

T
527

90897

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA DIFERENCIACIÓN DE
LAS ESPECIES DE *Cryptosporidium* spp. QUE AFECTAN AL
GANADO BOVINO EN LA REPÚBLICA MEXICANA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A :

SONIA VÁZQUEZ FLORES

COMITÉ TUTORAL:

Tutor: Dr. Jorge Alberto Saltijeral Oaxaca
Asesor: Dr. Rubén Danilo Méndez Medina
Asesor: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez

México D.F.

Agosto 31 de 2005

“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT, contando además con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93 ”

“El trabajo de tesis de Doctorado fue apoyado económicamente por los proyectos PAPIIT - IN218996 y CONACyT -1123PB del Departamento de Parasitología y CONACyT 400310-5-27669-B del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México”

**El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco
aprobó la tesis que presentó:**

Sonia Vázquez Flores

El día 31 de agosto del año 2005

Jurado:

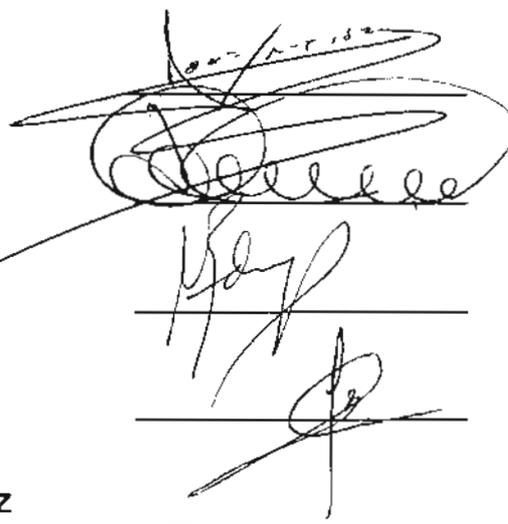
Tutor: Dr. Jorge Alberto Saltijeral Oaxaca

Asesor: Dr. Rubén Danilo Méndez Medina

Asesor: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez

Sinodal: Dr. Javier Olivares Orozco

Sinodal: Dr. Roberto Montes de Oca Jiménez



The image shows four handwritten signatures on horizontal lines. The top signature is the most complex, with a large circular flourish and the name 'Rubén Danilo Méndez Medina' written above it. The second signature is 'Antonio Verdugo Rodríguez'. The third signature is 'Javier Olivares Orozco'. The fourth signature is 'Roberto Montes de Oca Jiménez'. A thin line connects the text 'Asesor: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez' to the second signature.

DEDICADO A LA MEMORIA DE:

Una gran mujer, mi Abuelita Lolita, gracias por tu inagotable fe en mí.

Beatricita, por siempre tener un plato caliente de comida que me alimentaba el corazón.

AGRADECIMIENTOS

A Rodrigo y Gonzalo

Por las horas de espera, la paciencia y recordarme qué es lo importante.

A Oscar

Porque regresaste a mi vida para brindarme tú amor en la culminación de este capítulo.

A mamá

Por creer en mí y respaldarme siempre.

A mis asesores y sinodales

Por aventurarse conmigo, entrenarme y apoyarme en los momentos importantes.

A Wendy y Emiliano

Gracias por su apoyo en laboratorio y por su generosa amistad.

A Rigoberto

Por las largas horas de laboratorio y por situarme en el planeta Tierra. Gracias amigo.



Un agradecimiento especial por su ayuda desinteresada en el laboratorio e interpretación de resultados genéticos, inmunológicos y morfológicos a las siguientes personas: Dr. Alexandre Da Silva, Dr. Norman Pienazek, Dr. Iaci Moura, Dr. Michael Arrowood y Henry Bishop. Del Departamento de Diagnóstico Parasitológico de la División de Enfermedades Parasitarias de los Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia.

RESUMEN

La cryptosporidiosis se presenta clínica y subclínicamente en bovinos de todas las edades. Las manifestaciones clínicas se observan con mayor frecuencia en becerros neonatos, la más común es diarrea profusa acompañada de deshidratación, pérdida de peso y fiebre moderada. Se han reportado infecciones por diferentes especies de *Cryptosporidium* spp., la única especie que se ha demostrado produce enfermedad es *C. parvum* y se localiza en el intestino delgado. *Cryptosporidium andersoni* (antes *C. muris*) se encuentra principalmente en el estómago de bovinos adultos y *C. felis* que se presenta en intestino delgado. En México existe el antecedente de la presencia de cryptosporidiosis bovina desde el año 1983 y el tamaño de oocistos reportado corresponde a *C. parvum*. En general, la cryptosporidiosis bovina presenta en los análisis morfológicos dos tamaños de oocistos que coinciden con las dimensiones de *C. parvum* (4.8 a 5.6 μm) y *C. andersoni* (6.0 a 8.1 μm).

Se realizó un estudio transversal en ocho estados de la República Mexicana, en cuatro de las zonas ecológicas más importantes que comprenden cuatro climas diferentes: tropical subhúmedo con lluvias en el verano (Aw), muy seco semicálido (Bs), semiseco templado (Bsk) y templado subhúmedo con lluvias en el verano (Cwa).

Se muestrearon 612 animales, 421 fueron becerros neonatos y 191 vacas y vaquillas a primer parto. Todas las muestras se analizaron para detectar oocistos de *Cryptosporidium* spp. por medio de la tinción ácido-resistente modificada de Ziehl-Neelsen, anticuerpos monoclonales fluorescentes contra la pared del oocisto de *Cryptosporidium*, detección por medio de ELISA con coproantígenos y amplificación y secuenciación de los genes 18S ARNr y de la proteína de la pared del oocisto (COWP).

La prevalencia global fue de 47.6%, los becerros presentaron un 52.3% (intervalo de 22 a 72%) de prevalencia y las vacas y vaquillas un 37.2% (intervalo

de 32 a 100%). La prevalencia por clima fue más elevada en el clima semiseco templado (Bsk) con 61.7%.

Con el análisis morfológico se determinaron dos tipos de oocistos consistentes con las dimensiones de *C. parvum* y *C. andersoni*. La signología diarreica se presentó en 146 casos de becerros, donde el 73.9% de los oocistos fueron parecidos a *C. parvum*, con una probabilidad estadística que relaciona la presencia de diarrea y el tamaño del oocisto predominante altamente significativa ($p < 0.0001$) y un 19.9% fueron parecidos a *C. andersoni* y un 6.2% con ausencia de oocistos.

El análisis genético indicó que con excepción de un aislado, todas las muestras positivas fueron *Cryptosporidium parvum*, sin importar el tamaño del oocisto. Los aislados de la Cd. De México y del estado de Veracruz presentaron similitudes del 98 y 97% respectivamente con *C. parvum*, falta definir si son variantes, genotipos o inclusive una nuevas especies, sin embargo se requiere más investigación para poder determinar esto. Actualmente las herramientas moleculares a nuestro alcance impiden llegar a estas conclusiones sin incurrir en un gran margen de error.

ABSTRACT

Cryptosporidiosis is a disease that can occur clinical and subclinical in bovine of all ages. Clinical manifestations are often observed in neonate calves, being the most common a persistent diarrhea with dehydration, weight loss and mild fever. There have been report of infections of several species of *Cryptosporidium* spp. and the only to cause disease is *C. parvum* which is located in the small intestine. *C. andersoni* (formerly *C. muris*) it is mainly located in the stomach of adult bovine and *C. felis* is found in the small intestine. Bovine cryptosporidiosis has been reported in México since 1983 and most likely due to the size of the oocysts is *C. parvum*. The dimensions reported for the two bovine species are *C. parvum* (4.8 to 5.6 μm) and *C. andersoni* (6.0 to 8.1 μm).

A cross sectional study took place in eight status of México in four of the main ecological areas representing 4 different climates: tropical savannah (Aw), humid tropical (Bs), mid-latitude steppe (Bsk) and dry semiarid tropical (Cwa).

A total of 612 animals were sampled, 421 neonate calves and 191 cows and first calf heifers. All samples were analyzed to detect *Cryptosporidium* spp oocysts with the acid-fast modified Ziehl-Neelsen technique, fluorescent monoclonal antibodies against the oocyst wall of *Cryptosporidium*, fecal antigen detection by ELISA and amplification and sequencing of the 18S RNAr and oocyst wall protein (COWP) genes.

Overall prevalence was 47.6%, stratified analysis showed in neonate calves a prevalence of 52.3% (range of 32-72%) and cows and first calf heifers (32- 100%). Prevalence was higher in the mid-latitude steppe (Bsk) with 61.7%.

Morphological analysis showed two types of oocysts consistent with *C. parvum* and *C. andersoni* dimensions. Diarrhea was present in 146 cases in neonate calves, where 73.9% of the feces showed oocysts similar to *C. parvum* with a highly significant statistical difference ($p < 0.00001$) relating diarrhea with a predominant oocyst size, 19.9% of the cases showed oocysts similar to *C. andersoni* and 6.2% with absence of oocysts.

With the exception of two isolates, genetic analysis indicated that all positive samples to the morphological analysis were *Cryptosporidium parvum*, regardless of the oocyst dimension. Mexico City's and Veracruz isolates showed respectively 98 and 97% similarities with *C. parvum*, it has yet to be defined whether these are variants, genotypes or even new species, so more research is required. Currently the genetic tools available are unable to reach such conclusions without a large margin of error.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Historia	2
1.2	Taxonomía	3
1.3	Morfología	6
1.4	Ciclo biológico	11
1.4.1	Merogonia o Esquizogonia	11
1.4.2	Gametogonia	12
1.4.3	Esporogonia	12
1.5	Patogenia	13
1.6	Epidemiología	14
1.6.1	Prevalencia	15
1.6.2	Transmisión	16
1.6.3	Factores de riesgo	18
1.7	Tratamiento y Prevención	20
2.0	Antecedentes diagnósticos	21
2.0.1	Diagnóstico morfológico	23
2.0.2	Diagnósticos inmunológicos	24
2.0.3	Diagnóstico genético	25
2.0.3.1	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	25
2.0.3.2	Secuenciación	26
2.1	Diferenciación de <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Cryptosporidium andersoni</i> y <i>Cryptosporidium felis</i> en bovino	27

2.2	Antecedentes históricos de la presencia de <i>Cryptosporidium</i> spp. en becerros en México.....	28
3.0	Presentación del problema.....	30
4.0	JUSTIFICACIÓN	31
5.0	HIPÓTESIS	32
5.1	OBJETIVO PRINCIPAL	32
5.2	OBJETIVOS SECUNDARIOS	32
6.0	MATERIAL Y MÉTODOS	33
6.1	Estrategia general	33
6.2	Localización del estudio	35
6.3	Animales	36
6.4	Toma de muestra	37
6.5	Diagnóstico de muestras coprológicas	37
6.5.1	Diagnóstico morfológico con coloración ácido-resistente modificada ..	37
6.5.2	Aislamiento y conservación de muestras positivas	38
6.5.3	Concentración y cuantificación de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. Método de Sheather's modificado.....	39
6.6	Preparación de los oocistos para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	40
6.7	Extracción de ADN de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	41
6.7.1	Amplificación de ADN Genómico de <i>Cryptosporidium</i> spp. por PCR y PCR anidado	41
6.7.2	Mezcla para amplificación para PCR y PCR anidado.....	42
6.7.3	Programa de amplificación de ADN.....	43
6.7.4	Digestión con enzimas de restricción.....	43

6.7.5	Extracción de ADN de <i>Cryptosporidium</i> spp. a partir de heces (protocolo modificado para la extracción de ADN por FastDNA Kit)	44
6.7.6	Purificación de ADN por el Sistema QIAquick spin	45
6.7.7	Amplificación de ADN genómico de <i>Cryptosporidium</i> spp. con oligonucleótidos del gene 18S ARNr	45
6.7.8	Dilución de oligonucleótidos.....	46
6.7.9	Mezcla para amplificación por PCR de las secuencia del gene 18S ARNr	46
6.8	Identificación de inhibidores en la amplificación de ADN de <i>Cryptosporidium</i> spp. por PCR. Sistema de reconocimiento de inhibidores de PCR (SRI)	47
6.9	Programa de amplificación de ADN con las secuencias del gene 18S ARNr	48
6.9.1	Amplificación de la pared celular interna del oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. (COWP).....	48
6.9.2	Mezcla para amplificación por PCR de COWP.....	49
6.9.3	Testigo positivo.....	50
6.9.4	Testigo negativo.....	50
6.9.5	Purificación de los productos de PCR	50
6.9.6	Reacción de secuenciación.....	51
6.9.7	Programa de secuenciación.....	51
6.9.8	Purificación de la solución del producto de PCR para secuenciación ...	52
6.9.9	Gel de secuenciación.....	53
6.9.9.1	Preparación de las muestras para colocar en el gel de agarosa	53
6.9.10	Resultados de la secuenciación.....	54
7.0	Detección inmunológica por medio de anticuerpos monoclonales y policlonales anti- <i>Cryptosporidium</i>	54
7.1	Diagnóstico del género <i>Cryptosporidium</i> spp. por medio de la detección por anticuerpos monoclonales fluorescentes (AIF).....	55

7.2	Detección de <i>Cryptosporidium</i> spp. por anticuerpos policlonales en coproantígenos. Método diagnóstico comercial de un inmunoensayo enzimático de captura (ELISA) en la muestra fecal	56
8.0	Análisis de las secuencias	57
8.1	Análisis estadístico.....	58
9.0	RESULTADOS	59
9.1	Distribución de las muestras fecales	59
9.2	Prevalencia de cryptosporidiosis.....	60
9.3	Signos clínicos.....	64
9.4	Análisis morfométrico.....	66
9.4.1	Cryptosporidiosis y la relación con la dimensión del oocisto.....	69
9.5	Cuantificación de oocistos a partir de muestras fecales.....	70
10.	Resultados de los análisis genéticos.....	72
10.1	Análisis de contingencia del gene 18S ARNr.....	72
10.2	Determinación del genotipo de <i>Cryptosporidium parvum</i> por medio de COWP.....	77
10.3	Determinación de <i>Cryptosporidium andersoni</i>	86
11.0	Análisis de los anticuerpos monoclonales fluorescentes para la detección de oocistos de <i>Cryptosporidium parvum</i>	87
11.1	Análisis de la prueba de detección de coproantígenos de <i>Cryptosporidium</i> en heces.....	89
12.0	DISCUSIÓN	91
13.0	CONCLUSIONES	102
14.0	LITERATURA CITADA	103
	APÉNDICE I Publicación	
17.0	Molecular epidemiology to assess morphometric differences in oocysts of <i>Cryptosporidium parvum</i> from bovine populations of México Sonia Vázquez-Flores, Jorge A. Saltijeral O., R. Danilo Méndez M., Antonio Verdugo-Rodríguez , Rigoberto Hernández-Castro, Norman J. Pieniazek ⁴ and Alexandre J. da Silva.	122

ÍNDICE DE IMÁGENES

Figura 1	Clasificación taxonómica de <i>Cryptosporidium</i> spp. y las especies reconocidas hasta el año 2004.....	5
Figura 2	Esquematación de los oocistos de <i>C. parvum</i> y <i>C. andersoni</i>	6
Figura 3	Esquematación de los cromosomas I – V de <i>Cryptosporidium</i> spp.	8
Figura 4	Esquematación de los cromosomas VI-VIII de <i>Cryptosporidium</i> spp.	9
Figura 5	Ciclo biológico de <i>Cryptosporidium parvum</i>	13
Figura 6	Estados de la República Mexicana donde se efectuó el muestreo de ganado bovino. I. Localización geográfica.....	34
Figura 7	Esquematación de los sitios de unión de los oligonucleótidos, del PCR (OligoAK 1- 4), PCR anclado (OligoAK 2- 3) y sitio de corte Mae I del gene 18S ARNr de <i>Cryptosporidium</i> spp. para la diferenciación de especies (Award el Kariem <i>et al.</i> , 1994)	42
Figura 8	Sitios de unión de los oligonucleótidos empleados para amplificar hasta 1280 pb del gene 18S ARNr de <i>Cryptosporidium</i> spp. (da Silva <i>et al.</i> , 2000)	46
Figura 9	Gel de agarosa al 2% en TBE con el producto de PCR de un fragmento del gene (CDIAGGEF- XIAO1R) de 664 de pb del 18S ARNr de <i>Cryptosporidium</i> spp. El marcador de pm es un Ladder de 100 pb. Este es un ejemplo de las muestras amplificadas, con los aislados: S8 y S10 (Coahuila); S11 (Zacatecas); V2a, V2b, V3, V20 (Veracruz); V14 (Edo. de México); V7 (ratón). Testigo positivo (clona de <i>C. parvum</i>); testigo negativo (agua). El primer carril con la solución del producto amplificado de la PCR y el segundo carril con la solución del producto amplificado de la PCR diluido 1/10 ...	80
Figura 10	Gel de agarosa al 2% en TBE donde se muestra el producto de la PCR del gene COWP en su terminal N (Cry 9- Cry 15) con 505 pb y terminal C (Cry 12- Cry 14) con 526 pb de <i>Cryptosporidium</i> spp.	81

El marcador de pm es un Ladder de 100 pb. Este es un ejemplo de las muestras amplificadas, con los aislados: V1, V2, V3, V4 (Veracruz); V5, V6, V7 (ratón); V8 (rata); V10 y V11 (Hidalgo); V12, V13 y V14 (Edo. de México); V15 (Cd. de México); V2a, V2b y V4a. Control positivo (clona de COWP); control negativo (agua). Estas secuencias son para determinar el genotipo de *C. parvum*, funcionaron en pocas muestras: ratón, Veracruz, Edo. de México e Hidalgo, en este caso

Figura 11

Gel de agarosa al 2% en TBE para demostrar el sistema de detección de inhibidores (Spike) utilizando una clona del gene de *Cryptosporidium* spp. Marcador Ladder 100 pb. Se utilizaron las muestras S1, S2, S3 (veracruz); S4 y S12 (Edo. de México); S5 y S6 (Hidalgo); S7 (Cd. de México); S8 y S10 (Coahuila); S11 (Zacatecas); Sp1 (clona diluída 1/2); Sp2 (clona diluída 1/10); testigo positivo (clona de 18S ARNr); testigo negativo (agua). Cuando amplifican las Sp1, Sp2 y el aislado no hay inhibición

82

Figura 12

Gel de agarosa al 2% en TBE para demostrar la solución del producto purificado de PCR por el sistema Stratagene de un fragmento de 644 pb del gene 18S ARNr (CDDIAGGEF-XIAO1R) de *Cryptosporidium* spp. Se utilizó el marcador molecular Ladder de 100 pb. Las muestras purificadas fueron S9 (Coahuila); V7 (ratón); V14 (Edo. de México); V15 (Cd. de México), cada aislado con una dilución del producto purificado de la PCR diluído 1/20. El producto diluido muestra ser suficiente para realizar la reacción de secuenciación

83

Figura 13

Gel de agarosa al 2% con TBE mostrando el producto de PCR del fragmento del gene 18S ARNr de *Cryptosporidium* spp. de 556 pb. El marcador de peso molecular es Ladder 100 pb. La muestra amplificada es Z8 (Durango). El testigo negativo (agua). El sistema de amplificación es el de Award el Kariem, *et al.*, 1994.....

84

Figura 14

Gel de agarosa al 2% en TBE mostrando el producto anidado de

85

	PCR de 256 pb del fragmento del gene 18S ARNr de <i>Cryptosporidium</i> spp. y el producto de la digestión de la enzima <i>Mae 1</i> con una sola banda que indica que es <i>Cryptosporidium parvum</i> . Marcadores Ladder <i>Hind</i> III (123 pb) y pBR322/ <i>Msp</i> I. Muestras Z8 y Z11 (Durango); testigo negativo (agua). El sistema de amplificación es el de Award el Kariem, <i>et al.</i> , 1994.....	
Figura 15	Oocistos de <i>Cryptosporidium parvum</i> genotipo bovino	88
Figura 16	Oocistos de <i>Cryptosporidium andersoni</i>	89
Figura 17	Resultados de la prueba de detección de coproantígenos contra <i>Cryptosporidium</i> spp. por medio de la prueba de ELISA, con una densidad óptica de 450 nm, muestra que el aislado de bovino fue detectado como positivo, así como el testigo positivo de origen humano	90

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Grafica 1	Distribución y porcentajes de las muestras obtenidas por Estados en la República Mexicana	59
Grafica 2	Distribución de las desviaciones estándar por clima en relación con la prevalencia de cryptosporidiosis en becerros, vacas y vaquillas ..	61
Grafica 3	Distribución morfométrica de los oocistos similares a <i>C. parvum</i> o <i>C. andersoni</i> estratificada por climas	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Estados de la República Mexicana donde se efectuó el muestreo de ganado bovino. II. Clima y Vegetación	35
Tabla 2	Estados de la República Mexicana donde se efectuó el muestreo de ganado bovino. III. Origen de las muestras de <i>Cryptosporidium</i> spp. y tipo de muestreo	36
Tabla 3	Descripción del origen, edad, signología y distribución de las muestras para el análisis morfométrico, inmunológico y genético.....	39

Tabla 4	Oligonucleótidos que amplifican fragmentos del gene de la subunidad 18S ARNr (584 y 1289 pb) de <i>C. parvum</i> y <i>C. andersoni</i>	41
Tabla 5	Oligonucleótidos que amplifican los fragmentos Terminal-N y Terminal-C de la pared del oocisto de <i>C. parvum</i> y <i>C. andersoni</i> (COWP)	49
Tabla 6	Prevalencia con desviación estándar, oportunidad relativa y frecuencia de casos de cryptosporidiosis de la población muestreada	60
Tabla 7	Prevalencia y desviación estándar, oportunidad relativa y frecuencia de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. estratificada por edades	63
Tabla 8	Prevalencia, frecuencia de casos y oportunidad relativa de cryptosporidiosis por clima en la población muestreada	64
Tabla 9	Diarrea por cryptosporidiosis en becerros neonatos en los establos muestreados	65
Tabla 10	Presentación de diarreas por cryptosporidiosis, prevalencia, frecuencia y oportunidad relativa estratificada por clima	66
Tabla 11	Distribución morfométrica de los oocistos sugerentes de <i>C. parvum</i> o <i>C. andersoni</i> estratificados por Estados de la República Mexicana	67
Tabla 12	Clasificación morfométrica de los oocistos similares a <i>C. parvum</i> y <i>C. andersoni</i> por clima con estratificación por edades	69
Tabla 13	Distribución y oportunidad relativa en casos de signología diarreica en becerros neonatos con relación a la morfometría	70
Tabla 14	Resultados selectos del método de concentración oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. por Sheather's por cada cada ml de sobrenadante y 100 g de heces en vacas y becerros	71
Tabla 15	Análisis de contingencia entre especies del género <i>Cryptosporidium</i> spp. del GenBank y secuencias del gene 18S ARNr aisladas de diferentes regiones del país	74

Tabla 16	Porcentaje de amplificación del gene 18S ARNr de <i>Cryptosporidium</i> spp. de los diferentes aislados de estudio	76
Tabla 17	Comparación de las secuencias amplificadas de los aislados del gene 18S ARNr <i>C. parvum</i> contra las secuencias BLAST NCBI	76
Tabla 18	Determinación del genotipo por medio del análisis de los fragmentos de COWP de <i>C. parvum</i> y <i>C. andersoni</i>	77
Tabla 19	Comparación de los fragmentos de las secuencias amplificadas de COWP de <i>C. parvum</i> y <i>C. andersoni</i> contra las secuencias NCBI BLAST	78
Tabla 20	Ejemplo de la comparación de las secuencias amplificadas del 18S ARNr de los aislados en estudio contra <i>C. parvum</i> genotipo B, <i>C. felis</i> y <i>C. muris</i> del GenBank	79
Tabla 21	Comparación morfométrica entre la tinción ácido-resistente y el método AIF* de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. de aislados selectos	87

1.0 INTRODUCCIÓN

Cryptosporidium es un protozoo que afecta a mamíferos, aves, reptiles y peces (Fayer y Ungar, 1986). *Cryptosporidium* pertenece al sub-reino *Protozoa*, phylum *Apicomplexa*, clase *Sporozoea*, subclase *Coccidia*, orden *Eucoccidiorida*, suborden *Eimeriorina* y familia *Cryptosporidiidae*. La cryptosporidiosis es una infección parasitaria gastrointestinal que en bovinos es producida por dos especies distintas: *Cryptosporidium parvum*, causante de la cryptosporidiosis intestinal y *Cryptosporidium andersoni* (antes conocido como *C. muris* genotipo A), que ocasiona la cryptosporidiosis gástrica (Lindsay, *et al.*, 2000).

En 1999 fue identificada una tercera especie en bovinos por el grupo de Bornay-Llinares, *Cryptosporidium felis* cuya morfología y localización es similar a *Cryptosporidium parvum* (Bornay-Llinares, *et al.*, 1999). *Cryptosporidium parvum* ha sido descrito como un agente causal de diarreas crónicas en humanos comprometidos inmunológicamente y diarreas agudas en humanos inmunocompetentes, así como en animales jóvenes e inmunodeprimidos (Corwin, 1992). El periodo infeccioso en *C. parvum* en bovinos se presenta frecuentemente a las 2 semanas de edad, con un periodo prepatente de 5 días y un periodo de producción de oocistos de 53 días (Heine, *et al.*, 1984; Faubert y Litvinsky, 2000).

Cryptosporidium andersoni como agente causal de enfermedad, requiere de un mayor estudio, hasta la fecha se desconocen los periodos prepatogénicos y patogénicos (Lindsay *et al.*, 2000). En bovinos infectados natural y experimentalmente se han detectado grandes cantidades de oocistos en sus excretas sin que haya una demostración de signos clínicos y el periodo infeccioso es más frecuente entre el primer y segundo mes de edad, con una presentación crónica (Iseki, *et al.*, 1989, Atwill, *et al.*, 1999).

Cryptosporidium felis es una especie que no ha sido estudiada lo suficiente en gatos, en bovinos se desconoce si causa enfermedad, sin embargo se ha encontrado en ganado adulto en Polonia (Pieniasek, 1999; Bornay-Llinares, *et al.*, 1999).

1.1 Historia

El género *Cryptosporidium* (esporoquistes ocultos) fue establecido por Edward Ernest Tyzzer en 1907, tras encontrar oocistos de *Cryptosporidium muris* en las glándulas pépticas de un ratón (*Mus musculus*), en 1910 describe la estructura del oocisto y el ciclo biológico endógeno en ratones infectados experimentalmente. En 1911, Léger establece la familia Cryptosporidiidae y al año siguiente, Tyzzer describe a un segundo miembro del género: *Cryptosporidium parvum* como un protozooario morfológicamente diferente de *Cryptosporidium muris*, establecido en el intestino delgado de ratones (Tyzzer, 1912).

El primer reporte de cryptosporidiosis producido por *C. parvum* en ganado bovino, fue realizado por Panciera *et al.*, en 1971, al detectar al parásito en cortes histológicos del yeyuno de una becerro de 8 meses de edad que padecía diarrea crónica. Sin embargo, el papel de *Cryptosporidium parvum* como principal agente enteropatógeno en diarreas clínicas en becerros neonatos, no fue establecido sino hasta 1980 por Tzipori.

La presencia de *C. muris* genotipo A (ahora *C. andersoni*) en bovinos se describe en 1981 durante un brote epidémico de cryptosporidiosis intestinal en bovinos neonatos (Upton, 1985). En el año 2000, el grupo de Kansas encabezado por Lindsay acuña la nueva especie *andersoni*, en honor de Bruce Anderson. Este protozooario presenta características morfológicas y de comportamiento idénticas al *C. muris* de ratón, pero la evidencia en cuanto a sus diferencias genéticas es muy pobre (Lindsay, *et al.*, 2000). *C. andersoni* causa

controversia y algunos grupos de investigadores deciden denominarlo *Cryptosporidium muris* genotipo A, (Morgan, 2000). Esta tesis utiliza el término *C. andersoni* en lugar de *Cryptosporidium muris* origen bovino para diferenciarlo del *Cryptosporidium muris* de origen murino.

Desde finales de 1997 se comenzaron a utilizar los genotipos para diferenciar *C. parvum* de diferentes orígenes. Se manejó el término de genotipo bovino y humano, esta clasificación surgió para rastrear epidemiológicamente la fuente de contaminación en el brote de Milwaukee, EUA (1997) lo que permitió evitar el crear nuevas especies de *Cryptosporidium* dado que las secuencias de *C. parvum* humano y bovino presentaban menos del 10% de variación entre ellos (Peng, *et al.*, 1997). Sin embargo, en 2002 se determina que *Cryptosporidium parvum* que proviene del *Homo sapiens* reciba el nombre *Cryptosporidium hominis* (Morgan-Ryan, *et al.*, 2002) dado que este genotipo es infectante sólo para el humano.

En 1976, *C. parvum* se asoció con un caso de gastroenteritis infantil, siendo hasta la década de los 80's que junto con el surgimiento de la epidemia del SIDA se le reconoce como un patógeno oportunista incorporándolo al grupo de parásitos emergentes. El humano es el único huésped que puede ser infectado en cualquier etapa de su vida, los individuos en mayor riesgo son aquellos con inmunodeficiencias, pero cualquier persona puede generar inmunidad parcial o total cuando ha estado previamente expuesta a *C. parvum* (Upton, 2003).

1.2 Taxonomía

La información a partir del ARN ribosomal, ha puesto de manifiesto las relaciones filogenéticas entre los grupos de protozoarios, lo que obliga a hacer una revisión taxonómica en la clasificación de éstos. El resultado del análisis filogenético, sugiere que *Cryptosporidium* spp. surgió más tempranamente que el

resto del *phylum* Apicomplexa. Ahora, puesto que *Cryptosporidium* spp. se localiza infectando dos órganos específicos (estómago e intestino) de los animales, esto sugiere el género emergió antes de los peces y reptiles (Xiao, *et al.*, 2004).

Tradicionalmente y de manera genérica se le ha incluido como parte de las coccidias, sin embargo, los estudios moleculares recientes colocan a *Cryptosporidium* en un grupo monofilético más cercano con el de las gregarinas que de las eimerias, por lo que se sugiere redefinir su localización filogenética, puesto que no pertenece a la subclase Coccidiasina (Carreño, *et al.*, 1999; Upton, 2003, Xiao, *et al.*, 2004). La clasificación que se reconoce hasta la fecha es la siguiente:

Phylum:	Apicomplexa (Levine, 1970)
Clase:	Conoidasida (Levine, 1988)
Subclase:	Coccidiasina (Leuckart, 1879)
Orden:	Eucoccidiorida (Leger and Duboszcq, 1910)
Suborden:	Eimeriorina (Leger, 1911)
Familia:	Cryptosporidiidae (Leger, 1911)
Género:	<i>Cryptosporidium</i> (Tyzzer, 1907) (sin. <i>Cryptocystidium</i> Paperna <i>et al.</i> , 1986) (Figura 1) ¹

La traducción de la secuencia genómica completa de *Cryptosporidium parvum* no codifica para el apicoplasto y mitocondrias. Con esta información se dificulta localizar al género *Cryptosporidium* como un integrante del Phylum Apicomplexa, por lo que su clasificación taxonómica no concuerda con el genoma descrito por Abrahamsen y su grupo en el año 2004 (Abrahamsen, *et al.*, 2004).

¹ <http://www.mujiweb.cz/www/iroger/crypto/phylum.htm>

Las especies que afectan a bovinos hasta la fecha y que son aceptadas genéticamente son las siguientes:

Cryptosporidium parvum por Tyzzer, 1907

Cryptosporidium andersoni por Lindsay et al., 2000

Cryptosporidium felis por Iseki, 1979.

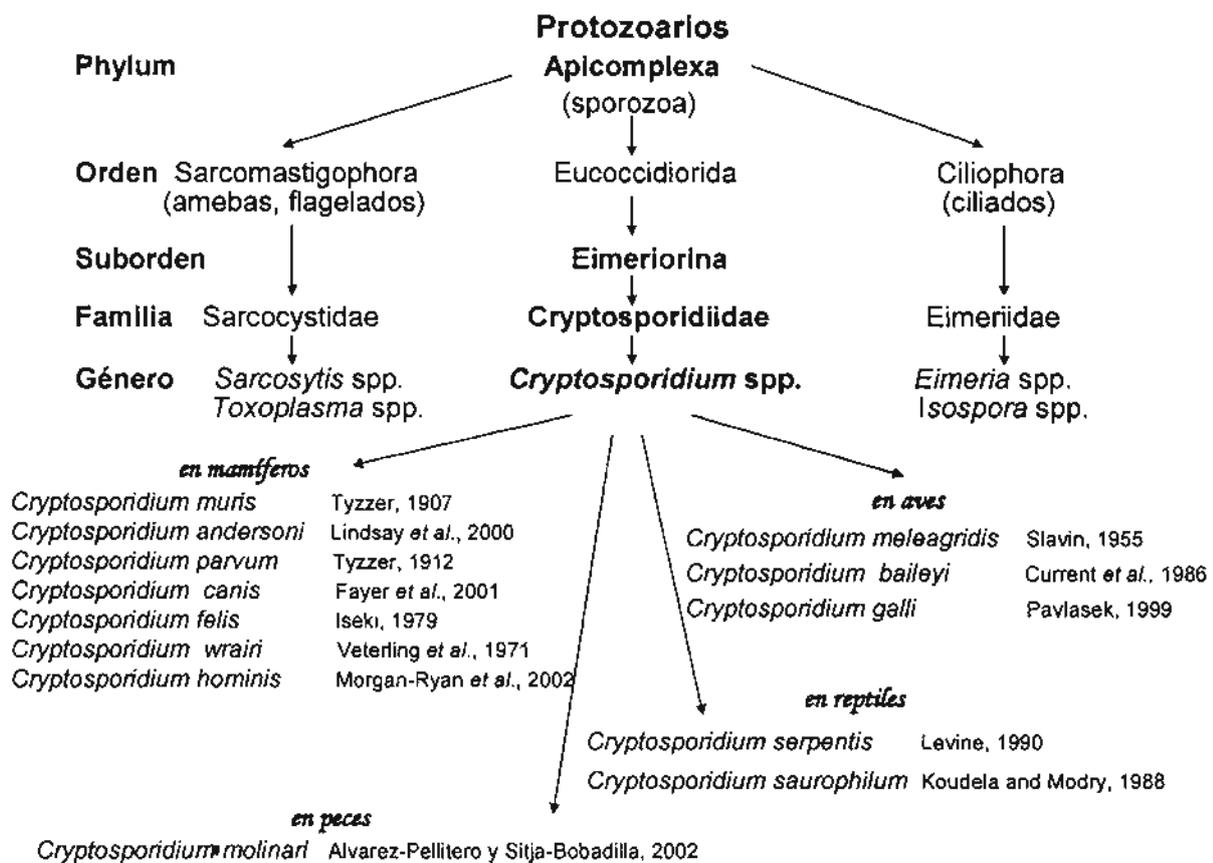


Figura 1. Clasificación taxonómica de *Cryptosporidium* spp. y las especies reconocidas hasta el año 2004

1.3 Morfología

Cryptosporidium parvum presenta oocistos con una longitud de 4.8 a 5.6 μm y de ancho 4.2 a 4.8 μm , se observan esféricos, translúcidos y refringentes al microscopio óptico. Los oocistos de *C. andersoni* son ovalados con una longitud de 6.0 a 8.1 μm y ancho de 5.0 a 6.5 μm . Los oocistos de *C. felis* se caracterizan por tener una longitud de 3.2 a 5.1 μm y ancho de 3.0 a 4.0 μm (Xiao, *et al.*, 2004).

