

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



“Evaluación de la excreción de ooquistes de *Cryptosporidium spp* en becerras con diarrea, con tres técnicas diferentes”

**POR
JOSE LUIS RODRÍGUEZ DANIEL**

**TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA

MAYO DE 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

“Evaluación de la excreción de ooquistes de *Cryptosporidium spp* en becerras con diarrea, con tres técnicas diferentes”

POR
JOSE LUIS RODRÍGUEZ DANIEL

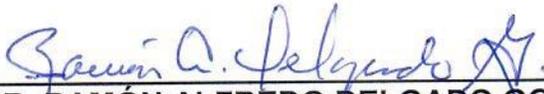
TESIS

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR

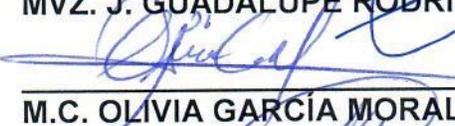
PRESIDENTE:


DR. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

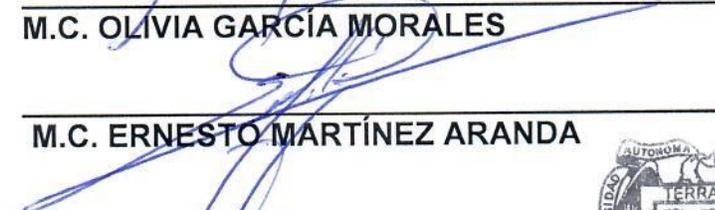
VOCAL:


MVZ. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

VOCAL:


M.C. OLIVIA GARCÍA MORALES

VOCAL SUPLENTE:


M.C. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA


DR. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA

MAYO DE 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Evaluación de la excreción de ooquistes de *Cryptosporidium spp* en becerras
con diarrea, con tres técnicas diferentes.

POR
JOSE LUIS RODRÍGUEZ DANIEL

TESIS

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL COMITÉ DE ASESORÍA COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR

ASESOR PRINCIPAL:


DR. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ


DR. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA

MAYO DE 2017

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Nicéforo Rodríguez Herrera y Paulina Fca. Daniel Tapia por haberme dado la vida y apoyarme incondicionalmente en toda mi carrera para obtener un logro tan grande como es el convertirme en un profesionalista.

A mis hermanos, Juan Nicéforo Rodríguez Daniel, Reyna Paulina Rodríguez Daniel, Cristina Rodríguez Daniel y Teresa Rodríguez Daniel, por ser parte de mi familia y darme su ayuda incondicional.

A mi Alma Mater, por aceptarme ser parte de ella y darme una formación como profesionalista.

Al Dr. Ramón Alfredo Delgado González, por brindarme todo su apoyo y permitirme ser parte de su proyecto para realizar mi tesis de titulación.

A mis compañeros, del servicio social de laboratorio de Diagnostico, Cesar Octavio Cruz Marmolejo, Pablo Espinoza y Sandra Hernández silva por brindarme el apoyo durante la realización de mi proyecto.

DEDICATORIAS

A mis padres, Nicéforo Rodríguez Herrera y Paulina Fca. Daniel Tapia por su confianza y el apoyo que me brindaron todo este tiempo.

A mis hermanos, Juan Nicéforo Rodríguez Daniel, Reyna Paulina Rodríguez Daniel, Teresa Rodríguez Daniel, a quienes quiero mucho.

A mi novia, Alicia Barrón Rodríguez, una persona a quien quiero mucho y por darme su apoyo incondicional en cualquier momento.

A toda mi familia, gracias a todos por sus consejos, toda su ayuda y su apoyo, mil gracias a todos los que estuvieron y siguen estando conmigo.

RESUMEN

La diarrea de las becerras producida por *Cryptosporidium* afecta principalmente a animales recién nacidos de 3 a 21 días de edad. Los métodos de diagnóstico convencionales para la identificación de ooquistes infectivos de *Cryptosporidium* requieren la observación microscópica con la técnica de Ziehl Neelsen modificada. El presente trabajo compara tres técnicas coproparasitológicas, directa, de flotación y sedimentación teñidas con Ziehl Neelsen modificada para la identificación de criptosporidias en heces diarreicas de becerras con la finalidad de conocer la prueba más sencilla y rápida que se pueda utilizar en estos casos de brotes de diarrea. Se muestrearon 54 becerras con diarrea de 1 a 35 días de edad con un promedio de edad de 13 días. La técnica de sedimentación mostró 31 (57.4%) muestras positivas a criptosporidiosis. En la técnica de flotación se encontraron 42 (77.7%) muestras positivas a criptosporidiosis. En la técnica directa se observaron 34 (62.9%) muestras positivas a criptosporidiosis

Palabras claves: Criptosporidiosis, becerras, técnica de Sheather, técnica de Ritchie, Ziehl Neelsen modificada.

