

UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU " DE LAS VILLAS  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
DEPARTAMENTO: MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MAESTRÍA  
SALUD ANIMAL AVANZADA

PREVALENCIA DE *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* EN CERDITOS DE HASTA 50 DIAS DE EDAD EN 6 UNIDADES DE LA PROVINCIA DE VILLA CLARA.

(Tesis presentada en opción al Título académico de Máster en Salud Animal Avanzada).

Autor: Dra. M.V. Livia Rodríguez Jiménez

Tutor: Dr. M.V. Pedro Y. de la Fe Rodríguez. MSc.

Consultante: Dr. M.V. Eduardo Cruz Muñoz

Santa Clara

2010

## **RESUMEN**

El presente trabajo se realizó con el objetivo de diagnosticar la presencia de *Cryptosporidium parvum*, causantes de desórdenes gastrointestinales y su implicación en las diarreas neonatales de los cerdos en sus primeras etapas de vida. Para este propósito, 90 cerditos fueron muestreados, distribuidos entre seis Unidades Porcinas de la provincia Villa Clara y clasificados en dos categorías (crías y precebas) teniendo en cuenta sus edades. Muestras fecales diarreicas fueron colectadas y usadas para determinar la presencia de *Cryptosporidium parvum*, usando un Kit ELISA disponible comercialmente (código: Bio K 077). En 9 muestras (10%) se obtuvieron resultados positivos. De ellas, 3 muestras (6.8%) corresponden a la categoría "crías " investigadas, mientras que 6 muestras (13.04%) resultaron positivas en la categoría " pre ceba", no considerándose una incidencia significativa entre categorías. La presencia de *Cryptosporidium parvum* fue diagnosticada en 5 unidades investigadas (83.3 %), pudiéndose afirmar que tiene una incidencia significativa.

## **ABSTRACT**

This work was carried out to diagnose the presence of *Cryptosporidium parvum*, causing of gastrointestinal disorders and its implication in the diarrheas neonatales of the pigs in its first stages of life. For this purpose, 90 pigs were sampled, distributed among six porcine Units of Villa Clara province and classified in two categories (offspring and pre-fattening) taking into account their ages. Diarrheal fecal samples they were collected and used to determine the presence of *Cryptosporidium parvum*, using a commercially available ELISA Kit (code: Bio K 077). In 9 samples (10%) were results positive obtained. Of them, 3 samples (6.8%) they belong to the investigated category "offspring", while 6 samples (13.04%) they were positive in the category pre – fattening, not being considered a significant incidence among categories. The presence of *Cryptosporidium parvum* was diagnosed in five of units surveyed (83.3%), being able to affirm that he/she has a significant incidence.



<b>1. INTRODUCCION</b> .....	1
<b>2. REVISION BIBLIOGRAFICA</b> .....	4
2.1 DEFINICION.....	4
2.2 HISTORIA.....	4
2.3 TAXONOMIA Y CARACTERIZACION GENETICA.....	5
2.4 CICLO BIOLOGICO.....	9
2.5 LOCALIZACION.....	11
2.6 FACTORES PREDISPOONENTES.....	11
2.7 PATOGENIA.....	12
2.8 INFECCIÓN.....	16
2.9 TRANSMISION.....	18
2.10 SINTOMAS.....	20
2.11 LESIONES.....	21
2.12 DIAGNOSTICO.....	21
2.12.1 Microscopia.....	22
2.12.2 Diagnostico molecular.....	23
2.12.3 Inoculación en animales de laboratorio.....	26
2.12.4 Biopsia intestinal.....	27
2.13 PROFILAXIS.....	27
2.14 TRATAMIENTO.....	28
2.14.1 Terapia suportiva.....	29
2.15 EPIDEMIOLOGIA.....	30
2.16 ASPECTOS NOVEDOSOS.....	32
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b> .....	37
3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	37
3.2 CARACTERISTICAS DE LAS MUESTRAS.....	37
3.3 OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	38
3.4 DIAGNOSTICO DE <i>CRYPTOSPORIDIUM PARVUM</i> .....	38
3.5 PROCEDIMIENTO.....	39
3.6 INTERPRETACION DE RESULTADOS.....	40
3.7 ANALISIS ESTADISTICO.....	40
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	41
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	49
<b>6. RECOMENDACIONES</b> .....	50
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	51



## **INTRODUCCION**

Las enfermedades del tracto gastrointestinal que afectan a los cerdos en todas sus etapas, son los mayores factores que limitan la eficiencia y el desarrollo de la producción global porcina (Thomson *et al.*, 2004). En la industria porcina de nuestro país las enfermedades digestivas continúan siendo un importante problema económico. De forma global, la prevalencia de procesos gastroentéricos en el año 2008 ascendió al 31% (IMV. 2008).

El *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) se presenta frecuentemente asociado a otros patógenos entéricos en la producción de diarreas. Se ha reportado su participación en el síndrome diarreico y en otras afecciones en prácticamente todas las especies de animales vertebrados jóvenes y adultos, principalmente en el ganado bovino, ovino, caprino, porcino, aves y otros (Klopfenstein *et al.*, 1999). Hay que señalar que muchas veces esta parasitosis cursa de forma asintomática. Esto ha sido confirmado por varios estudios recientes en poblaciones humanas y animales (León *et al.*, 2001).

La cryptosporidiosis esta presente a nivel mundial, han sido encontradas en 90 países y 6 continentes, incluyendo China (Chen *et al.*, 1992; Fayer *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002) y afecta un amplio rango de mamíferos, aves, reptiles y peces. Muchos brotes de cryptosporidiosis en humanos son atribuidos a contaminación de las fuentes de agua potable, para la alimentación y otros usos productivos. Las infecciones en personas inmunocompetentes son generalmente efímeras, mientras en personas inmunocomprometidas (sobre todo con el SIDA) estas pueden desarrollar un proceso crónico (O'Donoghue, 1995; Griffiths, 1998; Fayer *et al.*, 2000).

La cryptosporidiosis natural en cerdos ha sido reportada en todo el mundo (Izumiyama *et al.*, 2001; Wieler *et al.*, 2001; Maddox-Hyttel *et al.*, 2006; Vítovec *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2006; Langkjær *et al.*, 2007; Suárez-Luengas *et al.*, 2007; Zintl *et al.*, 2007).

Son parásitos que infectan el borde de las microvellosidades del epitelio gastrointestinal de un amplio rango de hospederos vertebrados, incluyendo al hombre. Los individuos infectados muestran un amplio espectro de presentaciones clínicas, pero el poder patógeno de los *Cryptosporidium* varia con la especie del parásito que

este involucrado, el tipo y la edad y el estado de inmunidad del hospedero. Las infecciones con *Cryptosporidium* no están asociadas a síntomas clínicos o están asociadas solamente con el curso agudo. En algunos animales, como los reptiles infectados por *Cryptosporidium serpentis* o individuos inmunodeprimidos, la infección tiene un curso crónico y puede eventualmente ser letal (Xiao *et al.*, 2004).

Esta establecida como una zoonosis y varias especies de animales pueden constituir reservorios importantes en la cadena epidemiológica de transmisión. En causa de diarrea en personas afectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) causando muchas veces la muerte (Chaisson *et al.*, 1998).

Estudios recientes han revelado que el cerdo puede infectarse con *C.parvum* (Enemark *et al.*, 2003; Widmer, 2004) y puede jugar un papel en la transmisión de este parásito entre los animales y el hombre (Ryan *et al.*, 2003).

La información generada en las investigaciones, hallazgos clínicos de campo, reportes de clínicas y laboratorios, es de suma importancia en el diagnóstico de situación de las principales enfermedades en los animales domésticos. Esta información permite tener elementos para sentar las bases para el diseño de programas de prevención, control y erradicación de las enfermedades en diferentes regiones del país (Rodríguez *et al.*, 2001).

La identificación de especies de este género *Cryptosporidium* basadas en técnicas como la morfometría y otras, son poco confiables, esto hace necesario el uso de técnicas más depuradas y específicas para la identificación de especies. En este sentido en el presente trabajo se describe un protocolo desarrollado para la detección de *C.parvum* en heces mediante el uso de una técnica de inmunoensayo enzimático en heces fecales (ELISA).

Para valorar el problema científico formulamos la siguiente **Hipótesis:**

La presencia de *Cryptosporidium* sp. en las pjaras de Cuba han sido reportada por los laboratorios provinciales de diagnóstico e investigaciones veterinarias, por métodos convencionales con bajos niveles de sensibilidad y especificidad diagnóstica, desconociéndose su prevalencia.

Para dar respuesta a la anterior hipótesis, nos planteamos el siguiente **Objetivo General**:

Determinar la prevalencia de *Cryptosporidium parvum* en cerdos diarreicos de la provincia Villa Clara.

**Objetivos Específicos:**

- Determinar la prevalencia de *Cryptosporidium parvum* en cerdos diarreicos entre 0 y 25 días de edad (crías).
- Determinar la prevalencia de *Cryptosporidium parvum* en cerdos diarreicos entre 26 y 50 días de edad (pre ceba).
- Realizar comparación de la prevalencia de *Cryptosporidium parvum* entre las dos categorías estudiadas y las 6 unidades muestreadas.

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **Definición**

Cryptosporidiosis: Enterocolitis auto limitante de distribución cosmopolita causada por parásitos coccidios *C.parvum*. Es común en rumiantes jóvenes, especialmente en terneros, algo menos en el hombre y cerdo y raro en perros, gatos y caballos. Otros *Cryptosporidium* causan la enfermedad en reptiles y aves. La enfermedad en cerdos se caracteriza por pérdida de peso y diarrea acuosa. A menos que el sistema inmune este comprometido es una enfermedad auto limitante (Anadón, 1996).

### **Historia**

Fue reconocido por primera vez en las glándulas gástricas de ratones de laboratorio por Tyzzer en 1907 identificándolo como *C. muris* y en 1912 fue identificado una segunda especie, localizada en el intestino delgado del ratón de laboratorio, al cual denominó *C.parvum*.

En ternero el primer caso fue notificado en Estados Unidos en un animal de 8 meses que padecía de diarrea crónica y posteriormente Meuten *et al.* , (1975) diagnosticaron el parásito en un ternero de 2 semanas de edad sin evidencia de otro agente enteropatógeno, por lo que señalan por primera vez a este protozoo, patógeno para el ternero. En esta misma década se presentaron casos de cryptosporidiosis en humanos diagnosticados por biopsia intestinal (Le Coz, 1995).

Fue reportado como un patógeno humano por primera vez en 1976 por Nime, desde entonces la cryptosporidiosis se ha incrementado, reconociéndose como causa severa de cuadros diarreicos tanto en personas con SIDA, como en personas sanas (Guerrant, 1997).

El parásito *Cryptosporidium* fue reportado por primera vez en cerdos en Estados Unidos por (Kennedy *et al.*, 1977).

En investigaciones realizados en 1985 se determinó en la provincia de Habana en las heces de 506 terneros de 1-30 días de nacido que el 25% estaba parasitado con *C.parvum*, reportándose la infección en cerdos por Cabrera *et al.*, (1985).

En humanos, en el periodo de 1991-1992 y primer semestre de 1997 se reportaron 14 casos de cryptosporidiosis en el sanatorio provincial de Pinar del Río para pacientes afectados por el SIDA (Coste, 1997)

Un brote de diarrea por infección con *Cryptosporidium* sp. ocurrió en la sala de lactantes de un círculo infantil en la ciudad de Pinar del Río en noviembre de 1996. De 25 niños en el salón, 10 tenían diarreas (64%) identificándose en 15 de ellos el parásito (Duarte, 1997).

### **Taxonomía y caracterización genética.**

McDonald, 2006 clasifica las especies del género *Cryptosporidium* de la siguiente manera:

1. Phylum: *Apicomplexa* (presentan complejo apical).
2. Clase: *Esporozoa* (reproducción sexual y asexual con formación de ooquistes).
3. Subclase: *Coccidia* (el ciclo presenta merogonias, gametogonias y esporogonias).
4. Suborden: *Eimeriorina* se desarrollan macro y microgametos de forma independiente, y el cigoto es inmóvil).
5. Familia: *Cryptosporididae* (los ooquistes presentan cuatro esporozoitos y ciclo vital monoxeno, es decir, con un solo hospedador).
6. Género: *Cryptosporidium*.
7. Especie: *parvum*, *muris*, *baileyi*, *meleagridis*

Para este género han sido denominados 19 especies o más; pero existen dudas de que estas sean especies diferentes, actualmente se habla de especies específicas para diferentes especies animales.

Varios autores describen diferencias en la cantidad de especies de *Cryptosporidium* reportadas, como:

Valle *et al.*, 2002 que describe por lo menos 21 especies de *Cryptosporidium*, pero solamente 6 u 8 son consideradas de importancia clínica (*C. parvum*, *C. wrairi*, *C. Felis*,

*C.meleagridis*, *C.baileyi*, *C. serpentis* y *C.nasurom*. Entre ellos, *C.parvum* es el que infesta a la mayoría de los mamíferos.

Lindsay *et al.* ,2000 describen 10 especies de *Cryptosporidium* .Éstos incluyen el *C. parvum* de los humanos y muchos mamíferos, *C.muris* de los roedores, *C. andersoni* de los rumiantes, *C. felis* de los gatos, *C. wrairi* de los cuyes, *C. meleagridis* y *C. baileyi* de los pájaros, *C. serpentis* y *C. saurophilum* de los reptiles, y *C. nasorum* del pez.

Por otro lado, (Fayer *et al.*, 2000,2001;Morgan - Ryan, 2002;Ryan, Xiao *et al.* 2004) reconocen 13 especies de *Cryptosporidium* reconocidas , basado en diferencias genéticas, morfología de los ooquistes y el sitio de la infección :*C. muris* en roedores, *C. andersoni* en el ganado, *C.parvum* en rumiantes y humanos, *C. wrairi* en gallinas guineas ,*C. hominis*, *C. meleagridis* , *C. baileyi*, *C. galli* en aves, *C. serpentis*, y *C. saurophilum* en serpientes, *C. molnari* en peces , *C. felis* en gatos y *C. canis* en perros.

Reportándose por otros autores 14 especies de *Cryptosporidium* (Xiao *et al.*, 2004; Caccio *et al.*, 2005; Fayer *et al.*, 2005).

Cuatro especies de *Cryptosporidium* han sido reportadas en cerdos: *C. suis*(anteriormente genotipo I porcino),*C.genotipo II porcino (GPII)* ,*C.parvum* y *C. muris*(Ryan *et al.* ,2003,2004;Hamnes *et al.*,2006;Langkjaer *et al.*,2007 )

Identificándose por otros autores 5 especies genotípicas de *Cryptosporidium* en cerdos: *C. parvum*, *C. muris*, *C. genotipo II porcino*, *C. suis* y un nuevo genotipo (*GenBank Accession No EF489037*), siendo el *C. suis* y el genotipo II los más comúnmente hallados. (Enemark *et al.*, 2002, 2003; Guselle *et al.*, 2003; Ryan *et al.*, 2003, 2004; Vitovec *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2006; Chen and Huang, 2007; Langkjaer *et al.*, 2007; Suárez- Luengas *et al.*, 2007; Zintl *et al.*, 2007)

Tradicionalmente, la clasificación taxonómica de la coccidia y otros protozoarios ha sido basada en los caracteres fenotípicos como la caracterización morfológica y la especificidad de hospedero (Fayer *et al.*, 2000)

Ryan *et al.*, (2004) describe el *C. suis* (genotipo cerdo I) de esta manera:

Descripción: Los ooquistes son excretados de forma esporulada.

Tipo de hospedero: cerdos (*sus scrofa*)

Otros hospederos: existe un reporte en un humano (Xiao, Wang *et al.*, 2002)

Localización en el hospedero: células epiteliales en el intestino delgado y grueso, con un período de pre patencia: 4.8 días (rango 2-9) y un período patente: 12.6 días (rango 9-15) (Enemark *et al.*, 2003)

Tiempo de esporulación: Los ooquistes son excretados de forma esporulada.

El parásito infesta el borde micro villar del epitelio intestinal de una gran variedad de mamíferos, aves y reptiles, siendo huésped específico en la mayoría de las especies.

Se han caracterizado dos genotipos, el genotipo 1 que ha sido aislado solamente de humanos infestados y el genotipo 2; considerado zoonótico; se ha aislado tanto de ganado infestado (vacas, corderos, cabras y caballos) como de pacientes humanos infestados (Pieniazek *et al.*, 1999).

El estudio de los genes de la subunidad pequeña del rRNA divide a las especies del género *Cryptosporidium* en dos grupos; uno formado por *C. muris* y *C. serpentis*, y otro formado por *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. wrairi*, y *C. parvum*.

Se han descrito ocho genotipos en *C. parvum* al estudiar los genes que codifican la proteína externa de membrana (COWP), la *thrombospondin-related adhesive protein C1* (TRAP-C1) y el 18S rRNA, siendo los de origen humano y bovino los que presentan mayor importancia clínica. El genotipo bovino se asocia a infecciones humanas producidas por contacto directo con bóvidos infectados o sus heces. Excepcionalmente, se ha descrito infecciones en los pacientes inmunodeprimidos asociadas a otras especies o a otros genotipos. También se han demostrado diferencias de virulencia entre los aislados en cultivo celulares y en ratones.

