



**UNIVERSIDAD DE CHILE**



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DIAGNÓSTICO COMPARATIVO DE *Cryptosporidium* spp.  
MEDIANTE LAS TINCIONES DE ZIEHL-NEELSEN Y DE  
AUREAMINA EN HECES DE TERNEROS DIARREICOS DE  
REBAÑOS LECHEROS DE LA REGIÓN METROPOLITANA,  
CHILE.

**ANGELA DÍAZ LEE**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: Dr. FERNANDO FREDES MARTÍNEZ

Financiamiento: Proyecto DI, código MULT 06/17-2

SANTIAGO, CHILE  
2010

*Dedicado a mi madre,  
mi ángel por siempre.*

## AGRADECIMIENTOS

Finalizado una etapa tan importante en mi vida no puedo dejar de agradecer a todas aquellas personas que contribuyeron, con sus conocimientos y aportes, en mi formación académica.

De manera muy especial quiero agradecer al Dr. Fernando Fredes, por guiarme, acompañarme y apoyarme en todos mis buenos y malos momentos, en la realización de esta memoria y en la vida, llegando a ser un buen amigo. Por confiar en mí, y seguir hasta el día de hoy contribuyendo en mi formación académica y profesional.

Agradezco también al Sr. Patricio Toro, por su importante apoyo en el laboratorio de Enfermedades Parasitarias, por sus largas conversaciones y sus buenos consejos.

Al Dr. Rubén Mercado, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, por su apoyo en la realización de mi memoria de título, como profesor consejero.

Al Dr. Luis Moraga y al Dr. Mario Duchens por permitirme el acceso a las lecherías en las que se realizó este estudio.

Además, agradezco a mi familia, ya que sin ellos nada de esto sería posible, gracias por ser mi soporte y mi refugio durante toda la vida. Los Amo.

A mi madre M<sup>a</sup> Angélica, a quien dedico con especial amor este logro, gracias por acompañarme, estando siempre a mi lado, físicamente acá en la tierra, y ahora con tu espíritu desde el cielo. Te Amo.

A mi padre Rodolfo, quien siempre creyó en mí, y me entregó su apoyo incondicional, en cada uno de mis procesos, buenos y malos, siempre confiando en mis capacidades.

A mis hermanas, Pilar e Ignacia, gracias por estar conmigo, por quererme y hacer mi vida más feliz.

A mis amigas y amigos de la universidad, por tantos lindos momentos vividos durante la carrera; y a mis compañeros de laboratorio, por hacer siempre grato nuestro trabajo.

A María Rosa y María Olga, gracias por su apoyo, por alivianar mi carga y hacer que todo fuera mucho más fácil.

Y a ti Mauricio, mi compañero, mi amigo, mi confidente, por tu apoyo y amor sincero y desinteresado, por hacerme volver a creer en mí, y así concretar este importante logro.

Finalmente agradezco a Dios, por entregarme la vida que tengo y por poner en mi camino personas tan maravillosa. Por permitirme además recibir el regalo más bello del mundo, mi hijo Vicente, quien con su sonrisa me llena de fuerzas y orgullo para seguir adelante. Gracias hijo por llegar a mi vida a embellecerla y hacerla brillar nuevamente.

## ÍNDICE

<b>ABSTRACT</b>	7
<b>RESUMEN</b>	8
<b>INTRODUCCIÓN</b>	9
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	12
Aspectos generales	12
Etiología	12
Taxonomía	12
Especificidad de hospedero	13
Localización en el hospedador	14
Morfología	15
Ciclo biológico	15
Aspectos epidemiológicos	18
Distribución geográfica y prevalencia	18
Fuentes de infección y vías de transmisión	18
Factores de riesgo	19
Patogenia	20
Signos clínicos	21
Diagnóstico	22
Examen histológico	22
Detección de ooquistes en las heces	22
Diagnóstico inmunocromatográfico CryptoStrip®	24
Tratamiento	25
Control	26
Medidas higiénico sanitarias	26
Inmunoprofilaxis	26
<b>OBJETIVOS</b>	28
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	29
Tamaño muestral	29

Recolección de muestras	30
Procesamiento de muestras	30
Tinción de Ziehl-Neelsen	31
Tinción de Aureamina	32
Diagnóstico inmunocromatográfico CryptoStrip ®	33
Análisis estadístico	34
<b>RESULTADOS</b>	<b>35</b>
Resultados tinción de Ziehl-Neelsen	35
Resultados tinción de Aureamina	35
Resultados diagnóstico Inmunocromatográfico CryptoStrip ®	38
Resultados según edades de los animales	39
Análisis estadístico de los resultados	40
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>46</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>47</b>
<b>ANEXO</b>	<b>54</b>
Anexo I	54
Anexo II	55
Anexo III	56
Anexo IV	57

## **ABSTRACT**

*Cryptosporidium* spp. is a cosmopolitan protozoan that has a wide host range. In mammals, mainly affects newborns and clinically is characterized by varying degrees of diarrhea. It is considered like a zoonotic and re emerging agent, because can cause, in immunocompromised humans, severe clinical disease. It has been reported that calves under one month of age are most commonly infected. The diagnosis of cryptosporidiosis is performed through different laboratory techniques. In our country, at veterinarian medicine, the routine technique is the Ziehl-Neelsen stain (ZN) that detects the parasite oocysts in the feces of infect animals, by microscopic examination of satained extended upon concentration of the sample. Another satainig technique for diagnosis of this protozoan is Aureamina (AU), which also allows the display of *Cryptosporidium* spp. in previously concentrated stool smears, but through fluorescence microscopy. AU as advantages over ZN, in terms of speed in its making and reading. However, in our country have no information or studies about it.

The aim of this report was to compare the diagnostic efficiency of ZN against AU in the diagnosis of *Cryptosporidium* spp. in feces of diarrheic calves less than one month of age. For this, 205 samples were collected from two dairy herds in the Metropolitan Region. The infection level detected was 57,1% independent of the origin farm or the used technique. While 49,8% were positive to ZN and 56,1% to AU. The greater intensity of infection was observed in animals between 7 and 14 days old. However, note the finding of two positive animals on the birth day. Furthermore, was applied an inmunocromatographic diagnostic test (CR) for human use, as confirmatory. This work is the first report in Chile of the use of AU and CR for the diagnosis of cryptosporidiosis in bovine faeces.

It was concluded that AU was more sensitive than ZN ( $p < 0,05$ ), and the level of concordance was optimal between both tests. With CR, was achieved to confirm largely the diagnoses made by ZN and AU. Moreover, was possible to detect an infection frecuency in calves greater than that reported for dairy farms in the Metropolitan Region and country. It was also concluded that we would be facing a highly prevalent and re emerging infection. Finally, this is the first report of detection of this agent in animals from one day old.

## RESUMEN

*Cryptosporidium* spp. es un protozoo cosmopolita, que posee un amplio rango de hospederos. En los animales afecta principalmente a recién nacidos y se caracteriza clínicamente por distintos grados de diarrea. Es considerado un agente zoonótico y re emergente, ya que en el hombre inmunocomprometido puede producir una enfermedad clínica grave. Se ha informado que los terneros menores de 1 mes de edad son los más comúnmente infectados. El diagnóstico de esta enfermedad es de laboratorio y se realiza a través de distintas técnicas. La de rutina en nuestro país a nivel veterinario es la de Ziehl-Neelsen (ZN) y detecta los ooquistes del parásito en las heces de los animales infectados, mediante un examen microscópico de extendidos teñidos con ZN, previa concentración. Otra técnica de tinción para el diagnóstico de este protozoo es la de Aureamina (AU), la cual también permite la visualización de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en extendidos de heces previamente concentradas, pero a través de microscopía de fluorescencia. Esta última posee ventajas frente a ZN, en cuanto a la rapidez en su realización y lectura. Sin embargo, en nuestro país no existen antecedentes o estudios al respecto. El objetivo de la presente memoria fue comparar la eficiencia diagnóstica de ZN frente a AU en el diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. en heces de terneros diarreicos menores a un mes de edad. Para esto se recolectaron 205 muestras de dos rebaños lecheros de la Región Metropolitana. El nivel de infección detectado fue de 57,1% independiente del predio de origen o de la técnica utilizada. En tanto que 49,8% resultaron positivas a ZN y 56,1% a AU. La mayor intensidad de infección se observó en los animales de entre 7 y 14 días de edad. Sin embargo, es destacable el hallazgo de 2 animales positivos al día de nacido. También se aplicó una prueba inmunocromatográfica (CR) diagnóstica de uso humano, como confirmatoria. Este trabajo es el primer reporte en Chile del uso la prueba de AU y CR para el diagnóstico de la criptosporidiosis en heces bovinas. Se pudo concluir que AU fue más sensible que ZN ( $p < 0,05$ ), y que el nivel de concordancia fue óptimo entre ambas pruebas. Con CR se logró confirmar mayoritariamente los diagnósticos efectuados mediante ZN y AU. Además, fue posible detectar, una frecuencia de infección en terneros mayor a la descrita para predios lecheros de la Región Metropolitana y del país. Se concluye también, que estaríamos frente a una infección altamente prevalente y re emergente. Por último, este es el primer reporte de detección de este agente en animales de un día de edad.

## INTRODUCCIÓN

La enteritis y la diarrea son las principales causas de muerte durante las primeras semanas de vida de los terneros. Diversos agentes causales pueden verse involucrados en esta patología. Por lo general, en los neonatos se encuentran las infecciones bacterianas, en tanto que las infecciones virales y parasitarias suelen ocurrir a los 10 a 14 días (Blowey y Weaver, 2004).

En un determinado predio, donde la mayoría de los terneros estén infectados con el protozoo *Cryptosporidium* spp., sólo aquellos sometidos a estrés o con una patología concomitante presentan la enfermedad denominada criptosporidiosis (Blowey y Weaver, 2004).

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria que afecta principalmente al tubo digestivo del hombre y otros animales vertebrados, tales como: animales de granja (bovinos, ovinos, caprinos, equinos, pollos y pavos), de compañía (perros, gatos), de laboratorio (ratas, ratones) y también animales silvestres como aves, reptiles y peces (Gómez-Couso *et al.*, 2005). El género *Cryptosporidium* comprende protozoos que se desarrollan y multiplican en las células epiteliales de este aparato y ocasionalmente, puede infectar otros epitelios como el respiratorio y renal especialmente en individuos inmunocomprometidos (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Mercado *et al.*, 2007). Tiene una ubicación particular dentro de la célula ya que se sitúa en el borde luminal de los enterocitos, localización que se ha definido como intracelular, pero extracitoplasmática (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

Su ciclo biológico comprende dos fases reproductivas: asexuada (esquizogonia) y sexuada (gametogonia), ambas dentro del mismo hospedador y en el interior de los enterocitos, donde se generan ooquistes inmediatamente infectantes (esporulación) que son expulsados por las heces contaminando el medio ambiente (Acha y Szyfres, 2003).

Este parásito tiene una distribución cosmopolita y parece ser ubicuo, debido a que posee un amplio rango de hospederos, además de sobrevivir en el medio ambiente por largos periodos de tiempo debido a la gran resistencia de sus ooquistes (Naciri *et al.*, 1999).

En los animales afecta principalmente a aquellos recién nacidos, especialmente a terneros, y se caracteriza clínicamente por distintos grados de diarrea. En los humanos en

tanto, es considerada una zoonosis re emergente ya que en el hombre puede llegar a producir, en pacientes inmunocomprometidos, una enfermedad clínica grave que se asocia a una severa deshidratación, a un difícil tratamiento y que puede ser mortal (Almeida *et al.*, 2006; Sunnotel *et al.*, 2006).

Fue Tyzzer en 1907, el primero en proponer el nombre del género, enumerar sus principales características morfológicas y describir que *C. parvum* era la especie involucrada en cuadros diarreicos en mamíferos e investigar su ciclo biológico (Acha y Szyfres, 2003).

Actualmente se reconocen 20 especies de *Cryptosporidium* (Smith y Nichols, 2010), pero son 4 las especies que pueden ser de interés para el médico veterinario: *C. parvum* que infecta el intestino de muchos mamíferos (incluido el humano), *C. muris* que infecta intestino y estómago de ratones y abomaso de rumiantes, *C. baileyi* que infecta aparato respiratorio de las gallinas y aves silvestres y *C. meleagridis* que infecta el intestino de pavos y también el de aves silvestres (Barriga, 2002). En el caso específico del ganado vacuno la enfermedad es causada principalmente por el patógeno zoonótico *C. parvum* (Fayer, 2004; Sunnotel *et al.*, 2006), sin embargo, también se describen otras especies que producen infección en los bovinos como: *C. andersoni*, *C. bovis* y *C. ryanae* (Geurden *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2007; Smith y Nichols, 2010).