INDICE

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS	ii
RESUMEN	iii
INDICE	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1. <i>Cryptosporidium</i> y criptosporidiosis	2
2.2. Importancia de la criptosporidiosis como zoonosis	2
2.3. Criptosporidiosis en bovinos	4
2.4. Signos y lesiones	5
2.5. Epidemiología y prevalencia de la criptosporidiosis	6
2.5.1. Criptosporidiosis en México	8
2.6. Diagnóstico	9
2.7. Intensidad de excreción de ooquistes	10
III. OBJETIVOS	12
IV. HIPÓTESIS	12
V. MATERIAL Y MÉTODOS	13
5.1. Toma de muestras	13
5.2. Conservación de las muestras	13
5.3. Análisis de muestras	13
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
VII. CONCLUSIONES	18
VIII. LITERATURA CITADA	19

I. INTRODUCCIÓN

La diarrea de las becerras producida por *Cryptosporidium* afecta principalmente a animales recién nacidos de 3 a 21 días de edad (Delgado y col., 2007). Los métodos de diagnóstico convencionales para la identificación de ooquistes infectivos de *Cryptosporidium* requieren la observación microscópica con la técnica de Ziehl Neelsen modificada (ZNm), sin embargo, por su pequeño tamaño puede haber resultados poco definidos, limitando de este modo la eficacia de la técnica (Omoruyi y col., 2014). Para el diagnóstico generalmente se requiere de la observación del estado infectivo de los ooquistes, los cuales comúnmente miden de 4–6 μm , y debido al tamaño tan pequeño de los ooquistes, la tinción que los diferencia es ésta técnica de ZNm (Connelly y col., 2008).

Los métodos de las preparaciones húmedas directas en portaobjetos tienen un valor limitado para la detección de *Cryptosporidium* en muestras fecales, ya que los ooquistes pueden fácilmente confundirse con otros materiales presentes en las muestras. En pacientes asintomáticos o pacientes con síntomas clínicos mínimos, el uso de los métodos de rutina tales como el de flotación concentración con sacarosa, y la tinción ZNm pueden ser insuficientes para demostrar la presencia de criptosporidias en casos muy leves (Connelly y col., 2008). *Cryptosporidium* comúnmente no es detectado durante el examen directo de muestras sin una tinción, sin embargo, otras técnicas como por ejemplo la prueba inmunoabsorbente ligada a enzimas (ELISA) son utilizadas en laboratorios de análisis clínicos (Weber y col., 1991).

A pesar de estos antecedentes, los establos lecheros requieren de un diagnóstico rápido de la infección para determinar las acciones que se deben realizar ante un problema de diarreas severas en becerras de reemplazo, por tal motivo, el presente trabajo compara tres técnicas para la identificación de criptosporidias en heces diarreicas de becerras con la finalidad de conocer la prueba más sencilla y rápida que se pueda utilizar en estos casos.

II. ANTECEDENTES

2.1. *Cryptosporidium* y criptosporidiosis

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria de distribución cosmopolita causada por el parásito protozooario *Cryptosporidium*, el cual es transmitido por el agua, y es encontrado intracelularmente en los hospedadores animales (Hussein, 2011; Lee y col., 2011). Las especies de *Cryptosporidium* pertenecen al *Phylum* Apicomplexa y afectan una amplia variedad de huéspedes vertebrados (Hashim y col., 2006), infecta a diversas especies de animales incluyendo a los mamíferos y produce una infección entérica que se manifiesta con diarrea aguda y profusa que solo se observa en humanos y rumiantes (Tzipori y Griffiths, 1998; Xiao y col., 2004). Si la diarrea se vuelve persistente, puede causar la muerte del hospedador (Shing, y col., 2011; Wang y col., 2011a). El conocimiento de la procedencia de los parásitos que causan criptosporidiosis en las becerras es esencial para el control de la enfermedad, ya que ésta es una de las principales causas de la diarrea indiferenciada de las becerras y produce grandes pérdidas económicas.

2.2. Importancia de la criptosporidiosis como zoonosis

Alrededor de 30 especies de *Cryptosporidium* han sido reconocidas, muchas de las cuales están asociadas con enfermedad en humanos, ganado domesticado, animales de compañía y de vida silvestre (Slapeta, 2013). Mientras que *C. parvum* es un franco patógeno zoonótico (Xiao y Feng, 2008), el potencial clínico y zoonótico de las otras especies no está entendido.