Hace algún tiempo, se pensó que el *C. parvum* era la especie responsable de la cryptosporidiosis humana. Esto es principalmente debido a una falta de conocimiento claro de la estructura de la especie del género *Cryptosporidium*. Con el uso de análisis genético que ayuda a la definición de las especies tendremos un conocimiento bueno de la taxonomía de *Cryptosporidium* sp. y las herramientas moleculares para diferenciar las especies con la morfología del ooquistes. Así, los numerosos estudios

han mostrado dos especies de *Cryptosporidium* de ser responsable para la mayoría de las infecciones de cryptosporidiosis humana, el *C.parvum* y *C. hominis* (Caccio *et al.*, 2000, Carreno *et al.*, 2001, Gasser *et al.*, 2001).

Los parásitos son esféricos o elípticos. En las células epiteliales del intestino presentan un tamaño entre 2 y 6  $\mu\text{m}$  y se encuentran localizados en vacuolas parasitóforas. Los ooquistes presentan cuatro esporozoitos, sin esporocistos, son ovoides y pueden medir entre 4,5 y 7,9  $\mu\text{m}$ . Tienen ocho cromosomas de tamaños moleculares semejantes y presenta uno de los genomas más pequeños de los organismos unicelulares eucarióticos (Rodríguez *et al.*, 2002).

Cuando el hospedero evoluciona, el *Cryptosporidium* sp. se va adaptando a un grupo particular de animales y desarrolla alguna especificidad de hospedero. Esto se ha demostrado en especies de *C.intestinal* en mamíferos. Además de las especies nombradas como *C. parvum*, *C. hominis*, *C. wrairi*, *C. canis*, and *C. felis*, hay muchos genotipos de *Cryptosporidium* existen otras especies como el ratón, caballo, oveja, hurón, marsupial, zorro, mofeta, ciervo, ratón americano, oso, y genotipos marsupiales, genotipos I y II del cerdo y genotipo bovino B. Muchos de ellos fueron considerados *C.parvum* previamente. Incluso dentro del *C. canis*, existen diferencias genéticas entre los parásitos del perro, coyotes y zorros. Es probable que el genotipo y las especies que mejor desarrollen adaptación-hospedero sean los mamíferos, existen numerosos genotipos de *Cryptosporidium* intestinales en el agua que no ha podido atribuírsele a animales en específico (Xiao *et al.*, 2000).

Probablemente esta adaptación de hospedero ocurra en especies de *Cryptosporidium* de reptiles y pajaros, pero en menor magnitud. Aunque este resultado pueda ser debido a la escases de estudios, las menores diferencias genéticas están presentes entre el *C. serpentis* de las serpientes y lagartos. Así, se ven *C. serpentis* y *C. saurophilum* en serpientes y lagartos, y el genotipo de la tortuga infecta tortugas (Xiao *et al.*, 2002). Esto también parece suceder para el *Cryptosporidium* en los pájaros. El *C. baileyi*, el *C. meleagridis* y el *C. galli* son todos encontrados en muchos pájaros diferentes, aunque los patos y gansos parecen tener genotipo hospedador -adaptado (Morgan *et al.*, 2000, 2001, Xiao *et al.*, 2002).

Se sugiere que al nombrar nuevas especies de *Cryptosporidium*, deben cumplirse cuatro requisitos básicos: (1) el estudio morfo métrico de los ooquistes (2) las caracterizaciones genéticas; (3) la demostración natural y, siempre que sea factible, por lo menos alguna especificidad de hospedero experimental; y (el 4) estar de acuerdo con el Código internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN) (Xiao *et al.*, 2004).

### **Ciclo biológico**

Klopfenstein (1999) plantea que el género *Cryptosporidium* como todas las coccidias, poseen un ciclo de vida asexuado y otro sexuado. Este ciclo se inicia en la producción asexuada, cuando el ooquistes infectante se desesquista y los esporozoitos liberados invaden las células para convertirse en trofozoítos y esquizontes (merogonia), de primera y segunda generación. Los merozoítos (merontes) procedentes de esta segunda generación, inician el ciclo sexuado en microgametocitos y macrogametocitos que dan origen a células masculinas (microgametos) y femeninas (macrogametos). Estos se unen, forman zisotes y luego ooquistes, unos de pared delgada que auto infectan y otros de pared gruesa que sale del exterior para contaminar otros huéspedes. La reproducción se hace dentro de una vacuola parasitófora en la célula de la vellosidad, que se observa con prominencia al microscopio. La localización es intracelular pero extra citoplasmática.

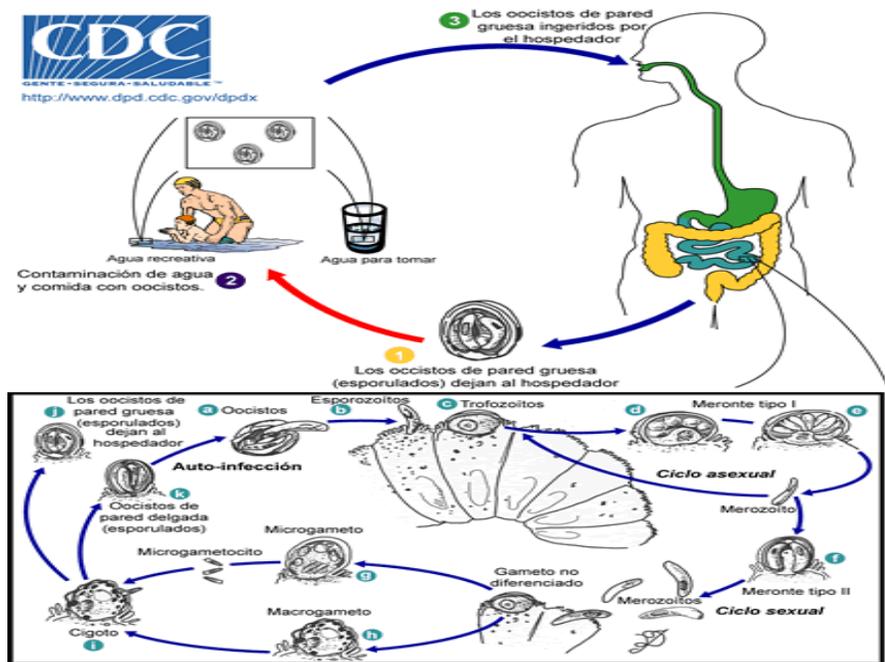
Los oocistos excretados en las heces son esporulados por lo que son inmediatamente infecciosos, en el huésped el oocisto produce cuatro esporozoitos sin esporocisto. El ciclo endógeno es corto (4-7 días), las etapas endógenas se encuentran inmediatamente por debajo de las membranas celulares epiteliales (Merck, 2006).

En el hombre pueden dar uno o más ciclos autoinfectantes. Los oocistos aparecen en las heces al comienzo de los síntomas clínicos y pueden seguir siendo excretados con ellas durante varias semanas después de desaparecer los mismos (Morgan-Ryan, 2002).

El ciclo se completa en un solo hospedador en dos días. La infección se produce por ingestión de ooquistes, provenientes de la contaminación fecal ambiental o de una persona o animal infectados. La exquistación se produce por contacto con agentes reductores, generalmente sales biliares o enzimas digestivas, aunque puede producirse

de forma espontánea. Aparecen cuatro esporozoítos móviles con forma de plátano que invaden la pared del epitelio intestinal. Se forma una vacuola parasitófora superficial formada por dos membranas provenientes del hospedador y por otras dos provenientes del parásito; esto hace que tenga localización intracelular, pero extra citoplasmática. Aparecen merozoítos intraluminalmente y, mientras algunos infectan otras células epiteliales del hospedador (originando un proceso de autoinfección), otros maduran sexualmente y forman cigotos. El ooquistes, que contiene cuatro nuevos esporozoítos, es infectivo al excretarse por las heces.

Los ooquistes están recubiertos de una pared gruesa que les confiere protección en el medio ambiente, pero un 20% de éstos presentan una pared fina y, por lo tanto, exquistan endógenamente, originando un fenómeno de autoinfección. En el medio ambiente se mantienen infecciosos durante meses en un intervalo amplio de temperaturas. La autoinfección es importante clínicamente, ya que la ingestión de pocos ooquistes puede originar procesos clínicos graves. La exquistación espontánea, en ausencia de sustancias reductoras, explica las infecciones pulmonares por este microorganismo (Rodríguez *et al.*, 2001).



Ciclo de vida de *C. parvum*.

### **Localización**

Su localización habitual es en el tracto gastrointestinal, fundamentalmente en la porción baja del intestino delgado, pero también puede parasitar otros órganos (León, 2001).

Trabajos recientes han detectado al *C.parvum* en la vesícula biliar de cerdo y corderos. También se ha detectado en los nódulos linfáticos mesentéricos, tráquea, pulmón y útero de una oveja (Thatcher & Friendhip, 2003).

### **Factores pre disponentes**

En un estudio epidemiológico realizado en la provincia de Ciego de Ávila en el período de 1987 a 1995 se determinó que los grupos de edades de 6-11 meses aportaron el mayor número de enfermos. No se detectó estacionalidad. La tenencia de animales en la vivienda, la práctica inadecuada de la lactancia materna, así como el lavado incorrecto de las manos, constituyeron factores de riesgo (Coste, 1997).

La cryptosporidiosis es más frecuente tanto en animales como personas inmunosuprimidos (MacKenzie, 2005).

Estudios realizados en Alemania y Hungría han mostrado que la crianza al aire libre tiene influencias negativas en los cerdos destetados (Bölcskei, *et al.* 1996), ocasionando bajas ganancias de peso y aumento de la mortalidad en cerdos de ceba (Bilic & Bilkei, 2006).

La infección coexistente del *C.parvum* y el *Síndrome atrófico multisistémico posdestete (PMWS)* provocada por el *circo virus porcino tipo 2 (PCV2)* puede ser de naturaleza accidental, la existencia de lesiones relacionadas con *C.parvum* en un cerdo afectado con PMWS, apoya la hipótesis de que los animales afectados con PMWS desarrollan un incremento de la susceptibilidad a las infecciones secundarias como resultado de un estado de inmunosupresión (Nuñez *et al.*, 2003).

La infección en cerdos de *PCV 2* esta asociada con una reducción temprana y severa de linfocitos CD4+ en los ganglios linfáticos (Sarli *et al.*, 2001) y sangre periférica (Segalés *et al.*, 2001) lo cual puede ser causa pre disponente a la infección cryptosporidial, como se ha demostrado en humanos (Xiao *et al.*, 2004)

La asociación entre los histiocitos y eosinófilos con infección de *PCV2* podrían inducir una función deficiente de la población de eosinófilos en su función de anti-parásito produciendo un aumento de la sensibilidad a las infecciones al parasitismo intestinal (Roitt *et al.*, 1998)

La mayor cantidad de pacientes positivos en Korea se debe a la mayor cantidad de población rural que esta más expuesta a este (Chai *et al.*, 2001)

### **Patogenia**

El *C.parvum* es un organismo protozoario obligado, son parásitos intracelulares que infectan las células epiteliales recubriendo la superficie luminal del tracto respiratorio y digestivo en una amplia variedad de hospederos. El único rasgo incluido es la ausencia de un período de esporulación fuera del hospedero (los ooquistes son infecciosos cuando ellos son vertidos en las heces), la falta de sporozoito dentro del ooquistes (es decir los sporozoitos están desnudos dentro del ooquistes) y la autoinfección (el ciclo de vida se repite dentro del mismo hospedero). Los ooquistes cryptosporidiales son pequeños: estos del *C.parvum* son de 4.5 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Aunque al menos se consideran 8 especies reconocidas de *C.parvum*, la cryptosporidiosis humana se le atribuye al *C.parvum*. Un número pequeño de infecciones atribuidas a otras especies de *Cryptosporidium* en humanos se ha informado, esencialmente restringidas a personas inmunocomprometidas (por ejemplo la inmunodeficiencia humana en personas enfermas con el SIDA) (Morgan *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2001).

Existen numerosos reportes sobre el predominio del *C.parvum* en el ganado doméstico como las cabras, llamas, ganado, ovejas, caballos y cerdos (Noordeen *et al.*, 2000; Rulofson *et al.*, 2001).

Al igual que otras coccidias, la infección por *C.parvum* es intracelular, pero además es extracitoplasmática, y se desarrolla debajo de la membrana celular o en el borde en cepillo de las células del epitelio intestinal.

Este ciclo también se ha descrito en otros epitelios (Kaplan, 2002). La cryptosporidiosis intestinal es caracterizada por diarrea acuosa severa pero puede, alternativamente, ser asintomático. La cryptosporidiosis pulmonar y traqueal en seres

humanos se asocia a toser y con frecuencia a una fiebre de calidad inferior; estos síntomas son acompañados a menudo por señal de diarrea intestinal severa (Prieto, 2004).

Según Martineau *et al.*, (2005) la cryptosporidiosis en cerdos se caracteriza por absorción de NaCl a la prostaglandina (PG) liberada por el tejido inflamado. Los resultados obtenidos en el trabajo de estos autores indican que las PGs alteran el transporte de NaCl en esta infección.

Los mecanismos de patogenicidad no están del todo establecidos. Estudios experimentales en porcinos demuestran que *C. parvum* inhibe la absorción de sodio glucosa dependiente. A su vez el aumento en la producción de prostaglandinas (PG) a nivel de la mucosa intestinal, colabora inhibiendo la absorción de cloruro de sodio, resultando en diarrea secretora. Estos efectos pueden ser, en parte debido a que PGE<sub>2</sub> actúa sobre componentes del sistema nervioso enterico o sea las vías neuronales colinérgicas y VIPérgicas (VIP: vasoactive intestinal peptide) y a la acción directa de la PGE<sub>2</sub> sobre los enterocitos.

Los mecanismos que llevan al aumento en la producción de prostaglandinas y la fuente de producción de las mismas no son conocidos; aunque se cree que las PG pueden ser formadas por los leucocitos residentes en el intestino y por los leucocitos presentes en la mucosa como respuesta a la infestación.

Las alteraciones en la permeabilidad intestinal también tienen un rol importante en la diarrea por cryptosporidiosis. El aumento de Interferón-gama producido durante la infestación aumenta la permeabilidad intestinal y disminuye la función de la barrera intestinal (Rodríguez *et al.*, 2001).

La respuesta del huésped a la infección es a través de inmunidad innata mediada por las células epiteliales y a través de inmunidad adquirida, mediada por linfocitos B y T. En estudios realizados en humanos y en ratas, se ha observado que la habilidad de resolver la diarrea se correlaciona con los niveles de CD4+T. Este dato es consistente con los casos clínicos de pacientes con *SIDA*, en los cuales cuando tienen un conteo de CD4+T de 200 c/mm<sup>3</sup> manifiestan enfermedad transitoria, mientras que cuando el conteo desciende a menos de 50 c/mm<sup>3</sup> CD4+T *C.parvum* coloniza los conductos

biliares y la probabilidad de sobre vivencia disminuye. El Interferón- gama tiene un rol principal tanto en la inmunidad innata como en la resolución de la infección por *C.parvum* (Dupont, *et al.*, 1995 y Caccio *et al.*, 2000)

El grado de infección depende del estado inmunológico del huésped. En huéspedes inmunocompetentes, la infección es generalmente aguda y auto limitante.

En individuos inmunosuprimidos puede convertirse en diarrea crónica, con deshidratación, debilidad y muerte. En estudios hechos en pacientes con SIDA, se encontró que la infección se extiende hacia el páncreas, conductos biliares, vesicular biliar y aparato respiratorio.

Los felinos clínicamente infestados muestran inapetencia, perdida de peso y diarrea de intestino delgado (Rodríguez *et al.*, 2001).

Varios reportes de casos de cryptosporidosis en animales inmunosuprimidos se han publicado: un caso de un gato infectado con el virus de la leucemia felina (+FeLV), en un gato con linfosarcoma (Lent *et al.*, 1993) y en un gato con enfermedad inflamatoria intestinal (Lappin *et al.* ,1997), produciendo duodenitis linfocítica plasmocítica sin embargo, la inmunosupresión no necesariamente precede la infección.

Puede producirse la infección por la ingestión de ooquistes y en el desarrollo de la enfermedad influye la exposición previa al microorganismo y el estado inmunológico del sujeto infectado. Estudios realizados en voluntarios sanos demuestran que puede producirse infecciones por la ingestión de menos de 3000 ooquistes. Histológicamente, el parásito se localiza dentro de las células epiteliales y pueden aparecer procesos de fusión o pérdida de vellosidades intestinales, hiperplasia de las criptas y cambios inflamatorios en la lámina propia con presencia de linfocitos, neutrófilos, células plasmáticas y macrófagos.

El ciclo completo del parásito puede reproducirse en embrión de pollo, en pulmón fetal humano y en células de riñón de cerdo. Se han desarrollado varias líneas celulares de origen intestinal, siendo la HT29.74 la más empleada en la evaluación de la utilidad terapéutica de diversos compuestos, pero esta línea, originada a partir de enterocitos humanos, sólo permite el desarrollo asexual del parásito. También se ha usado la línea

Caco-2, originaria de carcinoma de colon, para la producción de ooquistes. Las células de riñón canino Madin-Darby permiten el desarrollo asexual y sexual del parásito, pero no se producen ooquistes esporulados. Los estudios en animales se realizan en neonatos de varias especies como ratones, ratas, hamsters, cerdos, corderos y primates no humanos, pero la infección remite al desarrollarse los animales, lo que limita las investigaciones prolongadas. También se han empleado ratas y ratones atímicos, roedores inmunodeprimidos y primates infectados por el virus de la inmunodeficiencia de los simios. La mayoría de las investigaciones se han desarrollado con el genotipo 2, que es el que infecta a los animales de laboratorio, ya que el genotipo 1 sólo se ha identificado en hombres y en primates.