Su transmisión es de tipo horizontal y la infección ocurre por la ingestión de ooquistes. En terneros la transmisión del parásito sería fundamentalmente directa, vía fecal-oral, y la principal fuente de infección serían las heces excretadas por los animales neonatos con diarrea, aunque también hay que considerar la eliminación de ooquistes por parte de los animales adultos que actúan como portadores asintomáticos (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Así también es de gran importancia, desde el punto de vista de salud pública, la transmisión a través de los alimentos y el agua contaminados con ooquistes, ya que es frecuente encontrar *Cryptosporidium* spp. en aguas para consumo humano (Fayer, 2004).

En los animales el diagnóstico de esta enfermedad es de laboratorio y se realiza a través de distintas técnicas. Una de ellas es el examen histológico de intestino delgado para localizar el parásito en la mucosa, pero es un método invasivo y de escasa sensibilidad. Otra alternativa es la detección de ooquistes en las heces, ya sea mediante la tinción de extendidos

de heces concentradas y/o mediante técnicas inmunodiagnósticas (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

Los protocolos de laboratorio de rutina para la detección de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp., tanto en heces como en muestras de medio ambiente (ej. agua), incluyen la examinación microscópica, previa concentración y posterior tinción con Ziehl-Neelsen (ZN) (Henricksen y Pohlenz, 1981; Fayer, 2004).

En medicina veterinaria el método diagnóstico de rutina, es el de detección de ooquistes en extendidos de heces mediante concentración y posterior tinción de ZN. Otra técnica de tinción para el diagnóstico de este protozoo es la de Aureamina (AU), utilizada principalmente en medicina humana. Ésta, al igual que la tinción de ZN, consiste en la visualización de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en extendidos de heces previamente concentradas, pero a través de microscopía de fluorescencia. Además, posee ventajas frente al método de tinción de ZN en cuanto a la rapidez en su realización y lectura (De Quadros *et al.*, 2006).

La presente memoria de título se realizó para comparar la eficiencia diagnóstica de las técnicas ZN y AU utilizadas para la detección de esta infección parasitaria, ambas realizadas en extendidos de heces concentradas de terneros diarreicos de dos predios lecheros de la Región Metropolitana.

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **Aspectos generales**

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria de distribución cosmopolita, cuyo principal signo clínico en los rumiantes domésticos neonatos es la diarrea (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Su agente causal es un protozoo del género *Cryptosporidium* spp., que comprende organismos que se desarrollan y multiplican en las células epiteliales del aparato digestivo de vertebrados, así como también en la vesícula biliar, y el epitelio respiratorio y renal, especialmente en individuos inmunocomprometidos (Bowman, 1999; Castro-Hermida *et al.*, 2002a; Mercado *et al.*, 2007). Este agente parasitario está descrito en infecciones de 155 especies de mamíferos, incluido el ser humano (Castro-Hermida *et al.*, 2002a; Fayer, 2004).

Para Barriga (2002), entre los animales domésticos, los únicos realmente susceptibles a la enfermedad son los vacunos, y luego las ovejas y las cabras. Se ha encontrado un 80% o más de infección en terneros de menos de un mes y 62% en vacunos adultos asintomáticos.

En los rumiantes domésticos la criptosporidiosis debe considerarse no sólo desde el punto de vista de la sanidad y la producción animal, en la que se consideran las pérdidas debidas a morbilidad, mortalidad, gasto en medicamentos y horas de trabajo, sino que además es necesario considerar su carácter zoonótico y la posibilidad que el parásito pueda transmitirse a la población humana por los alimentos y el agua (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

### **Etiología**

#### **Taxonomía**

El género *Cryptosporidium*, junto con *Isospora*, *Cyclospora*, *Sarcocystis*, *Toxoplasma*, pertenecen al grupo de las coccidias, en el phylum Apicomplexa (Soulsby, 1987; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Acha y Szyfres, 2003). En el caso particular de *Cryptosporidium* este pertenece a la clase Sporozoa, subclase Coccidia, orden Eucoccidiida, suborden Eimeriina, familia Cryptosporidiidae (Soulsby, 1987; Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Sin embargo,

posteriormente se ha propuesto mediante estudios filogenéticos moleculares que protozoos del género *Cryptosporidium* pertenecerían al grupo de las gregarinas (Barta y Thompson, 2006).

### Especificidad de hospedero

Desde que fue descrito por Tyzzer (1907), numerosas especies del género *Cryptosporidium* han sido comunicadas en varios mamíferos hospedadores, pero actualmente sólo 20 son válidas para la mayoría de los investigadores (Cuadro 1) (Fayer, 2004; Pérez-Cordón *et al.*, 2005; Sunnotel *et al.*, 2006; Smith y Nichols, 2010). Fayer (2004), estableció que *C. parvum* es la especie que más afecta a los animales incluido el hombre, reportándose sobre 155 mamíferos hospedadores distintos, lo que se traduce en que este parásito no es hospedero específico. Se describe, por ejemplo, que *C. parvum* ha sido identificado en ratones, bovinos, humanos, equinos y muchos otros mamíferos.

*C. baileyi*, *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis* y *C. muris* se describen que son hospederos específicos para gallinas, perros, gatos, pavos y ratones, respectivamente; sin embargo, éstos afectan a los humanos por lo tanto, deberían también considerarse zoonóticos (Fayer, 2004; Thompson *et al.*, 2005). Incluso Scorza *et al.* (2003) describe, en el caso particular de *C. felis*, que éste se ha reportado en pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos y que el gato podría actuar como “carrier” de otros *Cryptosporidium* spp.

**Cuadro 1.** Descripción de las 20 especies validas de *Cryptosporidium* con sus distintos tipos de hospederos (Smith y Nichols, 2010).

Especie	Hospedero principal	Hospedero secundario	Sitio de infección
<i>C. hominis</i>	Humanos	Dugongo, ovinos	Intestino delgado
<i>C. parvum</i>	Bovinos, ganado, humanos	Ciervos, ratones, credos	Intestino delgado
<i>C. meleagridis</i>	Pavos, humanos	Loros	Intestino delgado
<i>C. canis</i>	Perros	Humanos	Intestino delgado
<i>C. felis</i>	Gatos	Humanos, bovinos	Intestino delgado
<i>C. suis</i>	Credos	Humanos	Intestino delgado y grueso
<i>C. wrairi</i>	Cobayos	Desconocido	Intestino delgado
<i>C. muris</i>	Roedores	Humanos, caprinos	Estómago
<i>C. andersoni</i>	Bovinos, camellos	Ovinos	Abomaso

<i>C. bovis</i>	Bovinos	Ovinos	Intestino delgado
<i>C. ryanae</i>	Bovinos	Desconocido	Desconocido
<i>C. xiaoi</i>	ovinos	Yak, carpinos	Desconocido
<i>C. fayeri</i>	Canguros	Desconocido	Intestino delgado
<i>C. macropodum</i>	Canguros	Desconocido	Desconocido
<i>C. baileyi</i>	Aves de corral	Codornices, avestruces, patos	Bursa
<i>C. galli</i>	Pinzones, pollos	Desconocido	Proventrículo
<i>C. serpentis</i>	Lagartos, serpientes	Desconocido	Estómago
<i>C. varanii</i>	Lagartos	Serpientes	Estómago e intestino delgado
<i>C. molnari</i>	Peces	Desconocido	Estómago (intestino)
<i>C. scophthalmi</i>	Peces	Desconocido	Intestino (estómago)

En ganado bovino existen al menos cuatro especies de *Cryptosporidium* que producen infección: *C. parvum*, frecuentemente asociado a infección en individuos neonatos; y *C. andersoni*, *C. bovis* y *C. ryanae* (Santín *et al.*, 2004; Smith y Nichols, 2010).

En el ser humano se han descrito al menos 8 especies que provocan infección, *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. muris*, *C. suis* y *C. andersoni* (Cama *et al.*, 2008; Smith y Nichols, 2010). Los más frecuentes son *C. hominis* y *C. parvum* (Xiao y Ryan, 2004; Sunnotel *et al.*, 2006; Mercado *et al.*, 2007; Cama *et al.*, 2008; Pintar *et al.*, 2010). En tanto que *C. meleagridis* también ha sido detectado, tanto en pacientes inmunocompetentes e inmunodeficientes, pero en una menor tasa (Mercado *et al.*, 2007).

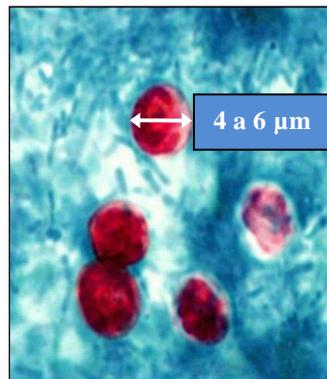
#### Localización en el hospedador

*Cryptosporidium* spp. se localiza principalmente en las partes finales de yeyuno e íleon, en el intestino delgado, aunque también puede afectar el intestino grueso, por lo que puede llegar a parasitar todo el tracto intestinal (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). En el caso específico de *C. parvum*, este afecta la parte distal del intestino delgado en terneros jóvenes, humanos y otros animales, y, ocasionalmente, puede afectar a células epiteliales del aparato respiratorio, renal y vesícula biliar sobre todo en individuos inmunodeficientes (Georgi y Georgi, 1990; Añas, 1998; Bowman, 1999; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Barriga, 2002; Botero y Restrepo, 2003; Mercado *et al.*, 2007). Los estadios endógenos se ubican en el borde

luminal de los enterocitos, localización definida como intracelular, pero extracitoplasmática (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

### Morfología

En relación a la morfología de los ooquistes de *Cryptosporidium* se describe que éstos son sub-esféricos, con un tamaño aproximado según la especie de 3,5 a 8  $\mu\text{m}$  de diámetro, esporulados al momento de ser expulsados, conteniendo 4 esporozoitos y sin esporoquistes (Current, 1985; Soulsby, 1987; Georgi y Georgi, 1990; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer y Xiao, 2007). En el caso particular de *C. parvum*, éste presenta ooquistes casi esféricos de 4 a 6  $\mu\text{m}$  (5,4 x 4,5  $\mu\text{m}$ ) (Figura 1) y es la especie involucrada en los cuadros de enteritis aguda y diarrea en mamíferos (García y Bruckner, 1988; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; García, 2001, Castro-Hermida *et al.*, 2002a; Castro-Hermida *et al.*, 2002b; Santín *et al.*, 2004).



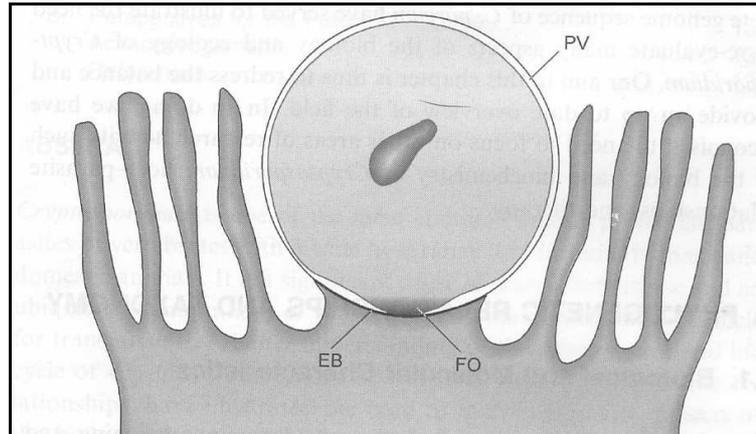
**Figura 1.** Morfología de los ooquistes de *Cryptosporidium*, sub-esféricos de un tamaño aproximado de 4 a 6  $\mu\text{m}$  de diámetro (Tinción de Ziehl-Neelsen, aumento de 100x).  
Obtenido de: [www.gefor.4t.com](http://www.gefor.4t.com)

### Ciclo biológico

*Cryptosporidium* spp. es un parásito monógeno y heterogénico, lo primero debido a que todos los estadios de desarrollo ocurren en un mismo hospedador (ciclo directo) y lo segundo ya que el parásito tiene fases de reproducción asexual y sexual, las que culminan con la formación de un ooquiste que corresponde al elemento infectante de esta parasitosis (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

El ciclo comienza con el ingreso de ooquistes esporulados vía oral al tracto digestivo (eliminados por las heces de un individuo infectado), en donde, los esporozoitos son liberados

por cambios en la temperatura y el pH, y acción de las sales biliares y proteasas (Del Coco *et al.*, 2009). Éstos alcanzan los enterocitos mediante movimientos de deslizamiento y flexión y se multiplican en la zona apical de las microvellosidades, dentro de una vacuola parasitófora intracelular, extracitoplasmática (Figura 2) (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer, 2004; Thompson *et al.*, 2005).