Para entender el significado en salud pública del potencial zoonótico de la infección por *C. parvum*, el diagnóstico de la criptosporidiosis en bovinos se ha basado en microscopía de luz (Del Coco y col., 2008; Tiranti y col., 2011), aunque ésta zoonosis está muy clara constituyendo un impedimento para desarrollar estrategias apropiadas para su control, ya que *C. parvum* está compuesto de

múltiples subtipos, los cuales parecen ser zoonóticos o antroponóticos. Por lo tanto, con la finalidad de entender la epidemiología molecular de éstas especies y para controlar la transmisión zoonótica, es esencial identificar los aislamientos a nivel subtipo, ya que los aislamientos de *C. parvum* albergados en becerras tienen un potencial zoonótico (Misic y Abe, 2007).

Se sabe que son varias especies de *Cryptosporidium* que infectan a los bovinos, sin embargo, la ocurrencia de infecciones mixtas con más de una especie y el impacto de este fenómeno sobre la salud de los animales y humanos es pobremente entendido. Se han reportado evidencias de infecciones mixtas con *C. parvum*, *C. bovis* and *C. andersoni*, así como con *C. bovis* y *C. parvum*. Las infecciones mixtas endémicas con estas tres principales especies de *Cryptosporidium* de los bovinos se ha observado en becerras en la transición de las primeras 6 semanas de edad (Shrestha col., 2014).

Muchos aspectos de la epidemiología de la criptosporidiosis no están bien entendidos debido a la incapacidad para diferenciar entre las taxas de *Cryptosporidium* por su morfología o fenotipo. Por lo tanto, las herramientas de genética molecular dirigidas a locus taxonómicamente informativos son ampliamente utilizados de forma retrospectiva, para distinguir entre taxones (Sulaiman y col., 2000).

Las infecciones mixtas con múltiples especies de *Cryptosporidium* podrían originarse de coinfecciones, o en el caso de infecciones crónicas, superinfecciones con múltiples taxas. Globalmente las infecciones mixtas por *Cryptosporidium* han sido descritas en humanos (Cama y col., 2006; Kurniawan y col., 2013) y en animales (Silverlås y col., 2013). Sin embargo, tales infecciones son comúnmente consideradas una excepción, aunque no es una regla, e investigaciones exhaustivas sobre la naturaleza de las infecciones mixtas en poblaciones animales, comúnmente no se les ha dado seguimiento con estudios

epidemiológicos moleculares. Además, se desconoce la prevalencia e impacto de éste fenómeno en animales y en salud pública.

2.3. Criptosporidiosis en bovinos

Las especies de *Cryptosporidium* que han sido identificadas en bovinos, incluyen *C. parvum* (Anusz y col., 1990), *C. bovis* (Fayer y col., 2005), *C. andersoni* (Lindsay y col., 2000; Satoh y col., 2003; Feng y col., 2011), *C. ryanae* (Fayer y col., 2008), *C. felis* (Bornay-Llinares y col., 1999), *C. hominis* (Smith y col., 2005), *C. suis*, *Cryptosporidium* genotipo ciervo (Fayer y col., 2006), *Cryptosporidium* genotipo *suis* y *Cryptosporidium* porcino genotipo II (Langkjaer y col., 2007). Sin embargo, las primeras cuatro especies (*C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* y *C. ryanae*), son las principales responsables de criptosporidiosis bovina (Maikai y col., 2011; Šlapeta, 2011; Wang y col., 2011b).

C. parvum coloniza el intestino delgado y constituye un importante agente del síndrome diarreico de los neonatos, en ocasiones acompañado por depresión, inapetencia, fiebre, deshidratación y pobre condición corporal (Björkman y col., 2003). En bovinos adultos también ha sido reportada esta especie causando una enfermedad que generalmente cursa en forma subclínica y presenta bajos niveles de infección (Fayer y col., 1998; Trotz-Williams y col., 2005; Singh y col., 2006). *C. andersoni* comúnmente se ha visto en ganado adulto asintomático, sin embargo, se ha asociado con abomasitis, con una ligera hiperplasia epitelial e infiltración de linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos en lámina propia (Masuno y col., 2006). Se asocia a reducción de la producción de leche y pobre ganancia de peso, además ha sido encontrado en ovinos y caprinos, y es considerado ser una especie zoonótica (Esteban y Anderson, 1995; Feng y col., 2011). Las especies *C. bovis* y *C. ryanae* infectan becerros destetados y de hasta un año de edad, y es más frecuente *C. bovis* que *C. ryanae* (Fayer y col., 2006; Fayer y col., 2007; Santin y col., 2008), en ambos casos, la infección del ganado con estas especies,

no se asocia con ningún signo clínico de enfermedad (Fayer y col., 2005; Fayer y col., 2008).