Los linfocitos T CD4+ son mediadores inmunológicos importantes en el control de la infección y se ha demostrado, en modelos experimentales, la asociación entre el déficit de los linfocitos T y la persistencia de la infección. Se detecta la presencia de anticuerpos del tipo IgG e IgM en todos los enfermos, incluidos los infectados por el VIH. Aparecen a los seis días de la infección y se mantienen durante muchos meses, incluso más de un año. También es posible detectar la presencia de IgA en el líquido duodenal de los pacientes, apareciendo a los 4-6 días de la infección y desapareciendo a los 15-20 días; según algunos datos experimentales, estos anticuerpos podrían estar implicados en la resolución del cuadro clínico.

La proteína CSL, de aproximadamente 1300 kDa es la glucoproteína apical de los esporozoítos y merozoítos y su neutralización con anticuerpos monoclonales protege de la infección en un modelo *in vivo*. Es la responsable de la infectividad del esporozoíto, ya que se une a las células epiteliales intestinales y, por lo tanto, es una diana prometidora en el diseño de vacunas (Seok-Hwa & Seong-Soo, 2001).

### **Infección**

Se han descubierto infecciones extraintestinales por *C.parvum* en ovejas y cerdos. Las infecciones fueron detectadas en mucosas de diferentes órganos y vísceras de 55 ovejas y 57 cerdos sacrificados en tres mataderos en Zaragoza (nordeste de España). Se utilizó la tinción utilizando la técnica de Ziehl-Neelsen modificada. Además, de las infecciones intestinales, los ooquistes de *Cryptosporidium* fueron encontrados en la

vesícula biliar de dos cerdos que tenían 2 meses de edad, en algunos órganos de ovejas incluyendo la vesícula biliar, ganglios linfáticos mesentéricos, traquea, pulmón, el útero de un cordero (Fleta *et al.*, 1995).

La presencia de ooquistes cryptosporidiales en útero ha sido reportado de forma natural. Sin embargo, la posibilidad del establecimiento de infecciones intrauterinas con *Cryptosporidium* sp. se ha demostrado de forma experimental en ratones. El parásito completó su ciclo de vida en el útero, pasando los ooquistes infectivos a través de la vagina (Liebler *et al.*, 1986)

Fleta *et al.*, (1995) confirmaron en sus resultados que el parásito *Cryptosporidium* puede infectar sitios extra-intestinales en las ovejas y cerdos, aunque cómo el organismo alcanza algunas de estas locaciones no está claro. Aunque la cryptosporidiosis extraintestinal no es común en mamíferos, se ha demostrado en humanos inmunodeprimidos y aves (Angus, 1990).

El *C.parvum* induce niveles de apoptosis moderado de células epiteliales intestinales cultivadas como máximo 24 horas después de la infección. Ha desarrollado estrategias para limitar la apoptosis que facilite su crecimiento y maduración en un período de tiempo temprano después de la infección de las células epiteliales.

El sitio primario de infección del *C.parvum* es el epitelio del intestino, aunque en células epiteliales de sitios extraintestinales, incluyendo el estomago, bilis y vías respiratorias, también puede infectarse (Goodwin *et al.*, 1991).

Se ha demostrado que *Cryptosporidium* puede ocasionar diarrea entre diferentes especies de animales, incluyendo a los humanos (Current & García, 1991), en los mamíferos este protozoario infecta a los enterocitos del intestino delgado, aunque también a las células epiteliales del intestino grueso, sistema biliar y tracto respiratorio en humanos inmunodeprimidos (Seculí *et al.*, 2000). Las infecciones extra intestinales han sido descritas en animales infectados de una forma natural. Se encontraron en la vesícula, conducto de la bilis y epitelio del conducto pancreático en un mono joven (Kovatch & Blanco, 1972) y en potros inmunodeficientes (Snyder *et al.*, 1978). Igualmente se descubrieron merontes y ooquistes en riñones y uretra en 2 terneros con

*Cryptosporidium* (Pavlassek & Nikitin, 1987), invasión respiratoria en un ternero que padece cryptosporidiosis intestinal (Mascaró *et al.*, 1994)

La mayor infección en humanos es causada por dos genotipos de *C.parvum*, genotipo I y genotipo II, estos son los genotipos humano y el bovino (zoonótico).El éxito en la infección experimental del *C.parvum* genotipo I "genotipo humano " se describió en cuatro cerditos y un cordero, el inoculo se obtuvo originalmente de dos niños con diarreas y el genotipo del *Cryptosporidium* fue determinado por PCR y secuenciando el rDNA. La dosis infectiva fue entre  $10^6$  y  $2 \times 10^6$  ooquistes. Ninguna señal de síntomas clínicos fue observada en los animales infectados, excepto en un cerdito que mostró diarrea acuosa. El período de eliminación de ooquistes en animales positivos fue entre 4 y 10 días.

El examen histopatológico del tracto gastrointestinal de los cerditos positivos revelaron la reducción de las vellosidades .En un cerdito la mucosa del intestino revelo la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium*. El tiempo de almacenamiento del inoculo (menor o igual a 3 semanas en PBS a 4° C) y la edad del animal (recién nacido) fue importante para el éxito de la inducción de la infección (Ebeid *et al.*, 2003).

Leah *et al.*, 2006, utiliza un modelo establecido de cerdito neonatal para la infección de *C.parvum* para determinar el papel de los neutrofilos en la patogénesis de la enfermedad inhibiendo su captación y utilizando la activación en vivo de anticuerpos monoclonales C-D18 .Los cerdos infectados fueron tratados diariamente con anti C-D18 o isotopo de inmunoglobulina G .La infección con *C.parvum* provoca un aumento significativo de la actividad mieloperoxidasa neutrofilica mucosal la cual se previene con el tratamiento a los cerditos con anti C-D 18.

En los mamíferos, el protozoario infecta normalmente los enterocitos del intestino delgado, aunque, en pacientes inmunodeficientes puede afectar el intestino grueso, el sistema biliar, el tracto respiratorio (Angus, 1990).Se ha descrito incidencias de infecciones extraintestinales en animales infectados de forma natural. Fue encontrado en el mono Rhesus joven infestación en la vesícula biliar , el conducto biliar y el epitelio del conducto pancreático(Kovatch and White,1972) y en potros inmunodeficientes (Snyder *et al.*, 1978).Similarmente , se detectaron merontes y

ooquistes en vías de desarrollo en los riñones y la uretra de dos terneros con diarrea producto de la cryptosporidiosis (Pavlassek & Nikitin, 1987) y se ha reportado la infección respiratoria en un ternero lactante que padecía cryptosporidiosis intestinal (Mascaró *et al.*, 1994). En infecciones experimentales en cerdos, se ha informado infecciones en el tracto respiratorio (Schloemer, 1982) en la tráquea o en la bolsa conjuntival e infección en la mucosa uterina después de haber sido inducida una inoculación intrauterina experimental en ratones adultos con *Cryptosporidium* sp. (Liebler *et al.*, 1986)

Se demostró algunas fases de su ciclo de vida, incluyendo ooquistes, en la tráquea y saco conjuntival de cerdos infectados de forma experimental la presencia de *Cryptosporidium* en la vesícula de algunos cerdos y ovejas puede explicarse por la diseminación directa del intestino delgado. La infección biliar en humanos inmunodeficientes esta bien confirmada y puede ser causa de colecistitis (Marguilis *et al.*, 1986)

## **Transmisión**

Estudios han demostrado que ooquistes del *C.parvum* son transmitidos por el agua y puede permanecer viable por varios meses (Fayer *et al.*, 1998)

Olson *et al.*, (1999) demostraron que a temperaturas por debajo de -4°C en agua el *Cryptosporidium* permanece viable por más de 12 semana. A temperatura de 4°C en agua el *C.* sobrevivirán por más de 12 semana .A 25 °C permanece su infectividad en agua por 10 semanas.

La cryptosporidiosis ha sido transmitida por la vía fecal oral e indirectamente a través de la comida o agua de bebida que se contamina por los ooquistes (Jokipii *et al.* ,1983; MacKenzie, 1994).El *C.parvum* causa diarreas agudas y auto limitadas en individuos inmunocompetentes y en animales domésticos. Sin embargo, el *C.parvum* puede tener la forma crónica y desencadenar un curso fatal en individuos inmunodeficientes (O'Donoghue ,1995).

Los ooquistes cryptosporidiales son resistentes medioambientalmente y son notablemente resistentes a las desinfecciones químicas (por ejemplo, la desinfección con cloro al agua potable) pero son susceptibles a temperaturas extremas de frío y calor (pasteurización) (Fayer *et al.*, 2000).

La causa probable de infección respiratoria en pacientes con SIDA puede ser la inhalación de ooquistes contenido en vómitos (Casemore, 1989).

La transmisión aerotransportada del ooquistes también ha sido sugerida en aves (Goodwin, 1991).

El contagio es a través de la vía oro-fecal, generalmente por contacto ó por contaminación indirecta a través de alimentos ó agua contaminada.

*C.parvum* es extremadamente infeccioso; debido a que a diferencia de los demás coccídeos, los ooquistes esporulan dentro del huésped infestado y son eliminados en estado infeccioso por la materia fecal. Una vez en el medio ambiente, los ooquistes son resistentes a la mayoría de los desinfectantes. La dosis infecciosa media de *C.parvum* es de entre 30 y 130 ooquistes (de estudios en humanos, pero un solo ooquistes es suficiente para causar infestación) (Mc Reynolds *et al.*, 2000).

Chalmers *et al.*, (1997) reportaron que el *C.parvum* en roedores salvajes puede actuar significativamente como reservorio con un alto potencial para infectar al hombre y al ganado debido a la convivencia. El papel de los perros en la transmisión es polémico, pero Abe *et al.*, (2002) negaron la posibilidad de transmisión en perros a través de PCR.

Atwill en (1997) encontró que 12(5.4%) y 17(7.6%) de 221 cerdos salvajes eliminaron ooquistes de *C.parvum* y quistes de *Giardia*, respectivamente. En estos cerdos el sexo y la condición corporal no esta asociado a la probabilidad de eliminación de ooquistes de *C.parvum*.

En cerdos jóvenes (<8 meses) y la alta densidad poblacional de cerdos (>2.0 cerdos salvajes/km<sup>2</sup>) tienen significativamente más probabilidad de eliminar ooquistes comparado con los cerdos más viejos (>8 meses) y poblaciones de cerdos con más baja densidad (<1.9 cerdos salvajes/km<sup>2</sup>) (Ward *et al.*, 2002).

Ran Yu *et al.*, (2004), determinaron en Korea, la presencia de *Cryptosporidium* en cerdos, determinándose una incidencia en humanos en varias localidades siendo los resultados en un 14 % en Chungcheongnam-do, incrementándose en Judok-eup de un 12.7 % a un 22.1 %, estos resultados demostraron que los cerdos pueden ser una fuente de transmisión de *Cryptosporidium* en humanos.

### **Síntomas**

Las manifestaciones clínicas dependen de la capacidad de respuesta del sistema inmune del paciente. Los organismos inmunocompetentes presentan una diarrea autolimitada de días o semanas; los inmunocomprometidos (con SIDA), sufren de diarrea grave y prolongada que puede llevar a la muerte (Cantin, 1999).

La infección por *Cryptosporidium* sp. resulta en un amplio rango de manifestaciones, desde infecciones asintomáticas hasta la enfermedad severa y que pone en riesgo la vida. La diarrea acuosa es el síntoma más frecuente y puede estar acompañado de deshidratación, pérdida de peso, dolor abdominal, fiebre, náuseas y vómito. En personas inmunocompetentes, los síntomas usualmente se presentan por periodos breves (1 a 2 semanas); pueden ser crónicos y más severos en personas inmunocomprometidas, especialmente en aquellas con conteos de CD4 <200/μl. El intestino delgado es el órgano más afectado, aunque afecta otros órganos incluyendo al tracto digestivo, pulmones y posiblemente conjuntiva (Kaplan, 2002).

En los animales domésticos las infecciones naturales por *Cryptosporidium* sp. se presentan con alta morbilidad y eventualmente con diarreas en becerros, corderos, y menos frecuente en lechones. Se ha considerado que su asociación con otras especies bacterianas y virales, puede provocar la muerte (Pérez, 2002).

En cerdos mayores la infección es asintomática y los animales mayores que se recuperan desarrollan resistencia ante futuras infecciones. En animales jóvenes se han descrito diarreas y mala absorción como consecuencia de la infección cryptosporidial (Rosell, 2004).

Ambos, el *C. suis* y *PGII* parece ser asintomático en el hospedero porcino (Enemark *et al.*, 2003; Guselle *et al.*, 2003; Ryan *et al.*, 2003; Vitovec *et al.*, 2006; Langkjaer *et al.*, 2007; Suárez- Luengas *et al.*, 2007; Zintl *et al.*, 2007).

## Diagnóstico

Según Macleod (1994) el diagnóstico se hace por identificación de los ooquistes en el frotis de heces o de la fase del ciclo vital de los parásitos en la biopsia intestinal. Se identifica mejor los oocistos después de la *concentración* de las heces con una técnica como la de flotación sacarosa de sheather. Los colorantes mas utilizados incluyen Auramina-Rodamina, un colorante acido-resistente modificado Zafranina y Azul de metileno.

Gajecki (1998) plantea que los ooquistes deben buscarse bajo la iluminación de contraste de fase debido a su transparencia y pequeño tamaño. Este autor señala además que debido a que los oocistos no se excretan continuamente, cuando no aparecen y existe la sospecha de la infección, se debe recurrir a un muestreo repetido.

La morfología del parásito esta en correspondencia con la técnica utilizada. Con la técnica de flotación con azúcar aparecen como cuerpos muy pequeños redondeados de color rosado tenue que contiene en su interior varios gránulos de color oscuro. La técnica de Ziehl Neelsen es muy efectiva para la identificación del parásito, observándose como cuerpos redondeados teñidos de rojo que contienen algunos gránulos oscuros, resultando claramente en el contraste verde del resto de la lámina (Gil, 1997).

Kváč *et al.*, 2003, utilizaron diferentes métodos de diagnóstico de rutina para *Cryptosporidium* sp. Dos de tinción, siete método de sedimentación-concentración, siete flotación-concentración y uno combinando flotación – sedimentación. Se probó estos métodos con dos concentraciones ( $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$ /g) de *C. parvum* y *C. andersoni*. Involucrando la sensibilidad y la especificidad, el método Auramina-Rodamina por Sheather resultó ser más efectivo entre los métodos seleccionados.

El frotis puede prepararse a partir de heces frescas o de material fecal conservado en polivinil-alcohol (PVA) o en acetato-sódico-acido-formol (SAF). No se recomienda el empleo de otros agentes conservadores de las heces por ejemplo formol al 10% (Bertschinger, 1999).

Martineau *et al.*, (2002) plantearon que ensayos de inmunofluorescencia (IF) con anticuerpos monoclonales se pueden utilizar para la detección de oocistos en las heces fecales. Los métodos de ELISA y de IF se han sido utilizados para detectar anticuerpos humorales específicos en el suero.

Debido al reducido tamaño de los ooquistes (de 4 a 6 micras) y a que la cantidad presente es muy variable, se deberán analizar múltiples muestras, antes de informar un resultado negativo (Arrowood, 2002).

### **Microscopia**

1) Frotis directos: Se usa solamente como técnica de screening. Para obtener un diagnóstico definitivo, debe combinarse con otra técnica más sensible. Si el preparado no va a ser teñido, se recomienda hacer la observación con un microscopio de contraste de fase.

2) Tinciones: Los ooquistes pueden ser teñidos con Giemsa, pero esta tinción no los diferencia de las levaduras fecales del mismo tamaño ni de otros detritos. La prueba rápida ácida de Zhiel-Neelsen (Zhiel Neelsen-acid fast) es un método simple y efectivo. Los ooquistes se ven de color rojo brillante sobre un fondo verde-azulado de levaduras y detritos. Esta técnica fue modificada y mejorada por medio de enfriado ó calentamiento de los colorantes.

3) Inmunofluorescencia: Es la más sensible y específica de las técnicas de microscopía. La sensibilidad de IFA es de  $10^4$  ooquistes por gramo de materia fecal. Es efectiva en bovinos debido a que en general esta especie elimina una gran cantidad de ooquistes. Los gatos eliminan alrededor de  $10^3$  ooquistes por gramo de materia fecal, por lo cual la sensibilidad disminuye (Hijjawi *et al.*, 2001).

4) Métodos adicionales:

Safranina caliente-azul de metileno, Tinción de Kohn's modificada, tintura de Koster modificada, anilina- carbol-methylvioleta y tartrazina.

Tinciones negativas.

Tinciones fluorescentes (auramina ó auramina-rodamina, auramina-carbol-fucsina, naranja de acridina mepacrina).

Estas son tinciones químicas y no son específicas, por lo cual pueden dar resultados falsos positivos ó dejar oocistos sin teñir. Son solamente métodos de screening. El diagnóstico debe ser confirmado por métodos más sensibles como inmunofluorescencia, ELISA ó Reacción de la polimerasa en cadena (PCR) (Kvác *et al.*, 2003).

### **Diagnóstico Inmunológico**

**ELISA:** Hay varios test de ELISA para detección de antígenos en materia fecal. Las técnicas convencionales pueden reemplazarse por ELISA debido a su simplicidad, y los requerimientos de equipo de laboratorio son limitados.

La sensibilidad y especificidad del ELISA para el descubrimiento de *C. parvum* es por lo menos tan bueno como aquellas técnicas más convencionales; los resultados son muy similares. La técnica ELISA es rápida y fiable y satisface el análisis de números muestras.