**Figura 2.** Diagrama representativo de la localización de *Cryptosporidium* en la célula hospedero (PV: vacuola parasitófora, EB: banda electrodensa, FO: organelo alimentador).  
Obtenido de: Thompson *et al.*, 2005.

Las dos primeras etapas de multiplicación son asexuadas. A partir de un esporozoito se forma el meronte I que contiene ocho merozoitos en su interior (Figura 3), los que se liberan y pueden volver a formar nuevos merontes I o ingresar a nuevas células y constituir el meronte II, que contiene cuatro merozoitos. Estos se liberan al lumen e ingresan a nuevas células para iniciar la fase sexuada del ciclo (García y Bruckner, 1988; Atías, 1998; Thompson *et al.*, 2005). Algunos se diferencian en gametos masculinos o microgamontes (catorce o dieciséis por cada merozoito), y otros en gametos femeninos o macrogamontes (uno por cada merozoito). Los microgamontes son liberados y cada uno va a fecundar a un macrogamonte formando así un cigoto, el cual luego de producida la esporulación, va a dar origen a un ooquiste con cuatro esporozoitos en su interior. Este es finalmente excretado con las heces, como ooquiste inmediatamente infectante (Figura 4) (Atías, 1998; Thompson *et al.*, 2005).



dependiendo de la edad y de la dosis infectante, puede prolongarse hasta 6-7 días (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

## **Aspectos epidemiológicos**

### **Distribución geográfica y prevalencia**

La criptosporidiosis es una enfermedad de distribución cosmopolita, y en ganado bovino afecta tanto a razas de carne como de leche (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

La prevalencia de esta enfermedad varía considerablemente con la edad de los animales. Así por ejemplo, en un estudio realizado en terneros diarreicos menores de 30 días de edad, la menor prevalencia de infección se obtuvo en los animales que se encontraban en los extremos de este rango etario, es decir entre los menores de 7 días y los mayores de 22 días; mientras tanto, que la mayor prevalencia se dio en terneros de rangos intermedios al mes de edad, es decir de 8 a 14 y de 15 a 21 días (De la Fuente *et al.*, 1999). Otros trabajos han reportado que la prevalencia de criptosporidiosis bovina está subestimada, debido al bajo número de muestras tomadas durante los distintos periodos de estudio. Lo anterior se basa en un trabajo que demuestra una mayor prevalencia de infección (93%) cuando el análisis de muestras de heces de terneros durante el periodo pre-destete, se realiza dos veces por semana durante un mes, en tanto que la prevalencia es menor a un 30% cuando se examina una o dos muestras por ternero durante el primer mes de vida (Castro-Hermida *et al.*, 2002a).

### **Fuentes de infección y vías de transmisión**

En los rumiantes domésticos, la principal fuente de infección para este agente parasitario son las heces excretadas, precisamente por los animales neonatos diarreicos infectados por *Cryptosporidium* spp., es decir un tipo de transmisión horizontal vía fecal-oral. Sin embargo, es necesario considerar además, la participación de animales adultos asintomáticos en el ciclo de transmisión de este endoparásito, ya que ellos también podrían eliminar ooquistes en sus heces. En los neonatos infectados se describe que durante el periodo de máxima eliminación, pueden excretar entre  $10^6$ - $10^7$  ooquistes por gramo de heces (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

También se ha descrito la transmisión indirecta de esta parasitosis, ya sea a través de los alimentos o por ingesta de aguas contaminadas con este agente protozoario (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). En humanos en tanto, la contaminación de aguas de consumo con material fecal de ganado bovino o humano, se ha asociado con brotes de diarrea causada por este parásito. Esto debe ser considerado desde el punto de vista de la salud pública, ya que los métodos usuales de tratamiento de aguas potables (filtración, floculación, sedimentación y desinfección) no son completamente eficaces en la remoción o inactivación de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Luna *et al.*, 2002; Fayer, 2004).

Tres hechos biológicos tendrían importancia en contribuir a la persistencia y diseminación de este parásito en el ambiente. Estos son: primero, los ooquistes son inmediatamente infectantes al salir con las heces del hospedero; segundo, estos ooquistes tienen una elevada resistencia a las condiciones medio ambientales lo que les permite, por ejemplo, permanecer infectivos por 2 a 3 meses (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Castro-Hermida *et al.*, 2006), y sobrevivir en el suelo por más de 50 días a temperaturas inferiores a los -10°C (Kato *et al.*, 2002); y por último, los ooquistes al ser muy pequeños y resistir la acción de desinfectantes convencionales, como la cloración, pueden pasar a través de los procesos físicos y químicos de tratamientos de aguas y por tanto sobrevivir en agua potable por varios meses (García y Bruckner, 1988; Georgi y Georgi, 1990; Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Sturbaum *et al.*, 2001; Fayer, 2004; Sunnotel *et al.*, 2006).

### Factores de riesgo

Entre los factores de riesgo a considerar, existen estudios que revelan que hay una asociación directa entre la edad de los animales y el riesgo de infección, para terneros menores de 30 días (Castro-Hermida *et al.*, 2002b). Se ha descrito que los terneros se infectan con *C. parvum* entre la primera y la cuarta semana de vida; y no se ha encontrado infección por este parásito en animales menores de 4 días de edad (Sturdee *et al.*, 2003; Kváč *et al.*, 2006). Así también, se describe que la mayor prevalencia de infección ocurre a las 2 semanas de vida (Kváč *et al.*, 2006).

Otro factor de riesgo de importancia, involucrado en la diseminación de la criptosporidiosis en rumiantes recién nacidos, son los métodos y la frecuencia de limpieza de pesebreras o establos, así como el tipo de suelo de los mismos (Castro-Hermida *et al.*, 2006).

Por ejemplo, el riesgo aumentaría si los animales están hacinados y si la higiene y otras prácticas de manejo son deficientes (Castro-Hermida *et al.*, 2002b). Se describe también que, al mantener a los terneros estabulados junto a su madre, evitando el contacto con otros terneros, la prevalencia de infección por *C. parvum* es menor comparada con aquellos terneros estabulados, sin su madre, y en contacto con otros animales de su misma especie y edad (Kvác *et al.*, 2006). Otro estudio demuestra que el riesgo de infección disminuye cuando los terneros son alojados de forma individual, en corrales previamente desinfectados, y cuando se usa piso de cemento, lavado diariamente por arrastre con agua a presión (Castro-Hermida *et al.*, 2002a).

En relación al consumo de calostro, la ausencia de este no sería considerada un factor de riesgo, ya que se ha descrito que los anticuerpos calostrales producidos en respuesta a la infección natural contra *Cryptosporidium* spp. no tienen un efecto protector frente a la infección neonatal en terneros (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Sin embargo, la ingestión de por lo menos 750 ml de calostro dentro de la primera hora de vida de terneros, fue alguna vez documentada como protectora (Gorman, 1987).

Por último, el tamaño del rebaño podría condicionar la presentación de la infección, existiendo una mayor frecuencia en rebaños grandes (mayor densidad de animales, alta carga de patógenos, etc.) (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Además, cuando *Cryptosporidium* spp. es el único agente causante de diarrea, la mortalidad es baja, pero en asociación con otros agentes infecciosos la mortalidad puede ser alta (Lippi y Castro, 2003).

### **Patogenia**

La invasión que provoca este protozoo en los enterocitos se traduce en una alteración de las células digestivas, lo que produce una atrofia parcial de las vellosidades intestinales y fusión de éstas, quedando la superficie de absorción disminuida (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999). El organismo intenta reemplazar las células dañadas mediante hiperplasia de las criptas, reemplazando las células maduras dañadas por otras nuevas cuya capacidad enzimática y de absorción es menor, lo que se traduce en un paso de fluidos desde la vellosidad a la luz intestinal, debido al aumento de la presión osmótica por el acúmulo de

nutrientes en el lumen. Paralelamente, puede existir una alteración en la permeabilidad del epitelio intestinal por modificación de las uniones celulares. Como consecuencia de todo lo anterior, se rompe el equilibrio entre absorción y secreción generando un síndrome de mala absorción (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Botero y Restrepo, 2003).

### **Signos clínicos**

No existen signos patognomónicos que diferencien a la criptosporidiosis de procesos causados por otros enteropatógenos (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). El principal signo clínico de esta parasitosis es la diarrea (Georgi y Georgi, 1990; Cordero del Campillo, 1999; Santín *et al.*, 2004) de consistencia variable entre heces aparentemente formadas y acuosas, de color amarillento, sin sangre, asociada a la excreción de un gran número de ooquistes. Esta puede ir acompañada de anorexia, dolor abdominal, pérdida de peso, postración y fiebre. Su duración es variable, oscilando entre 3-5 días en los casos leves y 1-2 semanas en los más graves (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Botero y Restrepo, 2003; Fayer, 2004). El síndrome de mala absorción además lleva a un sobre crecimiento bacteriano que agrava aun más el cuadro (Atías, 1998).

En infecciones naturales, la aparición de los síntomas y la eliminación de ooquistes comienzan en la primera o segunda semana de vida (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

El periodo de prepatencia tiene una duración de 3 a 5 días, pero puede ser tan largo como 2 semanas. En tanto que el periodo de patencia, puede ir de una a varias semanas en individuos inmunocompetentes (humanos y animales) y en los inmunocomprometidos esta duraría varios meses (Atías, 1998; Fayer, 2004).

Las alteraciones observadas a la necropsia de un rumiante neonato son caquexia y deshidratación. En la cavidad abdominal puede existir atrofia de la grasa mesentérica e infarto en los linfonodos regionales. El intestino delgado podría presentar una enteritis congestiva con la mucosa hiperémica, pero no hemorrágica y al observar las vellosidades éstas se pueden presentar atrofiadas y con el epitelio columnar sustituido por células inmaduras (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

## Diagnóstico

Los signos clínicos no son específicos, y a pesar que los datos epidemiológicos y la sintomatología nos ayudan, es necesario realizar un diagnóstico de laboratorio.

En los rumiantes en general, se sospecha de la enfermedad por la presencia de una diarrea intensa, en animales de menos de un mes de edad que no responde a tratamiento (Barriga, 2002). La confirmación de la infección es a través de la demostración de los ooquistes en las deposiciones (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Botero y Restrepo, 2003).

## Examen histológico

La obtención de biopsias de intestino delgado permite visualizar al parásito en el borde apical de los enterocitos (Figura 5) (Garcia y Bruckner, 1988; Atías, 1998). Este método no es usado en el diagnóstico *in vivo* debido a su carácter invasivo, a su escasa sensibilidad y elevado costo. Existen diversas técnicas de tinción histológica que podrían ser usadas, entre las que se encuentran hematoxilina-eosina y azul de toluidina (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

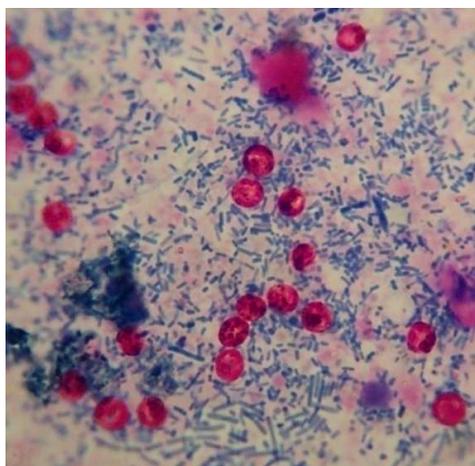


**Figura 5.** Corte histológico de intestino delgado. Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (flechas) adheridos a las células epiteliales del intestino (Tinción hematoxilina-eosina).  
Obtenido de: [www.facmed.unam.mx](http://www.facmed.unam.mx)

## Detección de ooquistes en las heces

Este método puede realizarse mediante tinción de extendidos de heces y/o técnicas inmunodiagnósticas (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

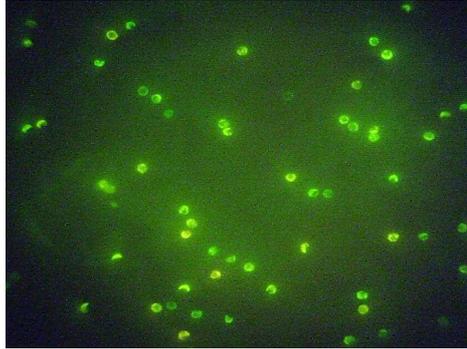
Las distintas técnicas de tinción se realizan sobre extendidos de heces, algunos con el material previamente concentrado, con el objeto de aumentar la sensibilidad (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Los protocolos de laboratorio de rutina para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., tanto en heces como en muestras de medio ambiente (ej. agua), incluyen la examinación microscópica de estos extendidos, previa concentración de la muestra, los que son teñidos ya sea con con Giemsa, Heine o ZN (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer, 2004). Dentro de éstas, la técnica más difundida para la detección de ooquistes en heces, es la de ZN modificada (Figura 6) (Georgi y Georgi, 1990; Atías, 1998; Barriga, 2002).