El oocisto maduro de *Cryptosporidium* spp. está constituido por una doble pared celular, con una sutura en la parte superior por donde eclosionan los cuatro esporozoitos desnudos, los cuales tienen un tamaño aproximado de 1 μm , que al liberarse dejan al oocisto con el cuerpo residual que es una estructura esférica y opaca de 0.5 μm de diámetro (Xiao, *et al.*, 2004; Lindsay, *et al.*, 2000) (Figura 2).

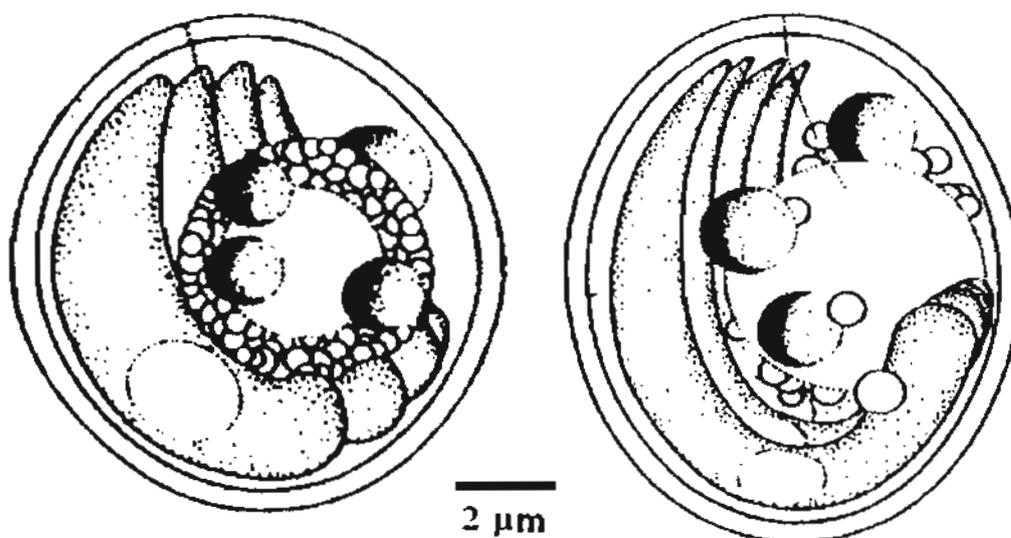


Figura 2. Esquematización de los oocistos de *C. parvum* y *C. andersoni* (Upton, S. J. y Current, W.L., 1985)

Un oocisto maduro contiene cuatro esporozoítos haploides, los cuales presentan de 2 a 3 anillos polares en la punta apical, una sola roptría, numerosos micronemas formados por gránulos de 15 nm aproximadamente ordenados en forma de cono, en los que se les identificaron 3 proteínas de 30, 120 y 200 kDa; presentan también cuerpos cristaloides de 45 a 60 nm de tamaño, cuerpos residuales (gránulos de amilopectina) y gránulos densos con proteínas de 120 a 180 kDa (Perkins, 1992; Petry y Harris, 1999; Harris y Petry, 1999; Spano y Crisanti, 2000). La secuencia total de ADN del oocisto es de 9.1 Mb (Abrahamsen, *et al.*, 2004). Cada esporozoíto tiene un núcleo haploide con 8 cromosomas (10.1-10.4 millones de pares de bases totales). Los cromosomas están numerados desde el más pequeño con el número I hasta el más grande VIII (Upton, 1999) (**Figuras 3 y 4**).

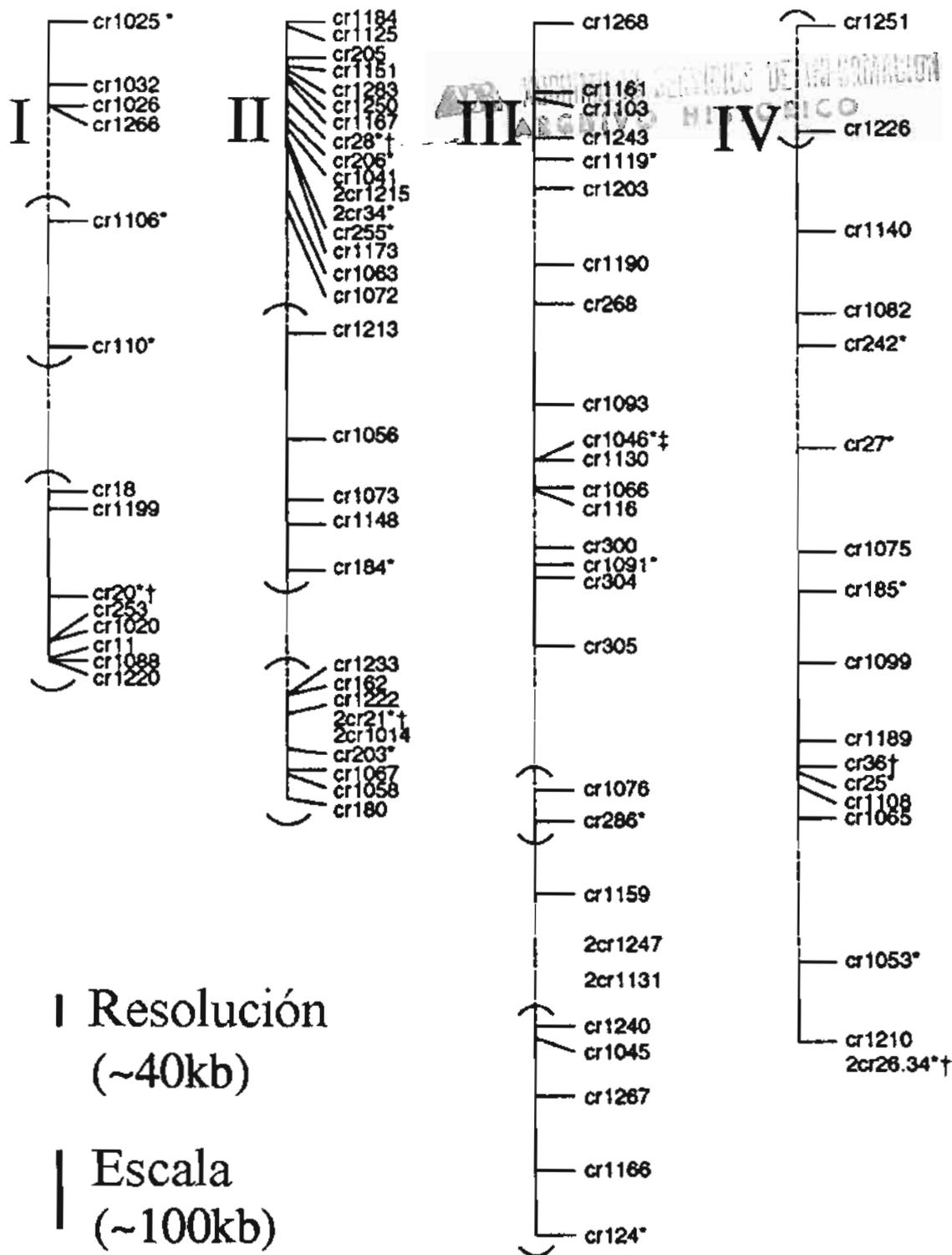


Figura 3. Esquematización de los cromosomas I – V de *Cryptosporidium* spp. (Piper, et al., 1998).

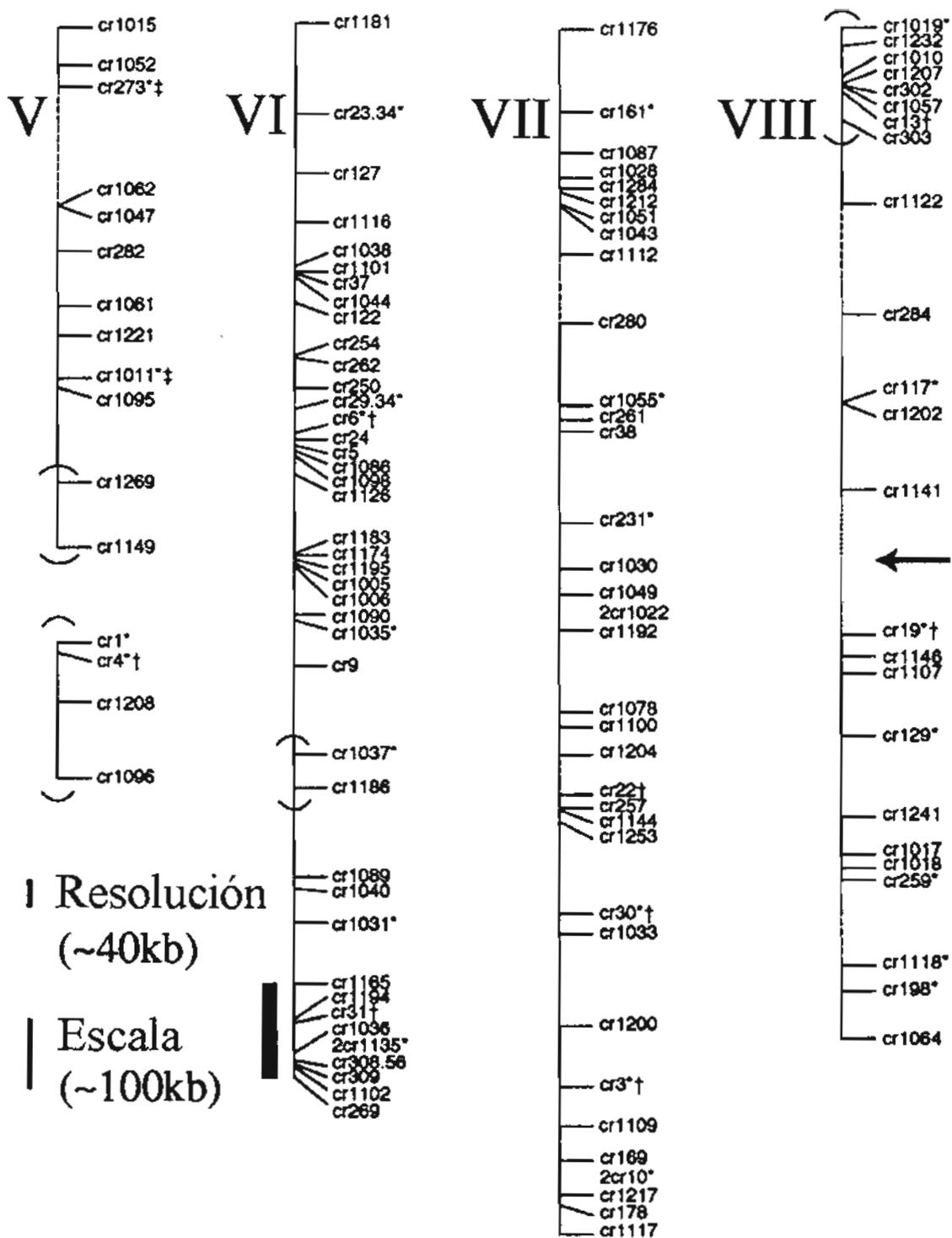


Figura 4. Esquematación de los cromosomas VI-VIII de *Cryptosporidium* spp. (Piper, et al., 1998).

La pared del oocisto es rica en uniones disulfuro, no presenta microporos, se le considera un protista pre-mitocondrial puesto que no presenta el genoma de las mitocondrias, sin embargo si presenta algunas proteínas chaperonas del aparato mitocondrial. No presenta apicoplasto, que en caso de otros Apicomplexa es un organismo sin el cual no pueden sobrevivir, y que es el producto de una endosimbiosis ancestral donde un alga verde unicelular se incorpora a la célula eucariótica y actúa como cloroplasto. Aparentemente esta ausencia del genoma del apicoplasto en el género *Cryptosporidium* indica que este emergió de una rama anterior a los Apicomplexa. Esto le confiere insensibilidad a los fármacos contra coccidias y está relacionado con la ausencia de intrones (Carey, *et al.*, 2004; Zhu, *et al.*, 2000; Abrahamsen, *et al.*, 2004; Spano y Crisanti, 2000). Los microgametos masculinos no son flagelados y no presenta enzimas para el ciclo de Krebs, sin embargo contiene 15 enzimas parecidas a las de plantas que sirven para los procesos de oxidación. La síntesis de ATP no está basada totalmente en la oxidación completa o cadenas respiratorias. Economiza ATP por el uso de pirofosfato dependiente de las fosfofructocinasas. *Cryptosporidium* metaboliza lactosa y otros azúcares convirtiéndolos en manitol que se almacena entre la vacuola parasitófora y el oocisto, por lo tanto no pasa rápidamente al lumen intestinal, por lo que se cree este mecanismo tiene importancia en la patogénesis de cryptosporidiosis (Petersen, 1993). Presenta glicerol de la deshidrogenasa 3-fosfato, similar a las plantas, hongos o el cinetoplasto de *Trypanosoma* spp. Aparentemente los ácidos grasos no son su fuente energética, aunque puede metabolizar lípidos complejos como fosfato de inositol o glicerolípido. La trihalosa sirve como una fuente de almacenaje energético con función antidesecante, antioxidante y estabilizadora de proteínas en los oocistos (Abrahamsen, *et al.*, 2004).

Los estadios de desarrollo endógeno del parásito varían de tamaño entre 0.2 a 6 μm y se localizan en el borde de las microvellosidades intestinales del huésped (Goebel y Braendler, 1982).

1.4 Ciclo biológico

El género *Cryptosporidium* presenta un ciclo monogénico, muy similar al de *Eimeria*, se inicia en el huésped con la ingestión vía oral de oocistos esporulados, los cuales constituyen la fase infectante. Bajo las condiciones adecuadas de acidez, presencia de sales biliares y proteinasas la sutura del oocisto se abre liberando a los esporozoítos desnudos, los cuales invaden el lumen del intestino delgado con afinidad por los enterocitos del íleon y en especial por las placas de Peyer, en el caso de *C. parvum*.

Este proceso es desconocido en *C. andersoni* aunque se localiza en las glándulas pépticas (Dubey, *et al*, 1990; Fayer y Ungar, 1986; Landsverk, 1987; Anderson, 1987).

1.4.1 Merogonia o Esquizogonia

Los esporozoítos se sitúan intracelularmente protegidos por dos capas delgadas, la externa que se origina del citoplasma de la célula huésped y la interna formada por el protozooario, ambas se unen en su base por un organelo tipo desmosoma, conformando en su conjunto la vacuola parasitófora. Aquí da principio la fase de multiplicación asexual, donde los esporozoítos se transforman en trofozoítos con un núcleo prominente que al dividirse en tres ocasiones dan lugar a 8 merozoítos dentro de un meronte, denominado Tipo I, el cual se rompe y los merozoítos liberados dan lugar a nuevos merontes. La reproducción asexual se puede dar de manera indefinida originando merontes tipo I que pueden multiplicarse continuamente o transformarse en merontes Tipo II, que contienen 4 merozoítos (**Figura 5**).

1.4.2 Gametogonia

Los merozoítos del meronte Tipo II se liberan e invaden nuevas células para llevar a cabo la reproducción sexual, formando tanto macrogametos (etapa femenina) como microgametos (etapa masculina), estos últimos se dividen por fisión múltiple dando origen a 16 microgametocitos por cada microgameto.

1.4.3 Esporogonia

Los microgametocitos maduran rompiendo los microgametos y penetran en los macrogametos fecundándolos. El macrogameto fecundado origina al cigoto, se forma una doble pared lipoprotéica alrededor de este, la cual confiere resistencia al oocisto inmaduro, en el que ocurre una meiosis que produce cuatro esporozoítos y un cuerpo residual cristalino. Existen dos tipos de oocistos maduros, unos con pared delgada (20%) y otros con pared gruesa (80%). Los primeros eclosionan rápidamente dentro del huésped (auto-infección endógena) y los segundos salen en las heces del huésped hacia el exterior. Cada generación de oocistos puede desarrollarse y madurar en un periodo de 12 a 14 horas. (Chermette y Boufassa-Ouzrout, 1988; Tzipori, 1983; Casemore, 1990).

La duración del ciclo varía desde un mínimo de 48 horas hasta 14 días (Malik and Maqbool, 1996). La dosis infectante (DI_{50}) en humanos inmunocompetentes se determinó en 132 oocistos, aunque se produjo infección en un voluntario sano por la ingestión de 30 oocistos (DuPont, 1995). En 1994, Haas y Rose realizaron un modelo matemático encontrando que un sólo oocisto es suficiente para producir infección. En el caso de becerros, dado que se eliminan grandes cantidades de oocistos por gramo de heces (1×10^8 en periodos de mayor susceptibilidad), se requiere una pequeña cantidad de oocistos en las heces para que se produzca una infección que ponga en riesgo la vida de un becerro susceptible (Angus, 1983).

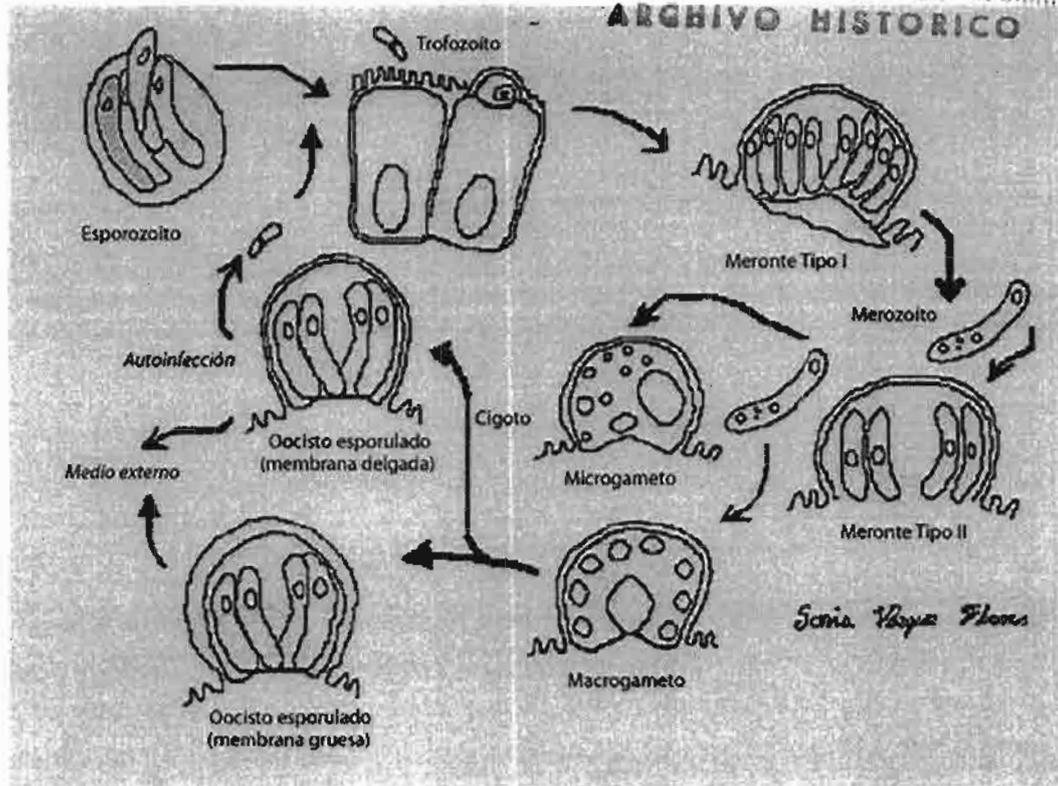


Figura 5. Ciclo biológico de *Cryptosporidium parvum*

1.5 Patogenia

Una vez ingeridos los oocistos, éstos eclosionan por estímulos físico-químicos liberando 4 esporozoitos que se adhieren a la porción apical de las vellosidades intestinales del yeyuno e ileon ayudados por el factor de adherencia (lectina) (Keusch, *et al.*, 1995). Aparentemente las células de la mucosa epitelial liberan citocinas, serotonina, histamina, adenosina, prostaglandinas, leucotrenos y factores activadores de plaquetas, los cuales actúan en las células entéricas e influyen en la actividad nerviosa del intestino, lo que altera el equilibrio osmótico produciendo el cuadro diarreico (Tzipori, 1983; Goodgame, 1996). La localización intracelular del parásito (invasión y multiplicación), la pérdida de la continuidad de la membrana de las vellosidades intestinales y la inflamación mediada por

linfocitos T producen atrofia de las vellosidades e hiperplasia de las criptas (Casey, 1988).

Estas células intestinales dañadas se reemplazan por células inmaduras funcionales con factores de eficiencia en la absorción de fluidos y nutrimentos disminuidos dando lugar al síndrome de malabsorción en cryptosporidiosis (Malik y Maqbool, 1996). La rapidez del ciclo biológico y su característica autoinfectante permite la colonización de grandes números de oocistos en el íleon, duodeno e intestino grueso (Pohlenz, *et al.*, 1978).

Los signos clínicos en becerros neonatos son: diarrea profusa amarillenta y mucosa, fiebre poco elevada, anorexia, pérdida de peso y desbalance electrolítico (Pohlenz, *et al.*, 1978). En general aquellos becerros infectados entre 5 y 15 días presentan diarrea moderada que es refractaria a tratamientos, después de unos cuantos días la infección se autolimita (Radostits, *et al.*, 1994)

1.6 Epidemiología

Cryptosporidium parvum ha sido reportado en los 5 continentes. En México ha sido diagnosticado en bovinos de la delegación Milpa Alta en la Ciudad de México, y diversos establos de los Estados de México, Querétaro, Guanajuato, Hidalgo, Veracruz, Coahuila, Zacatecas, Chihuahua, Jalisco y Nayarit (Vázquez-Flores, 2000; Maldonado, *et al.*, 1998, González, *et al.*, 1997). *Cryptosporidium andersoni* ha sido reportado en Estados Unidos, en el Reino Unido, Polonia, Japón y República Checa, (Anderson, 1987; Bukhari y Smith, 1996; Satoh, *et al.*, 2003; Kvac y Vitovec, 2003; Morgan *et al.*, 2000). *Cryptosporidium felis* ha sido reportado en EUA, Suiza y Polonia (Xiao, *et al.*, 2004). *Cryptosporidium andersoni*, se ha comprobado genéticamente en ganado bovino, camélidos y ovejas solamente (Xiao, *et al.*, 2004).

1.6.1 Prevalencia

En un estudio realizado en 1993 por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos que incluyó 28 estados, por lo que se determinó que el 90% de los establos productores de leche estaban infectados con una prevalencia promedio del 50% en becerros de 1 a 3 semanas de edad (USDA:APHIS:VS, 1993). En México se ha encontrado un intervalo entre 22% y 100% en edades similares dependiendo del sistema de crianza, donde del 93 al 95% los establos han sido positivos en un muestreo único (Vázquez-Flores, *et al.*, 1998; Vázquez-Flores, *et al.*, 2005; Maldonado, *et al.*, 1998). Dubey en 1990, recopiló las siguientes prevalencias en becerros neonatos: Hungría 27%, República Federal Alemana 40%, Canadá 26%, Italia 40%, Holanda 55%, Dinamarca 17%, Gran Bretaña 24%, Rusia 26% y Finlandia 76%. En el diagnóstico directo de heces en humanos las prevalencias van del 1% al 3% en Europa, EUA y Canadá y del 5 al 10% en Asia y África (Dubey, *et al.*, 1990).

Con referencia a *C. andersoni* en Estados Unidos se encontró en 24 de 30 ranchos (80%) de ganado destinado para carne y en 103 de 150 establos lecheros (69%) donde la prevalencia más elevada de esta especie fue del 13% de los bovinos en un establo lechero de California (Anderson, 1991). Hasta el momento, en la mayoría de los estudios de prevalencia del protozoario se han utilizado métodos diagnósticos morfométricos e inmunológicos que determinan con una alta especificidad el género *Cryptosporidium*, sin determinar la especie que afecta a los bovinos además, la sensibilidad de las pruebas diagnósticas varía considerablemente por lo que es difícil determinar la prevalencia real del parásito en poblaciones bovinas (Faubert y Litvinsky, 2000). En un estudio reciente, se encontró que existen dos picos de prevalencia en la presentación de cryptosporidiosis, el primero a las 2 semanas de vida del becerro y el segundo a los 6 meses de edad con una presencia del 30.4%, donde *C. andersoni* era el parásito predominante en las infecciones (Santín, *et al.*, 2004).

En EUA se reportó un estimado de pérdidas por 6.2 millones de dólares en becerros con cryptosporidiosis intestinal en el año 1984 (Alderink, 1985).

1.6.2 Transmisión

Cryptosporidium spp. se transmite por la ingestión de oocistos excretados en las heces de animales o humanos infectados por un hospedador susceptible. La transmisión tiene lugar de persona a persona, de animal a otro animal, de animal a humano y viceversa, por medio de agua, alimentos y aire contaminados (Goodgame, 1996, Fayer, *et al.*, 2000). Hay numerosos reportes de fuentes diversas contaminadas por oocistos de *C. parvum*, a través de las cuales la población humana ha sido infectada, como son: vegetales frescos, agua potable, albercas públicas y jugo de manzana entre otros (Guerrant, 1997, Monge y Chinchilla, 1995). Se atribuye la alta prevalencia de cryptosporidiosis dentro de los establos a que los becerros ingieren leche sin pasteurizar. La leche puede estar contaminada por mala higiene de la ubre, y se han reportado brotes epidémicos en humanos por el consumo de leche cruda (Harper *et al.*, 2002; Gellertie, *et al.*, 1997). El transporte mecánico juega un papel importante en la distribución de los oocistos de *Cryptosporidium* spp., el agua (lagos, lagunas, ríos) y la tierra superficiales, y la irrigación de cultivos con aguas negras han dispersado el parásito. Otros medios de transporte son las aves, existen reportes donde las gaviotas, patos canadienses y pekineses, las moscas (*Musca domestica*) y cucarachas (*Periplaneta americana*), pueden transportarlo a grandes distancias (Fayer, *et al.*, 2000).

En un estudio realizado por Guerrant en 1997 en Fortaleza, Brasil, para determinar la prevalencia del parásito en diversas poblaciones, se observó que el 10% de los animales presentaban *C. parvum* en las heces (incluyendo perros, cerdos, asnos y cabras), además el 22% del agua potable estaba contaminada (Guerrant, 1997).

Chalmers y colaboradores en 1997, encuentran en una comunidad agropecuaria del Reino Unido que los ratones silvestres presentan una prevalencia del 22 %, por lo que se considera que pueden ser un reservorio y potencialmente infectar al bovino y otras especies animales productivas dada su cohabitación, sin embargo, aunque se ha reportado un caso de infección en el humano por *C. muris*, no hay certeza que genéticamente sea este el agente infeccioso, tampoco se ha comprobado que los ratones participen en el ciclo de propagación de *C. parvum* hacia otros mamíferos (Chalmers, *et al.*, 1997; Scott, *et al.*, 1975; Katsumata, *et al.*, 2000).

En la literatura no se describe una vía de transmisión única, se implica al bovino como excretor de oocistos que llegan eventualmente a contaminar agua, alimentos o directamente al humano, hay numerosos reportes de la transmisión entre animal y hombre, aunque no se han identificado mamíferos intermediarios implicados en el ciclo (Chalmers, *et al.*, 1997).

Los brotes epidémicos reportados, presentan diferentes fuentes de contaminación y para identificar su origen se requiere conocer si *Cryptosporidium* spp., proviene de humanos o animales, por lo que la diferenciación de la especie del parásito se hace indispensable para entender los factores de riesgo y ejercer medidas de control adecuadas (Lengerich, *et al.*, 1993; Dupont, *et al.*, 1995; Peng, *et al.*, 1997; MacKenzie, *et al.*, 1994; Monge, *et al.*, 1995; Sulaiman, *et al.*, 1998; Morgan, *et al.*, 1998; Pieniazek, *et al.*, 1999).

En un estudio en el año 2000, utilizando métodos de concentración, tinción ácido-resistente e inmunofluorescencia directa, se determinó que las vacas en el periodo periparto eliminan grandes cantidades de oocistos de *Cryptosporidium* pudiendo ser éstas una fuente de contaminación para sus crías, además que se encontraron contaminados por oocistos el piso de la sala de parto, el agua y el pasto ornamental de la explotación lechera (Faubert y Litvinsky, 2000).

En el caso de *C. andersoni* se realizó un estudio prospectivo en un establo del Valle Central de California, EUA en 1994, haciendo el seguimiento de un grupo cohorte de vacas lecheras mayores de 2 años. Se monitoreó la presencia del protozooario en heces por un periodo de 6 años y la detección de *C. andersoni* fue continua, sin embargo desde el mes de agosto del año 2000, no se han detectado nuevos casos dado que la recría se realiza en otro establo desde el año 1996 y todos los animales del grupo de estudio han sido enviados a rastro (Holmberg, comunicación personal).

En un artículo del 2000, Lihua Xiao y colaboradores pretenden hacer una diferenciación entre los tiempos de infección de *C. parvum* y *C. andersoni*, donde el primero es en la etapa del nacimiento del bovino y fase neonatal y el segundo en la etapa de crecimiento hasta adulto, esta última información no ha sido corroborada por medio de infecciones experimentales hasta la fecha (Xiao, *et. al.*, 2000).

1.6.3 Factores de riesgo

Los oocistos de *Cryptosporidium* spp. pueden estar presentes en las heces de bovinos en todas las etapas de su vida, sin embargo, el periodo de mayor excreción es desde el nacimiento a la tercera semana de vida, particularmente si el becerro no ha ingerido calostro en cantidad suficiente (3 - 4 l) en las primeras 4 horas de vida. La calidad del calostro es también importante ya que se requieren de 30 a 50 mg/l de IgG₁ para proteger adecuadamente al becerro (Vázquez-Flores, 2000; Guterbock, 1995).

El pico de presentación de cryptosporidiosis se presenta a los 16 días de edad por lo que se requiere examinar las medidas de manejo y los factores de riesgo para extremar las medidas higiénicas en el ambiente de los becerros para disminuir el número de contagios.

Las áreas donde se puede dar la transmisión en becerros neonatos pueden ser en las salas de parto y crianza. Los acontecimientos alrededor del parto que incrementan la exposición de cryptosporidiosis están relacionados con la ingestión de los oocistos a través del canal de parto, dentro del corral de partos y que el becerro mame directamente de la vaca. En la sala de crianza: las becerreras continuas donde los becerros tienen contacto, el estar en ambientes cerrados, a través los utensilios de alimentación (mamilas, sondas esofágicas, cubetas, etc.), el personal que maneja a los becerros, o el cambio frecuente de cama (más de dos veces por semana) (Anderson, 1988, Faubert y Litvinsky, 2000, Sischo, *et al.*, 2000, Mohammed, *et al.*, 1999).

Entre las medidas que se han asociado a la disminución de cryptosporidiosis están, el ofrecer a los becerros calostro recientemente ordeñado, en botellas o bolsa esofágica limpia, el alimentar a los becerros de manera individual, con sustituto de leche y no leche fresca, el tener pisos de concreto, el uso de antibióticos y ionóforos como medida preventiva (Quigley, *et al.*, 1994, Mohammed, *et al.*, 1999).

En brotes epidémicos en Hidalgo, se encontró que el 90% de los becerros presentaron evacuaciones diarreicas, la mortalidad fue del 10% en animales calostrados y las condiciones de limpieza y cuidado de los becerros se podrían considerar de buena a excelente (Vázquez-Flores, *et al.*, 2005). La frecuencia tan elevada de cryptosporidiosis intestinal puede estar dada por la virulencia y patogenicidad del parásito pero hasta el momento no se han encontrado la evidencia genética para determinar cuáles son los factores involucrados con la morbilidad de *C. parvum* (Faubert y Litvinsky, 2000, Xiao, *et al.*, 2000²).

1.7 Tratamiento y prevención

Hasta el momento la mejor medida profiláctica es la higiene para prevenir el contagio, el becerro debe recibir calostro dentro de las primeras 4 horas de nacimiento y aislado en su corral o en una becarrera individual para evitar estar en contacto con la madre y ambiente contaminado (Garber, *et al.*, 1994; Faubert y Litvinsky, 2000).

Una vez manifiesta la cryptosporidiosis, el tratamiento es de mantenimiento, el becerro debe seguir su alimentación habitual tomando su leche en cantidad de 10% de su peso corporal y se le ofrecerán soluciones con electrolitos y sustancias protectoras de la mucosa. Las medidas higiénicas en los utensilios de alimentación y su entorno deben incrementarse para evitar contagios con los otros becerros y los humanos que conviven con ellos (Fayer, 1995).

Se han probado más de 200 medicamentos, incluyendo antibióticos y antiparasitarios, donde sólo dos han disminuido el número de oocistos excretados sin que eliminen la infección (Paromomicina y Nitaxozamida) (Upton, 1999). También se han desarrollado con muy poco éxito calostros con anticuerpos específicos anti-*Cryptosporidium parvum* en vacas hiperinmunizadas como auxiliar a becerros que no recibieron calostro (Harp, 1989).

El agua es una de las principales fuentes de transmisión en países como Australia, Estados Unidos y Reino Unido por lo que se hace constante énfasis en la detección de *Cryptosporidium* spp., en las fuentes acuíferas para determinar los métodos de purificación y filtración dependiendo del uso del agua. El incrementar la temperatura a 65 ° C del agua para ingestión permite que los oocistos dejen de ser viables, de tal manera que hervir el agua o la pasteurización previene la transmisión.

El uso de un sistema de ozonificación destruye los oocistos de *Cryptosporidium* spp. permitiendo el consumo de frutas y verduras crudas (Juraneck, 1995).

En los establos las medidas higiénicas como: limpieza de becerreras; lavado de utensilios destinados para la alimentación con agua caliente; así como la administración correcta de calostro en las primeras horas de vida, contribuyen a prevenir la transmisión en becerros neonatos (Fayer, 1995).

2.0 Antecedentes diagnósticos

Para el diagnóstico parasitológico en laboratorio, la morfología constituye el “patrón de oro” para determinar el género y en muchos casos la especie de los parásitos. El microscopio óptico, en combinación con algunas técnicas de tinción o en frotis directo de heces o sangre, flotación o sedimentación, son los elementos esenciales para un diagnóstico certero.

Se requiere de personal entrenado en el microscopio y el uso de técnicas adecuadas para una correcta identificación, sin embargo, existen parásitos que son difíciles de teñir y detectar, ya sea porque son muy pequeños o porque morfológicamente son muy parecidos (Singh, 1997). El uso de las técnicas serológicas, permite saber si el animal ha estado infectado en algún momento de su vida, pero no indica la presencia de una parasitosis activa, tampoco puede diferenciar las diferentes especies, meramente el género del parásito involucrado. En el caso específico de *Cryptosporidium* spp., se han cometido errores históricos en relación a la identificación de las especies que producen cryptosporidiosis en los diferentes hospedadores.

Actualmente, es difícil concebir que este protozooario se pueda diagnosticar con precisión sin el uso de técnicas moleculares que identifican que especie de

Cryptosporidium está involucrada en un proceso de enfermedad. A continuación se describen los diversos métodos morfológicos, inmunológicos y genéticos para la identificación de *Cryptosporidium* y sus diferentes especies.