Es fiable por el uso de anticuerpos monoclonales como conjugado asegura una excelente especificidad y resultados fiables.

Facilidad de uso: el tiempo de trabajo manual es mínimo.

La incubación se realiza a temperatura ambiente.

Los resultados están disponibles en 140 minutos para una sola prueba o un lote.

Flexibilidad: pueden leerse los resultados visualmente o espectrofotométricamente.

### **Diagnóstico Molecular**

La tecnología de PCR ofrece las alternativas al diagnóstico convencional de *Cryptosporidium* para las muestras clínicas y medioambientales (Kvác *et al.*, 2003).

Morgan *et al.*, 1998 realizaron los exámenes a 511 muestras de heces fecales. A través del PCR se descubrió un total de 36 muestras positivas de las 511 muestras, mientras la microscopía rutinaria descubrió 29 positivo. Un total de cinco muestras fueron positivas por encima de la microscopía rutinaria. La microscopía exhibió 83.7% sensibilidad y 98.9% especificidad comparadas a PCR. PCR es más sensible y más fácil interpretar siendo más práctico, es más adaptable al análisis de un lote, mientras reduce los costos considerablemente. Una ventaja importante de la prueba de PCR es su habilidad de diferenciar directamente los diferentes genotipos de *Cryptosporidium*. La sensibilidad, especificidad, la habilidad para genotipificar, la facilidad de uso, hacen del PCR una herramienta útil para el diagnóstico futuro y estudios en la epidemiología molecular de infecciones de *Cryptosporidium* (Zintl *et al.*, 2007).

Los rápidos adelantos en la biología molecular y en los análisis bioquímicos, traen consigo el reconocimiento de nuevas especies, sub especies y cepas. De acuerdo con las diferencias biológicas y moleculares notadas en cepas de *C.parvum* que infectan varios mamíferos llevaron al reconocimiento de dos grandes grupos que infectan a los humanos: uno zoonotico o genotipo 2 (cepa) capaz de infectar a un amplio rango de mamíferos, sobre todo el ganado y uno antroponotico o genotipo 1 que ha sido solo detectado en humanos y no ha sido con éxito(o por lo menos de forma consistente) propagándose a otros hospederos mamíferos (Widmer *et al.*, 2004).

La técnica de Reacción de la Cadena de Polimerasa (PCR) ha sido utilizada para diferenciar oocistos de *C.parvum* de los *C. wrairi*; ya que ambos tienen similitud morfológica y antigénica e incluso esta técnica presenta una coincidencia en un 98%, lo que ha llevado a algunos autores plantear la hipótesis de que los dos son especies independientes (Oliva, 2003).

Se han identificado dos genotipos: el genotipo 1 humano (HuG1) y el genotipo bovino 2 (BoG2).Estos genotipos biológicos tienen diferencia en el rango de hospedero, el aislamiento de Bo G2 parece ser infeccioso para una extensa variedad de mamíferos. El HuG1 parece ser más selectivo, infectando principalmente a los humanos.

Esta diferencia es importante, porque la mayoría de los casos de cryptosporidiosis en humanos >75 % es causada por HuG1 y menos del 25 % es causado por BoG2.

La conducta biológica del HuG1 *C.parvum* en animales no se ha estudiado hasta ahora debido a la incapacidad del parasito de infectar a hospederos no humanos. Sin embargo los estudios sucesivos han demostrado que el genotipo humano y bovino se comporta de una manera diferente en el hospedero humano.

Las dosis altas (de miles a millones de ooquistes) de BoG2 *C.parvum* son tradicionalmente usados en el estudio de la patogénesis en animales, aunque la forma natural de adquisición de *Cryptosporidium* son el resultado de baja ingestión de ooquistes. De hecho, el riesgo de adquirir *C.parvum* se eleva como resultado de dosis baja de infectivas.

Las diferencias observadas en los sitios de colonización del HuG1 y BoG2 del *C.parvum* ayudan a explicar las diferencias halladas en los resultados clínicos en los mismos hospederos. El BoG2 de *C.parvum* coloniza todo el intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) y el colon. Por cuanto, el HuG1 *C.parvum* coloniza solo el íleon y el colon. El intestino delgado es importante en la regulación de la absorción de electrolitos y nutrientes, el trastorno de sus funciones trae como consecuencia diarrea producto de la mala absorción.

Se determinó pérdida de la integridad epitelial y disminución de las vellosidades en el intestino delgado. Las cuales son asociadas a la presencia del parasito dentro del Brush border epitelial y a las manifestaciones clínicas desde moderadas a severas en los cerdos infectados por BoG2. Por lo que se propone que el sitio de colonización del parasito dentro del hospedero es un factor determinante en la expresión de la enfermedad por el hospedero (Pereira *et al.*, 2002).

El *C.parvum* genotipo porcino ha sido establecido como una nueva especie, *C. suis*, en base a la caracterización biológica y los estudios moleculares (Ryan *et al.*, 2004).

Enemark *et al.*, (2003) plantea que el *C. suis* se adapta a los hospedero porcino, pero infecta pobremente al ganado. La patogenisidad del *C. suis* no se ha reportado de una forma natural en cerdos y solo se han descrito en infecciones experimentales.

Los ooquistes esporulados del *C.parvum* genotipo bovino son morfológicamente idénticos a los ooquistes del *C. suis* (Mosier *et al.*, 2000)

El análisis de secuencia de un fragmento del gen SSU rRNA revelan la presencia de dos especies específicas de *Cryptosporidium* genéticamente distinto, *C.suis* y *C. genotipo II cerdo (CGPII)*. Es más, el *C.muris* era descubierto en dos casos. Los resultados esporádicos de las especies específicas para los roedores han sido informadas por Xiao *et al.* , (2006) y Zintl *et al.*, (2007).

A través del análisis por PCR – RFLP realizado a muestras fecales y raspado mucosal a cerdos jóvenes mostraron claramente la no presencia del tipo 1 en momentos que coincidieron ambos genotipos o ante la aparición del tipo 1 uno o dos días antes de aparecer el tipo 2, esto hace pensar que el tipo 2 además de establecerse más rápidamente que el tipo 1 puede exhibir algún efecto inhibitorio sobre el crecimiento del tipo 1(Oliva, 2003).

### **Inoculación en animales de laboratorio**

Los ooquistes pueden ser recolectados por centrifugación en azúcar y mantenidos en refrigeración en una solución de dicromato de potasio por más de seis meses sin aparente pérdida de viabilidad.

Se inoculan en ratones neonatos y después de una semana se examina microscópicamente el tejido intestinal (Greene, 1998).

### **Diagnóstico histopatológico**

Los cambios histopatológicos observados en las muestras de intestino delgado humanos varían desde moderada a severa atrofia de las microvellosidades. El grado de severidad de las lesiones se correlaciona con el número de organismos infectantes.

Si bien se pueden encontrar lesiones a lo largo de toda la mucosa intestinal, los cambios son generalmente más severos en el yeyuno distal y en el íleon.

Las vellosidades se presentan romas, acortadas, ensanchadas y fusionadas, mientras que las criptas se encuentran elongadas e hiperplásicas. Estas lesiones pueden ser acompañadas por infiltrados inflamatorios consistentes en células linfoides, macrófagos y neutrófilos en la lámina propia subyacente (Alves *et al.*, 2000).

### ***Lesiones***

En animales con diarrea persistente, la necropsia se caracteriza por deshidratación, emaciación y atrofia de vellosidades del intestino delgado. Las características microscópicas incluyen cantidades grandes de parasito dentro de los microvellocidades , mientras que a simple vista en el intestino se ve atrofiado , hiperplasia e infiltraciones con células inflamatorias (Callen, 1996).

El mismo autor plantea que en las aves en la forma respiratoria los pulmones se tornan grises.

En un análisis histológico realizado en tres cerdos con cryptosporidiosis se observó atrofia y fusión de las vellosidades intestinales con hiperplasia de las criptas, e infiltración linfocitaria en la lámina propia con pobre población de los linfocitos en la placa de Peyer. Una cantidad elevada fue observada mayormente en el vértice de las vellosidades, las células parasitadas mostraron un aspecto cuboidal o columna poco diferenciado. También se observó un discreto infiltrado inflamatorio mayormente linfocitos en la lámina propia (Illera, 1998).

### **Profilaxis**

Resulta fundamental mejorar el sistema inmune de la hembra mediante condiciones de alojamiento, manejo y nutrición adecuadas. La higiene de las instalaciones debe incluir limpieza diaria, desinfección periódica y vaciado sanitario. Es importante que las nulíparas hayan estado durante las 3-6 semanas antes del parto en contacto con los microorganismos de la explotación (generalmente a través de las heces) para crear cierta inmunidad frente a ellos. En los últimos días de gestación y en los tres primeros posparto debe explorarse el estado general de todas las cerdas, tomar rectalmente la temperatura y realizar exámenes y lavados uterinos cuando sea necesario (Gil Pascual, 1997).

La especie porcina es muy sensible al calor, ya que no lo pierde por evaporación cutánea y respiratoria (sólo por conducción y radiación). Por lo tanto, tendremos que mantener temperaturas adecuadas y diferentes para la madre y los lechones, sin oscilaciones, y evitando las corrientes de aire. La utilización de agua abundante y una dieta laxante o un purgante suave puede corregir la situación favorable para la multiplicación de coliformes (Gajecki *et al.*, 1998).

Plonait (2003) planteó que la severidad de la diarrea y tiempo de excreción de ooquistes pueden ser reducido con calostro de bovinos hiperinmunes. La protección esta relacionado a los niveles altos de anticuerpos de *C.parvum* en el lumen del estómago.

Chen & Huang (2007) realizaron una identificación molecular donde se mostró que *Cryptosporidium* aislados de los cerdos en China oriental pertenecieron a *C.parvum* genotipo "mouse". El resultado indicó que la cryptosporidiosis podría transmitirse entre los roedores y cerdos. Siendo este resultado muy importante para la prevención de cryptosporidiosis en los humanos y cerdos y poder controlar la reproducción de roedores y reducir la oportunidad de contacto con los ratones.

### **Tratamiento**

Numerosas drogas se han probado para el tratamiento de la cryptosporidiosis, pero debido a su localización única (intracelular pero extracitoplasmática) los resultados han sido generalmente insatisfactorios.

En los gatos los signos clínicos generalmente se revierten después de la administración de Paromomicina o Tilosina. La Tilosina, debe ser colocada en cápsulas resultando en un inconveniente para el dueño del animal y la Paromomicina puede producir insuficiencia renal aguda y sordera en algunos gatos (Gookin *et al.*, 1999).

Se han encontrado recidivas luego del tratamiento con Paromomicina, debido a que una vez que el parásito alcanza las vías biliares, no es alcanzado por la droga, ya que esta es absorbida por el tracto gastrointestinal (Bisel *et al.*, 1994).

Nitazoxamide, un antimicrobiano de amplio espectro demostró ser efectivo en el tratamiento contra cryptosporidiosis en estudios in vitro y en vivo (Theodos *et al.*, 1998).

Hay varios estudios exitosos en el tratamiento de cryptosporidiosis en pacientes con SIDA (Huston *et al.*, 2001), pero todavía no hay estudios suficientes para evaluar la eficacia de esta droga.

Estudios realizados en pacientes con SIDA usando una terapia combinada de Azytromicina, Paromomicina y Spiramicina demostraron ser efectivas para el tratamiento de la diarrea. Pero además de los antimicrobianos usados, los pacientes

recibían terapia antirretrovirus, por lo cual la resolución de la diarrea se atribuye más al aumento de CD4+ (provocado por el tratamiento antiviral) que al efecto de los antibióticos (Maggi *et al.*, 2000).

Debido a que la resolución de la diarrea depende del buen estado del sistema inmunológico del huésped, otra opción es la inmunoterapia no específica. En pacientes humanos inmunosuprimidos se han obtenido óptimos resultados, usando suero bovino hiperinmune, sin embargo el número de individuos en el estudio es muy bajo (Huston *et al.*, 2001).

Martineau (2002) administró el Paromomicin de 3 000mg/Kg. de P.V/día a ratones y 500mg/Kg. de P.V/día a cerdos durante diez días consecutivos, encontrándose que el fármaco fue efectivo en los ratones que tenían la infección en las superficies vellosas y considerablemente baja efectividad en sitios inaccesibles como las criptas abscedadas y en la boca del estómago. En los cerdos mostró ser efectivo en los casos que presentaban un grado ligero o medio de diarreas, debido al tránsito rápido de los alimentos en estos casos.

Otros fármacos que poseen efectividad incluyen, Putresina (un producto del metabolismo de la arginina), Azitromicin, Letrasuril etc. (Chaisson, 1998).

El mismo autor planteó que las inmunoglobulinas IgA, IgM, e IgG del suero hiperinmune del calostro bovino, reconocían diferentes estadios (merontes, merozoitos, micro y macrogametocitos, macro y microgametos) del parásito de los que se desprende que estas formas constituyen verdaderos antígenos.

En un estudio realizado por Delouis (2003) en secciones de íleon de cerdo demostró que el péptido YY (PYY) bloquea el efecto secretorio y antiabsorbente de la prostaglandina 12, por lo que plantea que puede jugar un papel importante en la cura de la diarrea secretora de la Cryptosporidiosis.

Otros fármacos que poseen efectividad incluyen, Putresina (un producto del metabolismo de la arginina), Azitromicin, Letrasuril etc. (Chaisson, 1998).

No hay ningún tratamiento eficaz o desinfectante actualmente, para la cryptosporidiosis porcina y la manera más eficaz de reducir el predominio de este

parásito es llevar a cabo una estricta bioseguridad y la higiene, para minimizar las infecciones (Merck, 2006).

### **Terapia suportiva**

Consiste de fluidos y electrolitos administrados por vías oral y parenteral. Leche entera de vaca en cantidades pequeñas varias veces al día para optimizar la digestión y disminuir la pérdida de peso. Hay que seguir dando la leche materna aunque el animal sigue con diarrea para disminuir la ocurrencia de muerte por inacción (Pejsak, 2004)

En el sistema de vigilancia epizootológica de Cuba la cryptosporidiosis esta entre las enfermedades de declaración obligatoria, clasificada como de tercer orden y aparece en el código 349 (Instructora 2/86 de la Notificación obligatorio de Enfermedades al IMV).

*Cryptosporidium* es capaz de provocar atrofia de las vellosidades intestinales , favorece la infiltración de células inflamatorias en la lámina propia, las funciones del epitelio afectado se altera , sobre todo se encuentra impedida la absorción electrogénica de glucosa estimulada por la absorción de sodio(Moore *et al.*,1995),estas alteraciones además de la creación de un ambiente de hiperosmolaridad intraluminal conducen al desarrollo de una diarrea que puede ser tan grave como para provocar la muerte, las manifestaciones patológicas de la cryptosporidiosis son más frecuentes en animales lactantes, aunque eventualmente los animales afectados se encuentran entre las 6 y 12 semanas de edad , como en este caso(Lindsay *et al.*, 1991;. Lindsay *et al.*, 1992)

### **Epidemiología**

La mucosa intestinal sufre un daño provocado directamente por la esquizogonia y merogonia o indirectamente por la liberación de toxinas. Los cryptosporidios provocan atrofia de las vellosidades intestinales, determinando una disminución de la superficie de absorción e hipersecreción de líquido entérico que conduce a la pérdida de agua y electrolitos procedentes de los compartimientos plasmáticos. Estas diarreas secretoras están asociadas frecuentemente con bacterias capaces de elaborar enterotoxinas. El mecanismo patogénico puede deberse a la descarga de metabolitos tóxicos directamente en el enterocito infectado, además de las alteraciones en la superficie de

la mucosa intestinal, con acortamiento de las microvellosidades, ensanchamiento de las criptas e infiltración leucocitaria de la lámina propia que pueden ser responsables de la disminución de la capacidad de absorción intestinal y de la diarrea. La atrofia de las vellosidades impide la absorción de la lactosa y Dxilosa y por lo tanto contribuye a desencadenar diarrea.

La prevalencia de este microorganismo es variable, en función de las características socioeconómicas de la población, ya que es más frecuente en los lugares con problemas de infraestructura en las canalizaciones de agua potable, en las piscinas, en la eliminación de aguas residuales o con estrecho contacto con animales (Suárez-Luengas *et al.*, 2007).

La infección normalmente ocurre entre 3 días de edad y al destete (Straw *et al.*, 1999), aunque este organismo parasitario puede encontrarse en cerdos de 30 semanas de edad (Sandford, 1987), es normalmente subclínica y no es considerada un problema en producciones de cerdos (Kennedy *et al.*, 1977; Sandford, 1987). Sin embargo en enfermedades que ocasionan inmunosupresión como el VIH o la enfermedad de Gumboro en los pollos puede ocasionar un curso desfavorable a la enfermedad (Hornok *et al.*, 1998)

Se encuentra en las heces del 1 al 3% de los habitantes de los países desarrollados (Europa y América del Norte), en el 5% de los de Asia y en el 10% de los de África. Es más frecuente en los menores de dos años. Mediante estudios serológicos se demuestra la presencia de anticuerpos en el 25-35% de los habitantes de los países desarrollados y en el 60-75% de los de países pobres. Un estudio realizado en niños de Salamanca mostró una seroprevalencia de IgG del 22,6%. En los países de clima tropical, es más frecuente en los meses cálidos y húmedos, mientras que, en los de clima templado, como España, es más frecuente en otoño y en invierno. Se han descrito grandes brotes asociados generalmente a deficiencias en los sistemas de potabilización del agua; el mayor descrito hasta la fecha se produjo en Milwaukee (USA) y afectó a 403.000 personas. En el Reino Unido se describieron 18 brotes en el período de 1989 a 1999 asociado a conducciones de agua contaminada con oocistos (Rodríguez *et al.*, 2001).