**Figura 6.** Tinción de Ziehl-Neelsen. Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. presentes en una muestra de heces de ternero diarreico (100x).

Obtenido de: Laboratorio de Parasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Otra técnica de tinción para el diagnóstico de este protozoo es la de AU, utilizada principalmente en medicina humana. Ésta, al igual que la tinción de ZN, consiste en la visualización de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en extendidos de heces previamente concentradas y teñidas con AU, pero a través de microscopía de fluorescencia (Figura 7) (Atías, 1998; Fayer, 2004). AU posee ventajas frente al método de tinción de ZN en cuanto a la rapidez en su realización y lectura microscópica (De Quadros *et al.*, 2006).



**Figura 7.** Tinción de Aureamina. Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. presentes en una muestra de heces de ternero diarreico (40x).  
Obtenido de: Laboratorio de Parasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Dentro de las técnicas inmunodiagnósticas se encuentran la aglutinación en látex, la inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales y ELISA de inmunocaptura de antígenos parasitarios en heces (García y Bruckner, 1988; Leng *et al.*, 1996; Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; García, 2001; Botero y Restrepo, 2003). Estas técnicas se han aplicado con el propósito de mejorar la calidad del diagnóstico (Atías, 1998).

De todos los métodos señalados, para algunos autores es la IFI la que presenta mayor sensibilidad y especificidad, y es la técnica que se usa con mayor frecuencia en el diagnóstico de la enfermedad en humanos (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Sin embargo, esta técnica en estudios nacionales de pacientes con diarrea crónica y SIDA, demostró una sensibilidad de un 78,3% versus un 86,9% para ZN (Atías, 1998).

#### Diagnóstico Inmunocromatográfico CryptoStrip® (CR) (CORIS, 2001)

CR es un test inmunocromatográfico que permite detectar ooquistes de *C. parvum* en muestras fecales concentradas o no concentradas.

La prueba se basa en la utilización de un sistema inmunocromatográfico con partículas de oro coloidal. Es provisto en un kit comercial que se encuentra listo para ser utilizado y sólo requiere una dilución de la muestra fecal en una solución tampón proporcionada por el fabricante, que es puesta en contacto con una tira reactiva (membrana de nitrocelulosa sensibilizada con anticuerpos anti *C. parvum*). La especificidad de la prueba se asegura

mediante el empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de superficie de la membrana del ooquiste, y conjugado con el oro coloidal.

El método de diagnóstico más utilizado y de rutina en medicina veterinaria en nuestro país es el de tinción de ZN en extendidos de heces.

### **Tratamiento**

Existen múltiples fármacos estudiados para el tratamiento de la criptosporidiosis humana y animal a nivel mundial. Entre ellos se incluyen antibióticos de amplio espectro, antihelmínticos, anticoccidiales, etc. Sin embargo ninguno ha resultado ser completamente eficaz en el tratamiento de esta parasitosis (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

A pesar de lo anterior, existen algunas drogas que logran atenuar los signos clínicos de la enfermedad y/o disminuir la eliminación de ooquistes por parte del animal. Algunas de ellas son la espiromicina y la azitromicina (antibióticos macrólidos), la paromomicina (antibiótico oligosacárido del grupo de aminoglucósidos) y la halofuginona (antiprotozoario del grupo de los derivados de la quinazolinona), que aunque no son totalmente efectivas, han demostrado ser mejor que otros tratamientos para controlar la diarrea del ternero causada por *C. parvum* (Gorman *et al.*, 1993; Foster y Smith, 2009). Por esto, el tratamiento sintomático puede prevenir elevadas tasas de mortalidad en rebaños y disminuir las pérdidas por morbilidad, sin embargo la primera medida a realizar es la reposición de fluidos y electrolitos mediante la administración oral o parenteral de soluciones hidratantes. Además se debe restringir el acceso a la leche durante un período de tiempo, para evitar que llegue sin digerir al intestino grueso, donde se produciría una diarrea de tipo fermentativo. La administración de probióticos es otra recomendación que se ha realizado, por el efecto antagónico que supone la instauración de una flora beneficiosa en el intestino (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

En la criptosporidiosis humana se han obtenido buenos resultados al utilizar fármacos como espiromicina y paramomicina (García y Bruckner, 1988; Atías, 1998). Este último ha demostrado una favorable respuesta clínica y parasitológica en más de la mitad de los casos tratados, pero luego de discontinuar el tratamiento los pacientes recaen (Atías, 1998).

## **Control**

### **Medidas higiénico sanitarias**

El control de esta parasitosis en los animales es muy difícil ya que prevenir la exposición de los terneros a la contaminación es complicado. Las medidas sanitarias y de higiene ayudan a prevenir la presentación de la enfermedad, a disminuir su prevalencia en zonas endémicas y/o a atenuar el riesgo zoonótico (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

Dentro de las medidas sugeridas en la literatura podemos mencionar: la destrucción de ooquistes mediante aplicación de desinfectantes eficaces en las zonas que habitan los animales, separación de animales enfermos de sanos, instalar bebederos y comederos altos para evitar la contaminación de éstos con heces, remoción diaria de materia fecal, controlar la entrada de animales portadores de otras especies (perros, ratones, etc.), mantener las maternidades limpias y desinfectadas con ozono o luz ultravioleta, controlar la temperatura y humedad de estos lugares, procurar que la ingestión de calostro y leche sea la adecuada (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer, 2004).

En el caso humano el control frente a esta enfermedad consiste en evitar la ingesta de agua o alimentos crudos que puedan estar contaminados con heces humanas o de animales. Igualmente debe evitarse la inmersión en aguas que contienen efluentes de alcantarillado o de granjas bovinas (Acha y Szyfres, 2003). En relación a los pacientes inmunocomprometidos, estos deben abstenerse de la ingestión de verduras crudas y agua sin hervir (Atías, 1998).

### **Inmunoprofilaxis**

Los anticuerpos del calostro materno procedente de animales naturalmente infectados no parece proteger; sin embargo, el calostro hiper inmune reduce el número de ooquistes eliminados, produce diarrea menos intensa y neutraliza esporozoitos en poco tiempo, a pesar de permitir la infección (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Botero y Restrepo, 2003).

Por último, en la presente memoria se comparó la eficiencia diagnóstica de dos técnicas utilizadas en la detección de *Cryptosporidium* spp., una de ellas es la tinción de ZN, que corresponde al método de rutina utilizado en medicina veterinaria para el diagnóstico de

esta enfermedad; y la otra es la tinción de AU, técnica utilizada principalmente en medicina humana, ambas técnicas fueron realizadas en extendidos de heces concentradas de terneros diarreicos de predios lecheros de la Región Metropolitana. Con esto se pretende contribuir al conocimiento epidemiológico de esta importante infección parasitaria de los terneros y a su diagnóstico de laboratorio y control en Chile.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

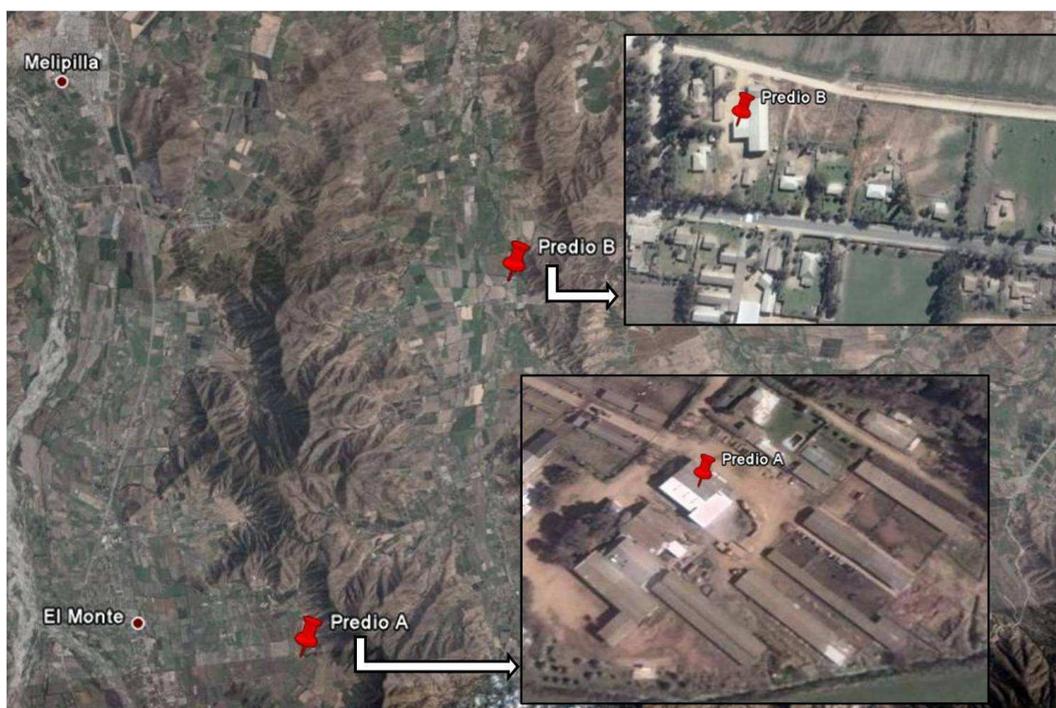
Comparar la eficiencia diagnóstica de la tinción de ZN frente a la tinción de AU en el diagnóstico de laboratorio de *Cryptosporidium* spp. en heces de terneros diarreicos de dos rebaños lecheros de la Región Metropolitana.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Pesquisar *Cryptosporidium* spp. mediante tinción de ZN y mediante tinción de AU en muestras de heces bovinas.
2. Analizar y comparar los resultados obtenidos por ambas técnicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este estudio se recolectaron, principalmente durante los meses de otoño, invierno y primavera, muestras fecales frescas de animales diarreicos, las que posteriormente fueron preservadas en formalina al 10% (Weitz y Tassara, 1989). Las muestras de heces se obtuvieron de dos predios bovinos lecheros distintos de la Región Metropolitana (predio A y predio B) (Figura 8).



**Figura 8.** Observación satelital del Predio A (33°38'S, 70°59'O) y Predio B (33°34'S, 71°06'O), ambos destinados a la producción de bovinos de leche. Región Metropolitana, Chile.

### Tamaño muestral

El tamaño muestral se determinó para la comparación de dos proporciones asumiendo arbitrariamente un 70% de positivos para la prueba de ZN y un 85% para la prueba de AU. Con un 95% de confianza y 95% de potencia, el número de muestras necesarias fue de 200.

### **Recolección de muestras**

Las muestras de heces fueron obtenidas sólo de terneros diarreicos, desde el día de nacidos hasta las cuatro semanas de edad, de dos predios lecheros de la Región Metropolitana.

Le recolección de muestras se realizó directamente desde el recto de cada animal. Estas fueron depositadas en tubos plásticos de 50 ml , con su respectiva identificación (fecha de recolección, número de ternero y fecha de nacimiento), y almacenadas en un contenedor adecuado, con hielo, y trasladadas inmediatamente al Laboratorio de Parasitología, Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Además se llevó un registro en el que se anotaron otros datos tomados a nivel de terreno como el predio de recolección, administración de calostro, tipo de alimentación, tipo de alojamiento y tratamientos realizados.

Una vez en el laboratorio, cada muestra se dividió en dos porciones; a una mitad se le agregó formalina al 10% y se mantuvo refrigerada entre 4 a 8 °C, mientras que la otra mitad fue congelada, pero sin adicionarle ningún tipo de preservante, hasta su posterior uso.

### **Procesamiento de muestras**

Las muestras anteriormente divididas fueron procesadas de distinta forma, dependiendo si estaban o no conservadas con formalina al 10%. Esto se realizó de la siguiente manera.