2.4. Signos y lesiones

Cryptosporidium es un protozooario ubicuo, parásito obligado que infecta el epitelio gastrointestinal de un amplio rango de huéspedes vertebrados (Plutzer y Karanis 2009; Fayer, 2010), resultando en gastroenteritis manifestada como diarrea de severidad variable. Los signos clínicos de la criptosporidiosis en bovinos son variables y principalmente dependen de la especie infectante y del estado inmune del huésped (Hajdusek y col., 2004; Broglia y col., 2008; Brook y col., 2008; Coklin y col., 2009).

Algunos bovinos infectados pueden ser asintomáticos; sin embargo, es frecuente clínicamente caracterizarse por diarrea, morbilidad e incluso mortalidad, particularmente en becerros recién nacidos (De Waele y col., 2010), causando pérdidas económicas (Mendonca y col., 2007; Díaz y col., 2010).

Cuatro especies de *Cryptosporidium*, son comúnmente diagnosticadas que infectan a los bovinos en diferentes grupos de edad (Broglia y col., 2008), entre éstas especies, *C. parvum* es la más común en bovinos, generalmente infectando becerras lactantes (<2 meses de edad) y muestran baja especificidad de huésped, con algunos genotipos considerados de potencial zoonótico (Alves y col., 2006; Coklin y col., 2009).

Las manifestaciones patológicas de criptosporidiosis son más frecuentes en animales lactantes de 1 a 3 semanas, aunque eventualmente los animales afectados se encuentran entre las 6 y 12 semanas de edad (Harp y col., 1990). La frecuencia de criptosporidiosis detectada es relativamente baja en becerras con diarrea en la primera semana pero se incrementa considerablemente la segunda semana para disminuir hasta los 45 días de edad.

La infección es adquirida por vía oral-fecal por contacto directo con hospedadores infectados o por ingestión de agua o alimentos contaminados (Karanis y col., 2007; Chalmers y Davies, 2010; Baldursson y Karanis, 2011).

Existen evidencias de lesiones que ocurren en intestino delgado, y ocasionalmente en el ciego y el colon, consistentes en atrofia y fusión de vellosidades, dilatación de las criptas, e infiltración de la lámina propia con neutrófilos, además de presencia de ooquistes de criptosporidias en la superficie epitelial (Angus y col., 1982). Sin embargo, en bovinos infectados natural y experimentalmente se han detectado grandes cantidades de ooquistes en sus excretas sin que haya una demostración de signos clínicos y el periodo infeccioso es más frecuente entre el primer y segundo mes de edad (Iseki y col., 1989, Atwill y col., 1999).

2.5. Epidemiología y prevalencia de criptosporidiosis

El protozooario del género *Cryptosporidium* es descrito como un importante patógeno gastrointestinal de diferentes hospedadores, incluyendo bovinos, animales de compañía y silvestres. Además, con ésta cadena epidemiológica, algunas especies de éste género son patógenas para los humanos (Castro-Hermida y col., 2007; Brook y col., 2008; Coklin y col., 2009; Xiao, 2010).

Algunas especies zoonóticas de *Cryptosporidium*, como *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis* and *C. parvum* son reportadas en la literatura (Xiao, 2010), mientras que la última es comúnmente descrita que infecta a humanos y rumiantes, especialmente bovinos (Alves y col., 2006).

Las especies de *C. parvum* pueden tener la más compleja epidemiología entre todas éstas debido a su capacidad para infectar a los humanos a través de transmisión zoonótica y antroponótica (Alves y col., 2003, 2006).

C. hominis y *C. parvum* en general son responsables de la mayoría de las infecciones por *Cryptosporidium* en humanos (Xiao, 2010). Cuatro especies de *Cryptosporidium* son comúnmente identificadas en bovinos, estas incluyen *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae*, y *C. andersoni* (Slapeta, 2013). Entre éstas, *C. parvum* es la única especie con un gran potencial zoonótico (Xiao 2010). Los animales de granja, particularmente los becerros neonatos han sido identificados como los principales reservorios de la criptosporidiosis zoonótica (Plutzer y Karanis, 2009; Xiao, 2010).

La criptosporidiosis produce un significativo impacto económico debido a los costos de gastos médicos y a las pérdidas en la productividad (Xiao y col., 2004). La principal fuente de contaminación de los animales susceptibles es el agua, ya que se han realizado estudios que mencionan que el 10% de las infecciones pueden ser transmitidas de individuo a individuo y la mayoría de las ocasiones es debido a la contaminación del agua potable (Eisenberg y col., 2005).

La alta prevalencia e intensidad de infecciones por *Cryptosporidium spp* en becerras lactantes de 1 a 30 días de edad es generalmente elevada, varía de 40 a 60%, frecuentemente mayor al 65%, aunque otros estudios muestran prevalencias que van desde 20 hasta 84%, esto indica que estos son parásitos comunes en las lecherías (Delgado y col., 2007; Lassen y col., 2009; Wang y col., 2011a).