La infección se transmite de persona a persona, por contacto con animales infectados, por el agua de bebida, por las piscinas o por los alimentos contaminados (frutas, verduras, zumos de frutas, moluscos, etc.), aunque un estudio llevado a cabo en Los Angeles en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) mostró que el agua potable tenía poca importancia en la transmisión de la enfermedad; las moscas también podrían desempeñar un papel como vectores mecánicos del parásito. Se ha demostrado la transmisión entre miembros de la familia, entre parejas sexuales, en guarderías, y entre pacientes y personal sanitario, e incluso se producen infecciones nosocomiales. Esto puede pasar desapercibido porque, en muchos casos, no existen síntomas clínicos importantes. Las infecciones por animales se producen, generalmente, a partir de animales de compañía infectados, de laboratorio o de granja. En un estudio llevado a cabo en Zaragoza, el 7% de los perros, el 44,4% de los terneros recién nacidos, el 17% de las vacas adultas y el 21,9% de los cerdos excretaban el parásito en las heces. La importancia de la transmisión de este parásito a través de los alimentos se refleja en los datos aportados por un sistema de vigilancia de las infecciones de origen alimentario. El Foodborne Diseases Active Surveillance Program (FoodNet), comunicó en 1997 los siguientes datos: 2205 casos de *Salmonella*, 1273 de *Shigella*, 468 de *Cryptosporidium*, 340 de *Escherichia coli* O157:H7, 139 de *Yersinia*, 77 de *Listeria*, 51 de *Vibrio* y 49 de *Cyclospora*.

En los pacientes infectados por el VIH con diarrea, la presencia del parásito se demuestra en el 11-21% de los casos, siendo más elevado el porcentaje en los enfermos de países pobres. Un estudio llevado a cabo en Barcelona en 1994 sobre 1456 pacientes infectados por el VIH mostró la presencia de algún enteropatógeno en 253 (17%); la incidencia fue mayor en los homosexuales (26%) que en los adictos a drogas por vía parenteral (12%). El patógeno más frecuente fue *C.* (104 enfermos), seguido de *Salmonella* (78 pacientes). En otro estudio llevado a cabo en Madrid, en el 30% de los pacientes con cryptosporidiosis intestinal aparecieron infecciones extraintestinales, que en el 61,5% fueron de localización biliar, y se observaron en el esputo en el 16,3% de los casos (Rodríguez *et al.*, 2001).

Los cerdos tienen un amplio rango de edad para la susceptibilidad a especies de *Cryptosporidium* y una prevalencia global en muchos países entre un 6 y un 60 %

Wieler *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2003; Vítovec *et al.*, 2006; Hamnes *et al.*, 2007; Langkjaer *et al.*, 2007; Suárez-Luengas *et al.*, 2007).

### **Aspectos novedosos.**

Enemark *et al.*, (2003) a través de un estudio de caracterización genética reveló que los cerdos se infectan con una forma de *Cryptosporidium* genéticamente distinto y aparentemente adaptado al hospedero, el *C. genotipo "cerdo"(PGII)*.

Ryan *et al.*, (2003) determinaron que los cerdos también pueden infectarse con *C.parvum* zoonótico “genotipo bovino”, indicando que ellos pueden jugar un importante papel como depósitos de infección para los humanos y otros animales.

Los ooquistes de *Cryptosporidium* excretados por los perros son morfológicamente similares a los de *C.parvum* y ha sido por consiguiente asumido como zoonótico. Sin embargo, la reciente evidencia genética sugiere que los perros albergan un tipo de *Cryptosporidium* genéticamente distinto a los descubiertos en humanos (Xiao *et al.*, 1999).

Métodos rutinarios e ideales que apoyen el desarrollo cryptosporidial in vitro no está todavía disponible. Se está necesitando métodos que permitan un desarrollo continuo (como se realiza rutinariamente con el *Toxoplasma spp.*), con producción eficaz de ooquistes maduros, ooquistes infecciosos, y métodos de cryopreservación que permitirían las acciones duplicadas.

A pesar de las limitaciones en el cultivo in vitro de *Cryptosporidium sp.*, los métodos actuales son útiles para evaluar la potencia de las terapias, métodos de desinfección para los ooquistes y la expresión del gen (Arrowood, 2002).

El *C.suis* se ha aislado de un paciente de VIH, aunque su potencial zoonótico es incierto y requiere de un estudio extenso (Xiao *et al.*, 2002).

Hamnes *et al.*, 2006 sugirieron una posible asociación entre especie *Cryptosporidium*/genotipo y los síntomas clínicos, ya que la diarrea no fue observada entre la manada que *C. genotipo cerdo II (GP11)* fue identificada.

Por otro lado, Maddox-Hyttel *et al.*, (2006) realizaron dos series de infecciones experimentales para demostrar la infectividad de *Cryptosporidium cerdo genotipo I*

(*C.Suis*) y *C. parvum* en cerdos, reportando que las infecciones causadas por *C.suis* no causaron ningún síntoma clínico o muy leves síntomas clínicos, con respecto a los causados por el *C.parvum*.

Por otra parte, Morgan *et al.*, (1999) encontraron que estas dos especies estaban asociadas a diarreas agudas en tres manadas de cerdos estudiadas, aunque la asociación con otros patógenos muy conocidos lo hizo imposible determinar si *Cryptosporidium*. era un patógeno primario o secundario.

Xiao *et al.*, (2002) determinaron el *C.parvum* genotipo porcino en un paciente VIH positivo basándose en un conteo de linfocitos T CD4+, en la historia clínica, no existiendo síntomas clínicos ni ocasionando severidad por la inmunosupresión. Demostrando esto que la inmunosupresión no es necesaria para que exista la presencia de *C. parvum* genotipo porcino en infecciones en humanos.

La dosis de infectividad del *C.parvum* es de aproximadamente de 10 ooquistes, manteniendo la infectividad durante semanas, actuando como una fuente potencial de infección (Olson *et al.*, 1999).

Trotz *et al.*, (2005) determinaron una asociación significativa entre la diarrea y el aumento de los niveles de excreción de *Cryptosporidium*. El estudio reveló una edad-especificidad de *Cryptosporidium* en la manada de 16, 31 y 100% para las cerdas, neonatos y cerditos destetados.

El genotipo del perro, ha sido identificado en pacientes con VIH en Estados Unidos, se requiere estudios extensos para comprender la importancia en la salud pública del genotipo del perro, así como otros genotipos y especies, para hospederos inmunocomprometidos (Current *et al.*, 1983).

La infectividad de las cepas caninas en humanos inmunocompetentes no ha sido demostrada, aunque se ha demostrado que los perros pueden infectarse experimentalmente con ooquistes de origen humano. Se especula que los humanos pueden adquirir la infección de forma natural de perros infectados.

La transmisión zoonótica de un perro fue sospechosa en un caso en que un estudiante veterinario fue infectado por un perro, desarrollando diarreas agudas y fue identificado ooquistes de *Cryptosporidium* en las heces (Greene *et al.*, 1999).

Stanford (1987) detectó histológicamente *Cryptosporidium* en las micro vellosidades intestinales en un 5.3 % de las muestras investigadas (184/3 491), realizado a través de un diagnóstico rutinario entre 1981 y 1985. Los cerdos infectados provenían de 133 granjas y entre 6 y 12 semanas de edad. Este organismo fue encontrado en el yeyuno, íleon, ciego y colón. Solamente el 26 % de las infecciones cryptosporidiales en cerdos provocaron diarreas

Se determinó 21 mono infecciones de *Cryptosporidium* genotipo II cerdo (GP11) y 15 infecciones mixtas de *Cryptosporidium* genotipo II cerdo (GP11) y *C. suis* fueron encontrados en cebaderos de cerdos. Dos cerdas infectadas con *C. parvum* subgenotipo IIA16G1R1, la cual fue reportada por primera vez en cerdos (Martin *et al.*, 2009).

De todos ellos, el *C. parvum* es el más importante especie zoonótica, el genotipo II cerdo (GP11) y el genotipo mouse no había sido reportado en humanos hasta ahora, pero existe un número pequeño de reportes de infecciones de *C. suis* y *C. muris* en personas inmunocomprometidas (Xiao *et al.*, 2002; Cama *et al.*, 2006; Gatei *et al.*, 2006; Muthusamy *et al.*, 2006).

Estudios realizados en el ganado han indicado que en terneros pre destetes la infección predominante es con *C. parvum*, por cuanto en animales post destetes la infección mayor es con genotipos no zoonóticos (Santin *et al.*, 2004).

Langkjaer *et al.*, (2007) en un estudio realizado en Dinamarca detectó el PG11 en un 29 % de cerdos pre destetados y el *C. suis* en un 71 %, sin embargo, en cerdos pos destetados la incidencia de PG11 fue de un 76 % y el *C. suis* en un 24 %. En España el PG11 y el *C. suis* fueron identificados en un 38.5 % y un 61.5 % en animales post destetados (Suárez-Luengas *et al.*, 2007).

En Irlanda, *C. suis* tuvo más prevalencia que el PG11 en animales post destetados (48.3% contra 37.9% de genotipificación de animales) (Zintl *et al.*, 2007).

También se ha informado, que la coinfección de *Cryptosporidium* con *rotavirus* puede provocar gran incidencia de diarrea llevando a la muerte (Enemark *et al.*, 2003).

Tzipori & Ward ,2002 sugirieron que cuando coinciden los dos genotipos, el tipo 2 predomina invariablemente, desplazando al tipo 1 en un periodo corto de tiempo a nivel del tracto intestinal, esto se ha observado en humanos y en cerdos pequeños .Este predominio del tipo 2 en infecciones mixtas nos hace parecer que sea debido a diferentes formas de desarrollo del ciclo de vida del parasito. Sin embargo la proporción de infección es diferente, mayor incidencia del tipo 2 con respecto al tipo 1 en las vellosidades de los cerditos (Akiyoshi *et al.*, 2002)

La identificación de poblaciones mixtas donde el tipo 1 coexiste con el tipo 2 es minúsculo (0.01 %) (Akiyoshi *et al.*, 2002)

Totalmente los ooquistes esporulados del *C.parvum* bovino es morfológicamente idéntico a los ooquistes del *C. suis* (Ryan *et al.*, 2004)

Sin embargo, en cerdos mayores la infección por *Cryptosporidium* se considera asintomática y los animales que se recuperan desarrollan resistencia ante futuras infecciones (Holland, 1990).

La infección cryptosporidial de los enterocitos parecen estar vinculados a la infección de *circovirus porcino tipo 2 (PCV2)* la cual ha sido asociada a una temprana y severa reducción de linfocitos CD 4 + en los ganglios linfáticos (Sarli *et al.*, 2001) y sangre periférica (Segale' *et al.*, 2001) que podría ocasionar predisposición a una infección criptosporidial, como fue demostrado en humanos (Pozio *et al.*, 1997)

La asociación entre los eosinofilos e histiocitos infectados por el *circovirus porcino tipo 2 (PCV2)* podrían inducir a una deficiente función de la población eosinofilica en su función antiparasitaria (Roitt *et al.*, 1998) resultando en un incremento a la sensibilidad a las infecciones parasitarias.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente estudio fue realizado en los laboratorios de Inmunología y Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y en el Laboratorio de Proteínas del Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, provincia de Villa Clara.

El muestreo se realizó en seis unidades porcinas con antecedentes de trastornos diarreicos en cerditos en las etapas de lactancia y después del destete, entre los meses de mayo y junio del año 2008.

### **Diseño Experimental**

El método de muestreo utilizado fue en Etapas Múltiples o Multinivel. Primeramente se seleccionaron a través del método aleatorio simple las seis unidades porcinas a muestrear. Posteriormente la selección de los animales se realizó por métodos no probabilísticos tomando como criterio de selección la presencia de diarreas en los mismos.

En cada Unidad se procedió a la selección de una muestra de 15 animales diarreicos de las categorías crías y precebas. Esta selección se realizó alternando el tamaño de la muestra por categoría en cada unidad porcina, garantizando al final del muestreo 44 crías (hasta 26 días de edad) y 46 precebas, (de 27 a 50 días de edad) para un tamaño de muestra de 90 animales. El tamaño de la muestra se calculó según Pfeiffer (2002) para poblaciones infinitas y con un nivel de precisión de 99%.

### **Características de las muestras**

Los 90 cerditos en estudio mostraron cuadros enteropáticos. Los síntomas consistían fundamentalmente en diarrea acuosa, espumosa, amarillenta y en algunos casos, grisácea y viscosa, no observándose signos hemorrágicos leves ni agudos.

El grupo de cerdos fue clasificado en dos categorías (crías o precebas), teniendo en cuenta sus edades. Como crías se consideraron los cerditos con edades comprendidas entre 0 y 25 días de nacidos y como precebas aquellos cuyas edades se encontraban entre 26 y 50 días de nacidos.

Los animales objeto de estudio se encontraban en condiciones zootécnicas, medioambientales y nutricionales semejantes, propias de su categoría y unidad. Ninguno de estos había sido tratado con antibióticos.

La distribución del número total de muestras por unidades y categorías se muestra en la tabla que aparece a continuación.

**Tabla No. 4:** Distribución de las muestras seleccionadas por unidades y categorías.

<b>Unidad</b>	<b>Identificación</b>	<b>Crías (0-25 días)</b>	<b>Preceba (26-50 días)</b>	<b>Total</b>
Salamina II	A	9	6	15
Calabazar	B	6	9	15
Charco hondo	C	7	8	15
Negrito	D	8	7	15

Remate	E	7	8	15
Cordobanal	F	7	8	15
<b>Total</b>		<b>44</b>	<b>46</b>	<b>90</b>

### **Obtención y procesamiento de las muestras**

La muestra se obtuvo por el método de colección directa de heces fecales.

Estas muestras fueron transportadas al laboratorio en adecuada refrigeración.

### **Diagnóstico de *Cryptosporidium parvum*.**

*Cryptosporidium parvum* fue investigado en las muestras fecales usando un kit comercial de ELISA indirecto de la firma Bio-X Diagnostics, Bélgica (código: Bio K 070).

Este kit ELISA contiene microplacas de 96 pocillos con las filas A, C, E y G sensibilizadas con anticuerpos monoclonales que asegura la captura de oocistos a partir de la muestra en la que se encuentran (materias fecales). Las otras filas de estas microplacas (B, D, F y H) fueron sensibilizadas con anticuerpos policlonales no específicos (negativo) del protozoario. En el kit los anticuerpos monoclonales y policlonales se encontraban conjugados con la enzima peroxidasa.

### **Procedimiento**

Para el desarrollo de esta técnica se procede de la forma siguiente:

- Se diluyó la muestra (v/v) en un buffer de dilución. Posteriormente se añadieron alícuotas de 100 µL de la muestra diluida en los pozos de la placa de ELISA comenzando por la segunda columna, la primera es usada para el antígeno control, y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Transcurrido este período las placas fueron lavadas tres veces con el buffer de lavado, evitando la formación de burbujas en los pocillos de la placa.
- Se añadieron 100 µL del conjugado (un anticuerpo monoclonal específico de los oocistos de CP unido a la peroxidasa) diluido a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente por 60 minutos. Posteriormente las placas fueron lavadas nuevamente y se le

añadieron 100 µL de solución indicadora (mezcla del cromógeno y el sustrato) por cada pocillo.

- Se incubó durante 10 minutos a 21°C +/-3°C al abrigo de la luz. Este período de tiempo se dió a título indicativo, puesto que en algunos casos se podrá alargar o acortar.
- Se distribuyó la solución de interrupción a razón de 50 µl por pocillo.
- Las densidades ópticas se midieron con un espectrofotómetro para placas utilizando un filtro de 450 nm. Los resultados se registraron lo antes posible tras la aplicación de la solución de interrupción. En los resultados de lecturas elevadas el cromógeno puede cristalizar y mostrar medidas erróneas.
- Si el protozario está presente en la muestra, el conjugado permanece fijo en su cúpula que contiene el antígeno y la enzima cataliza la transformación del cromógeno incoloro en un producto azul. La intensidad de la coloración es proporcional al contenido en oocistos de la muestra. La señal registrada en la cúpula negativa sensibilizada con el anticuerpo monoclonal patrón se resta de la señal de la cúpula positiva sensibilizada con el anticuerpo monoclonal específico del parásito. Con el antígeno de control del kit se pudo establecer la validez de los resultados obtenidos.

#### **Interpretación de los resultados.**

- Finalmente se leyó la densidad óptica (DO) a 450 nm de cada pocillo, usando un lector de microplacas Modelo: Opsys MR (ThermoLabSystems).

Para cada muestra se calculó la DO neta deduciendo de cada resultado obtenido la del control negativo correspondiente.

Igual procedimiento se siguió con el antígeno positivo de control.

El test sólo pudo ser validado si el antígeno positivo de control presentaba una diferencia de DO en diez minutos superior a los valores indicados en el control de calidad anexo.

El límite de positividad del antígeno fue de 0,150. Las muestras que expresaron una diferencia de DO superior o igual a 0,150 se consideraron positivas. Por el contrario, las muestras que dieron una diferencia de DO inferior a 0,150 se consideraron negativas.