#### **Muestras sin formalina**

Las muestras sin formalina fueron tamizadas, de esta forma se eliminó toda aquella partícula que pudiera entorpecer el proceso, por su gran tamaño. Posteriormente estas fueron centrifugadas a 1.500 g por 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y fueron congeladas a -20°C. Estas últimas, fueron las que se utilizaron para la técnica de CR.

#### **Muestras con formalina**

Las muestras con formalina también fueron tamizadas y posteriormente centrifugadas a 1.500 g por 15 minutos, para así concentrar los eventuales ooquistes presentes en la muestra. Transcurrido este tiempo se eliminó el sobrenadante y desde el sedimento se extrajo una

pequeña cantidad de muestra con una micropipeta, con la que se realizó un extendido de 1 cm de largo por 0,5 cm de ancho en un portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente, para la posterior realización de la técnica de ZN.

Del mismo sedimento se tomó otra pequeña cantidad de muestra y se realizó otro extendido de iguales características (duplicado), pero para realización de la técnica de AU.

### **Tinción de ZN (Anexo I) (Fredes *et al.*, 2007)**

Una vez seco el extendido en el portaobjetos, se procedió a su tinción, asegurando y manteniendo el orden de cada lámina durante todo el proceso.

En primer lugar, se procedió a vaciar sobre cada portaobjeto el primer colorante, que corresponde a fucsina básica, hasta cubrirlos completamente. Luego cada muestra se calentó hasta la emisión de vapores, pasando bajo ellas un algodón con alcohol encendido, sin hervir el colorante, y posterior a ello se dejó actuar por 20 minutos. Pasado ese tiempo, se procedió a lavar cada placa con agua corriente de la llave, hasta eliminar todo el exceso de colorante.

Luego cada muestra fue cubierta con alcohol-ácido, solo por 30 segundos, posteriormente se lavaron con agua corriente, para eliminar todo el exceso de producto. Este punto es fundamental en la técnica, por lo que se debe respetar el tiempo indicado, sin sobrepasarlo, para no alterar el proceso.

Después de lavadas las láminas, se cubrieron con azul de metileno, que es el segundo colorante de esta técnica de tinción, el cual se dejó actuar durante 2 a 5 minutos, para luego lavar nuevamente con agua corriente de la llave hasta eliminar todo el exceso. Finalmente se dejaron secar a temperatura ambiente, y fueron observadas al microscopio óptico, con aumento de 100x con aceite de inmersión.

Este procedimiento permitió la tinción del interior los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. de color fucsia, debido a que presenta características ácido-alcohol resistentes, lo que hace prácticamente inconfundible su presencia, debido a que son muy pocos los elementos parasitarios que cumplen con estas características.

Para la correcta lectura de las muestras en el microscopio, se contó con un control positivo, que en un principio correspondió a una muestra de heces humanas que contenía

abundantes ooquistes de *Cryptosporidium* spp. donada por la Unidad Docente de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y posteriormente, este estudio permitió disponer de controles positivos propios de heces bovinas.

### **Tinción de AU (Anexo II) (Fayer y Xiao, 2007)**

Una vez realizado el extendido de la muestra fecal (duplicado), se dejó secando a temperatura ambiente. Hecho lo anterior se cubrió con solución fenicada de AU al 0,3% por 10 minutos. Pasado ese tiempo se lavó con agua corriente de la llave, para posteriormente cubrir con alcohol-ácido, el cual se dejó actuar por 30 segundos.

Luego de un nuevo lavado con agua de la llave se cubrió la lámina con Permanganato de Potasio al 0,1% durante 30 segundos. Posterior a esto se lavó una vez más con agua potable y se dejó secar a temperatura ambiente.

Finalmente, se aplicó una gota de glicerina para fluorescencia (ver Anexo II), se puso un cubreobjetos y se leyó al microscopio de fluorescencia con objetivos de aumento de 10x y 40x.

Los ooquistes de *Cryptosporidium* se observan redondeados y su contenido de color verde-amarillo, se puede reconocer la pared y el contenido interior. El fondo de la preparación microscópica es de color negro.

De igual modo que para ZN, para la correcta lectura de las muestras en el microscopio, se contó con un control positivo, que en un principio correspondió a una muestra de heces humanas positiva y posteriormente, este estudio permitió disponer de controles positivos propios de heces bovinas.

Finalmente, para ambas técnicas microscópicas, cada muestra positiva se agrupó dependiendo del número de ooquistes observados por campo de visión, registrándose la intensidad de infección de la siguiente manera:

- Baja (+): de 1 a 3 ooquistes por campo.
- Media (++) : de 4 a 10 ooquistes por campo.
- Alta (+++) : de 11 a 20 ooquistes por campo.
- Muy alta (++++): más de 20 ooquistes por campo.

### **Diagnóstico Inmunocromatográfico (CR)**

De acuerdo a la indicación del laboratorio creador, esta prueba diagnóstica poseería una alta sensibilidad (cercana al 100%) cuando se aplica a heces humanas. Además, tiene la ventaja de ser independiente de la lectura del operador, pero es de mayor costo. Debido a esto último, esta técnica diagnóstica en la presente memoria de título se utilizó en 40 muestras fecales obtenidas de la siguiente manera: 1) en todas las muestras que dieron resultado positivo a ambas técnicas (ZN y AU); 2) en aquellas que resultaron positivas sólo a una de ellas y 3) en un caso especial al cual se le realizó a una muestra que resultó ser sospechosa a la técnica de AU. En tanto que, de ahí en adelante sólo se utilizó como confirmatoria de aquellas muestras que resultaron positivas a la técnica de ZN y negativas a la de AU y viceversa.

Así también, mediante una tabla de números aleatorios, se seleccionaron 11 muestras fecales (mantenidas congeladas), que previamente resultaron negativas a las dos técnicas microscópicas, para corroborar esta condición mediante CR. Este tamaño de muestra fue calculado con un nivel de confianza de 95%, para detectar al menos un caso de enfermedad con un valor estimado de prevalencia de 23% (Gorman *et al.*, 1989) y en una población de enfermos de 205 animales (Thrusfield, 2005).

CR se usó sólo con las muestras congeladas de acuerdo a instrucciones del fabricante.

Los kit se conservaron en su envase original, refrigerados a 4°C. Al momento de su utilización, los reactivos se debieron dejar a temperatura ambiente previo a realizar la prueba.

Las muestras sometidas a esta prueba debieron ser previamente descongeladas. Luego en un tubo de ensayo se añadieron 15 gotas de la solución buffer (tampón) de dilución. Se agregaron 20 µL de la muestra de heces. Se agitó para homogenizar la solución y se dejó reposar por 1 minuto. Pasado ese tiempo se introdujo en el tubo la tira reactiva y se dejó actuar por 15 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo se procedió retirar las tiras reactivas para su lectura.

Cuando la tira es sumergida en la suspensión fecal, esta migra con el conjugado por difusión pasiva (capilaridad) y llega al primer anticuerpo absorbido en la tira, el monoclonal anti *C. parvum*. Si el parásito está presente en la muestra, éste es reconocido y revelado por la aparición de una línea de color rojo. Posterior a esto, la muestra continua fluyendo y llega a

un segundo reactivo (anticuerpo que es considerado un control) que da a lugar a la aparición de una segunda línea roja oscura. Esta última línea indica que la cromatografía se ha desarrollado sin impedimentos y sería la única que aparecería en pruebas negativas.

### **Análisis estadístico**

Se determinó la frecuencia de infección en porcentaje, por el periodo de estudio, mediante los dos métodos realizados.

Los resultados se analizaron mediante la prueba estadística de Mc Nemar, entre los resultados de las pruebas de ZN y AU para proporciones correlacionadas o dependientes (Remington y Schork, 1970). También se utilizó el Índice Kappa para determinar los niveles de concordancia entre ambas pruebas (Fleiss, 1981).

## **RESULTADOS**

El periodo de toma de muestras del estudio abarcó nueve meses, los que se distribuyeron durante los años 2007 y 2008. La recolección de muestras se inició en el mes de marzo del año 2007 con solo una visita para ese mes de ese año, y finalizó en abril del año 2008. Cada uno de los otros ocho meses incorporados en el muestreo, tuvo en promedio una visita semanal y en estas se muestreo a todo animal nuevo que cursaba un cuadro de diarrea. El total de animales muestreados en este lapso fue de 205 (Cuadro 2). Con los ocho meses que incluyeron un muestreo semanal, se hizo una estimación de la distribución de las diarreas durante esos meses. Solo en un mes del periodo no hubo nuevos animales con diarrea (Figura 9).

### **Resultados tinción de ZN**

De las 205 muestras analizadas mediante esta técnica, resultaron 102 muestras positivas (49,8%) (Cuadro 3). La distribución de los animales diarreicos que resultaron ZN positivos se observa en el cuadro 2 y figura 9. De las muestras que resultaron positivas, en todas ellas se encontró la presencia de elementos sub-esféricos teñidos de color fucsia, por lo tanto ácido-alcohol resistentes, irregularmente teñidos, de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro aproximados, estructuras compatibles con ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (Figura 10).

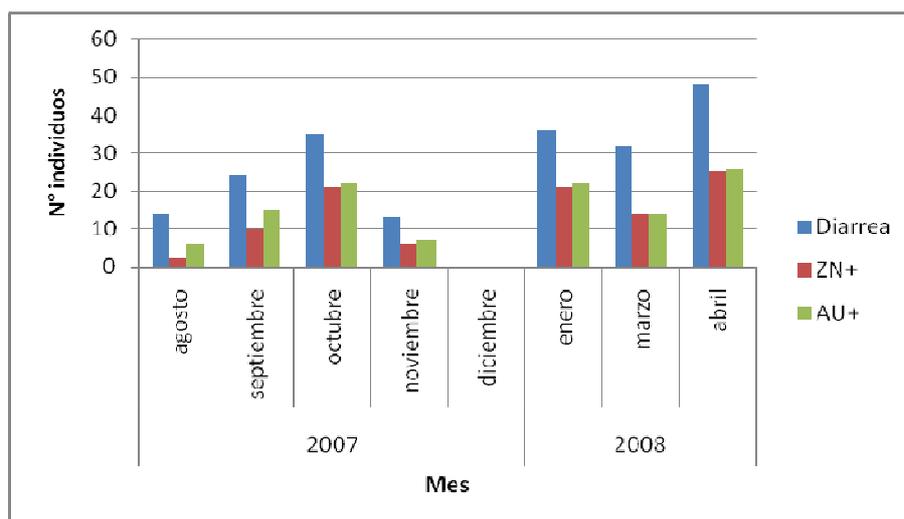
### **Resultados tinción de AU**

Del total de muestras recolectadas, al analizarlas mediante esta técnica de tinción, los resultados obtenidos fueron de 115 muestras positivas (56,1%) (Cuadro 2; Figura 9). En las muestras positivas se encontró la presencia de elementos esféricos, fluorescentes (color verde), irregularmente teñidos, de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro aproximados; estructuras compatibles con ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (Figura 11).

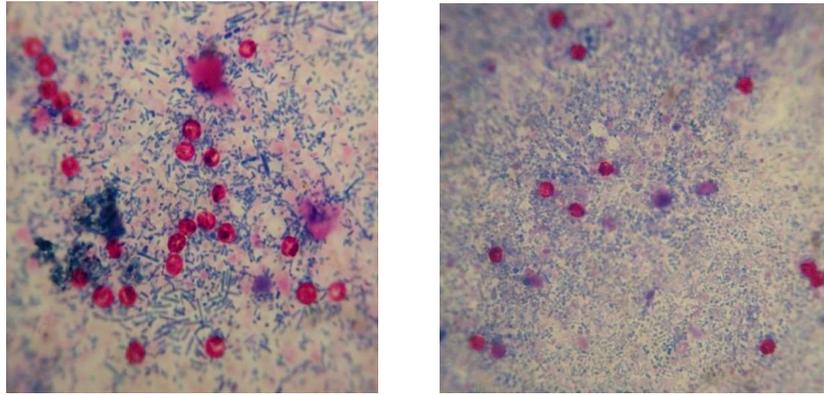
**Cuadro 2.** Distribución de animales diarreicos y positivos a Ziehl Neelsen o Aureamina por mes y por año durante el periodo de estudio.