La susceptibilidad a *Cryptosporidium* varía de acuerdo con la edad, y a otros factores de riesgo que causen la diseminación de la infección, además las infecciones mixtas con *E. coli* y Rotavirus, contribuyen en asociación con *Cryptosporidium*, la presentación de diarrea en becerras, con más severidad (Harp y col., 1989; Nussbaum y col., 1999).

2.5.1. Criptosporidiosis en México

Estudios realizados en Delicias, Chihuahua, muestran criptosporidiosis en becerras con diarrea con una edad promedio de 14 días y rangos de 1 a 35 días. El 40.54% de las becerras con diarrea se han observado positivas a la infección en un 84.61% de los establos examinados (Trujillo-Guerrero, 2011). En Cuauhtémoc, Chihuahua, la edad promedio observada en becerras con diarrea debido a criptosporidiosis es de 7 días con rangos de 1 a 21 días. Se ha encontrado el 60.9% de las muestras positivas a la presencia de ooquistes en 62.5% de los establos estudiados (Arreola-Hernández, 2011). En Tijuana, Baja California la edad promedio de las becerras con diarrea debido a *Cryptosporidium* spp es de 11 días con rangos de 4 a 31 días. Se ha observado que el 65.15% de las muestras de heces, han sido positivas a la presencia de ooquistes en el 100% de los hatos estudiados (Mendoza-Delgado, 2010). En todas las regiones los rangos de infección varían de 10 a 85% de becerras con diarreas y los animales más afectados estuvieron dentro de los 7 a 21 días de edad.

Otros resultados obtenidos de estudios de diagnóstico de diarrea en becerras muestran un porcentaje de positividad a la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp, en Jalisco en becerras de 1 a 30 días de edad con un 78%, en Querétaro en becerras de 2 a 20 días de edad con 75% y en Cd. Juárez, Chihuahua en becerras de 2 a 30 días de edad con 60%. Estos resultados no son concluyentes ya que no son estudios dirigidos sino de diagnóstico de la diarrea indiferenciada de las becerras. Estudios realizados en Aguascalientes muestran prevalencias que van de 33 a 48%, en becerras de 0 a 28 días de edad, con o sin diarrea (García y col., 2009).

El monitoreo de *Cryptosporidium* spp. en animales de granja y en el ambiente es comúnmente un desafío por la diferenciación entre especies zoonóticas y no zoonóticas. En años recientes, el análisis biológico molecular ha sido utilizado

ampliamente para la caracterización de *Cryptosporidium* spp. de varios animales (Elsafi y col., 2013; Fayer y col., 2013; Helmy y col., 2014).

2.6. Diagnóstico

El reconocimiento de las características morfológicas de los ooquistes por medio de microscopía, con la tinción de ZNm, es convincente para el diagnóstico de la criptosporidiosis, sin embargo, esta técnica es laboriosa y menos sensible y además está muy propensa a errores (Bialek y col., 2002). Los ooquistes de *Cryptosporidium* son bastante pequeños y consecuentemente pueden fácilmente confundirse con detritus de las heces y otros artefactos. También pueden confundirse fácilmente con ooquistes, tales como los de especies de *Cyclospora* y algunas levaduras (Connelly y col., 2008). Además, éste método no permite diferenciar entre especies de *Cryptosporidium* debido a que los ooquistes son muy similares los cuales se tiñen de rojo o rosa intenso como algunos componentes fecales, lo cual la hace una técnica deficiente comparada con otras.

Los métodos basados en el examen microscópico han sido reemplazados con técnicas más confiables como el reconocimiento molecular específico para cualquier patógeno. La sensibilidad del examen de heces con la tinción de ZNm es muy baja comparada con la detección de antígeno con ELISA, y requiere de la concentración de ooquistes de más de 500,000 por mL en heces sólidas (Weber y col., 1991). ELISA es considerada la prueba de oro para la detección de antígeno de *Cryptosporidium* spp, ya que es hasta 10 veces más sensibles que ZNm, considerándose ésta la prueba de oro (Katanik y col., 2001).

Existen otros métodos de diagnóstico que permiten la identificación de antígenos y proteínas de *Cryptosporidium* spp como la técnica de detección de antígeno en “sándwich” (sad-ELISA) o por la técnica directa de análisis de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Omoruyi y col., 2014).