Los valores de DO para cada una de las muestras se calcularon substrayendo al valor obtenido en los pocillos con anticuerpos específicos para cada una de las toxinas (filas A, C, E y G), el correspondiente control negativo o el valor obtenido en los pocillos con anticuerpos no específicos (filas B, D, F y H).

### **Análisis Estadístico**

Los resultados obtenidos fueron procesados con el empleo del paquete estadístico: ESTATISTICA Versión 8.0 (Stat Soft, 2008).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Positividad del Kit *ELISA* en la determinación de *Cryptosporidium parvum*.**

Los valores que informan exactamente el resultado de la prueba son los de la Densidad Óptica (DO), brindados por la lectura del equipo Opsys Reader a la longitud de onda de 405 nm, ejemplos de esta lectura son las imágenes 1 y 2.

#### **Imagen 1: Matriz de DO de un *ELISA* para *Cryptosporidium parvum* (Placa 1)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,078	0,139	0,091	0,078	0,079	0,072	0,144	0,066	0,070	0,089	0,126	2,450
B	0,066	0,065	0,076	0,119	0,062	0,054	0,089	0,059	0,055	0,064	0,102	0,061
C	0,141	1,306	0,087	0,070	0,176	1,124	0,105	0,097	0,492	0,083	0,063	2,372
D	0,107	0,490	0,075	0,054	0,117	1,000	0,073	0,066	0,063	0,083	0,053	0,058
E	0,209	0,065	0,351	0,073	0,064	0,086	0,067	0,186	0,081	0,054	0,092	0,102
F	0,177	0,056	0,261	0,065	0,052	0,063	0,054	0,144	0,057	0,050	0,079	0,093
G	0,071	0,128	0,182	0,079	0,300	0,062	0,107	0,126	0,213	0,114	0,096	0,070
H	0,079	0,065	0,064	0,075	0,105	0,050	0,091	0,106	0,276	0,086	0,086	0,058

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.02	0.074	0.015	0.041	0.017	0.018	0.055	0.007	0.015	0.025	0.024	2.389
B												
C	0.04	<b>0.816</b>	0,012	0,016	0,059	0,124	0,032	0,031	<b>0,429</b>	0,019	0,01	2,314
D												
E	0.032	0.009	0,09	0,008	0,012	0,023	0,013	0,042	0,021	0,004	0,013	0,009
F												
G	0.08	0.063	0,118	0,004	<b>0,405</b>	0,012	0,016	0,02	0,063	0,028	0,01	0,012
H												

**Imagen 2: Matriz de DO de un ELISA para *Cryptosporidium parvum* (Placa 2)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,083	0,061	0,136	0,491	0,099	1,169	0,206	0,174	0,089	0,126	0,155	2,666
B	0,081	0,055	0,102	0,117	0,064	0,093	0,091	0,131	0,074	0,087	0,104	0,070
C	0,202	0,225	0,091	0,839	0,106	0,099	0,080	0,066	0,534	0,150	0,125	2,755
D	0,116	0,175	0,095	0,492	0,093	0,082	0,071	0,051	0,233	0,104	0,065	0,062
E	0,127	0,116	0,118	0,070	0,097	0,112	0,275	0,060	0,232	0,062	0,122	0,075
F	0,057	0,086	0,090	0,058	0,084	0,110	0,054	0,053	0,058	0,054	0,095	0,064
G	1,225	0,138	0,059	0,092	0,169	0,110	0,130	0,070	0,161	0,097	0,126	0,070
H	1,222	0,065	0,052	0,078	0,143	0,095	0,123	0,080	0,154	0,115	0,068	0,062

Para la interpretación de los resultados, las muestras que dieron una diferencia de DO superior o igual a 0,150 se consideraron positivas (Grafico 1). Por el contrario, las muestras que dieron una diferencia de densidad óptica inferior a 0,150 se consideraron negativas (Tabla 1 y 2).

**Tabla 1: Determinación del límite de positividad del antígeno (Placa 1)**

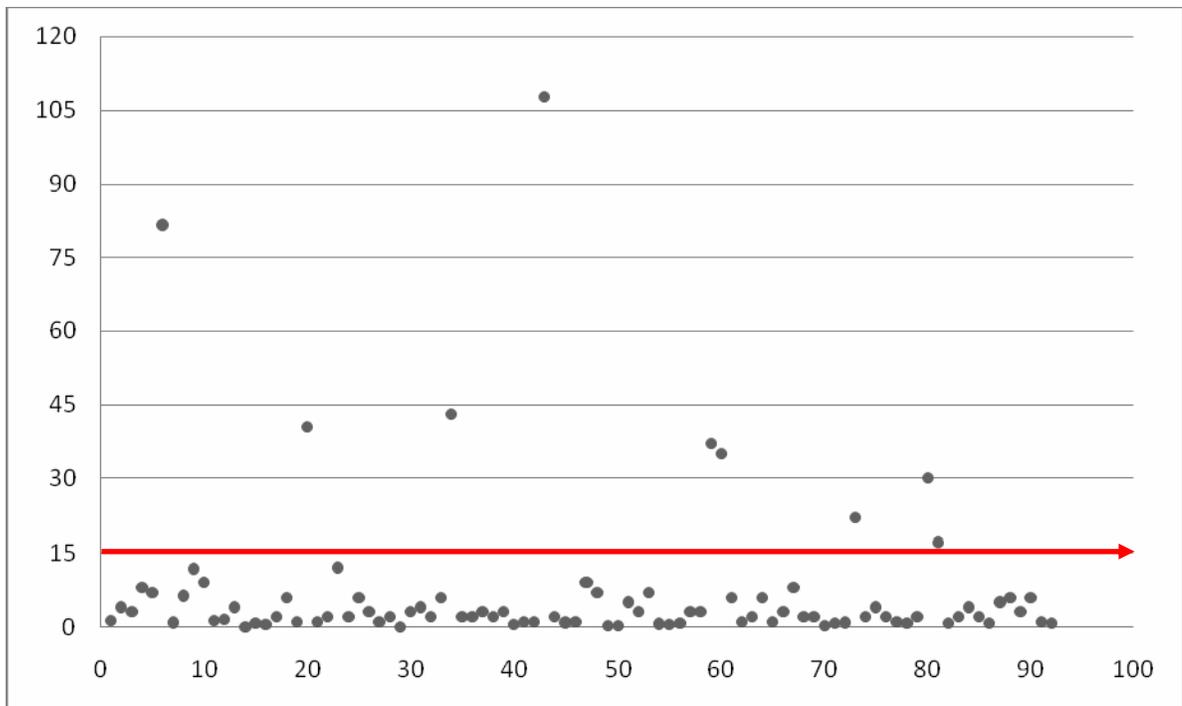
**Tabla 2: Determinación del límite de positividad del antígeno (Placa 2).**

E	0,17	0,23	0,28	0,58	0,512	0,602	<b>0,221</b>	<b>0,807</b>	<b>0,174</b>	<b>0,108</b>	<b>0,127</b>	<b>0,111</b>
A												
B	0,002	0,006	0,034	<b>0,374</b>	0,017	<b>1,076</b>	0,15	0,043	0,015	0,039	0,051	2,596
C	0,003	0,073	0,007	0,014	0,026	0,015	0,007	0,01	0,007	0,018	0,058	0,008
D	0,086	0,05	0,004	<b>0,347</b>	0,059	0,017	0,009	0,015	<b>0,301</b>	0,046	0,06	2,693

Se obtuvieron un total general de 9 determinaciones positivas para el parásito *C.parvum* (ver grafico 1). De ellas, 3 (6.8%) pertenecieron a muestras tomadas de cerditos que se encontraban entre los 0 y 25 días de nacidos (crías) y las otras 6 (13.04%) pertenecieron a muestras de cerditos que se encontraban entre los 26 y 50 días (precebas) (Tabla 3).

La mayoría de los estudios, reportan un prevalencia superior en animales pre destetado a los post destetados (Quílez *et al.*, 1996; Ryan *et al.*, 2003; Maddox-Hyttel *et al.*, 2006; Vítovec *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2008; Martín Kvac *et al.*, 2009).

**Grafico 1: Distribución general de valores de DO para *Cryptosporidium parvum*.**



El análisis estadístico ilustra que no existen diferencias significativas entre las dos categorías estudiadas (crías y precebas) según se observa en el grafico 2. Con un

estudio similar realizado por Chen y Huang (2007), que no encontró diferencias estadísticas entre estos grupos (21%:23%;  $P > 0.05$ ).

Un resultado similar es reportado por Ran Yu *et al.*, (2004), donde la incidencia de *Cryptosporidium parvum* fue de 10.5 %.

Coincidiendo con Johnson *et al.*, (2008), que encontraron una prevalencia de 22.1 % para *Cryptosporidium*. Reportándose una mayor incidencia en animales post destetes, 32.7 % (51/156) contra 10.6 % (13/126) para animales pre destete.

Estudios realizados a nivel mundial muestran diferentes niveles de prevalencia como 1.4% en Alemania (Wieler *et al.*, 2001), 2.1% en Cuba (Cabrera y García, 1985), 5.3% en los Estados Unidos (Sandford, 1987), 10.5% en Corea Sur (Yu y Seo, 2004), 22.1% en Australia (Johnson *et al.*, 2008), 21.9% en España (Quilez *et al.*, 1996) y 33.2% en Japón (Izumiyama *et al.*, 2001).

Sandford en 1987 determinó en un lote de 48 cerdos diarreicos positivos a *C. parvum* que 20 de los mismos eran positivos a colibacilosis, coccidiosis, salmonelosis, disentería del cerdo o adenovirus, este resultado demostró que *C. parvum* no era la única causa de diarrea en algunos de los casos evaluados y puede coincidir con otros agentes induciendo o exacerbando las manifestaciones clínicas, haciendo pensar en una posibilidad fuerte de infección subclínica.

Enemark *et al.*, 2003 encontraron que una infección mixta de Rotavirus y *Cryptosporidium* puede ocasionar una mayor incidencia de diarrea.

**Tabla 3: Total de muestras positivas a *Cryptosporidium parvum* por categorías y por unidades investigadas.**

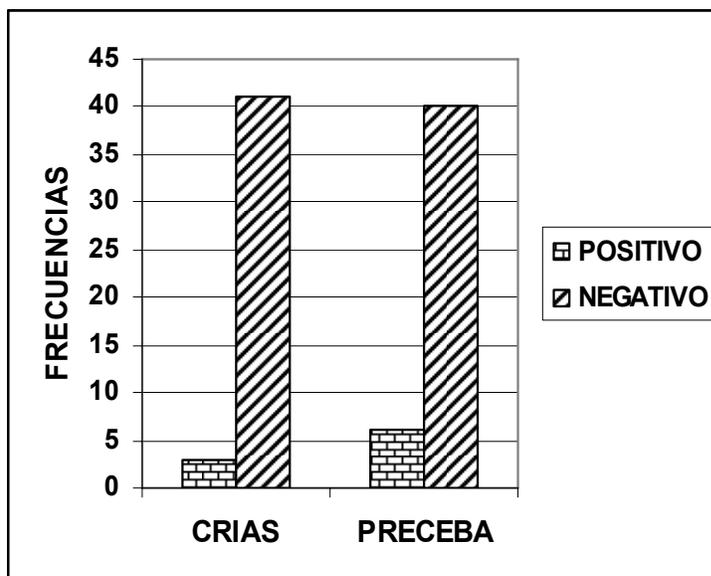
UNIDADES	Cantidad		%	
	Crías	Precebas	Crías	Precebas
A	1	1	11,1	16,6
B	1	1	16,6	11,1
C	-	-	-	-

D	-	2	-	28,57
E	1	-	12,5	-
F	-	2	-	25
<b>Total por Categorías</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>6.8</b>	<b>13.04</b>
<b>Total General</b>		<b>9</b>		<b>10</b>

No obstante, la determinación del *C.parvum* por un método con un nivel más alto de sensibilidad y especificidad diagnóstica nos permite comparar estos resultados con los obtenidos por Suarez –Luengas *et al.*, 2007, que determinaron la presencia de *Cryptosporidium* en el 30.7 % de los cerdos destetados, en cerdos de ceba (11.9 %) y 16 % en cerdas, no detectándose diarreas en ninguno de los cerdos investigados a diferencia de nuestros resultados en el que todos los cerdos presentaban diarrea.

Por otro lado, Quilez *et al.*, (1996), Ryan *et al.*, (2003), Guselle *et al.*, (2003) y Vitovec *et al.*, (2006) no encontraron asociación con infección de *Cryptosporidium* en cerdos con diarrea.

**Grafico 2: Distribución del total de muestras obtenidas positivas estudiadas, en relación a las categorías de los animales.**



Resultando un 10 % de positividad en ambas categorías estudiadas, lo que conlleva en muchas ocasiones a la aparición de síntomas clínicos y hasta la muerte (Manual Merck de Medicina Veterinaria, 2000). Esto se debe al bajo nivel inmunitario de los cerditos en las primeras semanas de vida, lo que los lleva a presentar en ocasiones síntomas clínicos incluso con infestaciones leves, además, a esta edad los animales no han estado expuestos anteriormente a cargas parasitarias para crear resistencia.

Izumiyama *et al.* (2001) reportaron que los cerditos destetados son más propensos a presentar cryptosporidiosis que los cerdos más viejos, excretando más ooquistes. Los cerditos destetados son considerados depósitos importantes *C. parvum*, contaminando el agua de bebida.

No coincidiendo nuestros resultados con Quiles *et al.*, (1996) donde encontraron una prevalencia en cerdos destetados que no presentaban diarrea de 64.7 % y de 46.7 % en cerdos con diarrea y en cerdos de ceba que no presentaban diarrea un 34.3 % y en cerdos con diarrea un 33.3 %, ya que todos nuestros animales investigados presentaban diarrea.

Por otro lado, Chen y Huang (2007) encontraron una asociación positiva entre el positividad del ooquiste y la presencia de diarrea, la prevalencia no resulto con diferencia significativa entre categorías pre destetes y post destetes.

Hamnes *et al.*, (2007) informaron un predominio significativamente superior de diarrea entre las camadas que habían resultado positivas a *Cryptosporidium*.

En Serbia, Mišić *et al.*, 2003 determinaron que en cerdos lactantes que presentaban diarrea resultaron positivos a *Cryptosporidium*, sin embargo, en cerdos post destetes y adultos, la infección se desarrolla asintomática.

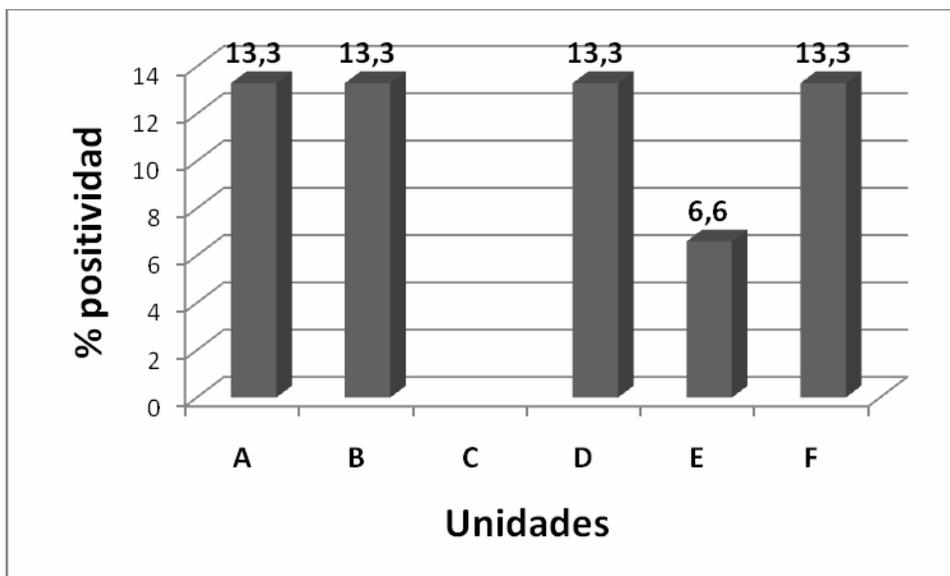
En México, Nevarez *et al.*, (1997) implicaron a *Cryptosporidium* como la causa infecciosa de enteritis en tres cerdos destetados de 10 semanas de edad en un lote de cerdos con malas condiciones de higiene y que habían sido sometidos a varios tratamientos con antibióticos.

Como los referidos por Sandford (1987), Izumiyama *et al.*, (2001) y Ryan *et al.*, (2003), reportando mayor incidencia de positividad a *Cryptosporidium* en el período post destete.

### **Corroboración de la presencia de *Cryptosporidium parvum* en las diferentes unidades.**

La determinación de *Cryptosporidium parvum* en muestras biológicas de heces fecales de los cerditos muestreados, demostró la presencia de *Cryptosporidium parvum* en el 83.3% de las unidades investigadas (Ver Gráfico 3 y 4). Este resultado supera un estudio realizado por Reinoso & Becares (2008), quienes reportan un 53 % de positividad de las unidades investigadas. Por otro lado, Quiles *et al.*, 1996 corroboraron la presencia de *Cryptosporidium parvum* en 21(77.8%) de las 27 unidades porcinas analizadas en Aragón España. Entre las seis unidades investigadas se aprecian diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) en cuanto a la presencia del *C. parvum* en las mismas, donde se observa que la proporción de muestras positivas fue cinco veces mayor (Ver Gráfico 4).