Año	Mes	N° nuevas terneras diarreicas	Positivos ZN	Positivos AU
2007	Marzo	3	3	3
2007	Agosto	14	2	6
2007	Septiembre	24	10	15
2007	Octubre	35	21	22
2007	Noviembre	13	6	7
2007	Diciembre	n.d.	n.d.	n.d.
2008	Enero	36	21	22
2008	Marzo	32	14	14
2008	Abril	48	25	26
<b>Total</b>		<b>205</b>	<b>102</b>	<b>115</b>

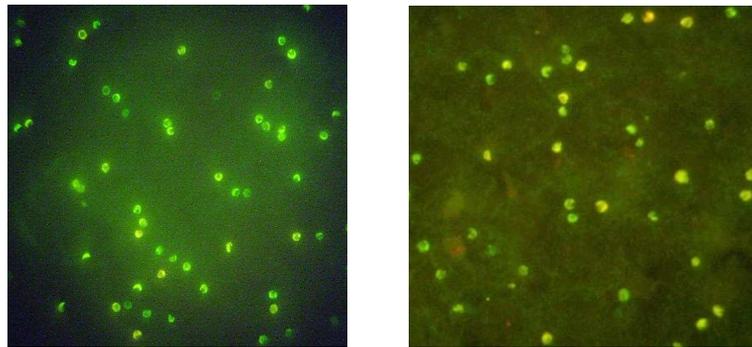
n.d.= no hubo nuevos animales diarreicos



**Figura 9.** Distribución de nuevos animales diarreicos muestreados por mes y por año, positivos a *Cryptosporidium* spp. a la técnica de Ziehl-Neelsen y Aureamina (marzo 2007 – abril 2008).



**Figura 10.** Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. detectados mediante la técnica de Ziehl-Neelsen en heces diarreicas de terneros (100x). Laboratorio de Parasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.



**Figura 11.** Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en dos muestras de heces diarreicas de terneros, mediante la técnica de Aureamina (40X). Laboratorio de Parasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Como se mencionó, se muestrearon los terneros diarreicos de dos predios lecheros, los que fueron identificados con letras A y B. Los resultados obtenidos en cada uno de los predios según la técnica diagnóstica aplicada fueron los siguientes:

- Predio lechero A:

Se recolectó un total de 60 muestras durante el periodo de estudio, de éstas, un 41,7% fueron positivas a ZN y un 56,7% a AU.

- Predio lechero B:

De un total de 145 muestras recolectadas en este predio durante el estudio, un 53,1% fueron positivas a ZN, en tanto que un 55,9% lo fueron a AU.

El resumen de los resultados obtenidos mediante cada técnica de tinción por predios esta representado en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Resultados de las técnicas Ziehl-Neelsen (ZN) y Aureamina (AU) en muestras de heces de terneros diarreicos por predio lechero (A y B) y en total (n=205).

Método	Positivos (por predio A y B)		Total n
	n	%	
ZN	25(A) + 77(B)	49,8	102
AU	34(A) + 81(B)	56,1	115

Por último, el presente estudio arrojó como resultado que 117 muestras (57,1%), resultaron positivas a *Cryptosporidium* spp. independiente del predio de origen o de la técnica utilizada.

### **Resultados Diagnóstico Inmunocromatográfico (CR)**

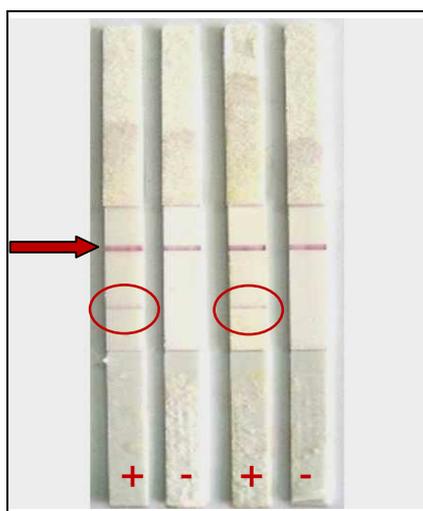
La prueba CR se aplicó a un total de 48 muestras. De éstas, 20 que fueron simultáneamente ZN y AU positivas, de las cuales 17 fueron CR positivas (85%); de 17 muestras positivas sólo a una de las técnicas (ZN o AU), 9 fueron CR positivo (52,9%). Sin embargo, con un diferente resultado según si era solo positiva a ZN 0% (0 de 2 muestras) o AU 60% (9 de 15) respectivamente.

De las 11 muestras negativas a ambas técnicas tradicionales, seleccionadas para ser corroboradas mediante CR, todas fueron negativas a esta última prueba.

En el cuadro 4 se resume el resultado obtenido de todas estas muestras analizadas mediante CR y en la figura 12 se presentan de muestra fotografías de tiras reactivas de CR con resultados positivos y negativos.

**Cuadro 4.** Resultados del diagnóstico Inmunocromatográfico CryptoStrip® (valor absoluto y porcentaje) en muestras de heces de terneros diarreicos positivas a una o ambas, de las técnicas microscópicas de Ziehl-Neelsen (ZN) y Aureamina (AU) (n=48).

Resultados pruebas Microscópicas	N° muestras Obtenidas	Positivo a CR	Porcentaje positivos %
Positivo a ambas (ZN y AU)	20	17	85
Positivo sólo a ZN	2	0	0
Positivo sólo a AU	15	9	60
Negativo a ambas (ZN y AU)	11	0	0
<b>Total</b>	<b>48</b>	<b>26</b>	



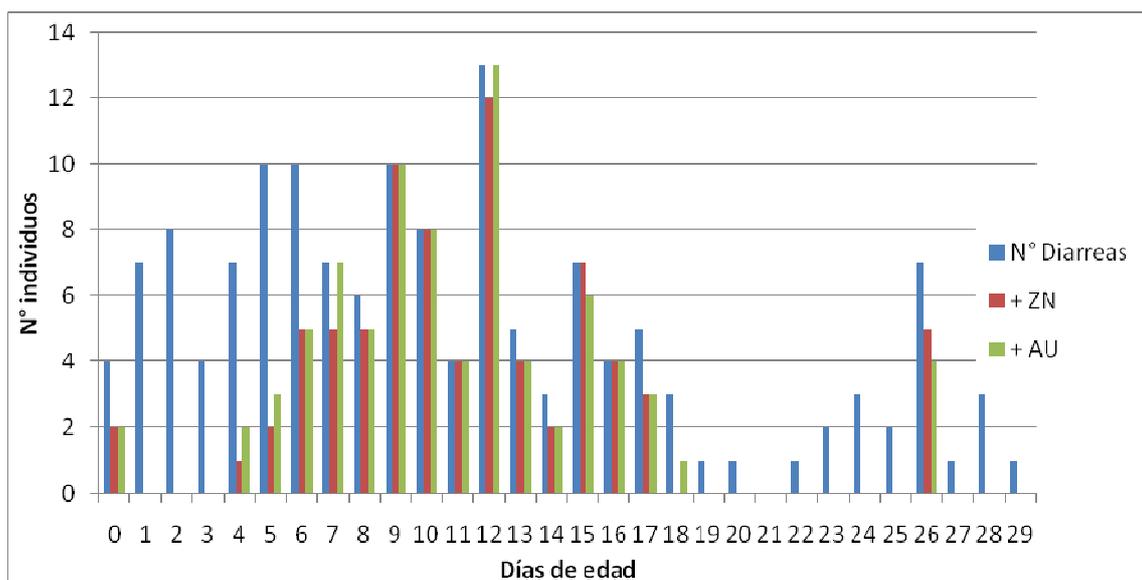
**Figura 12.** Tiras reactivas de CryptoStrip ® con resultado positivo (+) y negativo (-) de heces de terneros diarreicos. (Control de reacción, flecha). Laboratorio de parasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

### **Resultados según edades de los animales**

Se logró registrar la fecha de nacimiento y el día de la toma de muestra de 147 terneros diarreicos. De ellos, 79 fueron positivas a ZN, 83 a AU y 77 a ambas técnicas. La mayor intensidad de infección se observó en los animales de entre 7 y 14 días de edad (63%). Destacamos el hallazgo de 2 animales positivos (2,5%) a este protozooario al día de nacido. En el cuadro 5 se detallan estos resultados, según rangos etarios. La figura 13 en tanto, grafica la frecuencia de diarreas y de infección por *Cryptosporidium* spp. según edad y técnica empleada.

**Cuadro 5.** Distribución de la infección a *Cryptosporidium* spp. detectada mediante Ziehl Neelsen (ZN) y/o Aureamina (AU), según edad en terneros diarreicos de menos de un mes de edad, de lecherías de la Región Metropolitana.

<b>Rango etario</b>	<b>ZN +</b>	<b>AU +</b>	<b>ZN+ AU+</b>
< 7 días	10	12	10
7 - 14 días	50	53	50
15 - 21 días	14	14	13
> 21 días	5	4	4
<b>Total</b>	<b>79</b>	<b>83</b>	<b>77</b>



**Figura 13.** Frecuencia de diarreas e infección por *Cryptosporidium* spp. según edad, en terneros diarreicos de lecherías de la Región Metropolitana, diagnosticados por ZN y AU.

### Análisis estadístico de los resultados

Se comparó el resultado de ambas técnicas diagnósticas tradicionales mediante la prueba estadística de McNemar. Así también se obtuvo el índice *Kappa*, para determinar el nivel de concordancia.

Mediante McNemar fue posible concluir que existen diferencias estadísticamente significativas entre las técnicas de ZN y de AU ( $p < 0,05$ ) a favor de esta última (Anexo III).

El Índice *Kappa* determinó que el nivel de concordancia entre ambas pruebas fue óptimo (Anexo IV).

## DISCUSIÓN

De las distintas técnicas descritas para el diagnóstico de laboratorio de *Cryptosporidium* spp., los protocolos de rutina utilizan la detección microscópica de la presencia de ooquistes del parásito en heces, previa realización de métodos de concentración, y técnicas de tinción como ZN (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer, 2004). Siendo este, en medicina veterinaria, el método diagnóstico de elección (Georgi y Georgi, 1990; Atías, 1998; Barriga, 2002). En tanto que la tinción de AU para el diagnóstico de este protozoo, ha sido utilizada casi exclusivamente en muestras de origen humano (Atías, 1998; Fayer, 2004).

Por lo anterior, y ya que en Chile no existían antecedentes del uso de AU en medicina veterinaria, y con el fin de mejorar el diagnóstico de este endoparásito protozoario, en el presente estudio se implementó y desarrolló esta técnica de tinción, en extendidos de heces concentradas de terneros diarreicos de predios lecheros de la Región Metropolitana, para ser comparada con el método de rutina ZN.

Por tal motivo y para cumplir el objetivo específico n° 1 se pesquisó a *Cryptosporidium* spp., por ambos métodos diagnósticos, en muestras de heces de terneros diarreicos (n=205) provenientes de dos predios lecheros de la Región Metropolitana. Encontrándose un nivel de infección en estos de hasta un 57%, ya que este valor fue de un 56,1% si solo se considera los resultados con AU, en tanto que para ZN fue de un 49,8%.

Estos resultados revelan, una alta frecuencia de infección por *Cryptosporidium* spp., independiente de la técnica utilizada, y sugiere que, al menos en los predios analizados de esta región del país y en esta especie animal, estamos frente a una infección altamente prevalente y re emergente. Esto se sustenta en el hecho que la prevalencia descrita para este parasitismo en terneros diarreicos de lechería y en esta región mediante ZN fue de un 23,2% (Gorman *et al.*, 1989). Es decir que este estudio arrojó más del doble de infección con el mismo método diagnóstico, la misma especie animal y aproximadamente el mismo grupo etario.

Lo anterior también se puede afirmar, si se considera que los niveles de infección en otras zonas del país, como la zona sur, no sobrepasan ni se acercan a los niveles encontrados en este estudio, ya que se ha reportado una prevalencia para *Cryptosporidium* spp. de alrededor de un 30% (Campano, 1997).

El mayor número de casos de infección por *Cryptosporidium* spp. en predios lecheros de esta región, puede deberse a varias causas. Por una parte, ha habido una mayor intensificación de los sistemas productivos, lo que se traduce en un mayor número de animales y hacinamiento de éstos. Sin embargo, si sumado a esto existen deficiencias en las condiciones de higiene e inadecuadas medidas de manejo es posible esperar resultados como estos. Así por ejemplo, en este estudio, ambos predios muestreados presentaban similares condiciones de higiene y manejo, con terneros estabulados de forma individual, pero con contacto directo entre ellos y que eran separados de la madre al momento de nacer, sin embargo con adecuada administración de calostro. Las medidas de higiene utilizadas se basaban en la limpieza diaria de los corrales, con extracción del material de cama y las deposiciones, pero sin la aplicación de sustancias desinfectantes lo que reduciría la carga de otros agentes no estudiados. Además, a los animales que presentaban diarrea se les aplicaba un tratamiento antibiótico, pero en aquellos en que la diarrea no cedía con éste, no se aplicaba ningún tratamiento o medida adicional, ni tampoco se hicieron análisis o exámenes de laboratorio, salvo los que finalmente se llevaron a cabo debido a este estudio.