La PCR se ha utilizado para detectar *Cryptosporidium* en muestras clínicas de heces diarréicas en diversas partes del mundo. La PCR tiene la ventaja de mejorar la sensibilidad y la especificidad, sin embargo, éstos métodos han limitado su aplicabilidad en un punto de atención o en un entorno de bajos recursos debido a sus costos, infraestructura necesaria, e involucra técnicos con alto nivel técnico. (Higgins y col., 2001; Samie y col., 2006; Tumwine y col., 2003). La PCR ha mostrado una sensibilidad de 97%–100% y una especificidad del 100% para el diagnóstico de *Cryptosporidium* (Morgan y col., 1998; Bialek y col., 2002). La PCR permite una cuantificación real de ooquistes de *Cryptosporidium* con una sensibilidad de 8.7 ooquistes (Gao y col., 2014). Sin embargo, la complejidad del análisis molecular y la variabilidad de la matriz biológica son un desafío para la aplicación del diagnóstico por PCR en heces (Homem y col., 2012).

El método de flotación por centrifugación con una solución saturada de sacarosa para la evaluación microscópica de muestras de heces, se utiliza para fines de diagnóstico de criptosporidiosis, sin embargo, para confirmar el diagnóstico se utiliza la PCR para buscar especies específicas de *Cryptosporidium spp* (Machado y col., 2014).

2.7. Intensidad de excreción de ooquistes

Los huéspedes infectados por *Cryptosporidium* pueden excretar millones a billones de ooquistes esporulados en las heces (Fayer y col., 1998; Nydam y col., 2001; Xiao y col., 2001), los cuales pueden sobrevivir y persistir en las heces y en el ambiente por largos periodos, que van de varias semanas a muchos meses (Robertson y col., 1992).

Un gran número de ooquistes y quistes excretados indican que la excreción por el ganado lechero posee un riesgo para los becerros susceptibles y para la gente (Nydam y col., 2001), además de que el ganado juega un papel importante en la transmisión de criptosporidiosis a los humanos (Del Coco y col., 2014). De las

cuatro especies de *Cryptosporidium* que afectan a los bovinos (*C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae*, y *C. andersoni*), solo *C. parvum* es un importante patógeno zoonótico y su presencia en el ganado es de interés en salud pública porque la criptosporidiosis humana es más común donde hay producción intensiva de establos lecheros (Xiao y Feng, 2008; Fayer y col., 2010). La transmisión zoonótica de *Cryptosporidium* puede ocurrir a través del contacto directo también como a través de la ingestión de alimento y agua contaminados con ooquistes (Del Coco y col., 2009).

Se han publicado varios criterios para medir la intensidad de eliminación de *Cryptosporidium spp* en heces (Bednarska y col., 1998; Ortolani y Castro, 2003; Emre y col., 1998; Espinoza, 2007). Al respecto, la literatura está muy limitada sobre estas comparaciones de excreción, lo importante en este caso es encontrar una relación entre los grados de intensidad de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium spp*, y los grados de infección. El criterio tomado en nuestros estudios ha sido aplicado con muy poca variación en la interpretación, ya que se observaron 25 campos a 400 aumentos y se gradúan en negativo, grado 1 con 1 a 10 ooquistes, grado 2 de 11 a 20 ooquistes, grado 3 de 21 a 40 ooquistes, y grado 4 con más de 40 ooquistes. Algunos investigadores comentan que el grado 1 se presenta en animales asintomáticos o prepatentes, mientras que los grados 2 a 4 predominan en becerros con diarrea. Podemos entonces inferir que entre los grados de intensidad de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium spp*, se detectan los grados de infección en forma incipiente (grado 1), leve (grado 2), moderada (grado 3) y severa (grado 4).

III. OBJETIVOS

Objetivo General: Evaluar tres técnicas coproparasitoscópicas para identificar ooquistes de *Cryptosporidium spp* en heces diarreicas de becerras lactantes

Objetivos Específicos: Evaluar el grado de excreción de ooquistes en heces diarreicas de becerras lactantes con las técnicas directa, de flotación (Sheather) y de sedimentación (Richie), teñidas con Ziehl Neelsen modificada

IV. HIPÓTESIS

Las técnicas coproparasitoscópicas directa, de flotación (Sheather) y sedimentación (Richie), teñidas con Ziehl Neelsen modificada, para la evaluación de la excreción de ooquistes de *Cryptosporidium spp.*, en heces diarréicas de becerras lactantes presentan la misma eficacia.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Toma de muestras

Se tomaron de 20 a 30 g de heces de becerras menores de 60 días con signos clínicos de diarrea, por masaje directo del recto, en recipientes de plástico con tapa hermética, y se transportarán en refrigeración al laboratorio de parasitología de la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, en Torreón, Coah., para su procesamiento.

5.2. Conservación de las muestras

Las muestras se conservaron con Dicromato de Potasio al 2.5% (Relación 1:1), los recipientes se agitaron vigorosamente, se filtrarán por un Tamiz de 35 μm , se colocarán en un tubo de centrifuga con fondo cónico y se refrigeraron hasta ser utilizadas.