Las pruebas para el diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. van desde las simples y baratas como son las tinciones ácido-resistentes, hasta el diagnóstico por PCR y secuenciación. Los procedimientos diagnósticos están en relación al tipo de estudio que se esté realizando. Si se requiere un diagnóstico rápida, acerca de la presencia de *Cryptosporidium* spp., en muestras individuales o de un grupo de animales que cursan con un cuadro diarreico, lo más indicado es realizar una prueba de tamizaje, rápida y eficiente como son las tinciones. Estos procedimientos tienen la ventaja de ofrecer un diagnóstico oportuno y las tinciones se pueden almacenar de manera permanente para hacer revisiones históricas acerca de este caso. Otros métodos, menos económicos, pero de diagnóstico rápido son: el uso de coproantígenos o de marcado de oocistos por medio de anticuerpos monoclonales fluorescentes. La respuesta es rápida y específica para la presencia de oocistos de *Cryptosporidium*, spp. sin embargo no pueden determinar la especie involucrada, ni tampoco son sistemas de cuantificación o que determinan que tan severo es el cuadro de cryptosporidiosis.

El diagnóstico genético por medio de la amplificación de diversas de fragmentos específicos de *Cryptosporidium* spp., tiene la ventaja de que se determinan las especies involucradas en el proceso de cryptosporidiosis. Es un procedimiento costoso, por lo que no se recomienda en poblaciones muy amplias además requiere de personal calificado, y no permite determinar la severidad del cuadro de enfermedad (Vázquez-Flores, 1997).

2.0.1 Diagnóstico morfológico

Las técnicas descritas para la identificación morfológica en la literatura son diversas para la detección de oocistos de *Cryptosporidium* spp., la gran mayoría describen la morfología a partir de muestras fecales así como diagnóstico histológico post-mortem, y en algunos casos de pruebas *in vitro*.

El método más común es el diagnóstico por flotación y sedimentación, sin embargo, tiene el inconveniente que no se pueden identificar correctamente los oocistos de *Cryptosporidium* en la observación directa al microscopio óptico, pudiéndose confundir con levaduras o glóbulos de grasa. Este protozooario presenta la característica de ser un organismo ácido-resistente por lo que las tinciones modificadas de Ziehl-Neelsen o de Kinyoun son las más ampliamente utilizadas para la identificación de los oocistos y los esporozoitos a través del microscopio óptico (Pavlassek, J, 1982; García, *et al.*, 1983; Baxby, *et al.*, 1984). La tinción de auramina-rodamina también es útil pero tiene el inconveniente que requiere de un microscopio de fluorescencia (Arrowood, 1997).

La detección del protozooario por medio de cortes histológicos se realiza principalmente en el íleon, aunque se pueden tomar muestras del tracto digestivo: rúmen, retículo, región pilórica, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon espiral y colon recto. Los cortes deben ser fijados en una solución de formalina amortiguada, los cuales se incluyen en parafina y se cortan en secciones de 6 micras para ser teñidas con hematoxilina-eosina (Holmberg, comunicación personal). A la tinción, los oocistos maduros de *C. parvum* y *C. felis* se observan como una partícula ovoide (observación medial) o esférica (observación sagital) mientras que *C. andersoni* se presenta ovoide a la observación medial y sagital (Xiao, *et al.*, 2000). Los oocistos se observan basófilos y cercanos a la superficie de las células epiteliales (**Figuras 15 y16**).

Los métodos coprológicos usuales como flotación y sedimentación, por separado o en combinación, pueden ser utilizados en la concentración de los oocistos una vez que se ha diagnosticado una muestra positiva. Esta metodología no es recomendable para diagnóstico porque se pierden cerca del 85% de los oocistos en estos procesos (Webster, *et al*, 1994).

Sin embargo, con el sistema de concentración de los oocistos por medio de la técnica de Sheathers (gradiente 1.018) se han alcanzado hasta el 92% de la recuperación de los oocistos (Faubert y Litvinsky, 2000).

2.0.2 Diagnósticos Inmunológicos

Fueron implementados para identificar *Cryptosporidium* directamente de las muestras fecales, utilizando anticuerpos inmunofluorescentes (anticuerpos monoclonales y policlonales) para el diagnóstico y cuantificación de oocistos, con sensibilidad que va del 83 al 95% en casos diarreicos. El sistema mejor desarrollado detecta oocistos de *C. parvum* marcando la pared celular mediante anticuerpos monoclonales denominados OW50 y OW3 o la sutura del oocisto con el OW64 marcados con FITC (isotiocianato de fluoresceína) (Sterling y Arrowood, 1986; Anusz, *et al.*, 1990). Su costo aproximado es de \$30.00 MN por muestra si se generan los anticuerpos en el laboratorio diagnóstico (Morgan^b, *et al.*, 1998).

La prueba de ELISA permite la identificación de anticuerpos IgM, IgG, e IgA contra el género *Cryptosporidium* permitiendo un diagnóstico rápido a partir de las muestras fecales (coproantígenos), sin identificar las especies involucradas en el proceso de la cryptosporidiosis (Arrowood, 1997), se utiliza principalmente como prueba de tamizaje. Su costo aproximado es de \$8, 500 por cada placa de ELISA con 96 pozos a razón de \$ 88.00 MN por muestra, sin duplicarse e incluyendo testigos positivos, negativos y blancos.

Se han desarrollado pruebas serológicas para conocer el grado de exposición de diversos grupos poblacionales a *Cryptosporidium* detectando IgG e IgM principalmente, no funciona como prueba diagnóstica cuando la infección es activa (Lorenzo, *et al.*, 1995).

2.0.3 Diagnóstico genético

2.0.3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) consiste en amplificar un fragmento específico del ADN. El gene que se utiliza en protozoarios para los estudios filogenéticos es el 18S ARNr, este gene no codifica para ningún aminoácido o proteína, sin embargo siendo un gene conservado sirve para análisis filogenético. Se han utilizado también los genes del espaciador transcrito interno (ITS1 y ITS2) (Cai, *et al.*, 1992), el primero es que se emplea más ampliamente, desafortunadamente no parecen diferenciar las especies de *Cryptosporidium*, solo identifica el género. Las proteínas de la pared interna del oocisto (*Cryptosporidium* oocyst wall protein, COWP) se ha empleado ampliamente para determinar el genotipo de *C. parvum* (Spano, *et al.*, 1997), se utilizan los dos dominios mayores que contienen motivos de aminoácidos repetidos. Para determinar la viabilidad de los oocistos se ha utilizado la β - tubulina ARNm, como marcador (Widmer, *et al.*, 1999). También se han amplificado las proteínas de shock (HSP70), las proteínas trombosponinas relacionadas con el factor de adherencia (TRAP-C1 y TRAP-C2), la politreonina repetida (Poly-T), las enzimas como Acetil CoA y la reductasa dihidrofolada (DHFR), microsatélites (como auxiliar en la identificación del genotipo) (Gobet and Toze, 2001; Spano, *et al.*, 1998; Peng, *et al.*, 1997; Sulaiman, *et al.*, 1999; Cacció, *et al.*, 2000).

Se han realizado diversas combinaciones de los genes mencionados arriba con cortes enzimáticos y comparación de secuencias para identificar los diferentes genotipos o especies. En general el PCR es un método que permite diagnosticar

los oocistos de *Cryptosporidium* directamente de las heces, de tejidos fijados en parafina, de muestras concentradas y conservadas en soluciones amortiguadoras y a partir de aguas contaminadas.

El costo del diagnóstico por PCR se estima en \$257.00 MN por cada muestra y mediante el sistema de extracción del ADN directamente de heces se pueden correr 16 muestras por día, detectando cantidades menores a 60 ng del parásito (Morgan^b, *et al.*, 1998).

2.0.3.2 Secuenciación

Una vez amplificados los genes específicos 18S ARNr y COWP para determinar la presencia de *Cryptosporidium* spp. en las muestras. Realiza la determinación del orden de las bases púricas y pirimidicas marcados en los fragmentos amplificados de ADN. La secuencia debe hacerse de ambas direcciones del gene, de 3' a 5' y viceversa. Este proceso automatizado, de tipo colorimétrico, distingue una determinada longitud de onda a cada base que se excita por un haz de láser, y las traduce en colores: rojo, azul, negro y verde que corresponden a Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) y Citosina (C), respectivamente. Una vez obtenida la secuencia de cada fragmento del gene de *Cryptosporidium* spp., se ensamblan los genes y se procede a su análisis. Los resultados obtenidos se cotejan con secuencias reconocidas en el sistema BLAST del GenBank, de esa manera se comparan las secuencias obtenidas en la investigación entre sí y contra aquellas ya publicadas para saber el porcentaje de similitud entre ellas y determinar a qué especie y genotipo corresponden². El costo aproximado por la secuenciación de cada muestra es aproximadamente de \$78.00 MN (da Silva, comunicación personal).

² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

2.1 Diferenciación de *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium andersoni* y *Cryptosporidium felis* en bovino

Existen discrepancias reportadas en la literatura en cuanto a que *C. parvum* sea el mismo en las diferentes especies de mamíferos en las que se ha identificado, si bien se han establecido infecciones cruzadas entre humanos, bovinos, ratones y cerdos, hay evidencia que este protozooario presenta diferentes marcadores antigénicos de superficie que reflejan cambios adaptativos de un gene inestable, debido que se ha demostrado que el parásito tiene cambios en su fenotipo por la fuente de infección y por el huésped del que proviene (Sherwood, *et al.*, 1985; Moon y Bemrick, 1981; Award-El-Kariem, *et al.*, 1995; Nina, *et al.*, 1992; Ogunkolade, *et al.*, 1993).

El diagnóstico diferencial entre dos de las especies que afectan a los bovinos (*C. parvum* y *C. andersoni*) se ha basado principalmente en su morfometría, mediante frotis fecales teñidos con tinción ácido-resistente y observando al microscopio óptico (Anderson, 1991). Por otro lado, Webster, *et al.*, han demostrado que se requieren entre 1×10^4 y 5×10^5 oocistos por gramo de heces no concentradas para ser identificados por medio de la tinción ácido-resistente.

Con el desarrollo de la PCR, se han podido distinguir 13 diferentes especies de *Cryptosporidium* (*parvum*, *muris*, *felis*, *canis*, *wrairi*, *hominis*, *baileyi*, *meleagridis*, *galli*, *serpentis*, *saurophilum* y *molnan*) con una alta especificidad y una sensibilidad dependiente del número de oocistos a partir de heces (Figura 16) (Awad El-Kariem, *et al.*, 1994; Webster, *et al.*, 1996; Spano, *et al.* 1998; Bornay-Llinares, *et al.*, 1999; Xiao, *et al.*, 1999; Xiao, *et al.*, 2004).

Recientemente, se han logrado avances en la identificación genética de nuevas especies de *Cryptosporidium* spp., así como la caracterización de distintos genotipos de *Cryptosporidium parvum* según su origen (bovino, humano, felino,

canino, ratón y cerdo) (Morgan, *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 2000) y distintos genotipos de *C. muris* genotipo A (origen de bovino), ahora denominado *C. muris* genotipo B (origen de ratón) utilizando la pequeña subunidad del gene 18S ARNr. Por medio de la secuenciación de los nucleótidos marcados de genes, como son los de la pared celular interna del oocisto de *Cryptosporidium* (COWP) se ha hecho la diferenciación entre genotipo humano (G1) y genotipo bovino (G2) de *C. parvum* (Spano *et al.*, 1997). El uso de la pequeña subunidad 18S ARNr, del ITS1 y el gene COWP, permiten la diferenciación entre especies de *Cryptosporidium* que junto con la secuenciación y comparación de las secuencias con aquellas del GenBank, por el momento es la única manera de identificar correctamente los casos de cryptosporidiosis clínica o subclínica y saber que especies y genotipos están involucrados (Morgan, *et al.*, 1998; Pieniazek, *et al.*, 1999; Xiao, *et al.*, 2004).

2.2 Antecedentes históricos de la presencia de *Cryptosporidium* spp. en becerros en México

La producción de leche en el país es 9, 869.3 millones de l, de los cuales se exportan 39.5 millones de l. Se importan 2, 467.0 millones de l como: leche líquida 57.7 millones de l; 157, 800 de ton de leche en polvo y 77, 570 ton de quesos y el resto en subproductos lácteos. Se importaron 7, 092 vacas lecheras desde Australia, Nueva Zelanda y EUA en año 2003. La aparición de algunos casos positivos a Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) en el continente americano, desde el año 2002 en Canadá y a finales de 2003 en EUA, impide la importación de ganado de estas zonas, limitándose esta a Nueva Zelanda y Australia, que es muy costoso. Las décadas de dependencia de vaquillas lecheras a primer parto, desde EUA y Canadá había deprimido la producción de becerras de reemplazo en México. Al no poder importar ganado en los números que se necesitan, puede estimular la cría en el país, lo que representa un beneficio a la ganadería nacional a largo plazo (Sagarpa, 2004¹). Entre las bondades estarían: el cambiar la idea de la dependencia por la de autosuficiencia, la genética en algunos

establos de este país se ha realizado de una manera escrupulosa, comparable con las mejores recrias del mundo, por lo que el ganado no bajaría de calidad; y la disminución de importación de animales portadores de agentes infecciosos. Sin embargo, el tener una recria de becerras, implica el tener sistemas de control de enfermedades para evitar el perpetuar las mismas en la población de reemplazo. Entre las principales enfermedades de los becerros están las gastroentéricas: rotavirus, coronavirus, salmonelosis, colibacilosis y cryptosporidiosis; y las del tracto respiratorio: pasteurellosis, salmonelosis, mycoplasmosis, mainhemiosis, etc. (Rebhun, 1995).

En México se ha identificado el género *Cryptosporidium* en becerros neonatos de la zona de Tizayuca, Hidalgo, que corresponden a las características morfológicas y de localización en el duodeno de *C. parvum* (González, et al., 1983). Martínez y de Aluja, en 1986, evalúan dos métodos de tinción en frotis fecales en becerros de Tizayuca, Hidalgo (Martínez y de Aluja, 1986). En 1997, Saltijeral et al., publicó la presencia de *Cryptosporidium* spp., en becerros neonatos en Lagos de Moreno, Jalisco, y en 1998, Maldonado-Camargo y colaboradores lo identifican en Tizayuca, Hidalgo, Jalisco y el Estado de México, asociándolo con los factores de riesgo. Todos los estudios presentados, fueron realizados en ganado Holstein-Freisian, en poblaciones de becerros neonatos. En 1998, se identificaron oocistos de *Cryptosporidium* spp. en ganado adulto con características morfométricas dentro de los intervalos descritos por Lindsay y que describen como *C. andersoni* (Vázquez-Flores, 1998; Vázquez-Flores, 1999). El diagnóstico se realizó por tinción ácido-resistente, oocistos marcados por anticuerpos monoclonales fluorescentes, coproantígenos y PCR de un fragmento de la secuencia del gene 18S ARNr (Vázquez-Flores, 1999). En los muestreos realizados en becerros neonatos con o sin diarrea, se han localizado dos estructuras morfológicamente diferentes de este protozooario en regiones geográficamente distintas del país. Siendo el diagnóstico morfológico un método cuya eficiencia depende del observador, se requiere de otras técnicas diagnósticas más específicas tanto genéticas como inmunológicas que pongan de

manifiesto a las especies de *Cryptosporidium* presentes en bovinos (Vázquez Flores, 1999).

3.0 Presentación del problema

En 1994, surgió una controversia ya que se relacionaba a los animales silvestres y en particular al ganado bovino de carne que pastoreaba cerca de fuentes de agua (lagunas y ríos) como posible fuente de contaminación (Anderson, 1981; Ongerth y Stibbs, 1987; Atwill, *et al.*, 1996).

El ganado bovino ha sido implicado como transmisor directo en la cryptosporidiosis humana, se han reportando infecciones en personas relacionadas con el manejo de ganado bovino y ovino en Finlandia, Israel, Estados Unidos, Canadá y España (Pohjola, *et al.*, 1986; Miron, *et al.*, 1991).

Si bien, *C. parvum* es el único que afecta a individuos inmunocompetentes, se ha demostrado que la mayoría de los casos de cryptosporidiosis humana es de origen *C. parvum* genotipo humano (ahora conocido como *C. hominis*) con cifras que van del 85 al 92% (Xiao, *et al.*, 2000; Morgan-Ryan, *et al.*, 2002).

Sin embargo, *C. parvum* genotipo bovino puede afectar en mayor número a individuos inmunocomprometidos, en un estudio realizado por Pieniazek *et al.*, en 1999 se demostró que de 77 casos el 30% era el parásito responsable de la cryptosporidiosis. *Cryptosporidium felis* se ha diagnosticado en 9 casos de individuos con SIDA asociado a la presencia de signología diarreica (Xiao, *et al.*, 2000).

Por lo tanto, para entender correctamente como se distribuye *Cryptosporidium* spp. en animales, humanos y medio ambiente se requieren métodos más específicos que por el momento se tienen con el uso de PCR y secuenciación.

4.0 JUSTIFICACIÓN

En la zona central de la República Mexicana se ha reportado el género *Cryptosporidium* spp. desde el año 1983 (González, *et al.*, 1983), con evidencia morfológica que sugiere la presencia de *C. parvum* en becerros neonatos. Sin embargo, en muestreos realizados en poblaciones bovinas de diferentes edades y etapas reproductivas, se han aislado dos tipos de oocistos de *Cryptosporidium* que presentan marcadas diferencias morfológicas sugiriendo la existencia de una segunda especie en el país (Vázquez-Flores, 1999).

La importancia de conocer con precisión las especies de *Cryptosporidium* spp. que afectan al ganado bovino en el país, es la de obtener la información epidemiológica acerca de la distribución y caracterización del agente causante de zoonosis en humanos y el riesgo potencial que este representa.

Para evidenciar las especies de *Cryptosporidium* spp. en ganado bovino, en el presente trabajo se utilizaron métodos diagnósticos morfológicos, con microscopio óptico y sistemas digitales; inmunológicos, mediante el uso de anticuerpos monoclonales marcados contra la pared y sutura de los oocistos de *Cryptosporidium* spp.; y genéticos, mediante la amplificación de la secuencia del gene 18S ARNr y la pared del oocisto COWP, con la técnica de PCR y secuenciación.

5.0 HIPÓTESIS

Las diferencias morfológicas en los oocistos de *Cryptosporidium* spp. en ganado bovino productor de leche en México pueden deberse a variantes genéticas.

5.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Diferenciar las especies de *Cryptosporidium* spp. en poblaciones bovinas lecheras de cuatro zonas ecológicas de la República Mexicana, mediante su caracterización morfológica, inmunológica y genética.

5.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1. Determinar si hay diferencias en la excreción de oocistos en ganado adulto y becerros neonatos en cuanto a características morfométricas y número de oocistos eliminados.
2. Determinar si la presentación de cryptosporidiosis en las diferentes regiones climáticas están relacionadas con las distintas especies de *Cryptosporidium* spp.
3. Correlacionar la morfometría de *Cryptosporidium* spp., con sus características genéticas y signología diarreica entre becerros y ganado adulto.

6.0 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Estrategia general

Consistió en el diagnóstico diferencial de oocistos de *Cryptosporidium* spp. en poblaciones de ganado bovino excretoras de oocistos de establos en diferentes condiciones climáticas (tropical subhúmedo, muy seco semicálido, semiseco templado, templado subhúmedo) de cuatro de las principales regiones ecológicas. Existen seis zonas ecológicas en el país, y para la tipificación de las especies de *Cryptosporidium* que afectan al ganado bovino se realizó el muestreo en 4 diferentes regiones climáticas de la República Mexicana (tropical subhúmedo, muy seco semicálido, semiseco templado y templado subhúmedo), las otras dos corresponden a los litorales y a la zona de manglares donde no hay poblaciones bovinas en explotación (Neyra y Durand, 1998). La población bovina se estudió con base en muestreos transversales y de brotes epidémicos en ganado de varias edades, para tener un amplio panorama de su distribución dentro de las explotaciones lecheras.

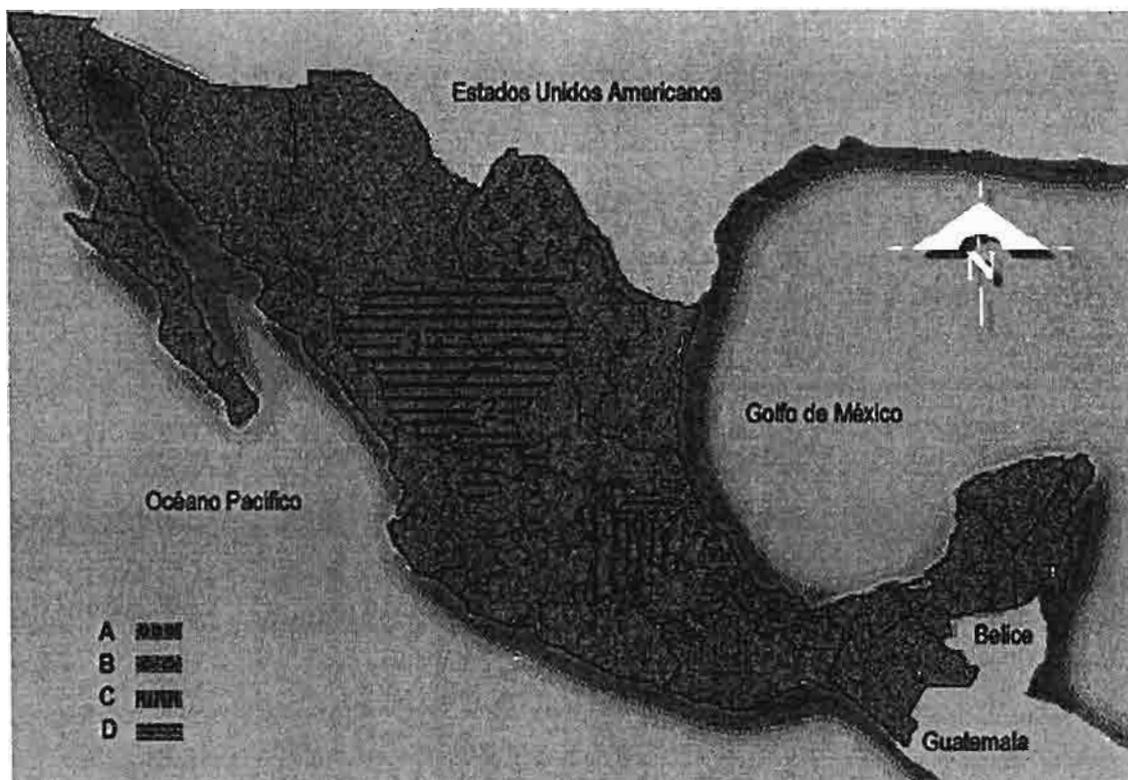
Los estados de la República Mexicana escogidos por su clima, ecología y tipo de producción lechera fueron: Veracruz, Coahuila, Zacatecas, Durango, Querétaro, Estado de México, Cd. de México e Hidalgo. La mayor parte de los muestreos transversales se realizaron en becerros neonatos y vacas mayores de 2 años de edad, también se hicieron muestreos y monitoreo de brotes de cryptosporidiosis en cada uno de los climas para una mejor comprensión de las características de auto-limitación de la enfermedad.

Para el diagnóstico se utilizaron varias técnicas cualitativas y cuantitativas, morfológicas e inmunológicas: microscopía óptica, por medio de tinciones y cuantificación de los oocistos por muestra, por identificación de anticuerpos monoclonales por inmunofluorescencia contra oocistos de *Cryptosporidium* spp. y por contraste de fases; purificación por la técnica de Sheater's y cuantificación en la cámara de Neubauer; y genéticas: reacción en cadena de la polimerasa (PCR),

enzimas de restricción y secuenciación utilizando la pequeña subunidad del gene 18S ARNr y la proteína de la pared del oocisto (COWP) para la identificación de las especies aisladas de *Cryptosporidium* spp. Una vez obtenidos los resultados de las secuencias estas se analizaron comparando unas con otras y contra las secuencias del GenBank para determinar la especie y genotipo correspondientes, así como el porcentaje de similitud.

Figura 6. Estados de la República Mexicana donde se efectuó el muestreo de ganado bovino.

I. Localización geográfica.



(A) tropical subhúmedo con lluvias en el verano (Aw); (B) muy seco semicálido (Bs); (C) semiseco templado (Bsk); y (D) templado subhúmedo con lluvias en el verano (Cwa)

6.2 Localización del estudio

Se obtuvieron muestras fecales de bovinos pertenecientes a establos lecheros de diferentes estados de la República Mexicana: Veracruz, Coahuila, Zacatecas, Durango, Querétaro, Estado de México, Cd. de México e Hidalgo. Los climas que se estudiaron fueron los siguientes: (A) tropical subhúmedo con lluvias en el verano (Aw); (B) muy seco semicálido (Bs); (C) semiseco templado (Bsk); y (D) templado subhúmedo con lluvias en el verano (Cwa) (Tabla 1).

**Tabla 1. Estados de la República Mexicana donde se efectuó el muestreo de ganado bovino.
II. Clima y Vegetación**

Clima ²	Estado de la República Mexicana	Temperatura promedio anual (°C) ¹	Precipitación pluvial media anual (mm) ¹	Vegetación ²
A. Tropical subhúmedo con lluvias en el verano (Aw)	Veracruz	24.6 (8.3-25.8)	1627.3 (275-2676)	Bosque tropical caducifolio, bosque tropical subperennifolio
B. Muy seco semicálido (Bs)	Coahuila	17.5 (8 -25)	407 (71.5-2834.8)	Matorral xerófilo, bosque espinoso
C. Semiseco templado (Bsk)	Zacatecas	15.4 (14.1-22.1)	485 (131-978)	Matorrales, sembradíos, pastizales, bosques
	Durango	20.9 (8.3-26.5)	272.5 (35-1594.8)	Bosques, matorrales, pastizales
	Querétaro	18.7 (13.2-25.1)	548 (169-1511.4)	Matorrales, bosques, pastizales
D. Templado subhúmedo con lluvias en el verano (Cwa)	Estado de México	19.6 (22-24)	889.5 (503-2217)	Sembradíos, bosques, pastizales
	Cd. de México	16.8 (10-18.2)	787.6 (383-1366)	Bosques, sembradíos
	Hidalgo	18.1 (11-19)	620.9 (181-3344.2)	Sembradíos, bosques, pastizales

¹ Köppen, W. 1948. ² Comisión Nacional del Agua, 2003.

El muestreo fue primordialmente transversal, y en algunos casos hubo la oportunidad de estudiar brotes epidémicos, sin embargo, para entender la distribución de *Cryptosporidium* spp. se hicieron muestreos en lugares donde

nunca se habían reportado brotes epidémicos de cryptosporidiosis con las características clínicas clásicas (Tabla 2).

6.3 Animales

La población en estudio consistió en ganado bovino: becerros de 3 a 60 días de edad y animales adultos en diferentes etapas de producción de establos lecheros cuya población fuera mayor a 100 animales. Se muestrearon 612 animales, 421 fueron becerros neonatos y 191 vacas y vaquillas a primer parto (Tabla 2).

Tabla 2. Estados de la República Mexicana donde se efectuó el muestreo de ganado bovino.

III. Origen de las muestras de *Cryptosporidium* spp. y tipo de muestreo

Origen de la muestra	Num. de Establos	Tipo de estudio	Animales muestreados	Num. de muestras
Veracruz	1	Transversal	Vacas y Becerros	47
Veracruz	1	Transversal	Vacas	9
Veracruz	1	Transversal	Vacas	80
Coahuila	2	Transversal	Becerros	80
Coahuila	2	Transversal	Becerros	12
Zacatecas	1	Transversal	Becerros	32
Durango	2	Brote epidémico	Becerros	77
Querétaro	1	Brote epidémico	Becerros	9
Querétaro	1	Transversal	Becerros	23
Edo. de México	1	Transversal	Becerros	14
Edo. de México	1	Transversal	Vacas	33
Cd. de México	1	Transversal	Vacas	15
Hidalgo	1	Transversal	Becerros	32
Hidalgo	1	Transversal	Vaquillas a primer parto	8
Hidalgo	1	Brote epidémico	Becerros	18

6.4 Toma de muestra



Las heces se obtuvieron directamente del recto y se guardaron en bolsas de plástico o guantes de palpación. Se tomaron los siguientes datos: número de identificación, fecha de nacimiento, fecha de toma de muestra y situación geográfica. Las muestras se guardaron en una caja herméticamente cerrada y con refrigerantes para su transportación, manteniéndose en refrigeración a 4° C sin conservadores hasta su procesamiento. Para el análisis genético las muestras positivas se congelaron sin conservadores en tubos de 1.5 ml a temperatura de -80 ° C hasta su proceso.

6.5 Diagnóstico de muestras coprológicas

El análisis morfológico y parte del análisis genético de las muestras se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM en los laboratorios de Inmunoparasitología del Departamento de Parasitología y Microbiología Molecular del Departamento de Microbiología e Inmunología, el análisis inmunológico y parte del genético se llevó a cabo en los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en Atlanta, GA, EUA, y en el Hospital Infantil en los Laboratorios de Diagnóstico Parasitológico, Diagnóstico Inmunológico de *Cryptosporidium parvum* y de Diagnóstico Molecular de *Cryptosporidium spp.* de la División de Enfermedades Parasitarias (DPDx) Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en Atlanta, GA, EUA.

6.5.1 Diagnóstico morfológico con coloración ácido-resistente modificada

En el laboratorio se procedió a la realización de frotis a partir de heces concentradas para teñirlos con la técnica de coloración ácido-resistente. Se

diluyeron 100 μl de heces en peróxido de hidrógeno comercial³ (11 volúmenes de oxígeno) en proporción 1:1 (heces:H₂O₂) para reblandecer la doble membrana del *Cryptosporidium spp.* Se tomó el sobrenadante con un peso aproximado por muestra de 0.4 g y un tamaño cercano a los 7 mm colocándose 6 muestras por laminilla. Las laminillas se dejaron secar por espacio de 24 h, realizándose posteriormente la tinción ácido-resistente. Las laminillas se sumergieron en el colorante de carbol fucsina durante 2 h, seguido de un lavado de agua corriente por 2 min. La laminilla se sumergió varias veces en una solución de alcohol-ácido (solución con 1% HCl y 70% alcohol etílico), enjuagándose después al chorro directo de agua por 5 min. El colorante de contraste (azul de metileno) se aplicó a la laminilla por 30 seg, lavándose el chorro de agua por espacio de 2 a 3 min. La preparación se secó a temperatura ambiente, posteriormente se colocó un cubreobjetos con resina sintética y se procedió a hacer el conteo de oocistos de *Cryptosporidium spp.* en el microscopio óptico a un aumento de 100 a 400 x , registrando los resultados en una bitácora con la identificación correspondiente a cada animal. Se observaron un total de 20 oocistos por laminilla, midiéndolos y clasificándolos en dos grupos como: oocistos chicos ($3.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$) y oocistos grandes ($5.9 \pm 1.5 \mu\text{m}$).

Para evitar sesgos en la medición se corroboró el tamaño de los oocistos en el Laboratorio de Diagnóstico Parasitológico de DPDx por medio de un sistema de cómputo para medición de estructuras.

6.5.2 Aislamiento y conservación de muestras positivas

Las muestras se consideraron positivas cuando presentaron al menos 2 oocistos por frotis. Todas las muestras positivas se dividieron en dos grupos en cantidad en 300 μl por vial de heces unas con dicromato de potasio al 5.0 %, en

³ Laboratorios Estrella, S.A. de C.V. Monte Carpio 81, México, D.F. 05400, México.

concentración 1:1 (heces:K₂Cr₂O₇) refrigerando a 4° C hasta ser utilizados y la segunda muestra en cantidad de 1.5 ml se mantuvo sin conservadores en congelación a - 80° C. El criterio para determinar un aislado fue el siguiente: las muestras con más de 10 oocistos por frotis se consideraron como un aislamiento individual, aquellas muestras que presentaban un número menor a 10 oocistos por frotis se reunieron considerándoles como un aislado por establo y por edad (Tabla 3).

Tabla 3. Descripción del origen, edad, signología y distribución de las muestras para el análisis morfológico, inmunológico y genético

Clima	Edad	Num. de muestras	Diarrea	Muestras individuales	Muestras múltiples
A	Beceros neonatos	26	13	18	8
	Vacas	110	0	33	77
B	Beceros neonatos	92	27	35	57
C	Beceros neonatos	141	37	52	89
D	Beceros neonatos	162	59	59	103
	Vaquillas a primer parto	8	8	8	0
	Vacas	73	9	15	58

6.5.3 Concentración y cuantificación de oocistos de *Cryptosporidium* spp. método de Sheather's modificado

Las muestras de heces conservadas en dicromato de potasio se lavaron 4 veces de tween 20 al 0.2% en agua destilada para eliminar el dicromato de potasio de las mismas. Posteriormente se tamizaron a través 3 mallas de 354 μ, 177 μ y 53 μ respectivamente, lavando con una cantidad total de 200 ml en Tween 20 al 0.2% en agua. El material filtrado se centrifugó varias veces durante 5 minutos a 1000 x g, retirando el sobrenadante e incorporando 20 ml en Tween 20 al 0.2% en agua hasta que el sobrenadante estuviera claro. Se suspendió el

sedimento en solución de Sheather's centrifugando por 15 min a 1000 x g. Se agregó el tween 20 al 0.2% en agua sobre la capa superficial, mezclando suavemente y obteniendo el sobrenadante. Se repitió el proceso de centrifugación de la solución de Sheather's para obtener la máxima cantidad de oocistos. El sobrenadante obtenido se centrifugó por 10 min a 1000 x g para obtener una pastilla, que lavó cuantas veces se requirió para eliminar el número mayor de bacterias posibles. Al cuantificar la pastilla se dividieron en varios tubos de 0.5 ml, en cantidad de 4×10^6 de oocistos de *Cryptosporidium* spp. por 100 μ l mantenidos en Tris-EDTA (TE 10:1).

Se cuantificó el número de oocistos en la cámara de Neubauer clasificándolos en los dos grupos el primero parecido a *C. parvum* (3.8 - 5.3 μ m), considerados como oocistos menores y *C. andersoni* (5.6 - 7.4 μ m) considerados como oocistos mayores.

Para extracción de ADN se requirieron concentraciones de 1×10^7 / ml de oocistos en solución (Awad El Kariem *et al.*, 1993). Los oocistos de los diferentes grupos no se separaron físicamente en la muestra por lo que se conservaron en alícuotas en una solución de PBS pH 7.2 a 4° C hasta la extracción de ADN.

6.6 Preparación de los oocistos para la extracción de ADN

La solución concentrada de oocistos se sometió a pre-incubación con una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% en proporción de 1:1 (peso:volumen) (concentrado de oocistos: NaOCl) a 4 ° C por 5 minutos (Dubey, 1995). Los parásitos se lavaron 3 veces en PBS 7.2 pH RPMI 1640 para remover los residuos de NaOCl. El tapón de sedimentación se resuspendió en 400 μ l de solución 10mM Tris-HCl - 1mM EDTA (TE 10:1) en tubos para microcentrifuga para su uso posterior.

6.7 Extracción de ADN de *Cryptosporidium* spp.

Para la extracción de ADN se utilizaron dos procedimientos: el primero consistió en la obtención del ADN por medio de un sistema modificado para *Mycobacterium tuberculosis* a partir de un concentrado de oocistos de *Cryptosporidium* spp. método adaptado dentro del laboratorio de Microbiología Molecular, de la FMVZ, UNAM, México, D.F. y en el segundo se obtuvo el ADN directamente de las heces positivas a *Cryptosporidium* spp. método desarrollado por el Departamento de Diagnóstico Parasitológico, CDC, Atlanta, EUA.