Un punto importante en la prevención y el control de esta patología es la eficiencia en las medidas de manejo de los animales, tanto de tipo alimentario como sanitario (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Para lograr un óptimo resultado es muy importante contar con el personal adecuado, tanto en la capacitación, como en el compromiso con su trabajo. Este punto fundamental no se cumplía a cabalidad en ninguno de los dos predios muestreados, ya que en ambos el personal a cargo no era estable por lo que no creaban un verdadero compromiso con la actividad desempeñada.

Es necesario recalcar que actualmente la criptosporidiosis se considera tanto en los seres humanos, como en algunos animales, una zoonosis re emergente (Almeida *et al.*, 2006; Sunnotel *et al.*, 2006), lo anterior debido al gran aumento de factores que pueden llegar a afectar el sistema inmune, provocando inmunodepresión, la cual es una condición preponderante en la presentación humana y animal de esta enfermedad (Fayer y Xiao, 2007).

El nivel de infección detectado por este estudio 57%, es considerado alto para esta zona de nuestro país, como ya se discutió. Sin embargo, lo más probable que este valor esté subestimando lo real, debido a lo descrito en la literatura científica internacional que indica, que un bajo número de muestras tomadas por animal durante este periodo de vida, podría

revelar una prevalencia mucho menor, a la que se obtendría si se toma un mayor número de muestras por animal. Como por ejemplo dos veces por semana durante un mes, en vez de la muestra única que se tomó para este estudio durante el primer mes de vida (Castro-Hermida *et al.*, 2002a).

El segundo objetivo específico de esta memoria era la de analizar y comparar los resultados de ambas técnicas. Al respecto, la prueba de McNemar demostró que la diferencia resultante entre ambas técnicas fue estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Esto se contrapone con los resultados de Brook *et al.* (2008) realizado en 29 muestras de terneros igualmente sometidas a ambas técnicas de tinción, en las que no se encontraron diferencias significativas ( $p = 0,25$ ). Así también, De Quadros *et al.* (2006) analizó 331 muestras de heces de animales domésticos, de distintas especies, y detectó un 7,5 y 5,7% de positividad para AU y ZN respectivamente, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambas técnicas. En el presente estudio en tanto, demuestra que existe una diferencia entre utilizar una técnica de tinción o la otra, y que la tinción de AU presenta mayor sensibilidad que la de ZN.

Al respecto, se ha sugerido que la técnica de tinción de ZN teñiría una pequeña proporción de los ooquistes presentes en una muestra, además de teñir un menor número de ooquistes que la técnica de AU (Brook *et al.*, 2008). Este mismo autor, estimó una sensibilidad aceptable para ambas técnicas de tinción. Sin embargo, en otro estudio, fue la tinción de AU el método escogido como de rutina, debido a que presentó una sensibilidad similar a una prueba comercial de inmunofluorescencia (Tee *et al.*, 1993).

Para cumplir este segundo objetivo, también se utilizó el Índice Kappa para determinar los niveles de concordancia entre ambas pruebas (Fleiss, 1981), el cual arrojó como resultado que el nivel de concordancia es óptimo (con un valor de  $k = 0,83$ ), mientras que otros estudios han determinado un nivel de concordancia de bueno ( $k = 0,79$ ) (Brook *et al.*, 2008).

Para la realización de este estudio se requirió la implementación, en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, de la técnica de tinción de AU. Esta técnica presenta ciertas desventajas con respecto al método de rutina de ZN.

La principal ventaja de la técnica de tinción de ZN es su bajo costo, esto sumado a que los extendidos una vez teñidos, pueden ser conservados de forma permanente, a diferencia de la tinción de AU (Brook *et al.*, 2008). Además, la fluorescencia del fondo de la muestra podría representar un problema de lectura en AU si la muestra presenta una gran cantidad de detritos fecales (Weber *et al.*, 1991). Aún así, si se cuenta con el personal capacitado, y el equipo necesario para la realización, la técnica de tinción de AU, según el presente estudio, resulta ser mejor.

Las pruebas de diagnóstico basadas en la observación microscópica de aspectos morfológicos de los agentes infecciosos buscados tienen la desventaja de ser totalmente operador-dependiente. Por eso, en este estudio se empleó, por primera vez en Chile, una prueba de inmunodiagnóstico para confirmar los resultados obtenidos en la pesquisa de este parásito en muestras fecales de bovinos

En un principio se pretendió usar la prueba diagnóstico inmunocromatográfico (CR) como prueba patrón, con el fin de confirmar a través de ésta, a las muestras que resultaran positivas a alguna de las técnicas de tinción realizadas. En el transcurso del experimento esto cambió, debido al alto costo que la prueba tenía, hecho desconocido por el equipo de trabajo al principio, por lo que se aplicó la prueba sólo a las muestras que resultaran positiva a una técnica, y negativa a la otra. De esta forma se aseguraba la sensibilidad de las técnicas de tinción, confirmando la positividad de las muestras analizadas.

Mediante CR se confirmó el 85% de los diagnósticos positivos simultáneos de presencia de *Cryptosporidium* spp. en la muestras fecales estudiadas. El principal valor de este resultado radica, en que por primera vez en Chile se confirma la existencia de las infecciones por este parásito en bovinos usando una prueba de laboratorio no morfológica, validando además el uso de las pruebas microscópicas tintoriales de diagnóstico. La negatividad de CR en algunas muestras fecales diagnosticadas como positiva mediante ZN o AU puede deberse a varias causas. Primero, el kit comercial de CR dice ser una prueba diagnóstica rápida *in vitro* para la detección de ooquistes de *C. parvum* en muestras de heces. Podría ser entonces, que la especie de *Cryptosporidium* presente en las heces de los animales negativos a CR, pero positivos a ZN o AU fuera distinta a *C. parvum*. Segundo, las muestras analizadas mediante CR presentaban en su mayoría una intensidad de infección baja (de 1 a 3 ooquistes por campo), por lo que podríamos pensar que la concentración de ooquistes

presentes en estas muestras sería determinante para la lectura real de esta. Lo anterior debido a que el control positivo utilizado, que presentaba una muy alta intensidad de infección (más de 20 ooquistes por campo), arrojó resultados positivos todas las veces que se sometió a CR. Sin embargo, es necesario considerar que el límite de detección indicado por el fabricante es de 200 ooquistes en 100  $\mu$ L de heces, valor desconocido para las muestras analizadas. Tercero y último, CR es una prueba de detección de la fase aguda de la infección, por lo que las muestras recolectadas con posterioridad a esta fase, podrían contener concentraciones de antígenos muy bajos para su detección (CORIS, 2001).

Por todo lo anteriormente descrito, se cumplió el primer y segundo objetivo específico, es decir se pesquisó *Cryptosporidium* spp. mediante ZN y AU en muestras de heces bovinas; y se analizaron y compararon los resultados obtenidos de ambas técnicas.

Sin embargo y por último, resulta de interés analizar y discutir los resultados según la edad de los animales. Se ha informado que los terneros de 1 mes de edad son los más comúnmente infectados con *Cryptosporidium* spp. Según la bibliografía consultada, no se han encontrado animales menores de 4 días infectados con este endoparásito (Sturdee *et al.*, 2003; Kváč *et al.*, 2006) pero sí existen infecciones descritas después de los 7 días de vida (Del Coco *et al.*, 2008). La mayor prevalencia reportada a *Cryptosporidium* spp. se produce en terneros de entre 8-14 y 15-21 días de edad, así como también, el mayor riesgo de infección (De la Fuente *et al.*, 1999). En el presente estudio, la mayor intensidad de infección se observó en los animales de entre 7 y 14 días de edad (63%), como ya se ha reportado. Sin embargo, destacamos el hallazgo de 2 animales positivos (2,5%) a este protozooario al día de nacido, es decir durante el periodo prepatente, antes de los 3 a 4 días de infección. Por lo anterior, esta sería la primera descripción de *Cryptosporidium* spp. en animales de un día de edad. Esto podría indicar la posibilidad de nuevas vías de transmisión, diferentes a las normalmente descritas para este endoparásito. Lo anterior hace necesario iniciar estudios en esta línea de investigación, que permitan identificar esta vía de infección, ya sea para confirmar así como entender este resultado.

## CONCLUSIONES

- Se determinó que existe diferencia estadística significativa ( $p < 0,05$ ) entre la prueba de Aureamina frente a la de Ziehl-Neelsen, a favor de la primera de ellas, lo que indicaría una mayor sensibilidad para el diagnóstico comparativo de *Cryptosporidium* spp. Con un nivel de concordancia de óptimo.
  
- Fue posible detectar, una frecuencia de infección por *Cryptosporidium* spp. en terneras de hasta un 57%, la que fue mayor a la descrita para predios lecheros de la Región Metropolitana y del país. Por lo que estaríamos frente a una infección altamente prevalente y, posiblemente, re emergente.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- **ALMEIDA, A.; DELGADO, M.; SOARES, S.; CASTRO, A.; MOREIRA, M.; MENDONCA, C.; CANADA, N.; CORREIRA DA COSTA, J.; COELHO, H.** 2006. Genetic characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Northern Portugal. *J Eukaryot Microbiol.* 53(S1): S26-S27.
- **ACHA, P.; SZYFRES, B.** 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. 3ª edición. Vol. III. Ed. OPS. Washington, DC, USA. 23-27pp.
- **ATÍAS, A.** 1998. Parasitología Médica. Ed. Mediterráneo. Santiago, Chile. 146-151pp.
- **BARRIGA, O.** 2002. Capítulo 58C: La coccidiosis: C. Las criptosporidiasis. *In: Las Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos en la América Latina.* Ed. Germinal. Santiago, Chile. 187-188pp.
- **BARTA, J.; THOMPSON, R.** 2006. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends Parasitol.* 22(10): 463-468.
- **BLOWEY, R.; WEAVER, A.** 2004. Atlas a color de enfermedades y trastornos del Ganado vacuno. 2ª edición. Ed. Elsevier. Madrid, España. 14-20pp.
- **BOTERO, D.; RESTREPO, M.** 2003. Parasitosis Humanas. 4ª edición. Ed. CIB. Bogotá, Colombia. 73-77pp.
- **BOWMAN, D.** 1999. *Georgis' Parasitology for Veterinarians.* Seventh edition. W.B. Saunders Company. USA. 99-100pp.
- **BROOK, E. J.; CHRISTLEY, R. M.; FRENCH, N. P.; HART, C. A.** 2008. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fresh and frozen cattle faeces. Comparison of three methods. *Lett Appl Microbiol.* 46(1): 26-31.
- **CAMA, V. A; BERN, C; ROBERTS, J; CABRERA, L; STERLING, C. R; ORTEGA, Y; GILMAN, R. H; XIAO, L.** 2008. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerg Infect Dis.* 14(10): 1567-1574.

- **CAMPANO.** 1997. La cryptosporidiosis de los animales domésticos. Boletín Epizootiológico 6(1): 25-35.
- **CASTRO-HERMIDA, J.; GONZÁLEZ-LOSADA, Y.; ARES-MAZÁS, E.** 2002a. Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). Vet Parasitol. 106(1): 1-10.
- **CASTRO-HERMIDA, J.; GONZÁLEZ-LOSADA, Y.; MEZO-MENÉNDEZ, M.; ARES-MAZÁS, E.** 2002b. A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. Vet Parasitol. 106(1): 11-17.
- **CASTRO-HERMIDA, J.; PORS, I.; MÉNDEZ-HERMIDA, F.; ARES-MAZÁS, E.; CHARTIER, C.** 2006. Evaluation of two commercial disinfectants on the viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Vet J. 171(2): 340-345.
- **CORDERO DEL CAMPILLO, M.; ROJO, F. A.; MARTÍNEZ, A.; SÁNCHEZ, C.; HERNÁNDEZ, S.; NAVARRETE, J.; DíEZ, P.; QUIROZ, H.; CARVALHO, M.** 1999. Parasitología Veterinaria. Ed. Mc Graw-Hill, Interamericana. Madrid, España. 213-221pp.
- **CORIS BIOCONCEPT.** 2001. Crypto-Strip (C-1005). Test inmunocromatográfico in vitro para detectar oocistos de *Cryptosporidium parvum* em las materias fecales. [Manual de uso]. Belgium, Coris Bioconcept. 4pp.
- **CURRENT, W. L.** 1985. Cryptosporidiosis. Journal of American Veterinary Medical Association. 187: 1334-1338.
- **DE LA FUENTE, R.; LUZÓN, M.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; GARCÍA, A.; CID, D.; ORDEN, J. A.; GARCÍA, S.; SANZ, R.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.** 1999. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. Vet Parasitol. 80(3): 179-185.
- **DE QUADROS, R.; MARQUES, S.; AMENDOEIRA, C.; DE SOUZA, L.; AMENDOEIRA, P.; COMPARIN, C.** 2006. Detection of *Cryptosporidium* oocysts by auramine and Ziehl Neelsen staining methods. Parasitol Latinoam. 61(3-4): 117-120.