5.3. Análisis de muestras

Las muestras de heces se analizarán por tres técnicas diferentes para identificar ooquistes de *Cryptosporidium* y medir la intensidad de excreción de ooquistes: Por 1) frotis directo de heces; 2) Técnica de Ritchie modificada; y 3) Técnica de Sheather.

1) Frotis directo: Inmediatamente después de la llegada al laboratorio, se examinaron las muestras de heces frescas, sin conservador. Se utilizó una muestra de aproximadamente 60 a 90 μL de heces (dos a tres gotas), se realizó un extendido fino homogéneo en la mitad de un portaobjetos y se dejó secar completamente al aire. Se realizó una tinción de ZNm, para demostrar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium*, observándose en un microscopio de luz visible a 40X.

2) Técnica de Ritchie modificada: Las muestras de heces conservadas con Dicromato de Potasio se procesaron para concentrar ooquistes. Las heces, previamente filtradas, se mezclaron en proporción 2:10 con una solución salina de formol (formol: 50 mL, Cl Na 5 g, agua destilada 950 mL), se colocaron en un tubo de centrifuga, se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 1,500 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se tomaron 60 a 90 μ L de heces (dos a tres gotas), del sedimento con pipeta Pasteur, se realizó un extendido fino homogéneo en la mitad de un portaobjetos, se dejó secar completamente al aire, y se aplicó la técnica de ZNm para verificar la presencia de ooquistes, observándose en un microscopio de luz visible a 40X.

3) Técnica de Sheather: Las muestras de heces conservadas con Dicromato de Potasio se procesaron para la técnica de flotación con sacarosa saturada, para recuperar ooquistes. Las heces, previamente filtradas, se mezclaron en proporción 2:10 con una solución saturada de sacarosa, se colocaron en un tubo de centrifuga, se agitarán vigorosamente y se centrifugarán a 1,500 rpm durante 5 minutos. Se tomarán 60 a 90 μ L (dos a tres gotas) de heces del menisco entre la solución y el aire, con una pipeta Pasteur, se realizó un extendido fino homogéneo en la mitad de un portaobjetos, se dejó secar completamente al aire, y se aplicó la técnica de ZNm para verificar la presencia de ooquistes, observándose en un microscopio de luz visible a 40X.

Breve descripción de la tinción de ZNm. Las muestras se tiñen con Fuchina fenicada por 30 minutos, se lavan con agua corriente, se decoloran con alcohol ácido (Alcohol al 70% y Ácido clorhídrico al 1%), se lavan con agua corriente y se contratiñen con azul de metileno al 1% durante 5 minutos.

Identificación de criptosporidias. Las criptosporidias se identificarán de acuerdo a su morfología esférica de 4 a 6 μ m de diámetro, a su estructura interna con una

pared delgada con bordes bien definidos, y a sus características tintoriales, observándose los ooquistes de color rojo intenso.

NOTA: Siempre se teñirán controles positivos para verificar la técnica de tinción.

Observación al microscopio: Las muestras (control y problema) de las laminillas con tinción de ZNm serán observadas al microscopio de luz visible con el objetivo de 40X. De acuerdo a su reacción tintorial se realizará el conteo de los ooquistes observados clasificándolos de la siguiente manera: Cero ooquistes (-), se cuentan cuarenta campos. En caso de observar ooquistes se cuentan 25 campos. 1 a 10 ooquistes (+), 11 a 20 ooquistes (++) , 21 a 40 ooquistes (+++) , más de 40 ooquistes (++++).

Análisis estadístico. Los resultados se presentan en porcentajes y se analizan con la prueba de Ji cuadrada para la comparación de los tres métodos.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se muestrearon 54 becerras de 1 a 35 días de edad con un promedio de edad de 13 días, con diarrea de uno a tres días de duración. Se analizaron mediante 1) observación directa al microscopio, 2) técnica de Ritchie (Sedimentación), y 3) técnica de Sheather (Flotación). En los tres casos se realizaron frotis y se tiñeron con ZNm para la identificación de ooquistes *Cryptosporidium spp.*, encontrándose los siguientes resultados:

La técnica de sedimentación mostró 31 muestras positivas a criptosporidiosis, de las cuales 11(35.5%) tuvieron grado 1, 2(6.5%) grado 3, y 18(58.0%) grado 4. En la técnica de flotación se encontraron 42 muestras positivas a criptosporidiosis, 15(35.7%) grado 1, 4 (9.5%) grado 2, 6 (14.3%) grado 3, y 17 (40.5%) grado 4. En la técnica directa se observaron 34 muestras positivas a criptosporidiosis, 14 (41.2%) grado 1, 3 (8.8%) grado 2, 1 (2.9%) grado 3, y 16 (47.1%) grado 4.