Los oocistos de *Cryptosporidium* spp. mantenidos en TE 10:1, se incubaron a 80° C por 20 min. Se agregó 25 µl de lisozima, mezclando e incubando a 37° C durante 1 h. Posterior a la incubación se agregó solución de duodecilsulfato de sodio al 10% (SDS 10%) y 5 µl de proteinasa K incubando por 20 min a 65° C. Se agregaron 52.9 µl de NaCl 5M y 42 µl la solución de bromidio cetiltrimetilamonio/NaCl (CTAB/NaCl) precalentado a 65° C, incubando la mezcla por 10 min a 65°C. Se realizó una extracción fenólica con 750 µl de Fenol/Cloroformo/Alcohol-Isoamílico (25:24:1) y el sobrenadante obtenido se obtuvo en un nuevo tubo de 1.5 µl agregándose etanol al 100% en cantidad de 180 µl. El producto se congeló 24 hrs. a -80°C, posteriormente se centrifugó a 12,000 x g por 30 minutos a 4° C. El sobrenadante se descartó, suspendiendo el sedimento en 15 µl de la solución amortiguadora de TE 10:1.

6.7.1 Amplificación de ADN genómico de *Cryptosporidium* spp. por PCR y PCR anidado

Para realizar la amplificación del ADN por medio de PCR se utilizaron 2 iniciadores de los extremos de una secuencia de 556 pares de bases, correspondiente a un gene de la subunidad 18S del ARN ribosomal. La secuencia utilizada está flanqueada por el OligoAK1: 5' a 3', AGT GCT TAA AGC

AGG CAA CTG y el OligoAK4: 5' a 3', CGT TAA CGG AAT TAA CCA GAC (Figura 7).

Con el producto del ADN amplificado por PCR se sometió a una segunda amplificación con dos cebadores internos de una secuencia de 256 pb para realizar un PCR anidado, la cual está flanqueada por el OligoAK2: 5' a 3', GGC CGT TCT TAG TTG GTG GAG y el OligoAK3: 5' A 3', CTC CAC CAA CTA AGA ACG GCC (Figura 7). Los productos obtenidos se observaron en un gel de agarosa al 2% (amortiguador TBE) teñido con 1.5 µl de bromuro de etidio y examinado con luz ultravioleta utilizando los marcadores Lambda *Hind* III (123 pb) y ADNpBR322/*Msp*1.

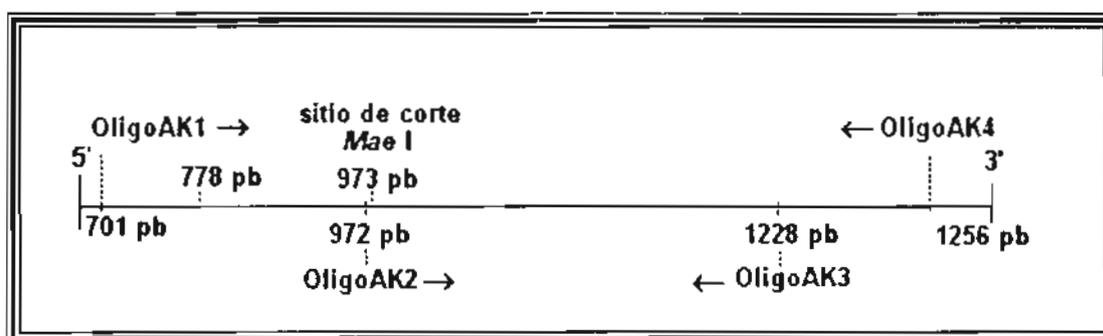


Figura 7. Esquemización de los sitios de unión de los oligonucleótidos, del PCR (OligoAK 1- 4), PCR anclado (OligoAK 2- 3) y sitio de corte *Mae* I del gene 18S ARNr de *Cryptosporidium* spp. para la diferenciación de especies (Award el Kariem *et al.*, 1994)

6.7.2 Mezcla para amplificación por PCR y PCR anidado

Se preparó un volumen total de 50 µl para la reacción: 5 µl de amortiguador 10x (Tris-HCl pH 8.3 20 mM, 1 mM ditionitrol, 0.1 mM EDTA, 0.1M KCl, 0.5% Nonidet P40, 0.5% Tween 20, 50% de glicerol pH 8.0), 0.25 µl de Taq DNA polymerase, Boehringer Mannheim (5 U), 2.5 µl de primer 1 (2µM), 2.5 µl de

primer 4 (2 μ M), 4 μ l de bases nucleotídicas (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) 200 μ M y 3 μ l de MgCl₂ (1.5 μ M) con 2 μ l de ADN (50 ng/ μ l) para la PCR y 2 μ l de producto de PCR (50 ng/ μ l) para PCR anidado.

6.7.3 Programa de amplificación de ADN

Se utilizó un termociclador Perkin Elmer 2400⁴ introduciendo el siguiente programa: 1er tiempo, desnaturalización a 94° C durante 5 min; 38 ciclos que consisten en: desnaturalización por 40 seg, alineamiento a 47° C por 1 min y extensión a 72° C por 3 min; terminando con un tiempo a 72° C por 10 min. La muestra se mantuvo a 4° C hasta realizar el PCR anidado, en la que se utilizan las mismas condiciones de amplificación o el gel de agarosa 2% (amortiguador TBE) (Awad El-Kariem *et al.*, 1994).

6.7.4 Digestión con enzimas de restricción

La solución del producto anclado de PCR se sometió a un proceso de purificación por medio del sistema comercial Concert Rapid Purification⁵ para eliminar residuos proteicos inespecíficos. Posteriormente el producto de PCR purificado se sometió a digestión con la enzima de restricción *Mae I*. Se utilizaron 2 μ l de la enzima *Mae I* con 10 μ l de buffer en 20 μ l de la solución del producto de PCR cbp 50 μ l con agua miliQ estéril. La incubación se realizó a 45 ° C por 2 h. Se agregó 1 μ l de EDTA 0.5 M pH 8.0 para detener la reacción. El corte en el sitio 273 se utiliza para identificar a *C. parvum* de otras especies de *Cryptosporidium* (Figura 7). Para determinar su sitio de corte se evidenció en un gel de agarosa al 2% (amortiguador TBE) con bromuro de etidio con los marcadores de peso molecular Ladder *Hind III* de 123 pb y ADNpBR322/*Msp1*, observándose con luz ultravioleta (Awad El-Kariem *et al.*, 1994).

⁴ Perkin Elmer 2400. Applied Biosystems Division, Drive Foster City, CA, 94404, EUA.

⁵ invitrogen Corporation, Life Technologies. 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, CA, 92008, EUA.

6.7.5 Extracción de ADN de *Cryptosporidium* spp. a partir de heces (protocolo modificado para la extracción de ADN por FastDNA Kit⁶)

Las muestras conservadas en dicromato de potasio al 5% se centrifugaron a 14,000 x g por 5 min se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml PBS/EDTA 0.5% (30 ml PBS con 60 µl de EDTA). Se mezclaron y centrifugaron a 14,000 x g por 5 min, repitiendo el procedimiento por lo menos 3 veces. Se agregaron las siguientes sustancias al tubo Matriz para lisis con microesferas (Multi Mix2): con un palito de madera aproximadamente 300 µl de heces y 400 µl de CLS-VF (solución de lisis para plantas), 200 µl de PPS (solución precipitante para proteínas) y 20 µl de PVP (polivinil-pirrolidona), se mezclaron y colocaron en el aparato Fast Prep FP 120 por 10 segundos a 5.5 de velocidad. Los tubos se centrifugaron a 14,000 g por 5 min. a 4° C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo (aproximadamente 600 µl). Se agregó la matriz de unión (tiosulfato de guanina) en cantidad de 600 µl y se mezcló suavemente invirtiendo los tubos 10 veces. Se incubó 5 min. a temperatura ambiente. Se centrifugó por 1 min a 14,000 g y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en Sews-M (etanol y sales) por pipeteo suave y se centrifugó por 1 min a 14,000 x g, eliminándose el sobrenadante. Se centrifugó un pulso para eliminar todo el sobrenadante y se agregaron 100 µl de agua ultrapura (DES) para eluir el ADN mezclándolo bien con el sedimento. Se incubó de 2 a 3 min y se centrifugó a 14,000 x g por 2 min transfiriéndose el sobrenadante (100 µl) a tubos limpios. Posteriormente se eliminaron los inhibidores de PCR del ADN de *Cryptosporidium* spp. por el sistema de purificación QIAquick PCR Purification Kit⁷.

⁶ Qiogene 15 Morgan, Irving, CA 92618, EUA

6.7.6 Purificación del ADN por el sistema QIAquick spin

A los 100 μ l de ADN obtenido directamente de heces se mezcló con 500 μ l de amortiguador PB (con sales caotrópicas) agregándose a la columna de purificación y se centrifugó a 14,000 x g por 1 min. Se desechó el sedimento y se agregó 750 μ l de amortiguador PE (con etanol) se centrifugó a 14,000 x g por 1 min, se eliminó el sedimento y se centrifugó nuevamente por 1 min a 14,000 x g. Se eluyó el ADN con Tris/HCl pH 8.5 en cantidad de 50 μ l y se centrifugó a 14,000 g por 1 min. Una vez purificado, el ADN estaba listo para ser amplificado por PCR.

6.7.7 Amplificación de ADN genómico de *Cryptosporidium spp.* con los oligonucleótidos del gene 18S ARNr

Para amplificar la mayor cantidad de pares de bases de la secuencia del gene 18S ARNr (1762 Kb) se utilizaron varios oligonucleótidos (Figura 8). Siguiendo el método de Xiao *et al.*, 1999, se amplificó un fragmento de 1325 pb utilizando un par de oligonucleótidos para amplificar desde la base más cercana al principio del gene (XIAO1F-XIAO2R) (Tabla 4), comenzando desde la base 180 hasta la 1000 y por último dos oligonucleótidos para amplificar desde la base 850 hasta la 1460 (CDIAGGEF-XIAO1R) conocido como fragmento diagnóstico (Tabla 4).

⁷ Qiagen 28159 Avenue Stanford, Valencia, CA, 91355, EUA.

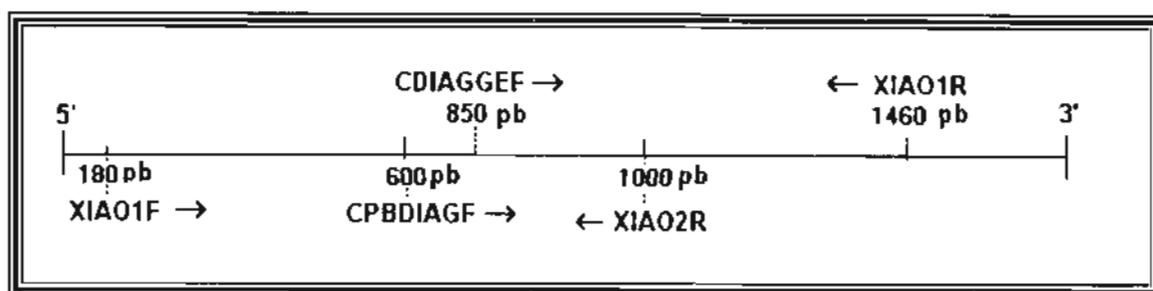


Figura 8. Sitios de unión de los oligonucleótidos empleados para amplificar hasta 1280 pb del gene 18S ARNr de *Cryptosporidium* spp. (da Silva *et al.*, 2000)

6.7.8 Dilución de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se diluyeron en H₂O ultrapurificada⁸ y libre de pirógenos para obtener una concentración de 10 picomoles/ml (Tabla 4).

6.7.9 Mezcla para amplificación por PCR con las secuencias del gene 18S ARNr

Se preparó un volumen total de 50 μ l por cada muestra en estudio del gene 18S ARNr por el método da Silva, *et al.*, 2000, que contenía por reacción: 5 μ l de amortiguador 10x (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.01% p/v gelatina), 0.25 μ l de Taq Gold (5 U/ μ l), 1.0 μ l de XIAO1F o CDIAGGEF, 1.0 μ l de XIAO2R o XIAO1R respectivamente, 4 μ l de bases nucleotídicas (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) 10 μ M y 0.25 μ l de MgCl₂ (25 U), 28.5 μ l de H₂O con 10 μ l de ADN (50 ng/ μ l).

⁸ Ampolleta comercial de agua, pura químicamente, libre de pirógenos y estéril.

6.8 Identificación de inhibidores en la amplificación de ADN de *Cryptosporidium* spp. por PCR. Sistema de reconocimiento de inhibidores de PCR (SRI)

Para detectar la presencia de inhibidores de la reacción de amplificación se utilizó como testigo positivo un producto clonado (485 pb) de la subunidad del 18S ARNr de *C. parvum* y *C. muris* (0.3 ng/ml). Se hizo un volumen total de 50 μ l que contenía por reacción: 5 μ l de amortiguador 10x (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.01% p/v gelatina), 0.25 μ l de Taq Gold (5 U/ μ l), 1.0 μ l de XIAO1F o CDIAGGEF, 1.0 μ l de XIAO2R o XIAO1R respectivamente, 4 μ l de bases nucleotídicas (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) 10 μ M y 0.25 μ l de MgCl₂ (25 U), 18.5 μ l de H₂O con 10 μ l de ADN diluido 1:10 (5 ng/ μ l) y 10 μ l de ADN clonado de *C. parvum* o *C. muris*.

Tabla 4. Oligonucleótidos que amplifican fragmentos del gene de la subunidad 18S ARNr (584 y 1289 pb) de *C. parvum* y *C. andersoni*

Nombre del oligonucleótido	Dilución para PCR	Secuencia del oligonucleótido (5' – 3')
XIAO1F	1: 28	TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG
CDIAGGEF	1:28	AGT TGG GGG CAT TTG TAT TTA AC
XIAO1R	1:23	CCC TAA TCC TTC GAA ACA GGA
XIAO2R	1:27	AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A
OligoAK 1	1: 28	AGT GCT TAA AGC AGG CAA CTG
OligoAK 2	1:25	CGT TAA CGG AAT TAA CCA GAC
Oligo AK 3	1:26	TAG AGA TTG GAG GTT GTT CCT
Oligo AK 4	1:26	CTC CAC CAA CTA AGA ACG GCC
AndersoniF	1:37	AAC TTT ACG GAT CGC ATC TCT GA
AndersoniR	1:38	CCC ATC ACG ATG CAT ACT CAT AA

6.9 Programa de amplificación de ADN con las secuencias del gene 18S ARNr

Para la amplificación de ADN, se utilizó un termociclador Perkin Elmer Gene Amp 9700⁹ introduciendo el siguiente programa: 1er tiempo, desnaturalización a 95° C durante 15 minutos; 45 ciclos que consisten en: desnaturalización a 94 ° C por 30 seg, alineamiento a 60° C por 30 seg y extensión a 72° C por 1.5 min; terminando con un tiempo a 72° C por 9 min.

La muestra se mantiene a 4 ° C hasta la purificación de la misma para el proceso de secuenciación.

6.9.1 Amplificación de la pared celular interna del oocisto de *Cryptosporidium* spp. (COWP)

Se utilizaron dos pares de oligonucleótidos de la secuencia COWP para determinar el genotipo de *Cryptosporidium parvum*. Estos oligonucleótidos provienen de una proteína clonada que se localiza en la capa interna de la pared del oocisto, presentando 1622 a.a. (4866 pb). Únicamente se amplifican los fragmentos finales de la pared del oocisto, que se conocen como terminal-N (560 pb) y terminal-C (540 pb) (Tabla 5).

Los genotipos de *C. parvum* se han descrito como de humano y de bovino, la similitud indica que estos dos genotipos se parecen en un 98%, presentando las diferencias para el genotipo humano en las bases 285, 125, 106 y 34, donde en el caso del genotipo animal, se mantiene un fragmento de 410 bp que fue sometidos a digestión con la enzima *Rsal*. En el caso de *C. andersoni*, se utilizaron oligonucleótidos para flanquear un pedazo de 448 bp de la pared del oocisto amplificando únicamente la terminal-N (Tabla 5).

Tabla 5. Oligonucleótidos que amplifican los fragmentos Terminal-N y Terminal-C del gene de la pared del oocisto de *C. parvum* y *C. andersoni* (COWP)

Nombre del oligonucleótido	Dilución para PCR	Secuencia del oligonucleótido (5' – 3')
Cry 15 Terminal-N	1:19	GTA GAT AAT GGA AGA GAT TGT G
Cry 9 Terminal-N	1:13	GGA CTG AAA TAC AGG CAT TAT CTT G
Cry 12 Terminal-C	1:19	CCA GAT GGA TTC AGA TTA TTG GG
Cry 14 Terminal-C	1:12	CTA TCT TTT CAC AAC CAC CGG ATG GGC
Cry AF Terminal-N	1:23	TGA TAA ATC TTG TCC TCC AGG T
Cry AR Terminal-N	1:24	GTT CGT TTG AAC ACA TTG CAA C

6.9.2 Mezcla para amplificación por PCR de COWP

Se preparó un volumen total de 50 µl que contenía por reacción: 5 µl de amortiguador 10x (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.01% p/v gelatina), 0.25 µl de Taq Gold (5 U/µl), 1.0 µl de los Oligonucleótidos diluidos: 1.0 µl de Cry 9 - Cry 15, 1.0 µl de Cry 12-Cry 14 y 1.0 µl de CryAf-CryAr (Tabla 5), 4 µl de bases nucleotídicas (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) 10 µM y 0.25 µl de MgCl₂ (25 U), 28.5 µl de H₂O con 10 µl de ADN (mínimo 1 ng/µl). Como testigo positivo se utilizó una muestra de ADN de *Cryptosporidium parvum* genómico en una dilución 1/10 en cantidad de 10 µl.

⁹ Perkin Elmer Gene Amp 9700, Applied Biosystems Division, 850 Lincoln Centre, Drive Foster City, CA, 94404, EUA.

6.9.3 Testigo positivo

Para corroborar que el sistema de amplificación fuera exitoso se utilizó como testigo positivo ADN genómico (50 ng/ml) de *C. parvum* (humano y bovino), *C. muris* (ratón) y *C. andersoni* (bovino). Para la amplificación del gene 18S ARNr se utilizaron clonas del gene de *C. parvum* y oocistos de *C. muris* aislados de ratón.

6.9.4 Testigo negativo

Se utilizó una muestra con H₂O ultrapura en lugar de ADN y muestras del ADN de *Cyclospora cayetanensis*, *Giardia intestinalis*, *Eimeria bovis* y *Neospora caninum*.

6.9.5 Purificación de los productos de PCR

Todos los productos de PCR se purificaron por medio del sistema de StrataPrep PCR Purification Kit¹⁰. Este sistema utiliza una sustancia (con sales caotrópicas) para unirse a fragmentos de ADN mayores a 100 pb eliminando los fragmentos de ADN inespecíficos. El producto de PCR se diluyó 1:1 con las sales caotrópicas (40 µl), vertiéndose en un tubo matriz que contiene fibras para atrapar los fragmentos de ADN. Se centrifugó a 14,000 x g por 30 segundos, desechándose las sales caotrópicas. Posteriormente se agregó al tubo matriz 750 µl del amortiguador (10 mM Tris HCl pH 7.5 con 100 mM NaCl con etanol 100%), centrifugándose a 14,000 x g. por 30 segundos, se desechó el sedimento y se volvió a centrifugar para eliminar el excedente de alcohol. Para eluir el ADN del

¹⁰ Num. Catálogo 40771. 11011 North Torrey Pines Road. La Jolla, CA, 92037, USA.

tubo matriz se utilizaron 50 μl H_2O ultrapura¹¹, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 14,000 x g por 30 seg.

Posteriormente se separaron 5 μl de la solución que contenía el producto de PCR purificado en un gel de agarosa al 2% (amortiguador TAE) para determinar por medio de la intensidad de las bandas la cantidad de producto para utilizarse en la reacción de secuenciación.

6.9.6 Reacción de secuenciación

Se realizó una reacción de secuenciación por cada oligonucleótido de manera individual, utilizándose una concentración entre 6 y 10 picomoles para estos oligonucleótido; se utilizó una mezcla para secuenciación que contenía MgCl_2 , dNTP y *Taq* polimerasa con el marcador *Big dye* en cantidad de 4 μl , se agregaron 4 μl de un amortiguador (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl 0.01% p/v gelatina), 1 μl del oligonucleótido, un máximo de 11 μl de la solución con el producto de PCR con un mínimo de 8 μl y H_2O suficiente para completar 20 μl de reacción. Todo el proceso se realizó con las muestras en hielo.

6.9.7 Programa de secuenciación

Se utilizó el siguiente programa para secuenciar la solución del producto de PCR purificado con los oligonucleótidos CDIAGGEF-XIAO1R, XIAO1F-XIAO2R, ANDERSONIF-ANDERSONIR: 25 ciclos de desnaturalización a 96 ° C por 10 seg, alineamiento a 65° C por 5 seg y extensión a 60° C por 4 min.

Para secuenciar con los oligonucleótidos Cry9-Cry15, Cry12-Cry14, CryAF-CryAR, se utilizó el siguiente programa: 25 ciclos de desnaturalización a 96 ° C por 10 seg, alineamiento a 55° C por 5 seg y extensión a 60° C por 4 min. Una vez

¹¹ Agua ultrapura, comercial, libre de bacterias, sin sales y libre de pirógenos. Sometida a rayos UV por 15 min.

terminado el proceso de secuenciación la placa se protegió con papel aluminio evitando así el daño que causa la luz directa a la muestra.

6.9.8 Purificación de la solución del producto de PCR para secuenciación

La purificación se realizó mediante el sistema Centri-Sep¹² para eliminar el exceso de radicales deoxi, este sistema elimina el 98% de las sales y nucleótidos de bajo peso molecular provenientes de los amortiguadores que se utilizan en las reacciones de secuenciación, el cual es diseñado especialmente para el sistema ABI 377A¹³ de secuenciación, que fue empleado para correr el gel de secuenciación.

Se utilizó una columna de purificación, prehidratándola con 800 μ l H₂O ultrapura por 30 minutos. Se mezcló y golpeó suavemente para eliminar todas las burbujas y que quedara una sustancia sólida, se eliminó el exceso de agua (aproximadamente 250 μ l) de la columna auxiliándose con una perilla que ejercía presión negativa en la parte superior del tubo. Se centrifugó la columna a 3,000 x g por 2 minutos, posteriormente se eliminó el líquido excedente (300 μ l). La reacción de secuenciación (20 μ l) se colocó al centro de la columna y se centrifugó a 3,000 x g por 2 minutos. El líquido se colectó en un tubo para microcentrífuga colocado al fondo de la columna. Posteriormente se llevó la muestra a la máquina de vacío Savant¹⁴ y se centrifugó a temperatura ambiente y presión negativa por 90 min. Los tubos se conservaron en el congelador protegidos por papel aluminio hasta correr el gel de secuenciación.

¹² Centri-Sep Columns, Princeton Separations, Inc. P.O. Box 300, Adelphia, NJ, 07710, USA.

¹³ Applied Biosystems Division, 850 Lincoln Centre, Drive Foster City, CA, 94404, EUA.

¹⁴ GMI, Inc. 6511 Bunker Lake Blvd. Ramsey, Minnesota, 55303, EUA.

6.9.9 Gel de secuenciación

Se utilizó el secuenciador Abi Prism 377A para correr el gel, este instrumento tiene la capacidad de analizar automáticamente las moléculas de ADN marcadas con colorantes fluorescentes múltiples.

El sistema consiste en electroforesis de un gel vertical, un sistema de detección de láser y análisis de computadora. El sistema de detección de fluorescencia va de 514 a 680 nm. Se lavaron perfectamente los cristales y los elementos para conformar la cámara donde se coloca el gel de tal manera que se eliminara todo vestigio de grasa. Se preparó el gel de poliacrilamida al 40% (135 ml de H₂O con 58.5 g de acrilamida y 1.56 g de bis-acrilamida) eliminando las impurezas en un filtro de nitrato de celulosa de 0.2 mm de diámetro y amortiguador TBE comercial¹⁵ (5.4 Tris, 2.8 ácido bórico, 0.4 EDTA y H₂O destilada cbp 50 ml) para ser instilado en la cámara de electroforesis. Se agregó el TBE a la cámara de abajo para que los cristales permanezcan húmedos y 594 ml de H₂O ultrapura en la cámara superior. Se calentó el instrumento a 51° C verificándose que el gel no tuviera imperfecciones, cerrando el aparato de secuenciación y analizándose con el láser. En aquellos carriles que presentaron defectos no se colocaron las reacciones de secuenciación. Este sistema permite que se corran 96 simultáneamente.

6.9.9.1 Preparación de las muestras para colocar en el gel de agarosa

Las muestras se prepararon agregando a cada muestra liofilizada de la reacción de secuenciación 2.5 µl de amortiguador de carga (ficoll:formamida, 1:5). Se mezclaron las muestras y desnaturalizaron entre 90 y 95° C por 2 min y posteriormente se colocaron en hielo. Se colocó el cristal de 96 pozos en hielo y se dispensaron 0.5 µl de la muestra en cada uno de los carriles verificando que

concuere la clave (A1, B1, etc.), con el código de la muestra, se colocaron los testigos positivos en el carril 1, salteados para tener por lo menos 5 testigos en las 96 muestras. Se colocó el peine de papel sobre los carriles del cristal absorbiendo cada muestra, el peine se situó después sobre el gel presionando sobre su superficie. Se cerró el instrumento y se hizo un corrimiento por 1 min, una vez que se transfirió la muestra al gel se retiró el peine y comenzó el proceso de electroforesis con una duración de 12 h.

6.9.10 Resultados de la secuenciación

Los resultados de la secuenciación se analizaron en el Sequencing Module for ABI PRISM 310 Mac. Posteriormente los datos se transformaron del sistema Macintosh a PC por medio del programa ABIview¹⁶. Una vez transformados las secuencias se analizaron con el sistema SeqMan II¹⁷ para poder obtener el género, especie y genotipo de cada aislado de *Cryptosporidium* spp.

7.0 Detección inmunológica por medio de anticuerpos monoclonales y policlonales anti-*Cryptosporidium*

La detección inmunológica se realizó con dos pruebas diferentes sobre los oocistos de *Cryptosporidium* spp. El diagnóstico por anticuerpos monoclonales marcados, un sistema que se puede adquirir comercialmente, aunque en este caso se utilizaron dos anticuerpos monoclonales experimentales. El diagnóstico por ELISA, que es un sistema comercial para determinar la presencia de oocistos en heces, es un sistema muy sensible. Ambos procedimientos ofrecen resultados en 2 horas y sirven bien para realizar tamizaje de un gran número de muestras.

¹⁵ Invitrogen Corporation, Life Technologies, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, CA, 92008, EUA.

¹⁶ Num. Catálogo 677-30 Applied Biosystems Division, 850 Lincoln Centre, Drive Foster City, CA, 94404, EUA.

¹⁷ DNASTAR, Inc. 1228 S. Park St. Madison, WI 53715, EUA.

7.1 Diagnóstico del género *Cryptosporidium* spp. por medio de detección por anticuerpos monoclonales fluorescentes (AIF)

El diagnóstico inmunológico se realizó en el laboratorio del Dr. Michael J. Arrowood de la División de Enfermedades Parasitarias en el CDC, Atlanta, GA. EUA. Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-ooquisto de *Cryptosporidium* spp. marcados con FITC (isotiocianato verde fluorescente) de ratón contra antígenos presentes en la superficie de la pared del ooquisto. Los anticuerpos monoclonales anti-ooquisto que se utilizaron para este estudio fueron experimentales. Se probaron los anticuerpos experimentales IgM OW50-FITC y anticuerpos IgG OW3-FITC diseñados contra la pared del ooquisto de *C. parvum*.

Se utilizaron los aislados de *Cryptosporidium* spp. conservados en heces con dicromato de potasio al 5%, heces sin conservadores en congelación u ooquistos concentrados en PBS pH 7.2. Se concentraron los ooquistos mediante el método de Sheather's descrito arriba. Los ooquistos se conservaron en PBS pH 7.2 hasta su diagnóstico. Se realizó un frotis delgado en la laminilla, se depositaron 2-3 gotas del conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC) con los anticuerpos monoclonales anti-*Cryptosporidium* marcados, se colocó 1 gota de la tinción de contraste (solución de eriocromo negro) revolviendo ambas sustancias y se dejaron incubar por 30 min a temperatura ambiente. Después se enjuagaron las laminillas con SSF pH 7.5 con ayuda de una piseta. Se agregó un amortiguador (glicerol, formalina y 0.1% de ácido de sodio) para montar el cubreobjetos. Se observaron las laminillas en el microscopio de inmunofluorescencia a una longitud de onda de 490-500 con filtro especial para FITC con el objetivo de 40x y 100x.

7.2 Detección de *Cryptosporidium* spp. por anticuerpos policlonales en coproantígenos¹⁸. Método diagnóstico comercial de un inmunoensayo enzimático de captura (ELISA) en la muestra fecal.

El método de detección de coproantígenos de *Cryptosporidium* spp. por medio de un método comercial de un inmunoensayo enzimático (ELISA) de captura con un doble anticuerpo (sándwich) utilizando anticuerpos anti-*Cryptosporidium* para capturar el antígeno del sobrenadante de la muestra fecal. Este sistema presenta la ventaja que no requiere la localización de oocistos o de personal de laboratorio entrenado en morfometría, sin embargo, el sistema detecta una muestra positiva a *Cryptosporidium* spp. sin que permita valorar el número de oocistos excretados, tampoco se puede determinar la especie que está afectando al paciente. El sistema está desarrollado para detectar casos de cryptosporidiosis en humanos, con una sensibilidad del 94% y especificidad del 99%, con un nivel de detección de 60 ng de antígeno de *Cryptosporidium* spp. El sistema puede correr 96 muestras en microplaca y se utiliza como método de tamizaje en brotes epidémicos.

El método diagnóstico de un inmunoensayo enzimático de captura (ELISA) en la muestra fecal, requiere de un lector para ELISA con un filtro de 450 nm. El paquete incluye un testigo positivo de *Cryptosporidium* spp. de origen bovino cuyo sobrenadante fecal es conservado en formol y contiene un amortiguador con timerosal. También incluye un testigo negativo de una muestra fecal de humano negativo a *Cryptosporidium* conservada en formol y con un amortiguador y timerosal.

La micro-placa de pozos de fondo curvo conteniendo anticuerpos policlonales de conejo anti-*Cryptosporidium*. Se agregaron 100 µL de testigo negativo en el pozo 1 y 2 gotas de testigo positivo en el pozo 2. Se agregaron 2 gotas del sobrenadante de la muestra heces en cada pozo. Dejándose incubar 20

¹⁸ Paquete de detección de antígenos de *Cryptosporidium*. *Cryptosporidium* antigen detection

min a temperatura de 15 a 25° C. Se realizó un lavado con el amortiguador del paquete comercial y el surfactante con timerosal. Se agregaron 2 gotas del reactivo azul (anticuerpos policlonales de cabra anti-*Cryptosporidium* conjugados con biotina, tinción azul y timerosal), incubándose por 10 min y posteriormente se lavaron con el amortiguador del paquete comercial y surfactante con timerosal. Se agregaron 2 gotas del reactivo 2 (streptavidin-peroxidasa [SA-NRP], tinción roja y timerosal), incubándose por 5 min y se lavan con agua desionizada. Se agregaron una gota del sustrato A (cromógeno de tetrametilbenzidina [TMB]) y dos gotas del sustrato B (solución de peróxido con base de ácido cítrico). Se le dieron unos golpecitos suaves para unir los sustratos y se incubó 5 min. Se agregaron 2 gotas de la solución para detener la reacción (ácido fosfórico 1M). Se mezclaron suavemente con un golpeteo y se realizó la lectura, midiendo el cero en un pozo vacío. La interpretación visual de un resultado positivo es que presenta un color amarillo y si no hay reacción tampoco no se observa color amarillo. La lectura de absorbancia con una longitud de onda de 450 nm fue de 0.15 o mayor indica que la muestra contiene antígenos para *Cryptosporidium* spp.

8.0 Análisis de las secuencias de ADN del gene 18S ARNr

Se utilizaron los sistemas Seqman II y Omega versión 2.0¹⁹ además de hacer las comparaciones con otras secuencias del banco de secuencias genómicas el sistema BlastN del GenBank²⁰.

microwell ELISA. In vitro diagnostics. LMD Laboratories, Inc. Carlsbad, CA, 92008

¹⁹ Accelrys Software Inc. 10188 Telesis Court, Suite 100, San Diego, CA, 92121, EUA.

²⁰ National Center for Biotechnology Information, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894

8.1 Análisis estadístico

Se utilizaron métodos de estadística descriptiva por medio del programa Quantitative Parasitology versión 1.0²¹, el programa Epi Info 3.3.2²² para comparar animales excretando oocistos, contra animales no excretadores de oocistos, con o sin manifestaciones clínicas de cryptosporidiosis. Se hicieron los análisis de Wilcoxon para determinar las diferencias en el tamaño de los oocistos estratificando por edades, por estados y por clima por Minitab 13.1²³. Finalmente se hicieron los análisis con el sistema JMP 5.1²⁴ de contingencia por casos, diarrea, clima, estados y edad por medio de regresión nominal logística; análisis de Mantel-Haenszel, la prueba exacta de Fisher para variables categóricas y pruebas no paramétricas, puesto que la distribución de los casos positivos estaba fuera de la normalidad.

Se hizo un análisis para determinar la cantidad de oocistos excretados tomando en cuenta que la recuperación de protozoarios es del 15% por medio de la concentración de Sheather's en una muestra que contenga inicialmente 4,000 oocistos por gramo de heces. Para lo cual se creó el siguiente algoritmo: Peso de la muestra x Núm. de oocistos recuperados x 600 (factor mínimo de recuperación) (Webster, *et al.*, 1996).

²¹ Hungarian National Scientific Research Foundation, 2000.

²² <http://www.cdc.gov/epiinfo>. Centers for Disease Control, Atlanta, GA, EUA.

²³ Minitab, Inc. Quality Plaza, 1829 Pine May Road, State College, PA, 16801-3008, EUA.

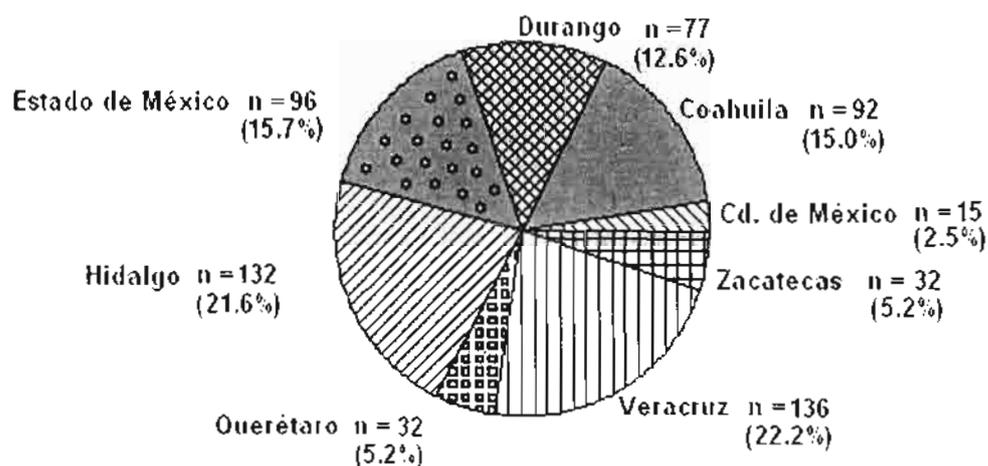
²⁴ SAS Institute, Inc. Campus Drive, Cary, NC, 27513, EUA.