**Gráfico 3: Prevalencia del *Cryptosporidium parvum* por unidades.**



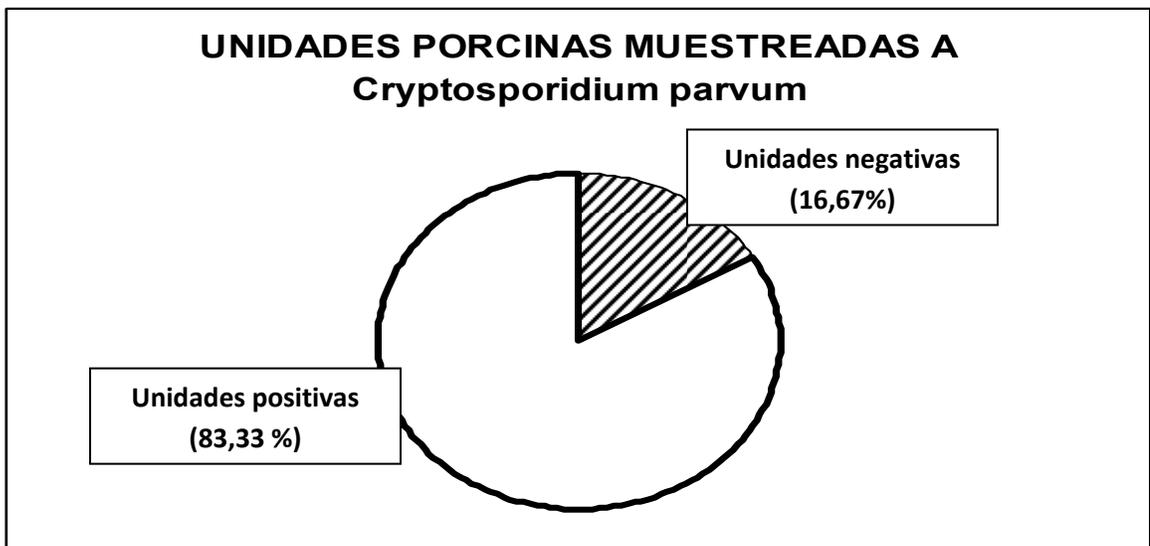
Resultado que pudiera atribuirse a la individualidad así como a las condiciones de bioseguridad, y de la situación zoonositaria en las categorías de cerdos susceptibles en cada

una de las instalaciones. Las causas fundamentales que originan una situación epizootica desfavorable, y que contribuyen a favorecer la propagación de la enfermedad, son, la contaminación del agua de bebida, la mala calidad sanitaria de los alimentos, inestabilidad en el suministro de piensos, bajo peso corporal de ellas crías en el momento del destete y deficientes condiciones higiénicas sanitarias. Considerando como un aspecto esencial, la carencia de productos desinfectantes para los procesos de habilitación sanitaria en las instalaciones destinadas a la maternidad.

Donde una alimentación adecuada puede tardar la aparición de *C.parvum* hasta después del destete .Posiblemente factores de inmunidad innata y adquiridos por la madre a través de la leche pueden proteger los cerditos lactantes de la infección (Olson *et al.*, 2003).

Por otra parte, la posible inadecuada desactivación de cadáveres y la contaminación de fuentes de abasto de agua de bebida favorecen la supervivencia de los microorganismos en las fuentes de infección primarias y facilitan la transmisión horizontal en la población de cerdos susceptibles en el interior de las granjas afectadas, lo cual favorece la propagación a otras unidades con vínculos dentro del territorio, especialmente aquellas con una alta población de cerdos.

**Grafico 4 Distribución del total de unidades positivas.**



Existen autores que asocian la presencia de *Cryptosporidium* con las diarreas, como los reportados en Serbia, donde los casos en crías que fueron confirmados como positivo a *Cryptosporidium* presentaban diarreas, no comportándose de esta manera los cerdos post destetados y adultos (Mišić *et al.*, 2003).

Otros autores, como Johnson en el 2008 determinaron la presencia de *C. suis* y el *PGII* en cerdos post destetes y sus heces eran normales y tenían buena salud.

Es preciso destacar la importancia zoonótica de este parásito, ya que se transmite al hombre; cursan con diarrea, deshidratación y hasta la muerte a personas inmunodeprimidas, fundamentalmente aquellas que padecen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Maggi *et al.*, 2000); de ahí la importancia de controlar esas entidades.

## **CONCLUSIONES**

De acuerdo a los resultados obtenidos y a la literatura consultada inferimos las siguientes conclusiones:

1. Se demostró la presencia de *Cryptosporidium parvum* en 5 de las 6 unidades donde se realizaron los muestreos.
2. Existe una mayor infestación en la categoría “preceba” que en la categoría “crías”, no encontrándose diferencia significativa.

## **RECOMENDACIONES**

1. Estudiar la posible influencia del *C.parvum* con la coexistencia con otros patógenos entéricos que puedan ocasionar diarrea.
2. Utilización del kit comercial de ELISA indirecto como método diagnóstico para la determinación de *C.parvum* por su mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica frente a los métodos convencionales hasta ahora utilizados.
3. Profundizar en los planes de capacitación y superación de todo el personal del sector, en los aspectos tecnológicos del proceso productivo, haciéndose también hincapié en las cuestiones inherentes al trabajo higiénico sanitario en las unidades.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abe, N., Sawano, Y., Yamada, K., Kimata, I., Iseki, M., 2002.** *Cryptosporidium* infection in dogs in Osaka, Japan. *Vet Parasitol* .108: 185-193.
- Alves, M., Matos, O., Spano, F., Antunes, F., 2000.** PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from HIV-infected patients in Lisbon, Portugal. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94:291-297.
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M., Fernández-Cruz, M.,1996.** Physiologie de la mamelle et thérapeutique antinfectieuse chez la truie. *Rev. Med. Vet.* 147 :181-190
- Angus KW., 1990.** Cryptosporidiosis in ruminants. In: Dubey JP, Speer CA, Fayer R, editors. *Cryptosporidiosis of man and animals.* Boca Rato: 83±103.
- Arrowood Michael J., 2002.** In Vitro Cultivation of *Cryptosporidium* Specie Clinical *Microbiology Reviews.*5:390-400

- Akiyoshi, D.E., Feng, X., Buckholt, M. A., Widmer, G., Tzipori, S., 2002.** Genetic analysis of a *Cryptosporidium parvum* human genotype 1 isolate passaged through different host species. *Infect. Immun.* 70:5670–5675.
- Atwill, Edward, R., Sweitzer, R., Das Grac, M., 1997.** Applied and environmental microbiology.63: 3946–3949
- Bertschinger, H., 1999.** Coliform mastitis. En: "Diseases of swine". 8th ed. Iowa State University Press: 833-860.
- Bilic, H. R., Bilkei, G., 2006.** *Balantidium*, *Cryptosporidium* and *Giardia* species infections in indoor and outdoor pig production units in Croatia *Veterinary Record.* 158: 61
- Bisel, F., Cotte, L., Rabodonirina, M., Rougier P., Piens, M. A. & Trepo, C., 1994.** Paromomycin: treatment for cryptosporidial diarrhea in patients with AIDS. *Clinical Infectious Diseases* .18:447-449.
- Bolcskei, A., Bilkei, G., Biro, Clavadetscher, E., Goost, Waller, C., Stelzer, P., 1996.** Management der *E. coli* – bedingten Faktorenkrankheiten nach dem Absetzen der Ferkel. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift.* 109: 108-111
- Cabrera, L. F., Garcia, M. G., 1985.** Intestinal cryptosporidiosis of diarrheic piglets in our environment. *Rev. Cubana de Cienc.Vet.* 16: 259-264.
- Caccio, S., Homan, W., Camilli, R., Traldi, G., Kortbeek, T., Pozio, E., 2000.** A microsatellite marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitol.*120:237-244.
- Caccio, S. M., Thompson, R.C.A., McLauchlin, J., Smith, H.V., 2005.** Unraveling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* 21:430–437.
- Callén, A., Falceto, M., 1996.** Endometritis porcina (Síndrome de la cerda sucia) *Anaporc.*160: 29-52
- Cama, V., Gilman, R.H., Vivar, A., Ticona, E., Ortega, Y., Bern, C., Xiao, L., 2006.** Mixed *Cryptosporidium* infections and HIV. *Emerging Infect. Diseases* 12: 1025–1028.

- Cantín, C., Oliva, J., Fillola, T., Luengo, A., Pérez, I., 1999.** Results obtained in Spain following the systematic application of flunixin meglumine post-farrowing. IPVS. Iowa (USA)
- Carreno, R. A., Pokorny, N. J., Lee, H., Trevors, J. T., 2001.** Phenotypic and genotypic characterization of *Cryptosporidium* species and isolates. J. Ind. Microbiol. Biotechnology. 26: 95-106
- Casemore, D.P., 1989.**The epidemiology of human cryptosporidiosis. Workshop Cryptosporidiosis. Edinburgh, 1988: 65-78.
- Chai, J. Y., Kim, N. Y., Guk, S. M., 2001.** High prevalence and seasonality of cryptosporidiosis in a small rural village occupied predominantly by aged people in the Republic of Korea. *Am J Trop Med Hyg.*65: 518-522.
- Chaisson, R., Moore, R., Keruly, J., 1998.** Impact of opportunistic disease on survival in patients with HIV infection. *AIDS.* 12:pp.29-33.
- 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 domestics*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasitol Res.*83: 478-482.
- Chen, Y., Yao, F., Li, H., Shi, W., Dai, M, Lu, M., 1992.** *Cryptosporidium* infection and diarrhea in rural and urban areas of Jiangsu, People's Republic of China. *J. Clin. Microbiol.* 30:492–494.
- Chen, F., Huang, K., 2007.** Prevalence and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* in pigs in eastern China. *Zoonoses Public Health.* 54: 393–400.
- Coste, J., 1997.** Cryptosporidiosis en pacientes seropositivos o enfermos del VIH. Sanitario provincial Pinar del Río. X111 Congreso Latinoamericano de Parasitología. La Habana 17al 23 de Noviembre: 25.
- Current, W. L., Reese, N. C., Ernst, J. V., Bailey, W. S., Heyman, M. B., Weinstein W. M., 1983.** Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. *N. Engl. J. Med.*308: 1252–1257.

- Current, W. L., & Garcia, L. S., 1991.** Cryptosporidiosis. Ciin. Microbiol. Rev., 4: 325-358.
- Delouis, C., Richard, P., 2003.** Lactation. En: Reproduction in mammals and man. Ed. C. Thibault; M.C. Levasseur; R.H.F. Hunter. Ellipses, París.
- Duarte, B., 1997.** *Cryptosporidium* sp. como causa de diarrea en un círculo infantil en la Ciudad de Pinar del Río. XIII Congreso Latinoamericano de Parasitología. La Habana 17 al 23 de Noviembre: 51
- Dupont H., Chappell C.; Sterling C., 1995.** The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. The New England Journal of Medicine.Vo.332 No.13. pp. 855-859.
- Ebeid, M.; Mathis, A., Pospischil, P., 2003.** Deplazes Infectividad del *Cryptosporidium parvum* genotipo I en la cerditos y corderos criados de una forma convencional. Parasitol Res. 90: 232–235.
- Enemark, H. L., Ahrens, P., Bille-Hansen, V., Heegaard, P. M. H., Vigre, H., Thamsborg, S. M., Lind, P., 2003.** *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the \_porcine\_ genotype. Parasitology. 126: 407–416.
- Enemark, H. L., Ahrens, P., Juel, C. D., Petersen, E., Petersen, R. F., Andersen, J. S., Lind, P., Thamsborg, S. M., 2002.** Molecular characterization of Danish *Cryptosporidium parvum* isolates. Parasitol.125: 331–341.
- Enemark, H. L., Bille-Hansen, V., Heegaard, P. M., Vigre, H., Thamsborg, S. M., Lind, P., 2003.** Pathogenicity of *Cryptosporidium parvum* evaluation of an animal infection model. Vet. Parasitol. 113: 35–57
- Fayer, R., Graczyk, T. K., Lewis, E. J., Trout, J. M., Farley, C. A., 1998.** Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. Appl. Environ. Microbiol. 64:1070-1074.
- Fayer, R., Morgan, U., Upton, S. J., 2000.** Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int. J. Parasitol. Vol.30: pp.1305–1322.

- Fayer, R.; Trout, J. M.; Xiao, L., Morgan, U. M., Lal, A. A., Dubey, J. P., 2001.** *Cryptosporidium canis* n. sp. From domestic dogs. J. Parasitol. 87: 1415–1422.
- Fayer, R., Santin, M., Xiao, L., 2005.** *Cryptosporidium bovis* n.sp (Apicomplexa: *Cryptosporididae*) in cattle (*Bos taurus*). J. Parasitol.91: 624–629.
- Fleta, J., Sfinchez-Acedo, C., Clavel, A., Quflez, J., 1995.**Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extra-intestinal tissues of sheep and pigs Veterinary Parasitology. 59:.201-205.
- Gasser, R. B., Zhu, X., Caccio, S., Chalmers, R., Widmer, G., Morgan, U. M., Browning, G. F., 2001.** Genotyping *Cryptosporidium parvum* by single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal and heat shock gene regions. Electrophoresis.22: 433-437.
- Gatei, W., Wamae, C. N., Mbae, C., Waruru, A., Hart, C. A., 2006.** Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya. The American Journal of Trop. Med. and Hygiene. 75:78–82.
- Gajecki, M., Przala, F., Bakula, T., Zduńczyk, E., Skorska-Wyszyńska, E., Kmita-Glazewska, H., Milosz, Z., Rodziewicz, M., 1998.** Prevención del síndrome MMA en cerdas preñadas mediante la administración de sulfato sódico. Med. Vet. .5:.223-227.
- Gil, Pascual, J., Pallas, R., Gil García, M., 1997.** Optimización de los parámetros reproductivos porcinos mediante la utilización de PGF2alfa en el periodo postparto. Anaporc. 107:17-22
- Goodwin, M. A., 1989.** Cryptosporidiosis in birds: A review. Avian Pathol. 18: 365-384.
- Gookin, J. L., Riviere, J. E., Gilger, B. C., Papich, M. G., 1999.**Acute renal failure in four cats treated with paromomycin. 215:1821-1823.
- Greene, C. E., Jacobs, G. J., Prickett, D., 1999.** Intestinal malabsorption and cryptosporidiosis in an adult dog. J. Am. Vet. Med. Assoc. 197: 365–367
- Griffiths, J. K., 1998.** Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment, and diagnosis. Adv. Parasitol. 40:37–85.

- Guerrant, R. L., 1997.** Cryptosporidiosis: an emerging, highly infectious threat. *Emerg. Infect. Dis.*3: 51–57.
- Guselle, N. J., Appelbee, A. J., Olson, M. E., 2003.** Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs: from weaning to market. *Vet. Parasitol.* 113:7–18.
- Hamnes, I. S., Gjerde, B. K., Forberg, T., Robertson, L. J., 2007.** Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in suckling piglets in Norway. *Veterinary Parasitology* 144, 222-233.
- Hamnes, I. S., Gjerde, B. K., Forberd, T., 2006.** Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in suckling piglets in Norway. *Vet. Parasitology* .141 : 30-41
- Hijawi, N. S., Meloni, B. P., Morgan, U. M., Thompson, R. C., 2001.** Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. *Int J Parasitol.*31:1048–1055
- Holland, R. E., 1990.** Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microbial. Rev.* 3:345-375
- Hornok, S., Heijmans, J. F., Békesi, L., Peek, H. W., Varga, I., 1998.** Interaction of chicken anemia virus and *Cryptosporidium baileyi* in experimentally infected chickens. *Vet. Parasitol.* 76: 43–55.
- Huston, C.D., Petri, W. A., 2001.** Emerging and reemerging intestinal protozoa. *Current Opinion in Gastroenterology.* 17:17-21
- Illera, M., 1998.** Endocrinología veterinaria y fisiología de la reproducción. Cilibac-Distribuidor. Madrid.
- IMV. (2008).** Principales Causas de Muerte en el 2008.
- Instrucción 2/86** de la Notificación obligatorio de Enfermedades al IMV del Ministerio de la Agricultura. República de Cuba.
- Izumiyama, S., Furukawa, I., Kuroki, T., Yamai, S., Endo, T., 2001.** Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infections in weaned piglets and fattening porkers in Kanagawa Prefecture, Japan. *Jpn.J. Infect. Dis.* 54: 23–26.

- Johnson, J., Buddle, R., Reid, S., Armson, A., Ryan, U. M., 2008.** Prevalence of *Cryptosporidium* genotypes in pre and post-weaned pigs in Australia. *Exp. Parasitol.* 19: 418–421.
- Jokipii, L., Pohjola, S., Jokipii, A. M., 1983.** *Cryptosporidium*: A frequent finding in patients with gastrointestinal symptoms. *Lancet* II: 358–361
- MacKenzie W (1994)** A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med* . 331: 161–167
- Kaplan, J., Masur, H., Holmes, K., 2002.** Guidelines for preventing opportunistic infections among HIV-infected persons. *MMWR*; 51: 1-46.
- Kennedy, G. A., Kreitner, G. L., Strafuss, A. C., 1977.** Cryptosporidiosis in three pigs. *J. Vet. Med. Assoc.* 130: 348–350.
- Klopfenstein, C., Farmer, C., Martineau, G., 1999.** Diseases of the mammary glands and lactation problems. En: "Diseases of swine" B.E.Straw; S.D. 'Allai-re, W.L. Mengeling, D.J. Taylor. 8th ed. Iowa State University Press. 833-860.
- Kovatch, R. M., White, J. D., 1972.** Cryptosporidiosis in two juvenile rhesus monkeys. *Vet. Pathol.*9: 426-440.
- Kváč, M., Květoňová, D., Půžová, G., Ditrich, O., 2003.** Comparison of Selected Diagnostic Methods for Identification of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium andersoni* in Routine Examination of Faeces. *Journal of Vet. Medic.* 50: 40
- Langkjaer, R. B., Vigre, H., Enemark, H. L., Maddox-Hyttel, C., 2007.** Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology.* 134: 339–350.
- Lappin M.R., Dowers, K., Ellsall, D., Taton-Allen, G., Cheney, J., 1997.** Cryptosporidiosis and inflammatory bowel disease in a cat. *Fel Pract* .Vol.3:pp.10-13.
- Leah, M., Zadrozny, H., Jones, L., Jody, L., 2006.** Neutrophils Do Not Mediate the Pathophysiological Sequelae of *Cryptosporidium parvum* Infection in Neonatal Piglets. 74: 10 .