- **DEL COCO, V. F.; CÓRDOVA, M. A.; BASUALDO, J. A.** 2008. Cryptosporidium infection in calves from a rural area of Buenos Aires, Argentina. *Vet Parasitol.* 158: 31-35.
- **DEL COCO, V. F.; CÓRDOVA, M. A.; BASUALDO, J. A.** 2009. Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. *Revista Argentina de Microbiología.* 41: 185-196.
- **FAYER, R.** 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol.* 126: 37-56.
- **FAYER, R.; XIAO, L.** 2007. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Ed. CRC Press. Second edition. 560pp.
- **FENG, Y.; ORTEGA, Y.; HE, G.; DAS, P.; XU, M.; ZHANG, X.; FAYER, R.; GATEI, W.; CAMA, V.; XIAO, L.** 2007. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Vet Parasitol.* 144(1): 1-9.
- **FLEISS, J. L.** 1981. *Statistical methods for rates and proportions.* 2<sup>a</sup> Ed. Wiley and Sons, New York Porport ISBN: 0-471-06428-9.
- **FOSTER, D. M.; SMITH, G. W.** 2009. Pathophysiology of Diarrhea in Calves. *Vet Clin Food Anim.* 25(1): 13-36.
- **FREDES, F., RAFFO, E., MUÑOZ, P.** 2007. First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in stool of Adélie penguin from the Antarctic using acid-fast stain. *Antarct Sci.* 19(4): 437-438.
- **GARCIA, L. S; BRUCKNER, D. A.** 1988. *Diagnostic Medical Parasitology.* Capítulo 4. 49-56pp.
- **GARCÍA, L.** 2001. Intestinal protozoa: Coccidia and Microsporidia. *In: Diagnostic Medical Parasitology.* 4<sup>th</sup> edition. Washington DC, American Society Microbiology. 49-74pp.
- **GEORGI, J. R.; GEORGI, M. E.** 1990. *Parasitology for Veterinarians.* Fifth Edition. Ed. Saunders Company. USA. 84-95pp

- **GEURDEN, T.; GOMA, F. Y.; SIWILA, J.; PHIRI, I. G. K.; MWANZA, A. M.; GABRIEL, S.; CLAEREBOUT, E.; VERCRUYSSSE, J.** 2006. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* in three cattle husbandry systems in Zambia. *Vet Parasitol.* 138(3-4): 217-222.
- **GÓMEZ-COUSO, H.; AMAR, C. F. L.; Mc LAUHLIN, J.; ARES-MAZÁS, E.** 2005. Characterization of a *Cryptosporidium* isolate from water buffalo (*Bubalus bubalis*) by sequencing of a fragment of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene (COWP). *Vet Parasitol.* 131(1-2): 139-144.
- **GORMAN, T.** 1987. La criptosporidiosis: una nueva entidad clínica. *Monografías de Medicina Veterinaria.* 9(2): 52-60.
- **GORMAN, T.; ALCAÍNO, H.; SANTELICES, J.** 1989. *Cryptosporidium* y otras coccidias intestinales en terneros de lechería. Región Metropolitana. Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria.* 21(1): 29-34.
- **GORMAN, T.; MANDRY, P.; MORALES, M.A.** 1993. Empleo de la espiramicina en el tratamiento de la diarrea de terneros infectados con *Cryptosporidium parvum*. *Parasitol al Día.* 17: 93-98.
- **HENRICKSEN, S.; POHLENZ, J.** 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scan.* 22: 594.
- **KATO, S.; JENKINS, M.; FOGARTY, E.; BOWMAN, D.** 2002. Effects of freeze-thaw events on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in soil. *J Parasitol.* 88(4): 718-722.
- **KVÁC, M.; KOUBA, M.; VÍTOVEC, J.** 2006. Age- related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. *Vet Parasitol.* 137(1): 202-209.
- **LENG, X.; MOSIER, D.; OBERST, R.** 1996. Simplified method for recovery and PCR detection of *Cryptosporidium* DNA from bovine feces. *Applied and Environ Microbiol.* 62(2): 643-647.
- **LIPPI, E.; CASTRO, P.** 2003. Aspectos epidemiológicos de la criptosporidiosis en becerros de rebaños lecheros. *Parasitol Latinoam.* 58(3-4): 122-127.

- **LUNA, S.; REYES, L.; CHINCHILLA, M.; CATARINELLA, G.** 2002. Presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp en aguas superficiales de Costa Rica. Parasitol Latinoam. 57(1-2): 63-65.
- **MERCADO, R.; BUCK, G.; MANQUE, P.; OZAKI, L.** 2007. Cryptosporidium hominis infection of the human respiratory tract. Emerg Infect Dis. 1(3): 462-464.
- **NACIRI, M.; PAUL, M.; MANCASSOLA, R.; PIRIER, P.; CHERMETE, R.** 1999. Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhea complex in suckling and dairy calves in France. Vet Parasitol. 85(4): 245-257.
- **PEREZ-CORDON, G.; ROSALES-LOMBARDO, M.; SANCHEZ-MORENO, M.** 2005. Procesamiento de muestras fecales en el estudio de *Cryptosporidium* spp. mediante PCR. Revista Peruana Biológica. 12(1): 158-160.
- **PINTAR, K. D. M.; FAZIL, A.; POLLARI, F.; CHARRON, D. F.; WALTNER-TOEWS, D.; MCEWEN, S. A.** 2010. A Risk Assessment Model to Evaluate the Role of Fecal Contamination in Recreational Water on the Incidence of Cryptosporidiosis at the Community Level in Ontario. Risk Anal. 30(1): 49-64.
- **REMYNGTON, R. D.; SCHORK, M. A.** 1970. Chi-square Test for frequency data. *In: Statistics with applications to the biological and healthy sciences.* Englewood Cliffs, N.J. Prentice-Hall. 240-244pp.
- **SANTÍN, M.; TROUT, J.; XIAO, L.; ZHOU, L.; GREINER, E.; FAYER, R.** 2004. Prevalence and age related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. Vet Parasitol. 122(2): 103-117.
- **SCORZA, A. V.; BREWER, M. M.; LAPPIN, M. R.** 2003. Polymerase chain reaction for the detection of *Cryptosporidium* spp. in cat feces. J Parasitol. 89(2): 423-426.
- **SMITH, H. V.; NICHOLS, R. A. B.** 2010. *Cryptosporidium: Detection in water and food.* Exp Parasitol. 124: 61-79.
- **SOULSBY, E.** 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7ª edición. Nueva editorial Interamericana. Mexico, DF. 823pp

- **STURDEE, A. P.; BODLEY-TICKEL, A. T.; ARCHER, A.; CHALMERS, R. M.** 2003. Long-term study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. *Vet Parasitol.* 116: 97-113.
- **STURBAUM, G.; REED, C.; HOOVER, P.; JOST, H.; MARSHALL, M.; STERLING, C.** 2001. Species-specific, nested PCR-restriction fragment length polymorphism detection of single *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microb.* 67(6): 2665-2668.
- **SUNNOTEL, O.; SNELLING, X.; MOULE, K.; MOORE, J. E.; CHERIE MILLAR, B.; DOOLEY, J. S. G.; LOWERY, C. J.** 2006. Rapid and sensitive detection of single *Cryptosporidium* oocysts from archived glass slides. *J Clin Microbiol.* 44(9): 3285-3291.
- **TEE, G. H.; MOODY, A. H.; COOKE, A. H.; CHIODINI, P. L.** 1993. Comparison of techniques for detecting antigens of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in faeces. *J Clin Pathol.* 46: 555-558.
- **THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M. E.; ZHU, G.; ENOMOTO, S.; ABRAHAMSEN, M. S.; HIJJAWI, N. S.** 2005. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology.* 59: 77-139 .
- **THRUSFIELD, M.** 2005. *Veterinary Epidemiology.* Third edition. Blackwell Publishing. UK. 584pp.
- **TYZZER, E. E.** 1910. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. Et sp. Nov.), of the gastric glands of the common Mouse. *J Med Res.* 18: 487-509.
- **WEBER, R.; BRYAN, R.; BISHOP, H.; WAHLQUIST, S.; SULLIVAN, J.; JURANEK, D.** 1991. Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence fro low sensitivity of current diagnostic methods. *J Clin Microbiol.* 29(7): 1323-1327.
- **WEITZ, J. C.; TASSARA R.** 1989. Diagnóstico de la cryptosporidiosis: Estudio comparativo de las tinciones Ziehl-Neelsen y Safranina. *Revista Médica Chilena.* 117: 899-902.

- **XIAO, L.; RYAN, U.M.** 2004. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 17: 483-90.

## ANEXO

### Anexo I

#### Tinción de ZN

- **Reactivos:** Azul de metileno, ácido acético glacial, ácido clorhídrico, alcohol etílico 95%, fucsina básica, fenol cristalizado, agua destilada.
- **Preparación de tinciones:**
  - Fucsina
    - Fucsina básica 10 g.
    - Alcohol etílico 95% 100 ml.
    - Fenol cristalizado (\*) 50 ml.
    - Agua destilada c.s.p. 1000 ml.

(\*) Fundir a baño María el fenol cristalizado agregando 10% de agua destilada y de éste medir 50 ml (aproximadamente 50 g).

Preparación: disolver la fucsina en el alcohol y luego agregar el fenol disuelto en agua destilada tibia.

- Azul de metileno
  - Azul de metileno 2 g.
  - ácido acético glacial 50 ml.
  - Agua destilada c.s.p. 1000 ml.
- Alcohol ácido
  - Ácido clorhídrico 30 ml.
  - Alcohol etílico 970 ml.

## Anexo II

### Tinción de AU

- **Reactivos:** Aureamina, fenol en cristales, permanganato de potasio, ácido clorhídrico, alcohol etílico 95%, buffer pH 9.5, glicerina destilada.

- **Preparación de tinciones:**

- Aureamina

- Aureamina 30 mg.

- Fenol 3 g.

- Agua destilada c.s.p. 100 ml.

- Permanganato de potasio

- Permanganato de potasio 100 mg.

- Agua destilada c.s.p. 100 ml.

Mantener ambas soluciones en botella ámbar.

- Alcohol ácido

- Ácido clorhídrico 30 ml.

- Alcohol etílico 95% 970 ml.

- Glicerina para fluorescencia

- Glicerina 90 ml.

- Buffer pH 9.5 10 ml.

### Anexo III

Prueba estadística de McNemar.

		Método #1		
		(+)	(-)	
Método #2	(+)	A	B	N <sub>1</sub>
	(-)	C	D	N <sub>2</sub>
		N <sub>3</sub>	N <sub>4</sub>	<b>Total</b>

$$X^2 = (B - C)^2 / (B + C)$$

Valor de  $X^2$  corregido con 1 grado de libertad:

$$X^2 = ([B - C] - 1)^2 / (B + C)$$

#### **Anexo IV**

Cálculo de índice *Kappa* (*k*) e Interpretación.

$$k = \frac{2(AD + BC)}{N_1N_4 + N_2N_3}$$

donde las N son los totales marginales etiquetados así:

		<b>Método #1</b>		
		<b>Si</b>	<b>No</b>	
<b>Método #2</b>	<b>Si</b>	A	B	N <sub>1</sub>
	<b>No</b>	C	D	N <sub>2</sub>
		N <sub>3</sub>	N <sub>4</sub>	<b>Total</b>

Interpretación:

<b><i>Kappa</i></b>	<b>Concordancia</b>
< 0,00	Mala
0,00-0,20	Pobre
0,21-0,40	Sufrible
0,41-0,60	Regular
0,61-0,80	Buena
0,81-0,99	Óptima
1,00	Perfecta