9.0 RESULTADOS

9.1 Distribución de las muestras fecales

Se estudiaron 612 animales en total, de los cuales 421 fueron becerros de 0 a 28 días de edad y 191 correspondieron a vacas y vaquillas a primer parto. Se muestrearon algunos establos de más de 150 vacas en Veracruz, Coahuila, Zacatecas, Durango, Querétaro, Estado de México, Cd. de México e Hidalgo, comprendiendo los siguientes climas: tropical subhúmedo (Aw), muy seco semicálido (Bs), semiseco templado (Bsk), templado subhúmedo (Cwa) de cuatro de las principales regiones ecológicas del país.

En la Gráfica 1 se muestran las respectivas proporciones de las muestras tomadas por cada lugar. Los Estados de Hidalgo y Veracruz son de los que se obtuvieron el mayor número de muestras, mientras que de la ciudad de México que no es considerada región ganadera se obtuvieron 15 muestras de ganado adulto.



Gráfica 1. Distribución y porcentajes de las muestras obtenidas por Estados en la República Mexicana

9.2 Prevalencia de cryptosporidiosis

De los 612 animales muestreados se encontró una prevalencia global de 47.6% (n = 291). En la Tabla 6 se muestra la prevalencia por estado de la totalidad de la población. Se realizó un ajuste en la distribución de los casos para realizar los análisis estadísticos puesto que los casos de cryptosporidiosis no presentaban una curva de distribución normal.

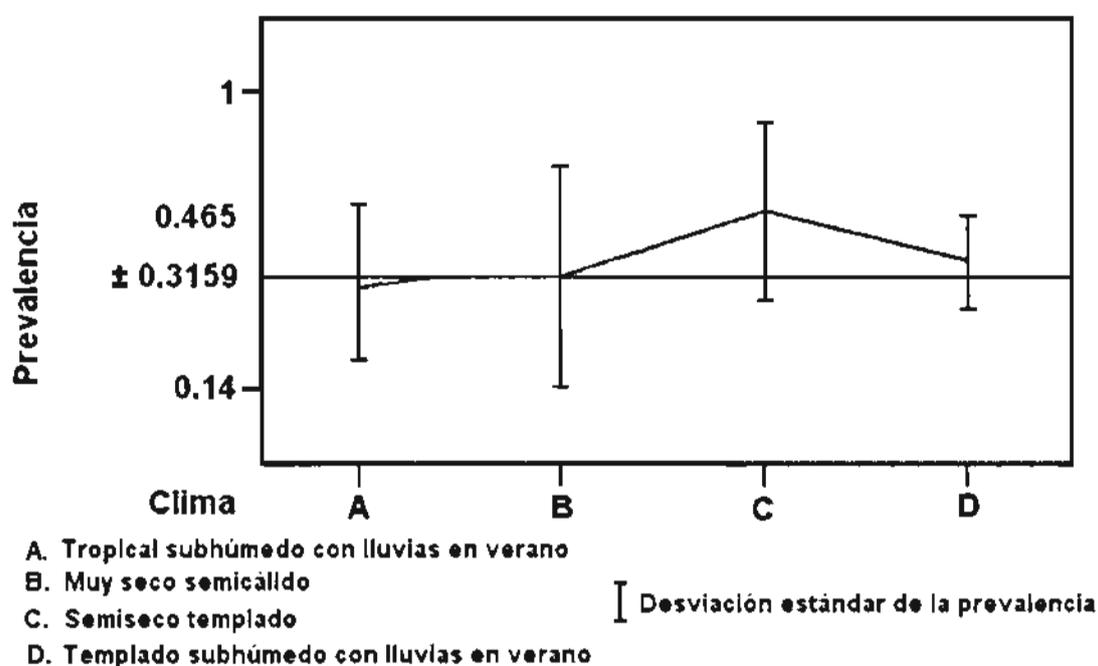
De los 421 becerros muestreados, se obtuvo que 220 becerros (52.3%), presentaron oocistos de *Cryptosporidium* spp. y que un 37.2% (n = 71) de vacas y vaquillas presentaron oocistos. La prevalencia en Zacatecas fue la más elevada con un 72% de casos positivos, mientras que la más baja fue en Coahuila con un 32% de casos. La oportunidad relativa (odds ratio) fue más elevada en el estado de Veracruz, con un 3.7 veces más posibilidad de contraer cryptosporidiosis en este estado.

Tabla 6. Prevalencia con desviación estándar, oportunidad relativa^a y frecuencia de casos de cryptosporidiosis de la población muestreada

Estado	Prevalencia	Oportunidad relativa	Frecuencia de casos
Veracruz	0.35 (± 16.7)	3.7	48
Coahuila	0.32 (± 14.8)	1.1	29
Durango	0.57 (± 7.4)	1.2	44
Querétaro	0.63 (± 4.8)	0.63	20
Zacatecas	0.72 (± 7.8)	0.23	23
Edo. de México	0.34 (± 12.6)	1.23	33
Hidalgo	0.66 (± 24.2)	0.12	87
Cd. de México	0.47 (± 0.13)	3.0	7
TOTAL	0.47		291

^a El término oportunidad relativa = odds ratio (Martín-Moreno y Banegas, 1997).

La presencia de cryptosporidiosis por clima presentó un intervalo de 31.5 hasta un 61.7 % (Tabla 7). La predicción de la prevalencia realizada en Minitab determina un intervalo entre 40 a 63%, por lo que con base en los datos que se obtuvieron del clima, este es el intervalo que se considera promedio a la presencia de cryptosporidiosis en cualquier edad de los bovinos. La probabilidad de encontrar un mayor número de casos fue del 0.02 (0.02-0.05) en el caso de la Cd. de México ($\alpha = 0.05$). No se encontraron diferencias estadísticas por clima a la presencia de cryptosporidiosis (Gráfica 2, Tabla 7).



Gráfica 2. Distribución de las desviaciones estándar por clima en relación con la prevalencia de cryptosporidiosis en becerros, vacas y vaquillas

Los valores predictivos de la prevalencia de cryptosporidiosis en la población total con base en los datos obtenidos por clima, indican que la probabilidad de presentar cryptosporidiosis presentaron un intervalo entre un 40 y 60%.

En la **Tabla 7**, se presentan los datos por estado en cuanto a la prevalencia de cryptosporidiosis estratificada por dos grupos de edad: 1) becerros; y 2) vacas y vaquillas. La prevalencia más elevada se presentó en un grupo de vacas y vaquillas en el Estado de Hidalgo con 100% de las muestras positivas y la prevalencia más baja la presentaron los Estados de Coahuila en becerros y Veracruz en ganado adulto con un 32%, respectivamente. La oportunidad relativa para contraer cryptosporidiosis en ambas edades fue mayor en el grupo de ganado adulto del estado de Veracruz (74.9 veces), seguida del Estado de México (50.1 veces), en la Ciudad de México (21.3 veces), y el Estado de Hidalgo con 0 veces. Al estratificar el análisis la oportunidad relativa de contraer cryptosporidiosis en becerros fue un 6.9 veces en el caso de Coahuila y 6.8 en el Estado de México.

Tabla 7. Prevalencia y desviación estándar, oportunidad relativa^a y frecuencia de oocistos de *Cryptosporidium* spp. estratificada por edades

Estado	Edad ^a	Prevalencia	Oportunidad relativa	Frecuencia de casos
Veracruz	1	0.50 (± 0.6)	1.5	13
	2	0.32 (± 5.9)	74.9	35
Coahuila	1	0.32 (± 19.1)	6.9	29
Durango	1	0.57 (± 3.8)	0.81	44
Querétaro	1	0.63 (± 3.2)	0.5	20
Zacatecas	1	0.72 (± 6.2)	0.22	23
Edo. de México	1	0.32 (± 7.8)	6.8	12
	2	0.36 (± 0.6)	50.1	21
Hidalgo	1	0.64 (± 14.2)	0.5	79
	2	1.00 (± 5.0)	0.0	8
Cd. de México	2	0.47 (± 0.14)	21.3	7
TOTAL		0.47		291

^aEdad 1 equivale a becerros neonatos; edad 2 equivale a vacas y vaquillas.

En la estratificación por clima y presencia de cryptosporidiosis por edades, la oportunidad relativa de contraer la enfermedad presentó poca variabilidad, con un intervalo entre 0.6 a 3.62 ambos en el clima D (templado subhúmedo con lluvias en el verano) (Figura 6) (Tabla 8).

Tabla 8. Prevalencia, frecuencia de casos y oportunidad relativa de cryptosporidiosis por clima en la población muestreada

Estado	Edad ^a	Prevalencia	Frecuencia de casos	Oportunidad relativa
A. Tropical subhúmedo con lluvias en el verano (Aw)	1	50.0 (± 0.6)	13	2.14
	2	31.8 (± 5.8)	35	
B. Muy seco semicálido (Bs)	1	31.5 (± 19.1)	29	1.0
C. Semiseco templado (Bsk)	1	61.7 (± 13.3)	87	2.14
				1.37
				0.58
D. Templado subhúmedo con lluvias en el verano (Cwa)	1	56.2 (± 6.3)	91	2.00
	2	44.4 (± 5.8)	36	0.6

^aEdad 1 equivale a becerros neonatos; edad 2 equivale a vacas y vaquillas. Oportunidad relativa: Clima C (Durango, Querétaro, Zacatecas); clima D (Edo. de México, Hidalgo, Cd. de México).

9.3 Signos clínicos

Se identificó la manifestación diarreica como el signo clínico más evidente y fácil de identificar. De los 146 becerros neonatos con diarrea, 137 casos se identificaron como cryptosporidiosis, definiéndose como caso positivo aquella diarrea con presencia de oocistos de *Cryptosporidium* spp.; los 9 casos restantes se dieron como negativos. No hubo vacas adultas con presencia de signos clínicos al momento del muestreo. Con base en el análisis estadístico, la

oportunidad relativa de presentar las manifestaciones diarreicas va del 0.22 en el Estado de Veracruz hasta un 2.3 en el Estado de México. Según el análisis de regresión logística y en el análisis no paramétrico de Wald, todos los grupos se comportaron de manera similar (Tabla 9).

Tabla 9. Diarrea por cryptosporidiosis en becerros neonatos en los establos muestreados

Estado	Presencia de cryptosporidiosis (probabilidad y IC ^a)	Oportunidad relativa	Frecuencia de casos
Veracruz	0.08 (0.05 - 0.14)	0.22	13
Coahuila	0.23 (0.17 - 0.30)	0.65	34
Durango	0.13 (0.08 - 0.19)	2.1	19
Querétaro	0.06 (0.03 - 0.11)	1.5	9
Zacatecas	0.06 (0.03 - 0.11)	1.5	9
Edo. de México	0.06 (0.03 - 0.12)	2.3	10
Hidalgo	0.35 (0.3 - 0.4)	0.4	52
Cd. de México	0	0	0
Total de diarreas			146

^aCI equivale al intervalo de confianza (95 % de confianza) y la probabilidad que los becerros neonatos presenten cryptosporidiosis en los establos estudiados.

El análisis estadístico estratificado por clima determinó que los climas A y B fueron significativamente diferentes a los otros climas. El clima A presentó un número menor de diarreas puesto que el número de animales adultos muestreados fue superior al de becerros. El clima B (Coahuila), cuya muestra fue únicamente de becerros neonatos, donde la presentación de diarrea ligada a la presencia de oocistos de *Cryptosporidium* spp. fue mayor que el resto. Los climas C y D fueron similares en la presentación de diarreas. La oportunidad relativa de

presentar diarrea fue la mayor con 8.3 veces en comparación con 0.3 en el caso de clima B que fue la menor (Tabla 10).

Tabla 10. Presentación de diarreas por cryptosporidiosis, prevalencia, frecuencia y oportunidad relativa estratificada por clima

Clima	Prevalencia (\pm DE)*	Frecuencia de casos	Oportunidad relativa
A. Tropical subhúmedo con lluvias en el verano (Aw)	9.6 (\pm 19.4)	13	8.3
B. Muy seco semicálido (Bs)	36.9 (\pm 12.0)	34	0.3
C. Semiseco templado (Bsk)	26.2 (\pm 3.4)	37	0.7
D. Templado subhúmedo con lluvias en el verano (Cwa)	25.5 (\pm 4.0)	62	0.8

*DE: Desviación estándar.

9.4 Análisis morfométrico

El análisis morfométrico mostró dos grupos de oocistos con tamaños consistentes con las características de *C. parvum* (< 5.3 μ m) y *C. andersoni* (> 5.8 μ m). El número de casos de cryptosporidiosis fue de 291, de éstos la presencia de oocistos parecidos a *C. parvum* fue del 70.8 % (\pm 108.05) y la presencia de oocistos parecidos a *C. andersoni* fue del 29.2% (\pm 44.6) (Tabla 11).

Tabla 11. Distribución morfométrica de los oocistos sugerentes de *C. parvum* o *C. andersoni* estratificados por Estados de la República Mexicana

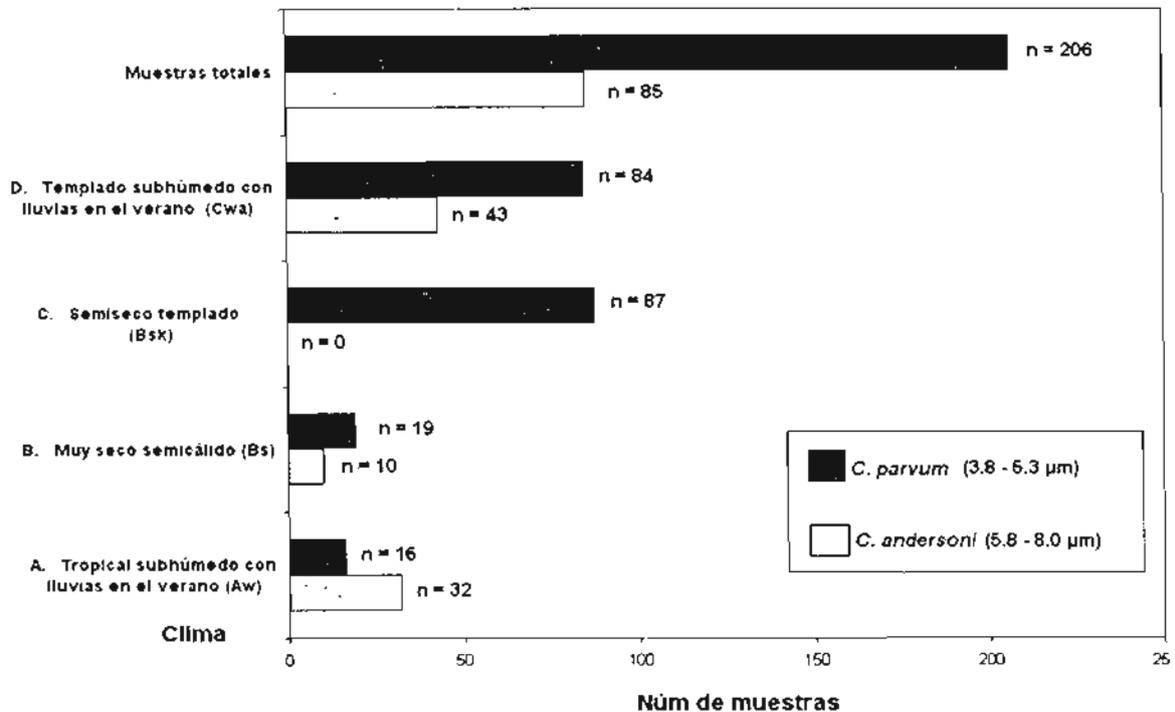
Clima y Estado de la República	Oocistos sugerentes de <i>C. parvum</i> (3.8 – 5.3 μm)	Oocistos sugerentes de <i>C. andersoni</i> (5.8 – 8.0 μm)
A. Veracruz	3.9 \pm 0.5	7.1 \pm 0.5
B. Coahuila	4.3 \pm 0.5	6.7 \pm 0.6
C. Durango	4.2 \pm 0.5	**
Querétaro	4.3 \pm 0.5	**
Zacatecas	4.0 \pm 0.4	**
D. Edo. de México	4.1 \pm 0.4	7.6 \pm 0.2
Hidalgo	4.0 \pm 0.5	6.9 \pm 0.5
México City	*	6.7 \pm 0.4

** *parvum* < 5.3 μm ; *andersoni* > 5.8 μm

El tamaño estimado de la dimensión media para los estados de Coahuila, Zacatecas, Durango, Querétaro, Hidalgo y Veracruz estuvo dentro del intervalo de *C. parvum* (3.8 - 5.3 μm). Los oocistos del Estado de México y la Ciudad de México, mostraron una dimensión media estimada dentro del intervalo de *C. andersoni* (5.8 – 8.0 μm). Aquellos estados de la República que mostraron tamaños mixtos fueron: Veracruz, Coahuila, Edo. de México y Hidalgo (Tabla 11).

Al realizar el análisis por clima y edades en cuanto a la morfometría de los oocistos se encontró que el clima C (semiseco templado), presentó oocistos sugerentes de *C. parvum* únicamente, en caso del resto de los climas la presencia de oocistos fue de de ambos tamaños (Gráfica 3). El análisis por Wilcoxon determinó una diferencia altamente significativa en el grupo Coahuila ($p < 0.0001$).

Gráfica 3. Distribución morfométrica de los oocistos similares a *C. parvum* o *C. andersoni* estratificada por climas



En cuanto a la oportunidad relativa de que un caso de cryptosporidiosis esté relacionado con un determinado tamaño de oocistos se encontró que: en ganado adulto la oportunidad de encontrar *C. parvum* fue para el clima A (Aw) 1.5 veces y 6.2 veces para el clima D (Cwa), mientras que para encontrar *C. andersoni* fue de 0.9 para el clima A y 1.1 para el clima D. En becerros neonatos la oportunidad para encontrar *C. parvum* fue para el clima A de 6.2 veces, y menos de 1 para los climas B, C y D, mientras que para encontrar *C. andersoni*, fue en todos los climas menos de una oportunidad (Tabla 12).

Con base en la presencia de los diferentes tipos de oocistos se realizó un análisis de la proporción del oocisto de tamaño dominante con relación al tamaño del oocisto en menor número (Tabla 12), encontrándose lo siguiente: en el caso

del clima A la presencia de oocistos parecidos a *C. andersoni* en la población de ganado adulto fue 4.0 mayor y 19 veces mayor en el caso del clima D. En cuanto a la población de becerros el tamaño de oocistos parecidos a *C. parvum* fue el dominante con una presencia de 2.3 veces para el clima A, 1.9 para el clima B y 2.8 en el clima D.

Tabla 12. Clasificación morfométrica de los oocistos similares a *C. parvum* y *C. andersoni* por clima con estratificación por edades

Edad	Clima ^a	No. de animales	Oportunidad relativa		Proporción ^c
			<i>parvum</i> ^b	<i>andersoni</i> ^b	
Vacas	A	110	1.5	0.9	4.0
	D	81	6.2	1.1	19.0
Becerras	A	26	6.1	0.01	2.3
	B	92	0.2	0.02	1.9
	C	141	0.8	NA	NA
	D	162	0.4	0.01	2.8
Total		612			

^a A: clima Aw; B: clima Bs; C: clima Bsk; D: clima Cwa. ^b Proporción hecha en relación con la presencia del tamaño del oocisto dominante. ^c *parvum* < 5.3 µm; *andersoni* > 5.8 µm. NA no aplica.

9.4.1 Cryptosporidiosis y la relación con la dimensión del oocisto

De los 146 casos de diarrea, se obtuvieron 73.9% de oocistos parecidos a *C. parvum*, 19.9% de oocistos parecidos a *C. andersoni* y 6.2% con ausencia de oocistos. La distribución por estado de la República y clima se muestra en la **Tabla 13**.

La probabilidad que la presentación diarreica relacionada con el tamaño del oocisto fue altamente significativa ($p < 0.0001$) a la presencia de oocistos parecidos a *C. parvum*, y significativa a la presencia de oocistos parecidos con *C. andersoni* ($p = 0.02$). En el análisis de regresión logística por estados, Coahuila mostró diferencias estadísticamente significativas contra los otros estados de la

República ($p < 0.01$) a la presencia de *C. parvum* relacionado con signología diarreica.

La oportunidad relativa de encontrar *C. parvum* relacionado con diarrea fue la siguiente: para el Clima A (Aw), fue de 0.8, en el caso del Clima B (Bs) fue de 0.02, para el Clima C (Bsk) la oportunidad relativa varió entre 1.9 y 3.0 y globalmente fue de 4.7 veces; para el clima D (Cwa) fue desde 0 hasta 3.0 con una oportunidad relativa por clima de 1.9 (Tabla 13).

En el caso de la oportunidad relativa de encontrar *C. andersoni* relacionado con diarrea, el modelo no fue estable por lo que la respuesta arrojó datos incongruentes y no se incluyeron en los resultados.

Tabla 13. Distribución y oportunidad relativa en casos de signología diarreica en becerros neonatos con relación a la morfometría

Región climática y Estado de la República	<i>C. parvum</i>	<i>C. andersoni</i>	Oportunidad relativa oocistos como <i>C. parvum</i>	
A. Veracruz	9	4	0.8	0.8
B. Coahuila	17	10	0.02	0.02
C. Durango	19	0	2.2	4.7
Querétaro	9	0	1.9	
Zacatecas	9	0	3.0	
D. Edo. de México	8	0	3.3	1.9
Hidalgo	37	15	0.6	
Cd. de México	0	0	0	
Diarreas con presencia de oocistos	108 73.9 % (± 0.58)	29 19.8 % (± 0.09)		

^a A: clima Aw; B: clima Bs; C: clima Bsk, D: clima Cwa.

9.5 Cuantificación de oocistos a partir de muestras fecales

Se utilizó un algoritmo para la cuantificación de oocistos a partir de una muestra fecal: $\text{Peso de la muestra} \times \text{Núm. de oocistos recuperados} \times 600$ (factor mínimo de recuperación). Se hizo un ensayo de este método con muestras del estado de Veracruz para determinar la cantidad de oocistos que se podían recuperar de una muestra de heces. La cantidad de oocistos recuperada no estuvo en relación con las características de la muestra fecal, si había o no presencia de signología clínica o estado de salud general del animal muestreado. La mayor cantidad de oocistos recuperados fue de un bovino adulto sin manifestaciones clínicas (**Tabla 14**). Se utilizó el método modificado de Sheather's a un gradiente específico de 1.2 para extraer los oocistos de la muestra fecal. La variante del método consistió en que: una vez extraída la capa superior con los oocistos, se realizó una segunda centrifugación 15 minutos a 1000 x g para obtener un número mayor de oocistos, aunque estos presentarían un mayor número de desechos que en extracto de oocistos de la primera centrifugación (ver apéndice I).

Tabla 14. Resultados selectos del método de concentración oocistos de *Cryptosporidium* spp. por Sheather's por cada ml de sobrenadante y 100 g de heces en vacas y becerros

Origen de la muestra	Núm. de oocistos por ml. recuperados en el sobrenadante	Núm. de oocistos recuperados en 100 g de heces
Vaca	1.0×10^4	6.0×10^8
Vaca	1.8×10^5	1.1×10^{10}
Vaca	2.4×10^6	1.4×10^{11}
Vaca	4.0×10^4	2.4×10^9
Becerro	4.0×10^4	2.4×10^9
Becerro	2.0×10^4	1.2×10^9
Becerro	3.0×10^4	1.8×10^9

10.0 Resultados de los análisis genéticos

Una vez obtenidas las secuencias del gene 18S ARNr ADN con el sistema reportado por da Silva *et al.*, 1999, de cada uno de los aislados se procedió a realizar diversos análisis para clasificarlos genéticamente según la especie de *Cryptosporidium*. De los fragmentos de las secuencias obtenidas se realizó un consenso y se unieron las secuencias para obtener la mayor cantidad de bases de una sola secuencia (**Figura 4**). En cuanto al sistema de Award el Kariem *et al.*, 1994, la muestra Durango que es la única en la que se probó el sistema, produjo resultados con el conjunto de los tres procesos, con la amplificación del ADN genómico con un producto de 556 pb, cuyo producto de PCR fue sometido a la digestión enzimática con Mae 1, y el resultado indicó que era *C. parvum*, por el peso molecular 251 pb. Sin embargo, puesto que este sistema requiere que para

la extracción de ADN se inicie con una millones de oocistos, la obtención de éstos lleva uno a dos días de trabajo, por lo que en conjunto no es un sistema rápido, y puesto que toda la manipulación de los oocistos y probablemente las sustancias inhibitoras con las que se trabajan lo hacen poco reproducible. Se decidió no utilizarlo para el resto de los aislados (**Figuras 13 y 14**) y encontrar un sistema de extracción más eficiente.

10.1 Análisis de contingencia del gene 18S ARNr

El análisis de contingencia (**Tabla 15**), refleja la compatibilidad de las muestras al ser comparadas con una secuencia de *Cryptosporidium parvum* de origen bovino obtenida del GenBank. Dicho análisis se hizo en el programa BLASTN 22.0 del National Center for Biotechnology Information. Se realizó el análisis comparando las secuencias obtenidas de los aislados contra aquellas registradas en el GenBank con dimensiones en sus oocistos parecidas a las obtenidas por el diagnóstico morfológico. La mayor parte de las secuencias de los aislados estuvieron entre un 99 y 100% de compatibilidad, las principales diferencias estuvieron en la muestra testigo de *C. andersoni* de California, EUA con un 93% de compatibilidad y muestras de bovinos adultos del estado de Veracruz con un 97% de compatibilidad de oocistos con dimensiones parecidas a *C. andersoni*. Los testigos positivos *C. parvum* (humano y bovino), *C. muris* (ratón) y *C. andersoni* (bovino) amplificaron y la secuencias de los aislados mostraron una similitud de 100%, 99% y 99% respectivamente para *C. parvum*. Los testigos negativos *Cyclospora cayetanensis*, *Giardia intestinalis*, *Eimeria bovis* y *Neospora caninum* no fueron amplificados.

Tabla 15. Análisis de contingencia de los especímenes de género *Cryptosporidium* de GenBank y secuencias del gene 18S ARNr aisladas de diferentes regiones del país

Secuencia o aislado	Especie o dimensión de <i>Cryptosporidium</i>	Especie de origen	Num. de bases comparadas	Porcentaje de compatibilidad
GenBank	<i>C. parvum</i>	Bovino	(1>1746)	
GenBank	<i>C. parvum</i>	Humano	(1>1746)	100
GenBank	<i>C. wrairi</i>	Cuye	(1>1746)	99
GenBank	<i>C. felis</i>	Gato	(1>1781)	95
GenBank	<i>C. muris (andersoni)</i>	Becerro	(1>1743)	93
GenBank	<i>C. muris (andersoni)</i>	Bovino	(1>1743)	94
Veracruz	<i>parvum</i>	Vaca	(1>1289)	97
California	<i>andersoni</i>	Vaca	(1>1280)	93
Torreón	<i>parvum</i>	Becerro	(1>1278)	99
Querétaro	<i>parvum</i>	Becerro	(1>1278)	99
Zacatecas	<i>parvum</i>	Becerro	(1>1270)	99
Cd. de México *	<i>parvum</i>	Infante	(1>1257)	100
Cd. de México *	<i>muris</i>	Ratón	(1>1120)	99
Veracruz	<i>parvum</i>	Vaca	(1>614)	99
Cd. México *	<i>andersoni</i>	Vaca	(1>608)	99
Hidalgo	<i>andersoni</i>	Becerro	(1>607)	99
Edo. de México	<i>parvum</i>	Becerro	(1>606)	99
Cd Neza Edo. Mex)	<i>andersoni</i>	Vaca	(1>605)	99
Veracruz	<i>parvum</i>	Becerro	(1>592)	100

* testigos positivos

El análisis se realizó en un mínimo del 35% y un máximo del 76% del tamaño total del gene 18S ARNr de 1780 pb. La tabla 15 muestra los fragmentos del gene 18S ARNr que se secuenciaron delimitados por las pares del base con referencia al gene completo. El fragmento del gene más completo fue el de una becerro de 3 semanas de edad de Veracruz, donde por medio de amplificaciones repetidas y al realizar el consenso de las secuencias obtenidas, se obtuvo un 76%

del gene 18S ARNr. La secuenciación del ADN mostró que la mayoría de las muestras de los oocistos de *Cryptosporidium* spp., del ganado analizado, independientemente del tamaño del oocisto fue *C. parvum* el cual tuvo de un 99 a un 100% de similitud con los registros del GenBank: AY204240 y AY204238 (Tabla 16). Los resultados son consistentes en todos los aislados de Veracruz, Zacatecas, Hidalgo, Querétaro y Estado de México. No en todos los casos la similitud fue del 100%, en el caso de las muestras provenientes de Coahuila se alcanzó hasta un 97% y del 98% en el caso de la Cd. de México, por lo que no se puede hacer una clasificación exacta de estos aislados. Al realizar el análisis contra otras secuencias de *C. parvum*, *C. muris*, *C. felis*, *C. wrairi* y *C. andersoni* del GenBank los resultados fueron todavía más lejanos. La tabla 18 muestra un análisis de un fragmento del gene 18S ARNr donde se identifican las diferencias y similitudes de tres aislados selectos del estudio con tres secuencias obtenidas del GenBank, una de *C. parvum* genotipo bovino, *C. felis* y *C. muris* genotipo becerro que son morfológicamente lo más cercano a los oocistos analizados.

Tabla 16. Porcentaje de amplificación del gene 18S ARNr de *Cryptosporidium* spp. de los diferentes aislados de estudio

Origen del aislado	Sitio de amplificación del 18S ARNr Gene con 1741 Kb		% amplificado del gene
Beceros Veracruz	858	1460	35
Vacas Veracruz	851	1470	36
Becerro neonato Veracruz	174	1487	76
Beceros Coahuila	196	1477	74
Beceros Zacatecas	179	1460	74
Beceros Querétaro	189	1480	75
Beceros Edo. de México	865	1475	35
Vacas Edo. de México	850	1459	35
Vacas Cd. México	852	1470	36
Beceros Hidalgo	865	1475	35
California <i>C. andersoni</i>	189	1487	75
Infante con <i>C. parvum</i>	193	1460	73

Tabla 17. Comparación de las secuencias amplificadas de los aislados del gene 18S ARNr *C. parvum* contra las secuencias BLAST NCBI

Origen del aislado	Similitud (%) 18S ARNr	Núm. de acceso del GenBank	Núm. de pb similares
Veracruz	97	AY204240	849
Coahuila	99	AY204238	1437
Zacatecas	99		1471
Hidalgo	99		1471
Querétaro	99		844
Estado de México	100		1156
Ciudad de México	98		496
California	99	AB089285	1549
		AY282707	702

* BLAST 22.0 (Mayo 94). GB: abreviatura del GenBank, National Center for Biotechnology Information. pb abreviatura para pares de bases. Todos las comparaciones fueron hechas con *Bos taurus*.

10.2 Determinación del genotipo de *Cryptosporidium parvum* por medio del COWP

El análisis de los fragmentos COWP terminal N y terminal C que se utilizaron como herramientas para determinar el genotipo dieron como resultado que las muestras provenientes de los estados de Coahuila, Zacatecas, Querétaro y Estado de México fueron *Cryptosporidium parvum* genotipo bovino (G2) (Tabla 18). No todas las muestras pudieron ser amplificadas y de estas no todos los fragmentos amplificados pudieron ser utilizados para la secuenciación (Figura 5).

Tabla 18. Determinación del genotipo por medio del análisis de los fragmentos de COWP de *C. parvum* y *C. andersoni*

Origen del aislado	COWP	
	Terminal- N	Terminal- C
Veracruz	No determinado	No determinado
Coahuila	<i>Cryptosporidium parvum</i> G2	No determinado
Zacatecas	<i>Cryptosporidium parvum</i> G2	<i>Cryptosporidium parvum</i> G2
Hidalgo	No determinado	No determinado
Querétaro	<i>Cryptosporidium parvum</i> G2	<i>Cryptosporidium parvum</i> G2
Estado de México	<i>Cryptosporidium parvum</i> G2	No determinado
Cd. de México	No determinado	No determinado
California	<i>Cryptosporidium andersoni</i>	No determinado

Los resultados del análisis de COWP fueron confirmados con el análisis de los fragmentos obtenidos y su comparación con las secuencias del GenBank: BX53835 y AF266273 (Tabla 19).

Tabla 19. Comparación de los fragmentos de las secuencias amplificadas de COWP de *C. parvum* y *C. andersoni* contra las secuencias NCBI BLAST

Origen del aislado	Clasificación genética	Similitud (%) COWP	Núm de acceso del GenBank	Núm. de pb similares
Coahuila	Cp	100	BX53835	1098
Zacatecas	Cp	100		771
Querétaro	Cp	100	AF266273	1098
Estado de México	Cp	98		1019
Hidalgo	Cp	99		953
California	Ca	99	AY282693	407
	Ca	99	AB089289	407

* BLAST 22.0 (Mayo 94). GB' abreviatura del GenBank, National Center for Biotechnology Information. pb abreviatura para pares de bases. Cp abreviatura para *C. parvum* y Ca para *C. andersoni*. El bovino fue el hospedador en todos los casos contra lo que se comparó la secuencia COWP.

Tabla 20. Ejemplo de la comparación de las secuencias amplificadas del 18S ARNr de los aislados en estudio contra *C. parvum* genotipo B, *C. felis* y *C. muris* del GenBank

NOMBRE		SECUENCIA 301-350
<i>C. parvum</i> genotipo B	GB' AF248743	'ACTCACCAGG TCCAGACATA GGAAGGATTG ACAGATTGAT AGCTCTTTCT 3'
<i>C. felis</i>	GB' AF112575
<i>C. muris</i> (becerro)	GB' AF093496
<i>C. parvum</i> (vaca-D)	Aislado
<i>C. parvum</i> (becerro-C)	Aislado
<i>C. parvum</i> (becerro-D)	Aislado

NOMBRE		SECUENCIA 351-400
<i>C. parvum</i> genotipo B	GB' AF248743	'TGATTCTATG GGTGGTGGTG CATGGCCGTT C.TTAGTTGG TGGAGTGATT 3'
<i>C. felis</i>	GB' AF112575
<i>C. muris</i> (becerro)	GB' AF093496
<i>C. parvum</i> (vaca-D)	Aislado
<i>C. parvum</i> (becerro-C)	Aislado
<i>C. parvum</i> (becerro-D)	Aislado-C.....

NOMBRE		SECUENCIA 401-450
<i>C. parvum</i> genotipo B	GB' AF248743	'TGTCTGGTTA ATTCCGTTAA CGAACGAGAC CTTAACC..T GCTAAATAGA 3'
<i>C. felis</i>	GB' AF112575
<i>C. muris</i> (becerro)	GB' AF093496G
<i>C. parvum</i> (vaca-D)	Aislado
<i>C. parvum</i> (becerro-C)	Aislado
<i>C. parvum</i> (becerro-D)	Aislado-CA--C-.....