- Le Coz, P. ,1995.** Control de las metritis. Anaporc.150: 56-67
- Lent, S.F., Burkhardt, J. E., Bolka, D., 1993.**Coincident enteric cryptosporidiosis and lymphosarcoma in a cat with diarrhea. Journal of the American Animal Hospital Association .29:492-496.
- León, V., Madrid Sánchez, J., Hernández Ruipérez, F., Pelegrín, A., 2001.** Ciencias Veterinarias Volumen XXX. Consejo General de Colegios Veterinarios de España.
- Liebler, E.M., Pohlenz, J.F., Woodmansee, D.B., 1986.** Experimental intra-uterine infection of adult BABL/c mice with *Cryptosporidium* sp. Infect. Immun.54:255-259.
- Lindsay,D.S.,Blagburn,B.L.,1991.**Cryptosporidium parvum infections of swine.Compedium, Vol.13:pp.891-894
- Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., Stuart, B.P., 1992.** Coccidia and other protozoa.In: Diseases of swine .7<sup>th</sup> ed. 660-667
- Lindsay, D. S., Upton, S. J., Owens, D. S., Morgan, U. M, Blagburn, B. L. , 2000.** *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from Cattle, *Bos taurus*. J. Eukaryot. Microbiol..47: 91–95.
- MacKenzie, W., 1994.** A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. N Engl J Med . 331:161–167
- MacKenzie, W., Hoxie, N., Proctor, M., Gradus, S., Davis, J., 2005.** A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. N Engl J Med. 331:161–167.
- Macleod, G.,1994.** Pigs: The homoeopathic approach to the treatment and prevention of diseases. The C.W. Daniel Company Limited.
- Maddox-Hyttel,C., Langkjaer, R.B., Enemark, H.L., Vigre, H., 2006.***Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs–occurrence and management associated risk factors. Vet Parasitol .141:48–59.
- Maggi ,P., Larocca, A.M.V., Quarto, M., Serio, G.,Pastore, G., 2000.**Effect of the Antiretroviral Therapy on Cryptosporidiosis andmicrosporidiosis in Patients Infected

with Human Immunodeficiency Virus Type 1. *European Journal Of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* .19:213-217.

**Marguilis, S.J., Honing, C.L., Soave, R., Bovoni, A.F., Jacobson, M., 1986.** Biliary tract obstruction in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.*,105: 207-210.

**Martin Kváč, Bohumil, S., Hanzlíková, D.,Květoňová, D., 2009.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs at slaughterhouses in South Bohemia, Czech Republic. *Parasitol Res.*104:425–428

**Martineau, G., Smith, B., Doize, B., 2002.** Pathogenesis, prevention and treatment of lactational insufficiency in sows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.*8:661-684.

**Martineau, G., Klopfenstein, C., 2002.** Pour une meilleure lactation. *Rencontres Internationales de production Porcine.* Loudéac.

**Martineau, G., Klopfenstein, C. (2005).** Fisiopatología de lactación (la disgalaxia) y fisiopatología de las adopciones (la disadopción). VI Simposio Internacional de Reproducción e Inseminación Artificial Porcina. Madrid.

**Mascaro, C., Aroedo, T., Rosales, M.J., 1994.** Respiratory cryptosporidiosis in a bovine. *J. Parasitol.*80:334-336.

**McDonald, V., 2005.** Cryptosporidiosis. *The Welcome Trust illustrated history of tropical diseases.* London, England: The Welcome Trust: 256-263

**Mc Reynolds, C., Lappin, M.R., McReynolds, L., Spilker, M., Spilker, S., 2000.** Serum and fecal *Cryptosporidium* antibody in experimentally inoculated cats. *Vet. Parasit.*15:20-23.

**Merck & Co. Inc. 2000.** El manual Merck de Veterinaria. Edic.5; edit. Océano Grupo

**Merck & Co. Inc. 2006.** El manual Merck de Veterinaria. Edic.1; edit. Océano Grupo

**Merino, N., 1991.** Cryptosporidiosis asociada a la infección de bacterias enteroinvasivas en conejos diarreicos. *Rev. Salud animal.* 13 :87-90.

- Meuten, D. J.; Van Kruiningen, H. J.; Lein, D. H. 1975.** Cryptosporidiosis in a calf. J Am Vet Med Assoc 165:910±4
- Misic, Z., Katic-Radivojevic, S., Kulisic, Z., 2003.** Cryptosporidium infections in nursing, weaning and post-weaned piglets and sows in the Belgrade district. Acta Vet. (Belograd.) 5–6: 361–366.
- Moore, R., Tzipori, S., Griffiths, J. K., Johnson, K., Montigny, L., Lomakina, I., 1995.** Temporal changes in permeability and structure of piglet ileum after site-specific infection by *Cryptosporidium parvum*. Gastroenterology. 108: 1030-1039
- Morgan, U. M., Buddle, Armson, A., Elliot, A., Thompson, R.C., 1999.** Molecular and biological characterization of *Cryptosporidium* in pigs. Aust. Vet. J. 77: 44–47.
- Morgan, U.M., Xiao, L., Fayer, R., Lal, A.A., Thompson, R.C., 2000.** Epidemiology and strain variation of *Cryptosporidium parvum*. Contrib. Microbiol. 6:116–139.
- Morgan, U. M., Monis, P. T., Xiao, L., O'Donoghue, P., Fayer, R., Thompson, R. C., 2001.** Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* from birds. Int. J. Parasitol. 31:289-296
- Morgan-Ryan, U., Fall, A., Ward, L., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R., 2002.** *Cryptosporidium hominis* sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo sapiens. J Eukaryot Microbiol. 49:433-440.
- Mosier, D.A., Oberst, R.D., 2000.** *Cryptosporidiosis*: a global challenge. Ann. N. Y. Acad. Sci. 916:102–111.
- Muthusamy, D., Rao, S.S., Ramani, S., Monica, B., Banerjee, I., Abraham, O.C., Kang, G., 2006.** Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* sp. isolates from human immunodeficiency virus-infected individuals in South India. Rev. Microb. Clin. 44: 632–634.
- Nevarez, A.M., Ramírez, R., Niño, R., Rodríguez, L.E., Ramírez, E., 1997.** Identificación de *Cryptosporidium* en cerdos con enteritis. Veterinaria México 28, 231-234.

- Yu, J. R., Seo, M., 2004.** Infection status of pigs with *Cryptosporidium parvum*. Korean Journal of Parasitology 42, 45-47.
- Nime, F. A., Burek, J. D., Page, D. L., 1976.** Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan cryptosporidium. Gastroenterology. 70:592-598.
- Noordeen, F., Rajapakse, R. P., Faizal, A. C., Horadagoda, N. U., Arulkanthan, A. 2000.** Prevalence of *Cryptosporidium* infection in goats in selected locations in three agroclimatic zones of Sri Lanka. Vet. Parasitol.93:95–101
- Núñez, A., McNeilly, F., Perea, A., Sánchez-Cordón, P.J., Huerta, B., 2003.** Coinfection by *Cryptosporidium parvum* and porcine circovirus type 2 in weaned pigs. J. Vet. Med. 50:255–258
- O'Donoghue, P.,1995.** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. Int J Parasitol.25:139-195.
- Oliva, J., Pérez, I., 2003.** Uso de finadyne en cerdas para estimular su capacidad lechera. Albéitar . 28:28-29
- Olson, M. E., Goh, J., Philips, M., Guselle, N., McAllister, T. A., 1999.** *Giardia* cyst and *Cryptosporidium* oocyst survival in water, soil, and cattle feces. J. Environ. Qual.28:1991–1996.
- Olson, M.E., Guselle, N.J., Appelbee, A.J., 2003.**Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs: from weaning to market. Veterinary Parasitology .113: 7–18
- Pavlasek, L., Nikitin, V.F., 1987.** Finding of coccidia of the genus *Cryptosporidium* in the organs of the calf excretory system. Folia Parasitol.Vol: 197-198.
- Pejsak, A., Tarasuik, K., Jochle, W., (2004.** Immuno-prophylaxis against MMA and/or CM in sows with a vaccine against urinary tract infections. Libro del 11th International Pig Veterinary Society Congress, Lausanne (Suiza) : 307.
- Pereira, S.J., Ramirez, E., Ward, A., 2002.**Pathogenesis of Human and Bovine *Cryptosporidium parvum* in Gnotobiotic Pigs. The Journal of Infectious Diseases. 18:5-8

- Pérez, I., 2002.** Lactation problems in sows: New trials and data concerning the effectiveness of the systematic use of flunixin meglumine post partum in the sow and the weight improvement in the litter at weaning. IPVS. Sidney (Australia).
- Pieniazek, N. J., Bornay-Llinares, F. J., Slemenda, S. B., Addiss, D. G. ,1999.** New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. *Emerg. Infect. Dis.* 5:444–449.
- Plonait, H., Kump, W., Schoning, G., 2003.** Profilaxis del síndrome MMA por medicación antibacterina y alimentación restringida. *Veterinaria en Praxis.* 7:20-21.
- Prieto, D., 2004.** Fisiología de la lactación. En: García Sacristán, A. *Fisiología Veterinaria* Ed. Interamericana:893-914
- Quilez, J., Sánchez-Acedo, C., Clavel, A., Lopez-Bernad, F., 1996.** Prevalence of *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragon (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* 67:83–88.
- Ran, Y.Yu, Min, Seo., 2004.** Infection status of pigs with *Cryptosporidium parvum*. *The Korean Journal of Parasitology .* 42:45-47.
- Reinoso, R. & Becares E., 2008.** The occurrence of intestinal parasites in swine slurry and their removal in activated sludge plants. *Bioresource Technology.* 99: 6661–6665
- Rodríguez, R., Ligia, C. y Domínguez, J., 2001.** Frecuencia de parásitos gastrointestinales en animales domésticos diagnosticados en Yucatán, México.
- Roitt, I., Brostoff, J. y Malen, D., 1998.** *Immunología*, 4th edn. Harcourt Brace España, S.A., Madrid
- Rosell, V, Cereza, J., Concellón, A., 2004** Fisiología y prevención de la MMA de la cerda. *Anaporc.* 43: 3-8
- Rulofson, F.C., Atwill, E.R., Holmberg, C.A., 2001.** Fecal shedding of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium parvum*, *Salmonella* organisms, and *Escherichia coli* O157:H7 from llamas in California. *Am. J. Vet. Res.* 62: 637–642

- Ryan, U.M., Samarasinghe, B., Read, C., Buddle, J.R., Thompson, R.C., 2003.** Identification of a novel *Cryptosporidium* genotype in pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3970–3974.
- Ryan U.M., Samarasinghe, B., Read, C., Buddle, J. R.,Thompson, R. C. A., 2003.**Identification of a Novel *Cryptosporidium* Genotype in Pigs *Division of Health Sciences.* 615.
- Ryan, U.M., Monis, P., Enemark, H.L.,Sulaiman, I., Samarasinghe, B., Xiao, L., 2004.***Cryptosporidium suis* n. sp. (*Apicomplexa: Cryptosporidiidae*) in pigs(*Sus scrofa*). *J. Parasitol.* 90:769–773
- Stanford, S.E. (1987).** Enteric cryptosporidial infection in pigs: 184 cases (1981-1985). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Vol.190: pp.695-698.
- Santin, M., Trout, J.M., Xiao, L., Zhou, L., Greiner, E., Fayer, R., 2004.** Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet. Parasit.* 122:103–117.
- Sarli, G., Mandrioli, L., Laurenti, M., Marcato, P.S., 2001.** Immunohistochemical characterization of the lymph node reaction in pig post weaning multisystemic wasting syndrome. *Vet. Immunol.Immunopathol.*83:53–67.
- Schloemer, L., 1982.** Die Obertragung von *Cryptosporidium* sp. des Kalbes auf Mäuse, Hamster and Meerschweinchen sowie Schweine, Schafe und Ziegen. University~ München, Tier~, irztliche Fakultat, Diss.:44.
- Seculí, J., Perelló, B., 2000.** **Patología y clínica del ganado porcino.** 200:523-549
- Segalés, J., Alonso, F., Rossel, C., Pastor, J., Rodríguez-Arrijoja, M., Calsamiglia, G., Domingo, M., 2001.** Changes in periferal blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting síndrome (PMWS).*Vet. Immunol. Immunopathol.*81:37–44.
- Seok-Hwa, C., Seong-Soo, K., 2001.** Therapeutic effect of bee venom in sows with hypogalactia syndrome postpartum. *J. Vet. Sci.* 2 : 121-124

- Straw, B.E., Menge ling, W.L., Taylor, D. J., 1999.** Diseases of Swine, 8th edn. Blackwell Science Ltd, Oxford. Upton, S.J., and W.L. Current, 1985: The species of *Cryptosporidium* infecting mammals. J. Parasitol. 51:625–629.
- Suárez-Luengas, L., Clavel, A., Quílez, J., Goni-Cepero, M.P., Torres, E., Sánchez-Acedo, C., del Cacho, E., 2007.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain). Vet. Parasitol. 148:231–235
- Synder, S. P., England, J. J., McChesney, A. E., 1978.** Cryptosporidiosis in immunodeficient Arabian foals. Vet. Pathol. 15:2-17.
- Thatcher, G. & Friendship, R. M., 2003.** Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp infection on 77 Ontario hog farms. Vet. Parasitol. 52: 31-32
- Theodos, C.M., Griffiths, J.K., and Tzipori, S., 1998.** Efficacy of Nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in Cell Culture and in Animal Models. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 42:1959-1965.
- Thomson, J.R., Edwards, S.A., Strachan, W.D., King, T., Hazzeldine, M., 2004.** Etiología y control de las principales infecciones entéricas porcinas. J. Parasitol. 34:120-127
- Trotz-Williams, L.A., Jarvie, B.D., Martion, S.W., Leslie, K.E., Peregrine, A.S., 2005.** Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in southwestern Ontario and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. Can. Vet. 46:349–351.
- Tyzzar, E. E., 1907.** A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 5: 12–13
- Tzipori, S., Ward, H., 2002.** Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. Microbes Infect. .Vol.4:pp.1047–1058.
- Valle P.Y., Guerra, LL.Y., Mencho, J.D.P., Vázquez, A., 2006.** Comparación del parasitismo gastrointestinal en cerdos estatales y privados en diferentes categorías. Rev. prod. anim. 18 : 141-144

- Vitovec, J., Hamadejova, K., Landova, L., Kvac, M., Kvetonova, D., Sak, B., 2006.** Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in preand post-weaned pigs. *J. Vet. Med.* 53:239–243.
- Yu, J.R., Seo, M., 2004.** Infection status of pigs with *Cryptosporidium parvum*. *Korean Journal of Parasitology.* 42: 45-47.
- Wang, K., Wang, J., Pan, B., 2002.** Epidemiological survey of Cryptosporidiosis in Anhui province China. *World J. Gastroenterol.* 8:371–374.
- Ward, P.I., Deplazes, P., Regli, W., Rinder, H., Mathis, A., 2002.** Detection of eight *Cryptosporidium* genotypes in surface and waste waters in Europe. *Parasitology* 124:359–368.
- Widmer, G., Akiyoshi, D., Buckholt, M. A. , Feng, X., Rich, S. M., Tzipori, S., 2004.** Animal propagation and genomic survey of a genotype 1 isolate of *Cryptosporidium parvum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 108:187–197.
- Wieler, L. H. Ilieff, A. Herbst, W. Bauer, C., Vieler, E., Bauerfeind, R., Baljer, G., Zahner, H., 2001.** Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhea in southern Germany. *J. Vet. Med.* 48:151–159
- Xiao, L., Morgan, U. M., Limor, Thompson, R. C. A., Fayer, R. and Lal, A. A., 1999.** Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 65:pp.3386–3391.
- Xiao, L., Alderisio, K., Limor, J., Royer, M., 2000.** Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5492-5498.
- Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Lal, A. A., 2001.** Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J. Infect. Dis.* 183:492–497.
- Xiao, L., Bern, C., Arrowood, M., Sulaiman, I., Zhou, L., Kawai, V., Gilman, R. H., 2002.** Identification of the *Cryptosporidium pig* genotype in a human patient. *J. Infect. Dis.* 185: 1846–1848.

- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J., 2004.** *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. Clin. Microbiol. Rev. 17:72–97.
- Xiao, L., Moore, J.E., Ukoh, U., Gatei, W., Lowery, C.J., Murphy, T.M., 2006.** Prevalence and identity of *Cryptosporidium* sp. in pig slurry. Appl Environ Microbiol 72:4461–4463
- Zintl, A., Neville, D., Maguire, D., Fanning, S., Mulcahy, G., Smith, H.V., DeWaal, T., 2007.** Prevalence of *Cryptosporidium* species in intensively farmed pigs in Ireland. Rev. Parasit.134:1575–1582.