NOMBRE		SECUENCIA 451-500
<i>C. parvum</i> genotipo B	GB' AF248743	'CATAAGAAAT ATT...ATAT TTTTATCTG TCTTCTTAGA GGGACTTTGT 3'
<i>C. felis</i>	GB' AF112575-ATTA-----T-----
<i>C. muris</i> (becerro)	GB' AF093496	--AT-----T-----..AT --C-ATCT-A -----C
<i>C. parvum</i> (vaca-D)	Aislado
<i>C. parvum</i> (becerro-C)	Aislado
<i>C. parvum</i> (becerro-D)	Aislado

NOMBRE		SECUENCIA 501-550
<i>C. parvum</i> genotipo B	GB' AF248743	'ATGTTTAATA CAGGGAAGTT TTAGGCAATA ACAGGTCTGT GATGCCCTTA 3'
<i>C. felis</i>	GB' AF112575
<i>C. muris</i> (becerro)	GB' AF093496	G--CC--CG -GA-----G-----
<i>C. parvum</i> (vaca-D)	Aislado
<i>C. parvum</i> (becerro-C)	Aislado
<i>C. parvum</i> (becerro-D)	Aislado

NOMBRE		SECUENCIA 551-591
<i>C. parvum</i> genotipo B	GB' AF248743	'GATGTCCTGG GCGGCGGCG CGCTACACTG ATGCATCCAT C 3'
<i>C. felis</i>	GB' AF112575
<i>C. muris</i> (becerro)	GB' AF093496-A-----G-
<i>C. parvum</i> (vaca-D)	Aislado
<i>C. parvum</i> (becerro-C)	Aislado
<i>C. parvum</i> (becerro-D)	Aislado

GB' Abreviatura para el número de acceso al GenBank, National Center for Biotechnology Information (NCBI). Aislados selectos del estudio de Vaca de clima D, Becerro de clima C, Becerro de clima D.

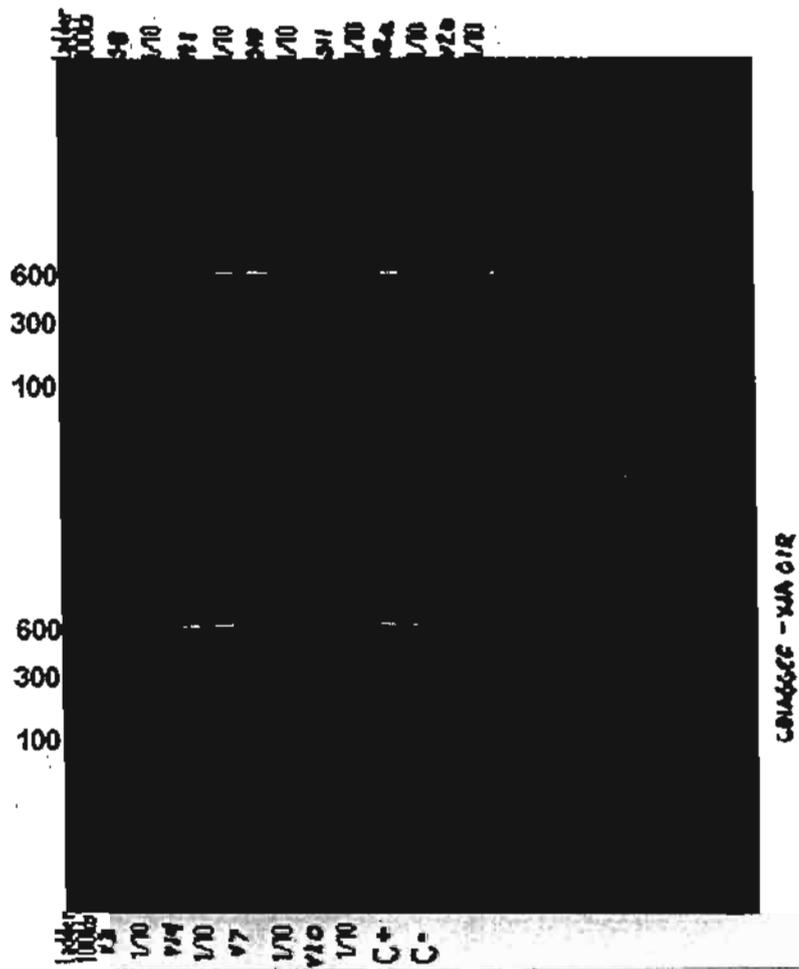


Figura 9. Gel de agarosa al 2% en TBE con el producto de PCR de un fragmento del gene (CDIAGGEF- XIAO1R) de 664 de pb del 18S ARNr de *Cryptosporidium* spp. El marcador de pm es un Ladder de 100 pb. Este es un ejemplo de las muestras amplificadas, con los aislados: S8 y S10 (Coahuila); S11 (Zacatecas); V2a, V2b, V3, V20 (Veracruz); V14 (Edo. de México); V7 (ratón). Testigo positivo (clona de *C. parvum*); testigo negativo (agua). El primer carril con la solución del producto amplificado de la PCR y el segundo carril con la solución del producto amplificado de la PCR diluido 1/10.

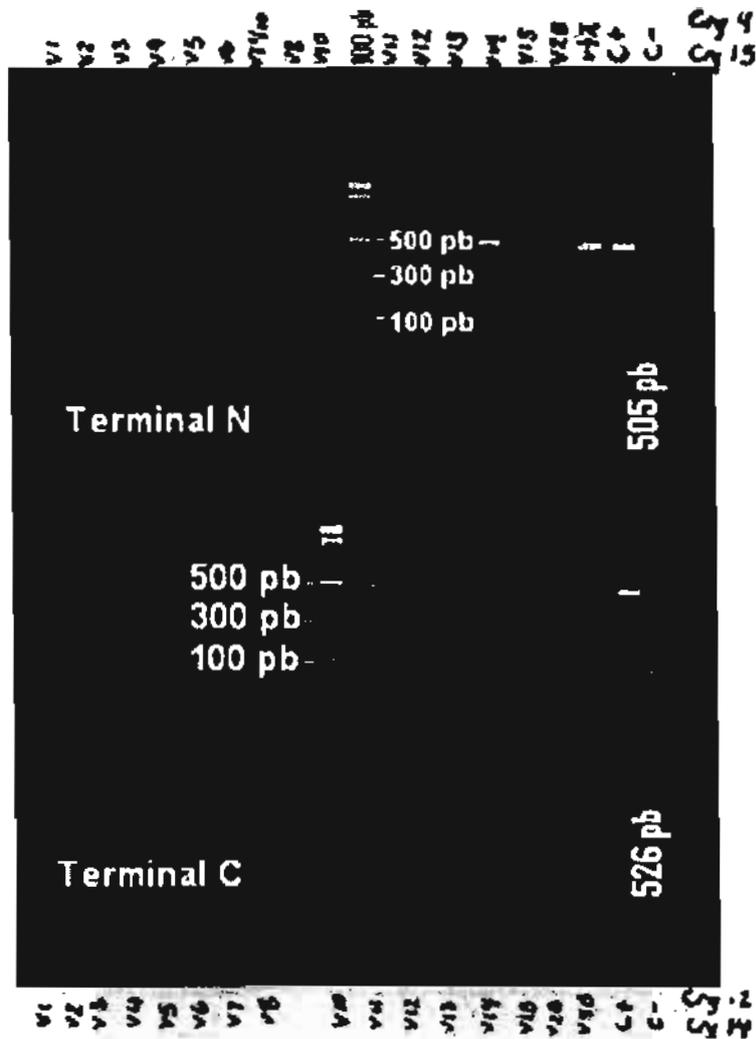


Figura 10. Gel de agarosa al 2% en TBE donde se muestra el producto de la PCR del gene COWP en su terminal N (Cry 9- Cry 15) con 505 pb y terminal C (Cry 12- Cry 14) con 526 pb de *Cryptosporidium* spp. El marcador de pm es un Ladder de 100 pb. Este es un ejemplo de las muestras amplificadas, con los aislados: V1, V2, V3, V4 (Veracruz); V5, V6, V7 (ratón); V8 (rata); V10 y V11 (Hidalgo); V12, V13 y V14 (Edo. de México); V15 (Cd. de México); V2a, V2b y V4a. Testigo positivo (clona de COWP); testigo negativo (agua). Estas secuencias son para determinar el genotipo de *C. parvum*, funcionaron en pocas muestras: ratón, Veracruz, Edo. de México e Hidalgo, en este caso.

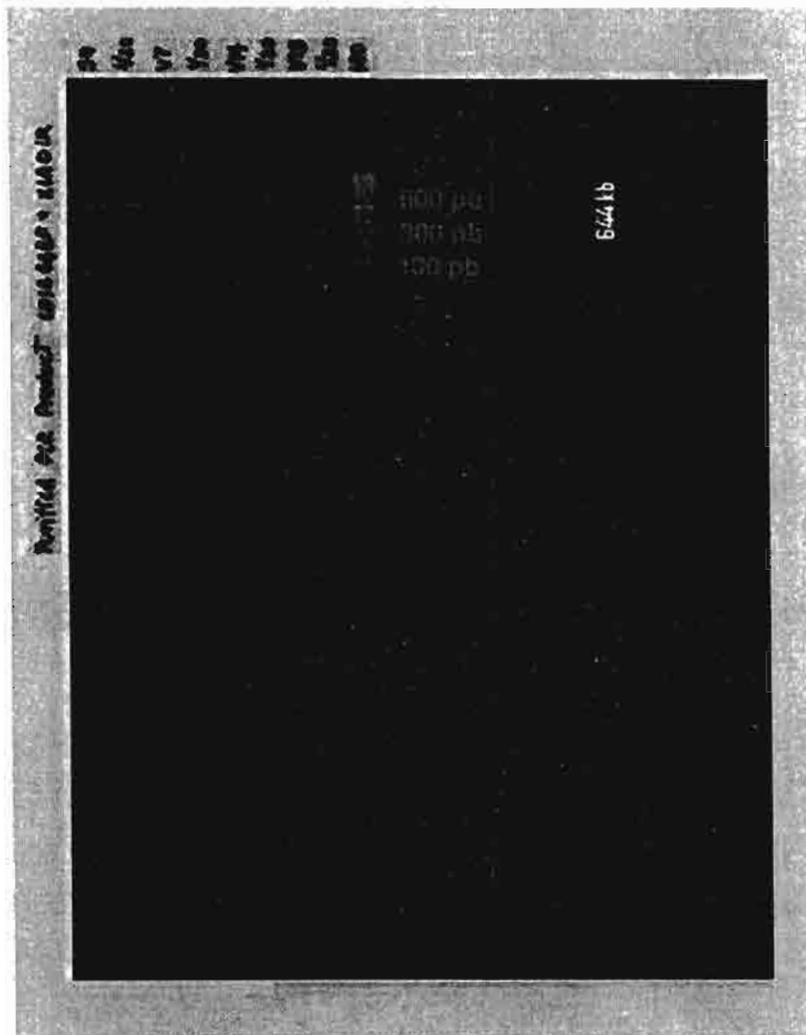


Figura 12. Gel de agarosa al 2% en TBE para demostrar la solución del producto purificado de PCR por el sistema Stratagene de un fragmento de 644 pb del gene 18S ARNr (CDDIAGGEF-XIAO1R) de *Cryptosporidium* spp. Se utilizó el marcador molecular Ladder de 100 pb. Las muestras purificadas fueron S9 (Coahuila); V7 (ratón); V14 (Edo. de México); V15 (Cd. de México), cada aislado con una dilución del producto purificado de la PCR diluido 1/20. El producto diluido muestra ser suficiente para realizar la reacción de secuenciación.

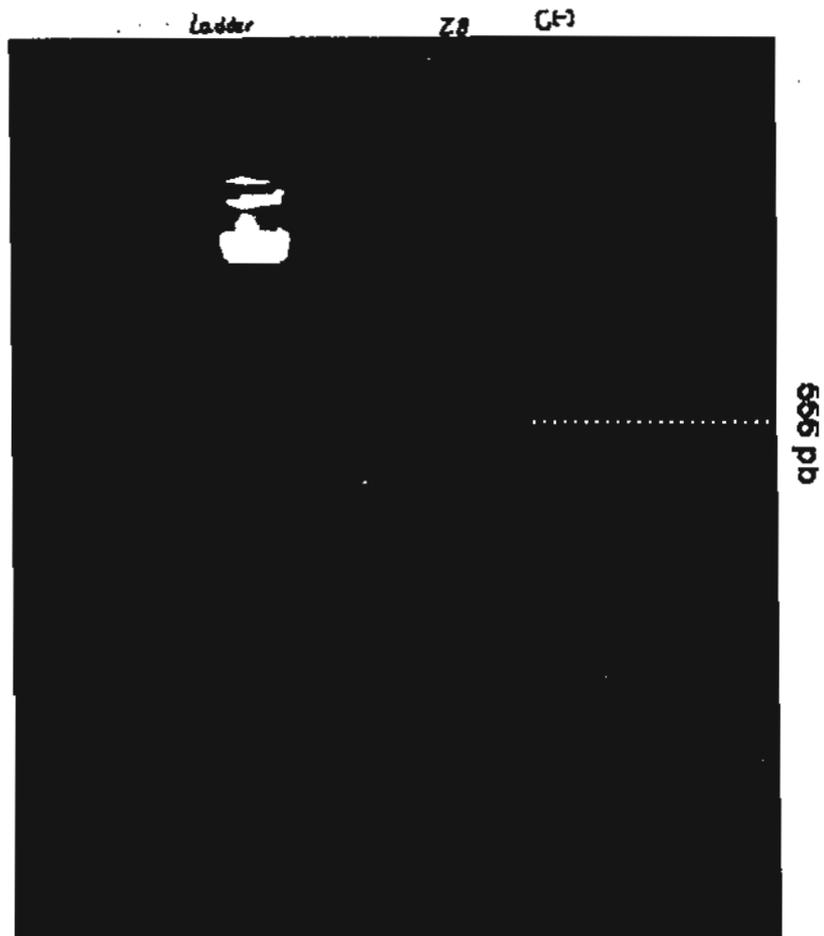


Figura 13. Gel de agarosa al 2% con TBE mostrando el producto de PCR del fragmento del gene 18S ARNr de *Cryptosporidium* spp. de 556 pb . El marcador de peso molecular es Ladder 100 pb. La muestra amplificada es Z8 (Durango). El testigo negativo (agua). El sistema de amplificación es el de Award el Kariem, et al., 1994)

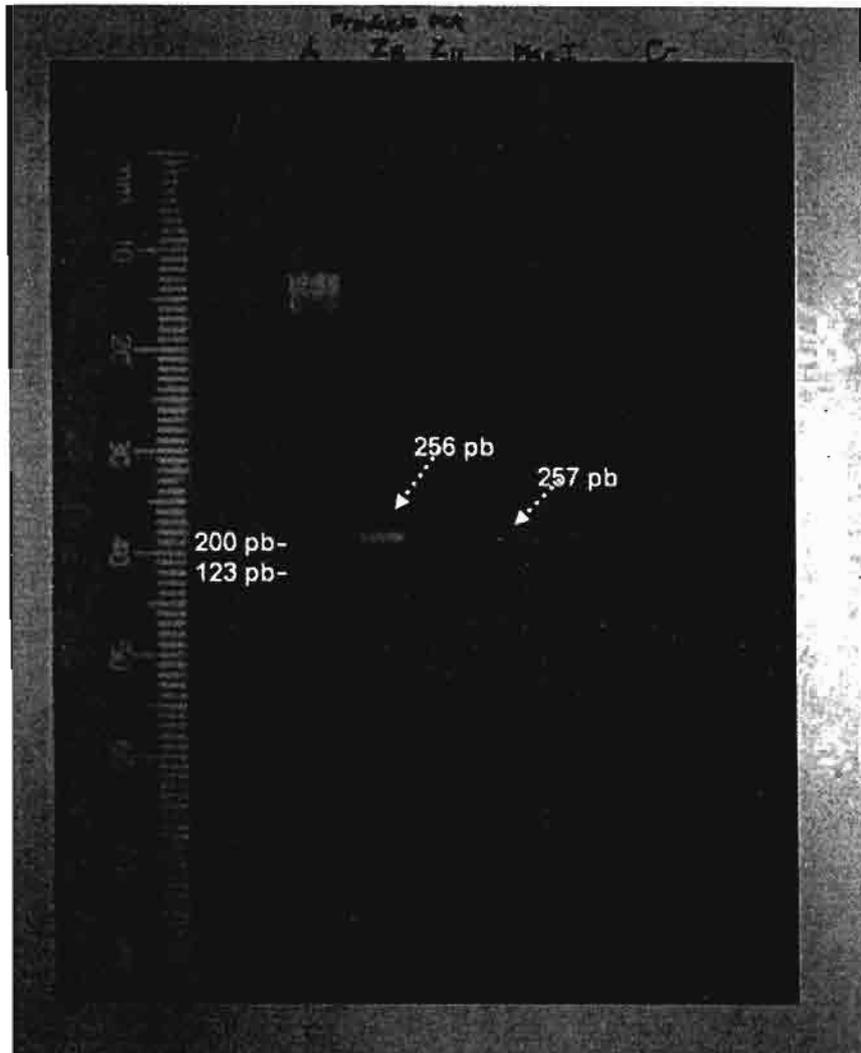


Figura 14. Gel de agarosa al 2% en TBE mostrando el producto anidado de PCR de 256 pb del fragmento del gene 18S ARNr de *Cryptosporidium* spp. y el producto de la digestión de la enzima *Mae 1* con una sola banda que indica que es *Cryptosporidium parvum*. Marcadores Ladder *Hind III* (123 pb) y pBR322/*Msp1*. Muestras Z8 y Z11 (Durango); testigo negativo (agua). El sistema de amplificación es el de Award el Kariem, *et al.*, 1994).

10.3 Determinación de *Cryptosporidium andersoni*

Uno de los testigos positivos que se utilizaron para la comparación de morfología y genética fue un aislado de un rancho lechero en el valle central de California, USA, en la que se detectó *C. andersoni* en ganado adulto por varios años. El análisis indicó que había diferencias entre las secuencias de *C. andersoni* y *C. parvum*, de los aislados en estudio. La similitud en el gene 18S ARNr de *C. andersoni* en un 99% con las secuencias AB089285 y AY282707 (Tabla 17) y del 99% con el gene COWP en las secuencias AY282693 y AB089289 del GenBank (Tabla 18). La secuencia de *C. andersoni* no pudo ser incluida en el análisis que se presenta en la Tabla 19 puesto que ninguna de las secuencias que se encuentran hasta el momento en el GenBank bajo el nombre de *C. andersoni* son diferentes a las de *C. parvum* o *C. muris* de origen bovino.

11.0 Análisis morfométrico de los oocistos de *Cryptosporidium* spp. marcados con anticuerpos monoclonales fluorescentes (AIF)

Las laminillas obtenidas se observaron bajo 200-400 x en un microscopio epifluorescente. Los oocistos marcados se observaron verde brillante fluorescente.

Tabla 21. Comparación morfométrica entre la tinción ácido-resistente y el método AIF* de oocistos de *Cryptosporidium* spp. de aislados selectos

Origen del aislado	Clasificación por tamaño de de <i>Cryptosporidium</i>	Oocistos teñidos por:		
		tinción ácido-resistente	AIF*	
			OW 50 (IgM)	OW3 (IgG)
Coahuila S8	<i>C. parvum</i>	4.0 m μ	5.0 m μ	5.0 m μ
Coahuila S9	<i>C. parvum</i>	4.0 m μ	5.0 m μ	5.0 m μ
Coahuila S10	<i>C. parvum</i>	4.0 m μ	5.0 m μ	5.0 m μ
Zacatecas S11	<i>C. parvum</i>	4.0 m μ	5.0 m μ	5.0 m μ
Edo. de México A1	<i>C. parvum</i>	4.0 m μ	5.0 m μ	5.0 m μ
Humano H1	<i>C. parvum</i>	4.5 m μ	5.2 m μ	5.2 m μ
Veracruz V2a	<i>C. parvum</i>	3.85 – 4.0 m μ	4.5 m μ	4.5 m μ
Veracruz V2b	<i>C. parvum</i>	3.85 – 4.0 m μ	5.0 m μ	5.0 m μ
Veracruz V3	<i>C. parvum</i>	3.85 – 4.0 m μ	5.0 m μ	5.0 m μ
Veracruz V20	<i>C. parvum</i>	4.0 m μ	4.5 m μ	4.5 m μ
Hidalgo V9	<i>C. muris</i>	5.6 – 7.0 m μ	6 - 8 m μ	6 - 8 m μ
Hidalgo V10	<i>C. parvum</i>	4.4 m μ	5.0 m μ	5.0 m μ
Querétaro Q1	<i>C. parvum</i>	5.3 m μ	Coproantígenos	
Edo. de México V13	<i>C. muris</i>	6.5 – 7.5 m μ	7.5 - 8 m μ	*
Edo. de México V14	<i>C. muris</i>	5.5 m μ	6 - 8 m μ	**
Cd. de México V15	<i>C. muris</i>	5.5 m μ	6 - 8 m μ	**
Ratón V7	<i>C. muris</i>	6.5 – 8.0 m μ	7.5 - 8 m μ	7.5 - 8 m μ
California Q2	<i>C. andersoni</i>	6.5 – 8.0 m μ	7.5 - 8 m μ	7.5 - 8 m μ
Durango Z11	<i>C. parvum</i>	5.5 m μ	*	*

* AIF Oocistos marcados con anticuerpos monoclonales inmunofluorescentes. Los códigos a un lado del Estado de la República indican el aislado utilizado para hacer la morfometría comparativa

La morfometría entre la tinción ácido-resistente y los oocistos marcados por anticuerpos monoclonales presentó similitudes en cuanto a las dimensiones por medio de ambos sistemas. Los anticuerpos monoclonales no distinguen entre las especies de *Cryptosporidium* spp. por lo que los oocistos marcados fueron tanto de *C. parvum*, *C. muris* y *C. andersoni* (Figura 15 y 16).

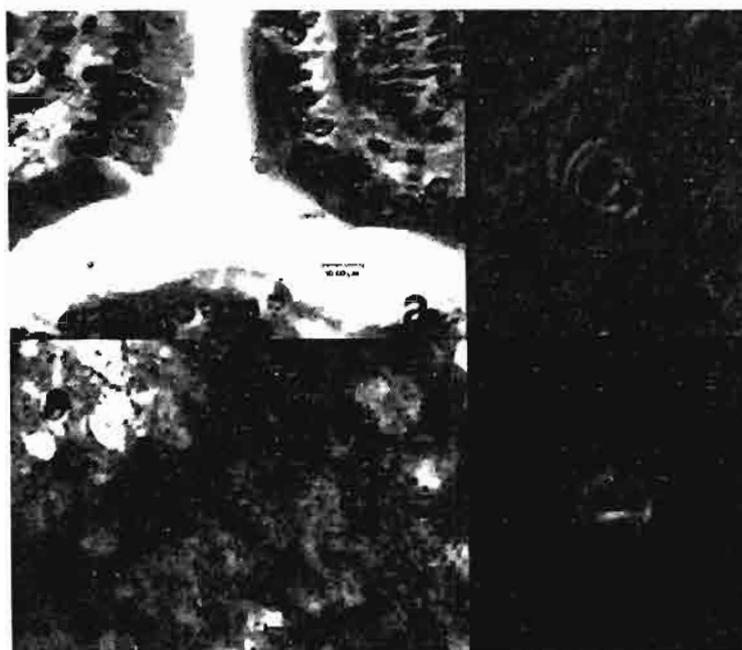


Figura 15. Oocistos de *Cryptosporidium parvum* genotipo bovino

a. Oocistos en fleón de becerro neonato (hematoxilina-eosina); b. Oocisto con microscopio de contraste de fases (DIC 100x); c. Oocistos teñidos con tinción ácido-resistente (Ziehl-Neelsen modificada 100 x); d. Oocisto inmunofluorescente marcado con anticuerpo monoclonal OW50 (100x) (Originales S. Vázquez Flores).

Durante el análisis morfométrico realizado por un sistema de cómputo de medición se tomaron imágenes fotográficas tanto del oocisto marcado con los anticuerpos monoclonales como de su imagen con los ópticos Nomarsky (de contraste diferencial de fases [DIC]) (Figura 15 y 16).

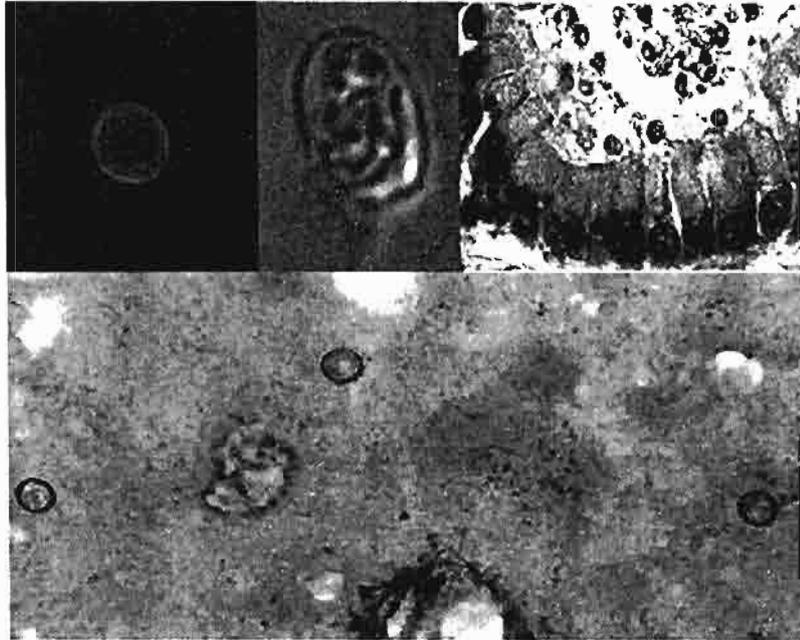


Figura 16. Oocistos de *Cryptosporidium andersoni*

- a. Oocisto inmunofluorescente marcado con anticuerpo monoclonal OW50 (100x);
 b. Oocisto con microscopio de contraste de fases (DIC 100x); c. Oocistos en las células gástricas de un torete (hematoxilina-eosina) (Cortesía del Dr. Steve Upton) d. Oocistos teñidos con tinción ácido-resistente (Ziehl-Neelsen modificada 100 x) (Originales S. Vázquez Flores).

11.1 Análisis de la prueba de detección de coproantígenos de *Cryptosporidium* en heces (ELISA)

El sistema diagnóstico para la detección de coproantígenos de *Cryptosporidium* spp. por medio de anticuerpos policlonales (ELISA) detectó la muestra de bovino como positiva. Los testigos positivo y negativo estuvieron dentro de los rangos esperados, y se colocó un segundo testigo positivo de un

infante con cryptosporidiosis activa, que presentó reacción positiva. La muestra de becerro presentó un valor de absorbancia de 0.917, mientras que las del infante fue de 0.367 (Figura 17).

TABLE OF ABSORBANCE VALUES
 FILE Cryptosporidium in calves
 SINGLE WAVELENGTH: 450 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Results
A	0.000	0.001	0.001	0.001	0.041	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001	
B	0.000	0.001	0.001	0.001	0.041	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001	
C	0.000	0.001	0.001	0.001	0.041	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001	
D	0.000	0.001	0.001	0.001	0.041	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001	
E	0.000	0.001	0.001	0.001	0.041	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.367	niño
F	0.000	0.001	0.001	0.001	0.041	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.917	becerro
G	0.000	0.001	0.001	0.001	0.041	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	1.274	(+)
H	0.000	0.001	0.001	0.001	0.041	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	(-)

Figura 17. Resultados de la prueba de detección de coproantígenos contra *Cryptosporidium* spp. por medio de la prueba de ELISA, con una densidad óptica de 450 nm, muestra que el aislado de bovino fue detectado como positivo, así como el testigo positivo de origen humano

12.0 DISCUSIÓN

El resultado genético en este estudio indica que los aislados que tuvieron características similares a los oocistos de *C. parvum* y *C. andersoni* fueron genéticamente *C. parvum* genotipo bovino. En aislado de becerro del estado de Veracruz la similitud con *C. parvum* fue del 97%, el fragmento del gene 18S ARNr fue de 1289 pb lo que equivale al 76% del gene completo. La diferencia entre *C. andersoni* y *C. parvum* es del 93% y con *C. felis* del 95%. También se determinó que los oocistos provenientes de un rancho de California, USA, consistentes con el tamaño de *C. andersoni* y *C. muris* de becerro (Xiao, *et al.*, 1998), son idénticos uno al otro según el análisis realizado en el GenBank.

El hallazgo más importante del presente trabajo es que la dimensión de los oocistos no está correlacionada con la especie y genotipo correspondiente al *Cryptosporidium parvum* descritos en la literatura reciente. Un artículo de Upton y Current de 1985, describe numerosos oocistos consistentes con las dimensiones de *C. parvum* y *C. muris* en becerros de la Universidad de Auburn en Alabama, EUA, en tres becerros de 27 que examinaron. Este descubrimiento se realizó durante un brote epidémico de cryptosporidiosis dentro de su estación experimental. En la típica descripción de la presencia de *C. muris* (*C. andersoni*), el hallazgo de esta dimensión de oocistos se realiza en bovinos adultos y en este artículo se reporta también la presencia de oocistos grandes exclusivamente en un becerro neonato, asociando la presencia de oocistos con diarrea leve (Upton y Current, 1985). En 1982, Pavlásek describe el tamaño de los oocistos obtenidos a partir de yeyuno e íleon, purificados por medio del método de flotación con $ZnSO_4$ de 4.5 a 6.3 μ y 3.5 a 6.0 μ , con formas elípticas y redondas (Pavlásek, 1983). En el año 2000, Sréter y colaboradores, describen la presencia de oocistos con las mismas características morfológicas de *C. muris* o *C. andersoni*, mediante estudios de infectividad en ratas y ratones donde inoculan con los oocistos de dimensión parecida a *C. muris*, sin mostrar signos de infectividad, adicionalmente estudian un gene 18S ARNr identificando un fragmento que

colocan en el GenBank. Hay que recordar que *C. muris* se describió originalmente en ratones (Tyzzer, 1912), y es común encontrarlo en ratones, no en ratas. Al analizar el fragmento del gene 18S ARNr por medio del mismo sistema de GenBank que colocan como *C. andersoni*, éste es idéntico a *C. parvum*, por lo que el resultado que ellos obtienen es consistente con el hallazgo de la presente tesis. Cómo este ejemplo, hay muchos otros de grupos de investigadores japoneses, polacos y norteamericanos, en donde la descripción no es sustentada por una secuencia genética que demuestre que no es *C. parvum* (Uga, *et al.*, 2000; Katsumata *et al.*, 2000; Cai, *et al.*, 1992; Lindsay, *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2000; Satoh, *et al.*, 2003).

Upton y Current, describen también que en los últimos tres años ellos observaron que un 5% de vacas adultas, han presentado oocistos de tamaño consistente con el entonces denominado *C. muris*. Desde esta fecha, no hay descripciones de brotes epidémicos o muestreos selectivos que describan dos tamaños. En el centro de investigación VMTRC (Veterinary Medicine Teaching and Research Center), de la Universidad de California campus Davis, California, EUA, se realizaron numerosos estudios en la zona del valle de San Joaquín, California, USA, con más de 4000 animales muestreados de todas las edades productivas y se describieron constantemente dos tipos diferentes de *Cryptosporidium* spp. consistentes con las medidas de *C. parvum* y *C. andersoni* en becerros y vacas adultas (C. Holmberg y S. Vázquez-Flores) (observaciones no publicadas). Dado que en ese período de investigación, el diagnóstico genético estaba en sus etapas iniciales no se hicieron análisis más allá del género *Cryptosporidium* spp. por PCR.

Hasta el momento, en varias publicaciones donde describen la especie que se considera como *C. andersoni*, por medio de diagnóstico morfológico y genético, no incluyen una secuencia en el GenBank que demuestre que efectivamente es una especie diferente (Morgan-Ryan, *et al.*, 2000; Sréter, *et al.* 2000; Satoh, *et al.*, 2004). No hay evidencias sólidas para demostrar que hay alguna diferencia entre *C. muris* de *C. andersoni*; después de casi 5 años de la descripción de la nueva

especie en bovinos, no secuencias del gene 18S ARNr o del gene COWP en el GenBank que sea diferente a *C. muris*. Dos ejemplos concretos son las secuencias en el GenBank que se atribuyen a *C. andersoni* para el gene 18S ARNr: AB089285 (1722 pb) y AY282707 (375 pb), y para el gene COWP: AY282693 (506 pb), AF266262 (504 pb), AB089289 (404 pb), cuya similitud con *C. parvum* es del 98%.

El método genético de identificación es correcto, sin embargo, los fragmentos del gene 18S ARNr seleccionados por los investigadores no fueron útiles para demostrar que han encontrado una segunda especie que infecta a bovinos, porque la diferencia debe ser mayor al 98 y 100% al ser comparada con las secuencias genéticas de *C. parvum*.

Dos de los indicadores que podrían auxiliar en la determinación de la especie *C. andersoni* son la localización del protozooario dentro del hospedador y la edad de infección de esta especie en el hospedador. Según el Dr. Ronald Fayer (comunicación personal), la estrategia para determinar genotipo y especie, debe ser la combinación de: 1) El gene de actina y el HSP-70, junto con el análisis del gene 18S ARNr; 2) estudios de infectividad, incluyendo la diferencia de edad del hospedador y el número de oocistos que producen para determinar cual es el rango de hospedadores de esta especie particular; y 3) algunos datos morfológicos y yo agregaría, la localización de los oocistos dentro del hospedador. La localización física de ambos *Cryptosporidium*, es un factor diferencial esencial, es decir, *C. parvum* se encuentra en el intestino delgado (en yeyuno e íleon), y *C. andersoni* o *C. muris* se encuentra en las células C de la mucosa gástrica (Anderson, 1981). Claro está, que no se está exhortando a hacer necropsias de bovinos para saber si es la especie infectante relacionada con la cryptosporidiosis gástrica, pero se requiere un estudio que corrobore su localización con una secuencia genética equiparada.

Hasta el momento, este trabajo sustenta la información morfológica que se ha publicado de la presencia de *C. parvum* en ganado en México, (González, *et al.*, 1983; Maldonado-Camargo, *et al.*, 1998), adicionalmente, se utilizó el gene

COWP para realizar la genotipificación, y se llegó a la misma conclusión que con el gene 18S ARNr, que el ganado bovino muestreado presenta *C. parvum* genotipo bovino, con excepción de un aislado del estado de Veracruz. Dicha secuencia no pudo amplificarse con los oligonucleótidos de la proteína de la pared del oocisto de *Cryptosporidium* (Terminal C y Terminal N), por lo que se desconoce si había polimorfismo en este aislado.

Puede considerarse que el aislado Veracruz con un 97% de similitud con *C. parvum* con el gene 18S ARNr, está fuera de los patrones definidos como similares genéticamente, sin embargo, una diferencia genética por sí misma no genera suficiente información para considerarlo una nueva especie, solamente se puede considerar como una variante o genotipo. Se puede demostrar que es un organismo diferente cumpliendo los principios de Koch y mediante las repeticiones necesarias por medio de muestreos y secuenciación de diferentes genes.

Al buscar la respuesta de qué determina una especie de otra y el acuñar nuevas especies o genotipos se debe basar en varios criterios, y el rigor científico indica que se deben cumplir los postulados de Koch. Éstos postulados no son aplicables al 100% en muchos de los casos; el primer postulado no es posible cumplirlo en el caso de *Cryptosporidium* spp. puesto que se ha encontrado un gran número de bovinos clínicamente sanos que eliminan oocistos en heces en cantidad comparable con bovinos que manifiestan signos clínicos. Sin embargo, en el caso de los otros 3 postulados, si se pueden cumplir y el artículo que sustenta la especie supuestamente diferente a *C. muris*, que es *C. andersoni* de bovinos, no cumple más que con la característica del aislamiento y la reproducción de la enfermedad en ratones, no en bovinos porque no tuvieron éxito. Bajo estas reglas tan débilmente sustentadas, es difícil de creer que haya tantas especies de *Cryptosporidium* afectando a mamíferos, aves y reptiles, con tan poco margen de diferencia en cuando a sus secuencias genéticas y que no cumplen los principios básicos de patogenicidad.

La detección inmunológica por anticuerpos policlonales y monoclonales, no representa un apoyo para la diferenciación de especies, ni genotipos. El sistema

de marcado de oocistos por anticuerpos monoclonales se puede utilizar como auxiliar en la determinación del tamaño y como un sistema diagnóstico sensible para la detección del género en heces (Arrowood, 1997).

La variabilidad en tamaños de los oocistos no es un factor estudiado en *Cryptosporidium*, en relación con el medio ambiente, si bien, muchos autores están convencidos que el fenotipo está intrínsecamente ligado al genotipo, existen otros autores que no le dan importancia a este factor. Los parásitos hipermutan, permitiendo una rápida adaptación en ambientes hostiles o cambiantes, además de hay una adaptación antigénica que le permite permanecer más tiempo en el huésped sin ser detectado (Barry y McCulloch, 2001). Asumiendo el contacto estrecho entre becerros y bovinos adultos por estar confinados en espacios reducidos como es en explotaciones intensivas, si presentan el mismo genotipo de *C. parvum*, aún con oocistos de diversas dimensiones, puede que se trate de un genotipo dominante y los sistemas de detección de otros genotipos que se han utilizado no sean adecuados cuando las infecciones son mixtas. Se puede tratar de otra fase del ciclo biológico excretada y no nada más se excretan los oocistos maduros, con capa delgada o gruesa (Holmberg, comunicación personal).

Las prácticas de manejo pueden variar entre explotaciones con diferencias en: la alimentación, desparasitaciones contra nematodos, trematodos u otros protozoarios, tratamientos antidiarreicos, desinfectantes, estado inmune, estado productivo, presencia de otros parásitos o agentes virales, bacterianos o ambos, en el tracto digestivo. Se sabe que *Plasmodium gallinaceum* tratado con rayos gama no puede replicarse en el mosquito *Aedes aegypti* (Terzian, 1961), en el caso de *Echinococcus multilocularis* tratados con Nitazoxanida, se observaron cambios en la morfología y sus ultraestructuras cuando se cultivaron *in vitro* (Stettler, et al., 2003).

Desde el punto de vista de la epidemiología clásica, la población bovina estimada de los estados muestreados (9, 869, 300 bovinos de leche) el 15 % son becerras de cría (148, 401), con una prevalencia del 50% de cryptosporidiosis, y un 99.9% de confianza en la prueba, se requerían solamente 19 animales para

determinar el agente responsable de la cryptosporidiosis. Puesto que la prevalencia en los estudios preliminares se estimó entre 90 y 95% en becerros neonatos (Vázquez-Flores, *et al.*, 1998), el número de becerros y adultos muestreados estimados disminuye considerablemente. Los estados seleccionados del estudio producen el 40% de la leche del país y representan el 10% de la población bovina de leche, por lo que se les considera estados de alta tecnificación, cuyos sistemas de producción son intensivos y exigen de sus vacas altas producciones, que aumentan el estrés, y las enfermedades infecciosas y metabólicas (Radostis, *et al.*, 1994). El tipo de análisis genético que se realizó cumple con las características de la Epidemiología Molecular, tomando en consideración que se determinó un agente, se conoce el huésped primario y se incluyó el clima como una parte del estudio del medio ambiente.

En cuanto a la implicación de *C. parvum* genotipo bovino en la salud pública se conoce que es responsable del 30% de las cryptosporidiosis humanas en otros sitios geográficos. No se estudiaron los factores de riesgo, puesto que para llegar a comprender éstos, era necesario determinar primero el agente etiológico que se presenta en algunas poblaciones bovinas, este trabajo presenta un sistema reproducible, sensible y específico para poder realizar el estudio de la población humana en riesgo, así como los factores que facilitan la transmisión de cryptosporidiosis bovina (Sagarpa, 2004¹, Sagarpa, 2004²).

La prevalencia de cryptosporidiosis mediante el análisis morfológico fue del 47.6%, considerando la totalidad de los animales muestreados. En cuanto a la prevalencia en becerros el 52.3% encontrado en el presente estudio es consistente con los hallazgos de Maldonado, *et al.*, 1998 que encontraron un 59% en becerros neonatos positivos a *Cryptosporidium* spp. por medio de análisis morfológico. La prevalencia del parásito presenta diferencias de región a región, los resultados del presente estudio indican que hay una gran variabilidad en la prevalencia (Tabla 7), donde en becerros neonatos se encontraron prevalencias desde un 32% como mínimo hasta un 72%. En bovinos adultos se ha encontrado en el Reino Unido una prevalencia del 62 al 92% (Scott, *et al.*, 1995), en el

presente estudio la prevalencia encontrada varió entre un 32% hasta un 100%, que en términos generales es la misma variabilidad del presente estudio. Olson y colaboradores establecen *C. andersoni* que en becerros es menos común que en bovinos adultos mediante un análisis morfológico (Olson, *et al.*, 1997).

La presencia de cryptosporidiosis por clima presentó un intervalo de 31.5 hasta un 61.7 % (Tabla 7). La predicción de la prevalencia realizada en Minitab determina un intervalo entre 40 a 63%, por lo que con base en los datos que se obtuvieron del clima, que se considera promedio a la presencia de cryptosporidiosis en cualquier edad de los bovinos y en cualquier clima. No se encontraron diferencias estadísticas por clima a la presencia de cryptosporidiosis, en la gráfica se muestra como las desviaciones estándar están incluidas entre sí, lo que significa que no parece haber una tendencia de un mayor número de casos en condiciones climáticas consideradas como desfavorables para la explotación de ganado como climas extremos o humedad relativa baja o alta (Gráfica 2).

Un estudio de la Universidad de Glasgow, en 1994, documenta que en sitios donde hay brotes intensos de cryptosporidiosis en becerros, el ganado adulto presenta oocistos de membrana gruesa y de tamaño similar a *C. parvum*, que no están asociados a manifestaciones clínicas, si bien el número de oocistos excretados llega hasta 720 millones en un día (Scott, *et al.*, 1994). En un artículo posterior, el mismo grupo no encuentra correlación entre la edad del bovino y la presencia de oocistos en tinciones ácido-resistentes (Scott, *et al.*, 1995). Esta información es interesante, porque no se considera usualmente a *C. parvum* como un parásito de adulto, ni menos un parásito que esté permanentemente en los bovinos siendo excretado en grandes número al medio ambiente. No está claro hasta el momento si las infecciones son crónicas o son infecciones nuevas y recurrentes.

En el presente estudio no se tomó en cuenta el segundo pico de prevalencia que se ha detectado en otros estudios en becerros de 6 meses de edad, que es un grupo susceptible pero no presenta manifestaciones diarreicas (Santín, *et al.*, 2004), éste es un hallazgo reciente que hubiera sido interesante

explorar al realizar los muestreos para tratar de identificar el parásito involucrado y hacer seguimiento de algunos animales hasta la edad adulta.

El análisis de oportunidad relativa apoya lo observado biológicamente en cuanto a transmisión y presencia de cryptosporidiosis, signos clínicos y dimensión de los oocistos. La oportunidad relativa para adquirir cryptosporidiosis fue más elevada para Veracruz en 74.9 veces, seguida del Estado de México con 50.1 y Ciudad de México con 21.3. Los tres valores más elevados fueron de la población adulta, lo que quiere decir que es elevada la probabilidad de adquirir cryptosporidiosis en vacas y vaquillas a primer parto, mucho más elevada que en caso de becerros neonatos puesto que la prevalencia en esta edad es también más elevada.

En el caso de los becerros la oportunidad relativa de obtener cryptosporidiosis fue más elevada en Coahuila y en el Estado de México, puesto que presentaron las prevalencias más bajas en comparación con los otros estados, lo que los hace grupos en riesgo.

El signo clínico que se consideró más importante fue la diarrea, la oportunidad relativa de tener diarrea fue más elevada en el estado de Veracruz, en 8.3 veces en el caso de los becerros. Y la diarrea estuvo en relación con la presencia de oocistos parecidos a *C. parvum* en un 73.9% lo que puede implicar que a mayor diarrea los oocistos excretados serán de tamaño pequeño. Análisis que coincide con las observaciones hechas en campo.

En el caso de la oportunidad relativa de encontrar *C. andersoni* relacionado con diarrea, el modelo estadístico no fue estable por lo que la respuesta arrojó datos incongruentes y no se incluyeron en los resultados. Por otro lado, no se ha demostrado que *C. andersoni* produzca enfermedad en ganado, por lo que puede pasar desapercibido si no hay manifestaciones clínicas y permanecer en los bovinos por tiempo indeterminado (Gasser y O'Donoghue, 1999).

En retrospectiva de lo que se podría mejorar en este estudio, resalta el hecho del muestreo el cual debería haber sido homogéneo en cuanto a las poblaciones de becerros y adultos muestreados. Por otro lado el sistema de hacer

los aislados combinando muestras, quizá no es un sistema deseable si la extracción del ADN se puede hacer directamente de heces, es preferible determinar el tipo de *Cryptosporidium* de muestras individuales y lo ideal sería clasificar los oocistos por dimensiones y extraer el ADN de los oocistos con diferentes dimensiones para correlacionar tamaño y resultado genético. La decisión de reunir muestras cuando no mostraran un buen número de oocistos, se tomó porque inicialmente el sistema de extracción demandaba un gran número de los mismos para obtener una cantidad de ADN para estandarizar las pruebas de amplificación. La técnica que se utilizó inicialmente en este trabajo de tesis fue un sistema para extracción de ADN de *Mycobacterium* spp. dada la similitud de la pared ácido-resistente entre ambos organismos. La razón por la que el método no fue práctico, es que se requerían grandes cantidades de oocistos para la extracción de 12 a 38 ng/ml con una cantidad inicial de oocistos de 8×10^5 / ml, resuspendida en 200 μ l. Esta cantidad se obtenía de una muestra fecal compuesta a partir de 5 becerros. Siendo tan pobre la cantidad extraída del ADN que no se pudo estandarizar la prueba, una de las posibles explicaciones es que los inhibidores no estaban siendo eliminados en su totalidad, y la amplificación no se lograba en la mayoría de los casos.

Por otro lado, la sensibilidad del método de extracción directa de heces, permitió la detección de muestras que presentaban un número reducido de oocistos, a razón de 1 oocisto por campo a 40 X al ser observados en frotis teñidos por tinción ácido-resistente, el sistema no se probó en muestras negativas (que aunque no se encontraran oocistos no significa que fueran negativas), puesto que el sistema de frotis teñidos no es muy sensible y es poco específico. El método da Silva, no es un método de tamizaje, aunque se detecten un 20% más casos positivos que por el diagnóstico morfológico, económicamente no es redituable, sin embargo la reproducibilidad de este método lo hace útil para otro tipo de muestras, por ejemplo: esputo, muestras en cultivo, tejido y heces formadas o diarreicas, así como agua y plantas, frutas y verduras sospechosas de contener oocistos de *Cryptosporidium* que por otros métodos diagnósticos serían

difíciles de detectar (da Silva, *et al.*, 2000). En este trabajo no se realizaron muestreos de piso, becerrerías, utensilios de alimentación, manos de los becerreros, etc. que podrían ser auxiliares en la determinación de la especie y genotipo de *Cryptosporidium* en el medio ambiente.

La presencia de los inhibidores en las muestras ambientales y fecales puede afectar la eficiencia del PCR al interferir en las reacciones entre el ADN y la polimerasa por procesos químicos y físicos. Existen tres mecanismos básicos que inhiben la amplificación de los ácidos nucleicos. El primero es la falla en la lisis celular. Uno de los factores más complejos para la extracción de ADN en los oocistos de *Cryptosporidium* spp. es el rompimiento de la pared celular (da Silva, *et al.*, 1999). Posteriormente la degradación y captura de los ácidos nucleicos. El ADN de los oocistos desintegrados de *Cryptosporidium* es digerido por la ADNasa puesto que los ácidos nucleicos se degradan por la enzima. También el templete de ADN puede permanecer secuestrado por lo que no se puede amplificar por medio de PCR; y por último, la inhibición de la actividad de la polimerasa. Existen inhibidores, que incluyen carbohidratos y otros productos que se degradan durante el proceso de extracción, que impiden la actividad de amplificación del fragmento de ADN (da Silva, *et al.*, 1999; Carey, *et al.*, 2004).

Un grupo de animales que pueden contribuir con otra pieza en la información de la transmisión de cryptosporidiosis y factores de riesgo, es el de los becerros de 4 meses de edad, un artículo reciente, del año 2004 encontró un segundo pico de excreción de oocistos (Santín, *et al.*, 2004). En un estudio realizado para la Universidad de California, EUA, se muestrearon animales de esa edad en 4 establos, encontrándose una muy baja prevalencia de *C. parvum* y *C. muris* en esta edad (0.03%) (observaciones no publicadas).

Uno de los aspectos que no se concluyeron en esta tesis fue la identificación correcta de un aislado de Veracruz con un 97% de similitud. Esto deja una línea de trabajo que pueda incluir factores de riesgo: diferencias entre razas de ganado, sistemas de producción, alimentación, muestreo de instalaciones, pisos, pastos, etc. y de ser posible la localización del parásito dentro

del hospedador, para determinar si este *Cryptosporidium* está en intestino delgado o en abomaso.

El muestreo de otros estados de la República que tengan participación en la producción lechera sería deseable, siguiendo el sistema de detección de *Cryptosporidium* directamente de heces y muestreando becerros neonatos, becerros destetados, vaquillas y vacas y aquellos humanos relacionados directamente con estos grupos, para poder hacer un seguimiento del protozooario en una población más amplia que nos de una idea más completa de la distribución del parásito y su implicación en salud pública.

13.0 CONCLUSIONES

I. La diferenciación morfológica por medio de la tinción ácido-resistente de los oocistos de *Cryptosporidium*, no es útil, ya que en el presente trabajo se demostró que los oocistos de dimensión consistente con *Cryptosporidium andersoni* (5.8 – 8.0 μm) genéticamente son *Cryptosporidium parvum* genotipo bovino.

II. La prevalencia en becerros neonatos fue del 32 hasta el 72 %, dentro de los intervalos normales esperados, mientras que la prevalencia en vacas fue del 36 al 47 % llegando hasta el 100% en un muestreo. La prevalencia en adultos por *Cryptosporidium parvum* no está bien establecida en la literatura y los resultados del presente trabajo indican que la cryptosporidiosis sin manifestación clínica y con un número de oocistos equivalente al de la excreción en becerros. Esto confirma que el ganado adulto es el contaminante ambiental silencioso más importante.

III. Los oocistos de *Cryptosporidium*, 3.8 – 5.3 μm , en becerros neonatos con diarrea fue consistente con *C. parvum* en un 73.9%.

IV. El análisis genético determinó que los aislados tienen entre un 99 y 100% de similitud solamente con *C. parvum* genotipo bovino. Se sugiere que los aislados con una similitudes entre 97 y 98% se pueden considerar como un genotipo diferente.

V. El identificar *C. parvum* genotipo bovino nos da información epidemiológica importante acerca de la distribución del genotipo que es responsable del 30% de la cryptosporidiosis en humanos en 8 regiones de la República Mexicana.

14.0 LITERATURA CITADA

1. Fayer, R., Andrews, C, Ungar, B.L., Blagburn, B. 1989. Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves. *J. Parasitol.* 75: 393-397.
2. Lindsay, D.S., Upton, S.J., Owens, D.S., Morgan U.M., Mead J.T. and Blagburn, B.L. 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from Cattle, *Bos taurus*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47(1):91-95.
3. Bornay-Llinares, F.J. da Silva A.J., Moura, I.N.S., Myjak, P., Pietkiewicz, Kruminis-Lozowska, W., Graczyk, T. K., Pieniazek, N. J. 1999. Identification of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecular methods. *Appl. Environment. Microbiol.* 65: 1455-1458.
4. Heine J., Pohlenz J.F.L., Moon H.W., Woode G.N., 1984. Enteric Lesions and Diarrhea in Gnotobiotic Calves Monoinfected with *Cryptosporidium* Species. *J Infec Dis.* 150:768-775.
5. Faubert, G.M. Litvisnky, Y. 2000. Natural transmission of *Cryptosporidium parvum* between dams and calves on a dairy farm. *J. Parasitol.* 86(3):495-500.
6. Iseki, M., Maekawa, T., Moriya, K., Uni, S. Takada, S., 1989. Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN66) in various laboratory animals. *Parasitol. Res.* 75:218-222.
7. Atwill E.R., Johnson, E., Klingborg, D.J., Veserat G.M., Markegard G, Jensen W.A. *et al.*, 1999. Age, geographic, and temporal distribution of

fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cow-calf herds. Am. J. Vet. Res. 60:420-425.

8. Pieniazek, J.N., Bornay-Llinares, J.F., Slemenda, B.S., da Silva, J.A., Moura, S.I.N., Arrowood, J.M., Ditrich, O. Addiss, G.D., 1999. New *Cryptosporidium* Genotypes in HIV-Infected Persons. Emerging Infectious Diseases 5(5): 45-51.
9. Tyzzer, E.E., 1907. A Sporozoan found in the peptide glands of the common mouse, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 5:12-13.
10. Tyzzer, E.E., 1910. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. J. Med. Res. 23:487-509.
11. Léger, I., 1911. *Caryospora simplex*, coccidie monosporé et la classification des coccidies. Arch Protistenkd 22: 71-88.
12. Tyzzer, E.E., 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. Nov.) a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Arch. Protistenkd. 26:394-412.
13. Panciera R.J., Thomassen R.W. Garner F.M., 1971. Cryptosporidial infection in a calf. Vet. Pathol. 8:479-484.
14. Tzipori S., Campbell I., Sherwood D., Snodgrass D.R. Whitelaw A., 1980. An outbreak of calf diarrhoea attributed to cryptosporidial infection. Vet. Rec. 1107:579-580.

15. Upton, S. J. Current, W.L., 1985. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) Infecting Mammals, *J. Parasit.*, 71(5):625-629.
16. Morgan-Ryan, U.M., Fall, A, Ward, L.A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R., Thompson, R.C.A., Olson, M., Xiao, L., 2002. *Cryptosporidium hominis* n.sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. 49(6):422-440.
17. Upton, S. 2003. Basic Biology of *Cryptosporidium*. <http://www.ksu.edu/parasitology/basicbio>.
18. Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J., 2004. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clin. Microbiol. Reviews*. 17(1):72-97.
19. Levine, N.D. 1985. Phylum II. Apicomplexa Levine 1970, p. 322-374. In JJ. Lee, S.H. Hunter, and E. C. Bovee (ed.), *An illustrated guide to the protozoa*. Society of Protozoologists, Allen Press, Lawrence, Kans.
20. Levine, N.D. 1970. Protozoan parasites of nonhuman primates as zoonotic agents. *Lab. Anim. Care*. 20(2):377-382.
21. Levine, N.D., 1988. Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. *J. Protozool.* 35(4):518-20.
22. Leger, L. 1899. Coccidie nouvelle de l'*Anguis fragilis*. *Comptes Rendus des Sciences del la Societe de Biologie (Paris)* 51: 309-311.
23. <http://www.mujiweb.cz/www/iroqer/crypto/phylum.htm>

24. Abrahamsen, M.S., Templeton, T.J., Enomoto, S., Abrahante, J.E., Zhu, G., Lancto, Ch.A., Deng, M., Liu, Ch., Widmer, G., Tzipori, S., Buck, G.A., Xu, P., Bankier, A.T., Dear, P.H., Konfortov, B.A., Spriggs, H.F., Iyer, L., Anantharaman, V., Aravind, L., Kapur, V. 2004, Complete Genome Sequence of the Apicomplexan *Cryptosporidium parvum*. *Science*. 304:441-445.
25. Perkins, M.E. 1992, Rhoptry Organelles of Apicomplexan Parasites. *Parasitol. Today*. 8(1):28-32.
26. Petry, F., Harris, J. R., 1999. Ultrastructure, fractionation and biochemical analysis of *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Intern. J. Parasitol.* 29:1249-1260.
27. Harris, J.R., Petry, F. 1999. *Cryptosporidium parvum*: Structural components of the oocysts wall. *J. Parasitol.* 85(5):839-849.
28. Piper, M. B., Bankier, A. T., Dear, P.H., 1998. A HAPPY Map of *Cryptosporidium parvum*. *Genome Research*, 8(12): 1299-1307).
29. Carey, C. M., Lee, H., Trevors, J. T., 2004. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts. *Water Research*. 28:818-862.
30. Zhu, G., Marchewka, M.J. Keithly, J.S. 2000. *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *Microbiol.* 146:315-321.
31. Spano, F., Crisanti, A., 2000. *Cryptosporidium parvum*: the many secrets of a small genome. *Internat. J. Parasitol.* 30: 553-565.

32. Petersen, C., 1993. Cellular Biology of *Cryptosporidium parvum*. Parasitol. Today. 9(3):87-91.
33. Goebel, E., Braendler, U. 1982. Gamogonic and sporogonic stanges of the developments of *Cryptosporidium* and their relationship to the epithelial cell of the intestine. In Miller, M., W. Gutteridge and P. Kohler, Eds. *Molecular and Biochemical Parasitology*. Elsevier, Amsterdam pp. 402-403.
34. Dubey J.P., Speer C.A., Fayer, R., 1990. *Cryptosporidiosis of Man and Animals*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 86.
35. Fayer, R., Ungar, B.L.P., 1986. *Cryptosporidium spp.* and cryptosporidiosis. Microbiol Rev. 50:458-483.
36. Landsverk, T. 1981. The epithelial covering Peyer's patches in young milk-fed calves. An ultrastructural and enzyme histochemical investigation. Acta. Vet, Scand. 22:198-210.
37. Anderson, B.C. 1987. Abomasal cryptosporidiosis in cattle. Vet. Pathol. 24:235-238.
38. Iseki, M. 1979. *Cryptosporidium felis* sp.n (Protozoa; Eimeriorina) from the domestic cat, JPN. J. Parasitol. 28:285-307.
39. Chermette, R., Boufassa-Ouzrouts, S., 1988. Cryptosporidiosis a cosmopolitan disease in animals and man. Technical series No. 5, Office International des Epizooties. Paris, France. 2nd edition. pp. 13-16.
40. Tzipori, S. 1983. Cryptosporidiosis in Animals and Humans. Microbiological Reviews pp. 84-96.

41. Casemore, D.P., 1990. Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis. *Epidemiology and Infection*. 104:1-28.
42. Malik, H.U., Maqbool, M., 1996. Cryptosporidiosis. *Int. J. Anim. Sci.* 11:53-61.
43. Dupont H., Chappell, C.I., Sterling, C.R., Okhusen, P.C., Rose, J.B., Jakubowsky, W., 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl J. Med.* 332:855-859).
44. Haas C.N., Rose J.B., 1994. Reconciliation of microbial risk models and outbreak epidemiology: The case of the Milwaukee outbreak. *Proceedings of the American Water Works Association*. pp. 517-523.
45. Angus. K.W., 1983. Cryptosporidiosis in man, domestic animals and birds: a review. *J.R. Soc. Med.* 76(1):62-70.
46. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services. *Cryptosporidium* is common in dairy calves. National Dairy heifer Evaluation Project. 1993. National Animal health Monitoring System, USDA:APHIS:VS, N119.293.
47. Vázquez-Flores, S., Ballesteros, R.G. y Méndez M.D., 1998. Detección de *Cryptosporidium muris* en bovinos neonatos la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo, CONAPAR' 98.
48. Maldonado-Camargo, S., Atwill, E.R., Saltijeral-Oaxaca, J.A., Herrera-Alonso, L.C., 1998. Prevalence of and risk factors for shedding *Cryptosporidium parvum* in Holstein Friesian dairy calves in central México. *Prev. Vet. Med.* 36:95-107.

49. González, C.A., González, M.L., 1997. Cryptosporidiosis en bovinos lactantes de hatos productores de leche en tres municipios del Estado de Nayarit. Taller Internacional: "La Cryptosporidiosis: un problema de Salud Pública y Salud Animal" UAM-Xochimilco, México, D.F.
50. Bukhari, Z., Smith, H.V. 1997. *Cryptosporidium parvum*: oocyst excretion and viability patterns in experimentally infected lambs. *Epidemiol. Infect.* 119 (1): 105-108.
51. Satoh, M., Hikosaka, K., Sasaki, T., Suyama, Y., Yanai, T., Ohta, M., Nakai, Y. 2003. Characteristics of a Novel type of bovine *Cryptosporidium andersoni*. *Applied and Environmental Microbiology.* 69 (1):691-692.
52. Kvac, M., Vitovec, J. 2003. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *J. Vet Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 50(9): 451-457.
53. Morgan, M. U. Sargent, D.K., Desplazes, O., Forbes, A.D., Spano, F., Hertzberg, H., Elliot, A., Thompson, A.C.R., 1998. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts, *Parasitology* 117:31-37.
54. Vázquez-Flores, S. Saltijeral, O.J.A. Méndez, M. Verdugo-Rodriquez, A, Hernández-Castro, R., Pieniazek, N.J., da Silva, A.J., 2005. Molecular epidemiology to assess morphometric differences in oocysts of *Cryptosporidium parvum* from bovine populations of México. *Vet. Par.* VETPAR1805 (aceptado).

55. Anderson, B.C., 1991. Prevalence of *Cryptosporidium muris*-like oocysts among cattle populations of the United States: Preliminary Report. J. Protozool., 38(6):14S-15S.
56. Faubert, G.M. Litvinsky, Y., 2000. Natural transmission of *Cryptosporidium parvum* between dams and calves on a dairy farm. J. Parasitol. 86(3):495-500.
57. Santín, M, Trout, JM, Xio, L., Zhou, L., Greiner, E., Fayer, R. 2004. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. Vet. Parasitol. 122:103-107.
58. Alderink F.J., 1985. The National Animal Disease Surveillance Program: determining the cost of livestock disease. Journal of Veterinary Medical Education 2(3):109-110.
59. Goodgame. R.W., 1996. Understanding intestinal spore-forming Protozoa: *Cryptosporidia*, *Microsporidia*, *Isospora*, and *Cyclospora*. Annals of Internal Medicine, 124(4): 429-441.
60. Guerrant, R.L., 1997. Cryptosporidiosis: An emerging, highly infectious threat. Emerging Infectious Diseases. 3(1).
61. Monge, R., Chinchilla, M., 1995. Presence of *Cryptosporidium* oocysts in fresh vegetables, Parasitology. 59(2): 202-203.
62. Harper, C.M., Cowell, N. A., Adams, B.C., Lanbgle, A.J., Wohlsen, T.D., 2002. Outbreak of *Cryptosporidium* linked to drinking unpasteurised milk. CDI. 26(3):449-450.

63. Gelletlie, R., Suart, J., Soltanpoor, N. Armstrong, R. Nichols, G., 1997. Cryptosporidiosis associated with school milk. *Lancet*. 4:350(9083):1005-1006.

64. Fayer, R., Moran, U., Upton, S.J., 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. Journ. for Parasitol.* 30:1305-1322.

65. Guerrant, R.L., 1997. Cryptosporidiosis: An emerging, highly infectious threat. *Emerging Infectious Diseases*. 3(1), January-March.

66. Chalmers, R. M., Sturdee, A.P., Bull, S.A., Miller, A., Wright, S.E., 1997. The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasitol. Res.* 83:478-482.

67. Scott, C.A., Smith, H.A., Mtambo, M.M.A., Gibbs, H.A., 1975. An epidemiological study of *Cryptosporidium parvum* in two herds of adult beef cattle, *Vet. Parasit.* 57:277-288.

68. Katsumata, T., Hosea, D., Ranuh, I.G., Uga, S. Yanagi, T. y Kohno, S., 2000. Short Report: Possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62(1):70-72.

69. Peng M.M., Xiao, L., Freeman, A.R., Arrowood, M.J., Escalante, A.A., Weltman, A.C., Ong, C.S.L., Mac Kenzie, W.R., Lal A.A, Beard, C.B., 1997. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: Evidence of two distinctive transmission cycles. *Emergent Infectious Diseases* 3(4) Oct-Dec.

70. MacKenzie, W. , Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E. Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B., Davis, J.P., 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the filtered public water supply. N. Engl. J. Med. 331:(3):161-167.

71. Monge, R., Chinchilla, M., Reyes, L., 1996. Estacionalidad de parásitos y bacterias intestinales en hortalizas que se consumen crudas en Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 44: 369-375.

72. Lengerich, E.J. Adiss, D.G., Marx, J. J., Ungar, B.L.P., Juranek, D.D.,1993. Increased exposure to *Cryptosporidia* among dairy farmers in Wisconsin. J. Inf. Dis. 167: 1252-1255.

73. Sulaiman, M.I., Xiao, L., Yang, C., Escalante, L., Moore, A., Beard, B.C., Arrowood, J.M., Lal, A.A., 1998. Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. Emerging Infectious Diseases 4 (4): 1-10.

74. Pieniazek, J.N. Bornay-Linares, J.F., Slemenda, B.S., da Silva, J. A. Moura, S. I. N., Arrowood, J.M., Ditrich, O., Addiss, G.D., 1999. New *Cryptosporidium* Genotypes in HIV-Infected Persons. Emerging Infectious Diseases 5(5): 45-51.

75. Morgan, M.U., Pallant, .L, Dwyer, W.B., Forbes, A.D., Rich, G., Thompson, A.C.R., 1998^b, Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. Journal of Clinical Microbiology 36(4): 995-998.

76. Situación actual de la producción de leche de bovino en México, 2004. J. L. Gallardo, Coordinador. L. Villamar, H. Pérez, E. Olivera (Eds.) Coordinación General de Ganadería, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México, D. F. <http://www.sagarpa.com.mx/>.
77. Guterbock, W., 1996. The Art of Raising Calves. Veterinary Medicine Teaching and Research Center. University of California-Davis.
78. Sischo, W.M., Atwill, E.R., Lanyon, L.E., George, J., 2000. *Cryptosporidia* on dairy farms and the role these farms may have in contaminating surface water supplies in the northeastern United States. *Prev. Vet. Med.* 43:253-267.
79. Mohammed, H.O., Wade, E., Schaaf, S., 1999. Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in dairy cattle in southeastern New York State, *Vet. Parasitol.* 83:1-13.
80. Quigley, J.D., Martin, K.R., Bemis, D.A., Potgieter, L.N.D., Reinemeyer, C.R., Rohrbach, B.W., Dowlen, H.H., Lamar, K.C., 1994. Effects of housing and colostrums feeding on the prevalence of selected infectious organisms in feces of Jersey calves. *J. Dairy. Sci.* 77:3124-3131.
81. Xiao, L., Morgan, U.M., Fayer, R., Thompson, R.C.A., Lal, AA., 2000. *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. *Parasitol. Today.* 16(7):287-292.
82. Radostis, O.M., Leslie, K.E., Fetrow, J., 1994. *Heard Health Food Animal Production Medicine.* 2nd ed. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania. pp. 189-190.

83. Pohlenz, J. Moon, H.W., Cheville, N.F., Bemrick, W.J. 1978. Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhea of calves. JAVMA 172(4):452-457.
84. Keusch, G.T., Hamer, D., Joe, A., Kelley M., Griffiths, J., Ward, H., 1995. Cryptosporidia--who is at risk? Schweiz Med Wochenschr. 6;125(18):899-908.
85. Tzipori, S., Smith, M., Halpin, C., Angus, K.W., Sherwood, D., Campbell, I.,1983. Experimental cryptosporidiosis in calves: clinical manifestations and pathological findings. Vet. Rec. 112: 116-120.
86. Goodgame, R.W., 1996. Understanding intestinal spore-forming Protozoa: *Cryptosporidia*, *Microsporidia*, *Isospora*, and *Cyclospora*. Annals of Internal Medicine, 124(4):429-441.
87. Casey, M.J., 1991. *Cryptosporidium* and bovine cryptosporidiosis: a review. Irish. Vet. J. 44:2-7.
88. Garber, L.P., Salman, M.D., Hurd, H.S., Keefe, T., Schlater, J.L., 1994. Potential risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. 205: 86-91.
89. Harp, J.A., Woodmansee, D.B., Moon, H.W., 1989. Effects of colostral antibody on susceptibility of calves to *Cryptosporidium parvum* infection. Am. J. Vet. Res., 50(12):2117-2119. *Erratum* in: Am. J. Vet. Res., 51(7):1115.
90. Singh, B., 1997. Molecular Methods for Diagnosis and Epidemiological Studies of Parasitic Infections. Int. Journ for Parasitol. 27(10):1135-1145.

91. Vázquez-Flores, S., 1997. Técnicas diagnósticas para la detección de *Cryptosporidium* spp. Curso teórico-práctico para el diagnóstico de enfermedades parasitarias emergentes. Calamanda, Querétaro, México.
92. García, L.S., Bruckner, D.A., Brewer, T.C., Shimizu, R.Y. 1983. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. J. Clin. Microbiol. 18:185-190.
93. Baxby, D., Blundell, N., Hart, C.A., 1984. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. J. Hyg. Camb. 92:317-323.
94. Pavlasek, J., 1982. First detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in calf faeces by flotation method. Folia Parasit. 29:115-118.
95. Arrowood, M. J., Sterling, C.R., 1989. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. Clin Microbiol. 27(7):1490–1495.
96. Webster, K.A., Smith H.V., Giles, M., Dawson, L., Robertson, L.J., 1996, Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in faeces: comparison of conventional coproscopical methods and the polymerase chain reaction, Vet. Parasit. 61:5-13
97. Sterling, C.R., Arrowood, M. J., 1986. Detection of *Cryptosporidium* sp. infections using a direct immunofluorescent assay. Pediatr Infect Dis. Jan-Feb;5(1 Suppl):S139-42.
98. Anusz, K. Z, Mason, P. H., Riggs, M. S., Perryman, L. E., 1990. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in bovine feces by monoclonal

- antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 28(12):2770-2774.
99. Lorenzo, M.J. Ben, B., Mendez, F., Villacorta, I., Ares-Mazas, M. E., 1995. *Cryptosporidium parvum* oocysts antigens recognized by sera from infected asymptomatic adult cattle. *Vet. Parasitol.* 60:17-25.
100. Cai, J., Collins, M. D., McDonald, V., Thompson D.E., 1992. PCR cloning and nucleotide sequence determination of the 18S rRNA genes and internal transcribed spacer 1 of the protozoan parasites *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1131(3):317-20.
101. Spano, F., Puri, C., Ranucci, L., Putignani, L., Crisanti, A., 1997. Cloning of the entire COWP gene of *Cryptosporidium parvum* and ultrastructural localization of the protein during sexual parasite development. *Parasitol.* 114:427-437.
102. Widmer, G., Orbacz, E. A., Tzipori, S. 1999. β -tubulin mRNA as a marker of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Appl. and Environ. Microbiol.* 65(4):1584:1588.
103. Gobet, P., Toze, S., 2001. Sensitive genotyping of *Cryptosporidium parvum* by PCR-RFLP analysis of the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *FEMS Microbiol. Letter* 200:37-41.
104. Spano, F., Putignani, L., Guida, S., Crisanti, A., 1998. *Cryptosporidium parvum*: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C1 (Thrombospondin-Related Adhesive Protein of *Cryptosporidium*-1) gene discriminates between two

alleles differentially associated with parasite isolates of animal and human origin. *Experimental Parasitol.* 90:195-198.

105. Sulaiman, I. M., Xiao, L., Lal, A. A., 1999. Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(10):4431-4435.
106. Cacció, S., Homan, W., Camilla, R., Traldo, G., Kortbeek T., Pozio, E. 2000. A microsatellite marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology.* 120:237-244.
107. Sherwood, D., Angus, K.W., Snodgrass, D. R., Tzipori, S. 1982. Experimental Cryptosporidiosis in laboratory mice *Inf. and Imm.* 38(2):471-475.
108. Moon, H.W., Bemrick, W.J., 1981. Fecal transmission of calf cryptosporidia between calves and pigs. *Vet Pathol.* 12:248-255.
109. Awad-Ei-Kariem, F.M., Robinson, H.A., Dyson, D.A. Robinson, H.A., Dyson, D.A., Wright, S. Fow, M.T., McDonald, V., 1995. Differentiation between human and animal strains of *Cryptosporidium parvum* using isoenzyme typing. *Parasitology.* 110:129-132.
110. Nina, J.M.S., McDonald, V., Deer, R.M.A., Wright, S.E., Dyson, D.A., Chiodini, P.L.C., McAdam, K.P.W.J., 1992. Comparative study of antigenic composition of oocyst isolates of *Cryptosporidium parvum* from different hosts. *Parasite Immunology.* 14:227-232.

111. Ogunkolade, B.W., Robinson, H.A., McDonald, V., Webster, K., Evans, D.A., 1993. Isoenzyme variation within the genus *Cryptosporidium*. *Parasitology Research*. 79:385-388
112. Webster, K.A., 1993. Molecular methods for detection and classification of *Cryptosporidium*. *Parasitology Today* . 9(7):263-266
113. González Morteo, C., Gómez, E. S., de Aluja, S.A., 1983. *Cryptosporidiosis en bovinos lactantes (histopatología, microscopía electrónica y de barrido)*. *Vet. Mex.* 14:12-22.
114. Martínez, V., de Aluja, S.A. ,1986 Evaluación de dos métodos de tinción de frotis fecales para el diagnóstico de la cryptosporidiosis en becerros. *Vet. Mex.* 17:303-307.
115. Saltijeral, J.A., Martínez, R.I., Perezcovarrubias, J., 1997. Presencia de *Cryptosporidium* en becerras de 1 a 30 días de edad en establos de Lagos de Moreno, Jalisco. Taller Internacional: "La *Cryptosporidiosis*: un problema de Salud Pública y Salud Animal" UAM-Xochimilco, México, D.F.
116. Vázquez-Flores, S. 1998. Presencia de *Cryptosporidium muris* en becerros neonatos de la cuenca de Tizayuca, Hidalgo. XIII Congreso Nacional de Parasitología CONAPAR'98 Zacatecas, Zac. México, 8 y 9 octubre 1998

117. Vázquez-Flores, S. 1999. Identificación de *Cryptosporidium parvum* por la Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en bovinos neonatos. XXIV Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica. Morelia, Mich. México. 30 de junio al 3 de julio.
118. Anderson, B.C., 1981. Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. 178:982-984.
119. Atwill, E. R., 1996. Assessing the link between rangeland cattle and water-borne *Cryptosporidium parvum* infection in humans. Rangelands 18(2):48-51.
120. Ongerth, J. E., Stibbs, H. H., 1987. Identification of *Cryptosporidium* oocysts in river water. Appl. Envir. Microbiol. 53:672-676.
121. Köppen, W., 1948. Climatología. Fondo de Cultura Económica. México.
122. Información geográfica, INEGI, México, D.F. 2003. INEGI. <http://www.inegi.gob.mx/geo/default.asp>
123. Comisión Nacional del Agua , 2003, México, D.F. <http://smn.cna.gob.mx>.
124. Neyra, G. L., Durand, S.M., 1998. Biodiversidad. La diversidad biológica de México Capítulo 3. Estudio del país. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Conabio, México, D.F.
125. Gasser, R.B., O'Donoghue, P., 1999. Isolation, propagation and characterization of *Cryptosporidium*. Inter. J. of Parasitol. 29:1379-1413.

126. Olson, M.E., Giselle, N. J. O' Handley, R. M., Swift, M.L. McAllister, T.A., Jelinski, M.D., Morck, D.W., 1997. *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in British Columbia, Can. Vet. J. 38:703-706.
127. Microbial Protein Toxins. 2005. Series: Topics in Current Genetics, Vol. 11 Schmitt, Manfred J.; Schaffrath, Raffael (Eds.)
128. Upton, S. J., Current, W.L., 1985. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa : Cryptosporidiidae) Infecting mammals. J. Parasitol. 71(5):625-629.
129. Pavlásek, I., 1983. First detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in calf faeces by flotation method. Folia Parasitologica (Praha) 29:115-118.
130. Scott, C.A., Smith, H.V. Gibbs, H.A., 1994. Excretion of *Cryptosporidium parvum* oocysts by a herd of beef suckler cows. Vet. Rec. 134:172.
131. Rebhun, W.C., 1995. Diseases of Dairy Cattle. Williams & Wilkins, A Waverly Company, Baltimore, EUA. pp 155 – 183.
132. Perspectiva de la Ganadería Bovina en México, 2004. J. L. Gallardo, Coordinador. L. Villamar, H. Pérez, E. Olivera, (Eds). Coordinación General de Ganadería, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México, D. F. <http://www.sagarpa.com.mx/>.
133. Barry, J. D. y McCulloch, R., 2001. Antigenic variation in trypanosomes: enhanced phenotypic variation in a eukaryotic parasite. Adv. Parasitol. 49:1-70.

134. Terzian, L.A., 1961. Morphological changes produced by gamma radiation on the sporogonous cycle of *Plasmodium gallinaceum*. *Exptl. Parasitol.* 11:102-110.

135. Stettler, M. Fink, R., Walker, M. Gottstein, B., Geary, T.G., Rossignol, J. F. y Hemphill, A., 2003. *In Vitro* Parasitocidal Effect of Nitazoxanide against *Echinococcus multilocularis* Metacestodes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 47(2): 467-474.

15.0 APÉNDICE I

Molecular epidemiology to assess morphometric differences in oocysts of

Cryptosporidium parvum from bovine populations of México

Sonia Vázquez-Flores^{1,3}, Jorge A. Saltijeral O.³, R. Danilo Méndez M.¹, Antonio Verdugo-Rodríguez², Rigoberto Hernández-Castro², Norman J. Pieniazek⁴ and Alexandre J. da Silva⁴.

Departamentos de Parasitología¹ y Microbiología e Inmunología², FMVZ, UNAM.

Departamento de Producción Agrícola y Animal³, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. , México, D.F. Division of Parasitic Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, Georgia⁴.

Corresponding author: Sonia Vázquez-Flores; Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Cd. Universitaria, Coyoacán, 04510, México, D.F. Phone (5255) 5622-5896; Fax (5255) 5622-5900; e-mail address: soniavf@correo.unam.mx.

Abstract

A cross-sectional study was conducted in eight states from four different climates (dry semiarid, mid-latitude steppe, humid subtropical and tropical savannah) of México where intestinal bovine cryptosporidiosis was diagnosed. A total of 612 fecal samples from neonatal calves and cows (Holstein-Friesian and Holstein-Zebu cattle) were analyzed using modified Ziehl-Neelsen acid-fast staining, PCR of the 18S rRNA and the Cryptosporidium oocyst wall protein (COWP) genes. Sequencing analysis of the

amplified fragments was performed to ascertain the species of Cryptosporidium present in the specimens. Prevalence of Cryptosporidium varied from 31.5% up to 71.9%. Nominal logistic regression analysis showed a highly statistical difference for the presence of Cryptosporidium among dry semiarid, humid subtropical and tropical savannah climates. A Wilcoxon signed ranked test showed that the estimated median dimension for oocysts collected from bovine cattle from the mid-latitude steppe climate were consistent with the dimensions for Cryptosporidium parvum (4.8 x 4.3 μm). Fecal samples from other climates showed an estimated median of oocysts of larger dimensions than C. parvum, where 29% of the samples were in the range of C. andersoni (7.4 x 5.6 μm). Molecular analysis demonstrated that C. parvum (previously named Cryptosporidium parvum genotype 2) was the only species found in all samples. This is the first study involving morphometric differentiation and molecular analysis to ascertain Cryptosporidium species associated with cattle cryptosporidiosis from different climates of México.

Keywords: Cryptosporidium parvum; C. andersoni; 18S rRNA; COWP; bovine cattle; morphometric differentiation.

Introduction

Cryptosporidium parvum is a coccidian protozoan parasite with worldwide distribution in mammals including humans. Tyzzer in 1912 classified this coccidian species after observing it in mice and it has been recognized since 1971 (Panciera et al., 1971) as a pathogen of the small intestine of cattle, the clinical manifestations are acute and severe in neonatal calves in contrast with adult cattle that can be infected but show no clinical signs (Corwin, 1992). Bovine cryptosporidiosis was first detected in México in 1983 (González et al., 1983) and reported again in 1998 (Maldonado-Camargo et al.,

1998) where prevalence and risk factors were studied in Holstein-Friesian cattle of central México by morphological identification of oocysts shed in feces.

To date, only three species have been reported to be associated with intestinal cryptosporidiosis in cattle and humans, i.e., C. parvum, C. felis, and the recently reclassified C. andersoni (Bornay-Llinares et al., 1999; Pieniazek et al., 1999, Lindsay et al., 2000). The morphologic differences between C. felis and C. parvum are not striking, with both oocysts dimensions averaging 4.6 x 4.0 µm and 5.2 x 4.6 µm respectively. Bovines have also a gastric species once identified as Cryptosporidium muris genotype A (Morgan et al., 2000), but renamed as Cryptosporidium andersoni (Lindsay et al., 2000). This species has larger oocysts which measure of 7.4 x 5.6 µm in average, identified in juvenile and adult cattle.

In the last decade, molecular analysis bases on loci such as 18S rRNA, COWP, Trap-C, and HSP70 has developed into very reliable approaches to provide identification of Cryptosporidium at the species/genotype level (Pienazek et al., 1999; Spano et al., 1998; Spano et al., 1997; Graczyk et al., 2001; Sulaiman et al., 2000; Peng et al., 1997; Xiao et al., 2000, Abrahamsen et al., 2004). This has been of great value to genetically differentiate Cryptosporidium species or genotypes that cannot be easily distinguished on the bases of morphological differences, such as the C. hominis (previously known as C. parvum genotype 1) and C. parvum which affect humans only and bovine and humans, respectively (Morgan-Ryan, et al., 2002, Peng, et al., 1997). In this study we used PCR and DNA sequencing to precisely identify the species that were associated with bovine cryptosporidiosis in México. Fragments from the 18S rRNA and COWP gene were amplified by PCR and typed using DNA sequencing analysis. Cryptosporidium parvum was the only species identified in all samples analyzed.

Materials and Methods

2.1. *Fecal specimens.*

A cross-sectional sampling of convenience was conducted in four distinct climates: tropical savannah (A), dry semiarid (B), mid-latitude steppe (C), and humid subtropical (D) at eight different states (Veracruz [A], Coahuila [B], Durango, Querétaro, Zacatecas [C], Estado de México, Hidalgo, and México City [D]), where cattle farming is a predominant economical activity (Table 1). Sampling in most states took place during summer time, with the exception of climate A, where the collection was held during winter time (wet season for tropical savannah), in order to have similar wet season conditions. Dairy farm selection was upon the owner's complaint of clinical signs consistent with the potential presence of intermittent cryptosporidiosis. Fecal samples from the rectum of Holstein-Friesian and Holstein-Zebu cattle were collected from herds each with more than 100 animals. All neonatal calves (0-28 days of age) in the farm were sampled regardless of their clinical condition. All multiparous cows and first calf heifers were sampled when they shared the same maternity pen with their neonate calves for more than seven days. Of the 612 samples, 421 were from neonatal calves and the rest from adult female cattle, including first calf heifers (Table 2).

2.2. *Purification of oocysts.*

Oocysts in fecal samples were concentrated on the top of the vial using hydrogen peroxide 1:1 (H₂O₂:feces), the supernatant was used for the fecal smears that were stained with modified Ziehl-Neelsen as a screening test (Entrala et al., 1995). All positive samples were preserved individually in two containers; one was kept at -80 °C with no preservatives and the other in a 1:1 solution with 5% potassium dichromate. All fecal samples from the same region with less than 10 oocysts per smear were pooled together on a farm basis (Table 2).

2.3. *Morphological differentiation of Cryptosporidium isolates.*

Preliminary observations of smears on an optical microscope at 40x (Carl Zeiss de México, México D.F., 04010) showed two distinct sizes of oocysts in some of the samples. A double blinded study by two trained observers was held to determine the size of the oocysts on permanent stained slides with acid-fast. Measurements of 50 oocysts were taken with a calibrated optical microscope at 40x and 100x on stained fecal smears with modified acid-fast stain with the aid of an ocular micrometer at the Parasitology Laboratory, School of Veterinary Medicine, UNAM, México; and a subset of fecal smears were chosen randomly to be measured at the Division of Parasitic Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, USA. Oocysts were divided into two categories: C. parvum-like oocysts (from 3.4 to 5.5 μm) and C. andersoni-like oocyst (from 5.6 to 8.0 μm) (Xiao, et al., 2004; Lindsay et al., 2000).

2.4. *Positive and negative controls.*

Positive controls from Cryptosporidium parvum human and mouse origin from México and Cryptosporidium andersoni from cattle isolate kindly donated (Dr. Charles Holmberg, UC Davis, Tulare, CA) were used. Negative controls were: Cyclospora cayetanensis (human origin) kindly donated by the TLCB Silvia Valencia, Instituto de Pediatría, México), Giardia intestinalis (mouse origin), Neospora caninum (dog origin) and Eimeria bovis (bovine origin) (from the Parasitology Laboratory, School of Veterinary Medicine, UNAM, México).

2.5. *DNA extraction.*

DNA was extracted directly from the feces by the modified method of da Silva et al. (1999), briefly: 300 μl of Cryptosporidium positive fecal sample was washed twice with 0.01 M phosphate-buffered saline pH 7.2 containing 0.01M EDTA (PBS-EDTA) followed by centrifugation at 14,000 x g for 5 min. DNA extraction was performed

using the FastDNA kit (Q-Biogene, Carlsbad, CA) along with the FastPrep instrument (FP 120, Q-Biogene). The eluted DNA was then purified with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Inc., Santa Clarita, CA), following manufacturer instructions. DNA was preserved in H₂O until PCR amplification.

2.6. PCR amplification.

Several primers were used in order to amplify most of the variable region of the 18S rRNA gene (from 601 up to 1500 bp) in all isolates (Johnson et al 1995; Xiao et al., 1999) (Table 3). DNA from some of the samples was additionally amplified with COWP N-terminal (cry9-cry15) and C-terminal domain primers (cry12-cry14) (Spano et al., 1997) (Table 3). PCR reactions were performed by using AmpliTaq Gold® in the PCR master mix. Conditions of PCR amplification for the 18S rRNA gene were: an initial activation of AmpliTaq Gold® at 95° c for 15 min, 45 cycles of (94°C for 30sec, 65°C for 30sec, 72°C for 1.5 min) finishing with 72°C for 9 min. COWP amplification was performed as follows: an initial activation of AmpliTaq Gold® at 95° C for 15 min, 45 cycles (94°C for 50sec, 55°C for 30sec, 72°C for 50sec) with a last cycle of 72°C for 10 min. In addition to negative and positive template controls, every run included controls to detect PCR inhibitors in the extracted DNA as described elsewhere (da Silva et al., 1999). The PCR products were resolved by electrophoresis in a 2% agarose gel in TBE stained with ethidium bromide, visualized and photographed in a UV transilluminator (Fotodyne, Hartland, WI, USA).

2.7. DNA sequencing.

After purification of the PCR reaction with StrataPrep PCR purification Kit (Stratagene, Foster City, CA). The samples were analyzed on a Perkin-Elmer ABI 377 genetic analyzer.

2.8. Statistical and molecular analysis.

Differences between climates regarding presence of Cryptosporidium spp. were analyzed using Nominal Logistic Regression using the JMP 5.1 (SAS Institute Inc.). A Wilcoxon ranked test was used to analyze morphometric measurements of oocysts with Minitab 13.1 (BCIS Lab, Saint Cloud State University). Sequences were assembled and edited using the program SeqManII (DNASTAR Inc., Madison, Wis.). Consensus was made of the different amplified fragments using SeqManII and Omega 2.0 (Accelrys Software Inc. San Diego, CA, USA).

Results

Prevalence of Cryptosporidium varied from 31.5% up to 71.9%. Nominal logistic regression analysis showed a highly statistical difference for the presence of Cryptosporidium among dry semiarid, humid subtropical and tropical savannah (B, D, and A) climates (Table 4). Morphometric analysis showed two distinct groups of oocyst dimensions, where 71% were classified as C. parvum-like and 29 % as C. andersoni-like oocysts. The estimated median dimension for oocysts from the states of Coahuila, Zacatecas, Durango, Querétaro, Hidalgo and Veracruz was within the range of 3.8 - 5.3 μm comparable with C. parvum and C. hominis (Xiao et al., 2004). Oocysts from Estado de México and all samples from México City, showed an estimated median dimension consistent with C. andersoni in the range of 5.8 – 8.0 μm , (Lindsay et al., 2000) (Table 4). A Wilcoxon signed ranked test showed that the estimated median dimension for oocysts collected from bovine cattle from the mid-latitude steppe climate were within the range of C. parvum oocysts (4.85 x 4.39 μm).

The molecular analysis was performed in a minimum of 35 % and a maximum of 76% of the full length 18S rRNA gene, which is 1730 bp long. DNA typing analysis showed that 100% of samples originating from dairy and beef production cattle contained C. parvum (100% similarity with GenBank entries AY204240 and AY204238) regardless

of the dimension of oocysts. Same results were obtained with isolates from Coahuila, Zacatecas, Querétaro, Hidalgo, México City, Estado de México and Veracruz. These results were confirmed by the analysis of fragments from the COWP N- and C-terminal domains as genotyping tools.

Discussion

There were similar results in the Cryptosporidium oocyst detection in faeces from calves, first calf heifers and older cows, which may be due to the approach used in this study, i.e., the sample was concentrated prior to the preparation of the smear to be stained with acid-fast staining, which may have increased the sensitivity of the screening test. Prevalence studies in cattle solely based on morphological analysis can lead to mistakes regarding the species associated with the infection (Xiao et al., 2000). It is important to distinguish among C. parvum, C. felis, and C. andersoni because of public health implications as C. parvum and C. felis may cause disease in both immunocompetent and immunodepressed humans, while the C. andersoni has not been clearly shown to produce clinical signs in cattle, nor clinical disease in humans (Gasser, 1999). In this study, molecular analysis, revealed the presence of C. parvum only, despite the results of morphologic analysis, which indicated difference in oocyst dimensions in a 29% of the samples analyzed from groups A, B, D. This leads to a line of questions regarding the precise prevalence information on C. andersoni-like parasites in adult cattle. There was no evidence of any other Cryptosporidium affecting cattle besides C. parvum in México in other morphological studies, (González, et al., 1983; Maldonado-Camargo, et al., 1998), being the oocyst dimensions different than the usual parameters, the decision was taken to use a genotyping tool, such as COWP, as an alternative to target the polymorphism in Cryptosporidium (Xiao², et al., 2000).

Although the original publication describing C. andersoni did not make available sequencing data of the C. andersoni genes, other GenBank entries for C. andersoni 18S and COWP sequence data exist and they could be used to strengthen this analysis (entries AB089285 [1722 bp], AY282707 [375 bp], for 18S and entries AY282693 [506 bp], AF266262 [504 bp], AB089289 [404 bp] for COWP n-terminal domain). It is also obvious that all GenBank entries for C. muris pre-dating renaming of the cattle C. muris to C. andersoni should be considered to be C. andersoni (e.g., L19069 for 18S rRNA). The comparison between COWP sequence data for C. andersoni and C. muris from Rock hyrax (GenBank entries number AF266262 and AF161579, respectively) show that they are 98% similar number.

Molecular analysis was not performed on the samples studied by Esteban and Anderson (Esteban and Anderson, 1995), which address the prevalence of C. muris in dairy farms cattle. Nevertheless, the isolate used in the study to rename C. andersoni was obtained from one of the dairies included in that study. A great number of animals from this particular herd had on the same fecal smear a mixture of different oocyst sizes, which overlaps with the sizes reported for C. parvum and C. muris. Most likely, the samples from this present study containing oocysts of two sizes represented cases of mixed infections, but this hypothesis was not confirmed with the molecular methods applied in this study, despite the fact that the PCR primers used to amplify the 18S coding region matched almost completely the C. andersoni sequence deposited in GenBank. Further research focusing on samples with similar characteristics should be useful to clarify this point.

Most of the isolates of the present study were quantified in a Nomarsky chamber (after purification with sucrose solution), and divided in two groups of oocysts, in the range of C. parvum and C. andersoni dimensions (data not shown) in 95 % of the cases the

smaller size oocysts was the dominant one. It is possible that the use of sucrose could have shrunk the oocysts due to dehydration, that is why the decision was taken to use the fixed stained smears as a more reliable method and that could be kept for future reference.

The group C climate showed only C. parvum-like oocysts in the morphological analysis. The farms that were sampled had a prevalent cryptosporidiosis that ranged from 57% to 72%; and in two separate samplings reached a 100%, with the same number of diarrheic cases. Group A, showed a higher number of adults with the C. andersoni like oocysts, 13 times more than the presence in calves or adults of the rest of the climates, with no clinical signs of the disease. Some reports have suggested an asymptomatic presentation of cryptosporidiosis in adult cattle (Scott, et al., 1994; Scott, et al., 1995; Atwill, et al., 1999), in the present study, from the 191 fecal samples of adult cattle, 37.7% were shedding Cryptosporidium, spp. oocysts and all were asymptomatic. Scott and coworkers (1995), did not find any correlation between age of animal and number of oocysts shed, information that was a constant in our observations.

Assuming that close contact among calves and cows, renders the same dominant genotype of Cryptosporidium, maybe different sizes of oocysts mean that we are detecting various stages of the biological cycle. There are other management practices that were not taken into consideration in this study and that can change the phenotype of the oocyst, for example, the use of treatments against nematodes, trematodes or other protozoa, or diarrhea treatments, disinfectants, nutrition, immune status, productive stage, other parasites. This is the first study, to our knowledge, that includes a fair sample size of cattle, from all ages, with clinical and asymptomatic animals, that deals

with prevalent and non-prevalent cryptosporidiosis, in a vast geographical area, and links phenotype with genotype.

Acknowledgments

The authors are grateful for the excellent technical support of Drs. Michael Arrowood and Iaci Moura and Henry Bishop. Sonia Vázquez-Flores was recipient of a scholarship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-119034) to obtain the degree of Doctorate in Biological Science from the Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.

Table 1. Climate characteristics of the 8 states sampled in the Mexican Republic

Climate	Mexican Republic State	Average Annual Temperature (°C) ¹	Average Annual Rainfall (mm) ¹	Vegetation ²
A. Tropical savanna (Aw)	Veracruz	24.6 (8.3-25.8)	1627.3 (275-2676)	Semi-deciduous tropical forest and mesophile forest, pasture
B. Dry semiarid (Bs)	Coahuila	17.5 (8 -25)	407 (71.5-2834.8)	Thorn forest, mesquite stands, pasture, shrubs
C. Mid-latitude steppe (Bsk)	Zacatecas	15.4 (14.1-22.1)	485 (131-978)	Bushes, crops, pasture, woods
	Durango	20.9 (8.3-26.5)	272.5 (35-1594.8)	Woods, bushes, pasture
	Querétaro	18.7 (13.2-25.1)	548 (169-1511.4)	Bushes, woods, crops
D. Humid subtropical (Cwa)	Estado de México	19.6 (22-24)	889.5 (503-2217)	Crops, woods, pasture
	México City	16.8 (10-18.2)	787.6 (383-1366)	Woods, crops
	Hidalgo	18.1 (11-19)	620.9 (181-3344.2)	Crops, woods, bushes

¹ Köppen, W. 1948. Climatología. Fondo de cultura económica. México. Geographical information, INEGI, México, D.F. 2003. ² CNA, 2003, México, D.F. <http://smn.cna.gob.mx>

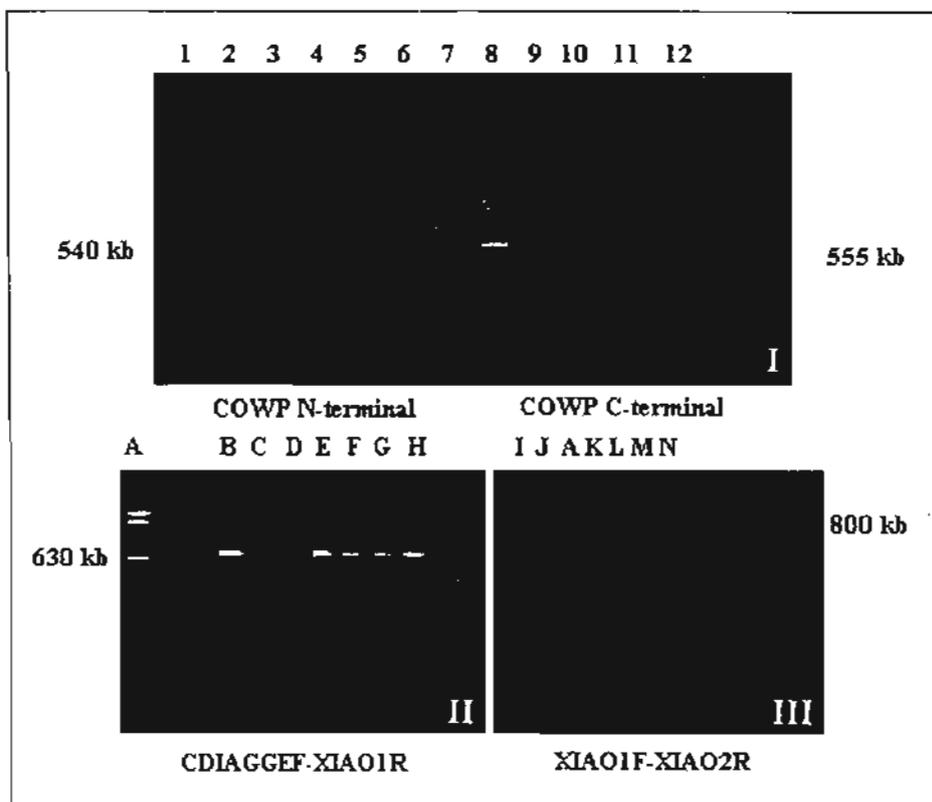


Figure 1. Distribution of *Cryptosporidium* spp. amplified with different primers. I. Oocyst wall amplifying isolates of the N- terminal region from Torreón (1,2), Zacatecas (3), Querétaro (4,5) and a mouse isolate (6,7), ladder 100 bp (8); the C-terminal region from Zacatecas (9), Querétaro (10), negative control (11) and mouse isolate (12). II. Amplified diagnostic fragment of the 18S rRNA, ladder 100 bp (A), positive control (B), Torreón (C, D), positive control (E), Edo. de México (F, G), positive control. III. Amplified diagnostic fragment of the 18S rRNA, *C. muris* genotype A (I, J), ladder 100 bp, positive control (K), *Giardia intestinalis* (L), positive control (M), *Cyclospora cayetanensis* (N). Positive control used for the 18S rRNA fragment was a cloned *C. parvum*.

References

1. Abrahamsen, M.S., Templeton, T.J., Enomoto, S., Abrahante, J.E., Zhu, G., Lancto, Ch.A., Deng, M., Liu, Ch., Widmer, G., Tzipori, S., Buck, G.A., Xu, P., Bankier, A.T., Dear, P.H., Konfortov, B.A., Spriggs, H.F., Iyer, L., Anantharaman, V., Aravind, L., and Kapur, V. 2004. Complete Genome Sequence of the Apicomplexan Cryptosporidium parvum. *Science*. 304, 441-445.
2. Anderson, B. C., 1988. Gastric cryptosporidiosis of feeder cattle, beef cows, and dairy cows. *Bovine Pract.* 23, 99-101.
3. Atwill, E. R., Johnson, E., Klingborg, D. J., Vesperat, G. M., Markegard, G., Jensen, Pratt, D. W., Delmas, R. E., George, H. A., Forero, L. C., Philips, R. L., Barry, S. J., McDougald, H. K., Gildersleeve, R. R., Frost, W.E. 1999. Age, geographic, and temporal distribution of fecal shedding of Cryptosporidium parvum oocysts in cow-calf herds. *Am. J Vet. Res.* 60, 420-425.
4. Bornay-Llinares, F., da Silva, A.J., Moura, I.N.S., Myjal, P., Pietkiewicz, H., Kruminis-Lozowska, W., Graczyk, T., Pieniazek, N.J., 1999. Identification of Cryptosporidium felis in a cow by morphologic and molecular methods. *App. Environ. Microbiol.* 65,1455-1458.
5. Carraway, M., Tzipori S., Widmer G., 1996. Identification of genetic heterogeneity in the Cryptosporidium parvum ribosomal repeat. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 712-716.
6. Casey, M., 1980. Cryptosporidium and bovine cryptosporidiosis. A review. *British Vet.* 1-5.
7. Corwin, R.M., 1992. Cryptosporidiosis: a coccidiosis of calves. *The Comp.* 1005-1007.
8. Comisión Nacional del Agua, 2003, México, D.F. <http://smn.cna.gob.mx>.
9. da Silva, A. J., Bornay-Llinares, F. J., Moura, Iaci, N.S., Slemenda, S. B., Tuttle, J. L., Pieniazek, N.J., 1999. Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens. *Molecular Diagnosis.* 4, 57-64.
10. Entrala, E., Rueda-Rubio, M, Janssen, D. Mascaró, C., 1995. Influence of hydrogen peroxide on acid-fast staining of Cryptosporidium parvum oocysts. *Int. J. Parasitol.* 25,1473-1477.
11. Esteban, E., Anderson, B.C., 1995. Cryptosporidium muris: Prevalence, persistency, and detrimental effect on milk production in a drylot dairy. *J. Dairy. Sci.*, 78, 1068-1072.
12. Gasser R.B., O'Donoghue, P., 1999, Isolation, propagation and characterization of Cryptosporidium. *Inter. J. of Parasitol.* 29, 1379-1413.

13. González, M.C., Gómez, E.S., Aluja, A.S., 1983. Cryptosporidiosis en bovinos lactantes (histopatología, microscopía electrónica y de barrido) (in Spanish, with English abstract) *Vet. Mex.* 14, 12-22.
14. Johnson DW, Pieniazek NJ, Griffin DW, Misener L, Rose JB, 1995; Development of a PCR protocol for sensitive detection of Cryptosporidium oocysts in water samples. *Appl Env Microbiol.* 61,3849-38455.
15. Köppen, W. 1948. *Climatología*. Fondo de cultura económica. México, D.F.
16. Lindsay, D. S., Upton, S.J., Owens, D.S., Morgan, U.M., Mead, J.R., Blagburn, B.L., 2000. Cryptosporidium andersoni n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle, Bos taurus. *J. Eukaryot Microbiol.* 47, 33-39.
17. Maldonado-Camargo, S., Atwill, E.R., Saltijeral-Oaxaca, J.A., Herrera-Alonso, L.C., 1998. Prevalence of and risk factors for shedding of Cryptosporidium parvum in Holstein-Friesian dairy calves in central México. *Prev. Vet. Med.* 36, 95-107.
18. Morgan, U. M., Xiao, L., Monis, P., Sulaiman, I. Pavlasek, I., Blagburn, B., Olson, M. Upton, S.J., et al., 2000. Molecular and phylogenetic analysis of Cryptosporidium muris from various hosts. *Parasitol.* 120, 457-464.
19. Morgan-Ryan, U.M., Fall, A., Ward, L.A., Hijjawi, H., Sulaiman, I., Fayera, R., Thompson, R.C., Olson, M., Lal, A. and Xiao, L. 2002. Cryptosporidium hominis n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo sapiens, *J. Eukaryot. Microbiol.* 49, 433-440.
20. Panciera, R. J., Thomassen, R. W., Garner, F.M., 1971. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Path.*, 172, 479-484.
21. Peng, M. P., Xiao, L., Freeman, A.R., Arrowood, M.J., Escalante, A., Weltman, A.C. et al., 1997. Genetic polymorphism among Cryptosporidium parvum isolates supporting two distinct transmission cycles. *Emerg . Infect. Dis.* 3, 567-573.
22. Pieniazek, N.J., Bornay-Llinares, F.J., Slemenda, S.B., da Silva, A.J, Moura, i.n., Arrowood, M.J., Ditrich, O., Addiss, D.G., 1999. New Cryptosporidium genotypes in HIV-infected persons. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 444-449.
23. Riozsa, L., Reiczigel, J., Mojosros, G. 2000. Quantifying parasites in sample hosts. *J. Parasitol.* 86, 228-232.
24. Scott, C.A., Smith, H.V., Gibbs, H. A., 1994. Excretion of Cryptosporidium parvum oocysts by a herd of beef suckler cows. *Vet. Rec.* 134, 172.
25. Scott, C. A., Smith, H.V., Mtambo, M. M. A., Gibbs, H.A., 1995. An epidemiological study of Cryptosporidium parvum in two herds of adult beef cattle, *Vet. Parasitol.* 57, 277-288.

26. Spano, F., Puri, C., Ranucci, L., Putignani, L., Crisanti, A., 1997. Cloning of the entire COWP gene of Cryptosporidium parvum and ultrastructural localization of the protein during sexual parasite development. *Parasitol.* 114, 427-437.
27. Spano, F., Putignani, L., Crisanti, A., Sallicandro, P., Morgan, U.M., Le Blancq, S.M., Tchack, L., Tzipori, S., Widmer, G., 1998. Multilocus genotypic analysis of Cryptosporidium parvum isolates from different hosts and geographical origins. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3255-3259.
28. Sréter, T., Egyed, Z., Széll, Z., Kovács, G., Nikolausz, M., Márialigeti, K., Varga, I., 2000. Morphologic, host specificity, and genetic characterization of a European Cryptosporidium andersoni isolate. *J Parasitol.* 86, 1244-1249.
29. Sulaiman, I. M., Morgan, U.M., Thompson, R.C., Lal, A.A., Xiao, L., 2000. Phylogenetic relationships of Cryptosporidium parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2385-2391.
30. Sulaiman, I. M., Lal, A.A., Xiao, L. 2002. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of Cryptosporidium parasites at the actin locus. *J. Parasitol.* 88, 388-394.
31. Tyzzer, E. E., 1907. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 5, 12-13.
32. Xiao, L., Escalante, L., Yang, Ch., Sulaiman, I., Escalante, A., Montali, R., Fayer, R., Lal, A., 1999. Phylogenetic analysis of Cryptosporidium parasites based on the small subunit rRNA Gene Locus. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1578-1583.
33. Xiao, L., Alderisio, K., Limor, J., Royer, M., Lal, A.A. 2000. Identification of species and sources of Cryptosporidium oocysts in storm waters with the small subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5492-5498.
34. Xiao, L., Limor, J., Morgan, U.M., Sulaiman, I., Thompson, R.C., Lal, A., 2000. Sequence difference in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of Cryptosporidium parasites. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5499-5502.
35. Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U and Upton, S.J., 2004. Cryptosporidium Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clin. Microbiol.* 17, 72-9.