Obtenidos los resultados se realizó la comparación de las tres técnicas de detección de ooquistes de *Cryptosporidium spp.* mediante la Ji cuadrada, observándose que no hubo diferencia significativa ($p = 0.05$) entre la técnica directa vs sedimentación, ni entre la técnica directa vs flotación, sin embargo si hubo diferencia significativa ($p = 0.02$) entre las técnicas de flotación vs sedimentación.

La criptosporidiosis generalmente se diagnostica mediante la detección microscópica de ooquistes en frotis fecales por métodos de tinción convencionales. Sin embargo, hay técnicas más sensibles y específicas como la de inmunofluorescencia, ELISA, y PCR (Morgan, y col., 1998). Para fines de investigación, la PCR se ha encontrado ser altamente sensible como además de ser una herramienta de diagnóstico para la criptosporidiosis ya que detecta hasta un ooquiste en 1 mL de muestra fecal (Xiao y col., 2001).

Sin embargo, el diagnóstico microscópico directo para la detección de criptosporidias en muestras fecales utilizando la técnica de ZNm, permite hacer una evaluación rápida de los brotes de diarreas en becerras y permite agilizar las medidas de control y preventivas para bajar la incidencia de la enfermedad (Morgan y col., 1998), a pesar de que la baja densidad de ooquistes y la excreción de ooquistes intermitente reduce significativamente la sensibilidad diagnóstica.

Con respecto a la técnica de ZNm, es un método económico y rápido para la identificación de ooquistes de *Cryptosporidium spp.* El criterio que se tomó para medir la intensidad de eliminación de ooquistes en heces, se basó en agrupar un grupo determinado de ooquistes y relacionarlos con los grados de severidad de eliminación de ooquistes (Bednarska y col., 1998; Ortolani y Castro, 2003; Emre y col., 1998; Espinoza, 2007).

El análisis microscópicos de los frotis fecales teñidos con ZNm es el método más utilizado para el muestreo tamiz para el diagnóstico de *Cryptosporidium spp.* (Kehl y col., 1995; Rodríguez-Hernández y col., 1994). También se ha encontrado que algunos métodos de detección inmunológica no son más sensibles que la microscopía convencional (Quilez y col., 1996), aunque los estudios con PCR tienen una sensibilidad y especificidad del 100%, comparado con un 83% de sensibilidad y 98% de especificidad para la microscopía (Morgan y col., 1998).

VII. CONCLUSIONES

La técnica directa, de flotación y sedimentación junto con la tinción de ZNm para el diagnóstico de criptosporidiosis en becerras lactantes, son métodos rápidos y efectivos para implementar las medidas necesarias para controlar o erradicar la infección un hato lechero.

La técnica directa vs la técnica de sedimentación y vs la técnica de flotación, no presentan diferencias estadísticamente significativas para su utilidad en el diagnóstico de la criptosporidiosis en heces diarréicas de becerras. Sin embargo, la técnica de flotación vs la técnica de sedimentación si es significativamente más efectiva.

VIII. LITERATURA CITADA

Alves, M., Xiao, L., Antunes, F., Matos, O. (2006). Distribution of *Cryptosporidium* sub-types in humans and domestic wild ruminants in Portugal. *Parasitol. Res.* 99:287–292.

Alves, M., Xiao, L., Sulaiman, I., Lal, A.A., Matos, O. y Antunes, F. (2003). Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle and zoo ruminants in Portugal. *J. Clin. Microbiol.* 41:2744–2747.

Angus, K.W., Tzipori, S. y Gray, E.W. (1982). Intestinal lesions in specific-pathogen-free lambs associated with a *Cryptosporidium* from calves with diarrhea. *Vet. Pathol.* 19:67-78.

Anusz, K.Z., Mason, P.H., Riggs, M.W. y Perryman, L.E. (1990). Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in bovine feces by monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 28:2770-2774.

Arreola-Hernández, S.I. (2011). Frecuencia de criptosporidiosis en becerras lactantes de la cuenca lechera de Cuauhtémoc, Chihuahua. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, División Regional de Ciencia Animal. Torreón, Coah.

Atwill, E.R., Johnson, E., Klingborg, D.J., Vesperat, G.M., Markegard, G., Jensen, W.A., Pratt, D.W., Delmas, R.E., George, H.A., Forero, L.C., Philips, R.L., Barry, S.J., McDougald, N.K., Gildersleeve, R.R. y Frost, W.E. (1999). Age, geographic, and temporal distribution of fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cow-calf herds. *Am. J. Vet. Res.* 60:420–425.

Baldursson, S. y Karanis, P. (2011). Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks—an update 2004–2010. *Water Res.* 45:6603–6614.

Bednarska, M., Bajer, A. y Sinsky, E. (1998). Calves as a potential reservoir of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* sp. *Ann. Agric. Environ. Med.* 5 (2):135-138.

Bialek, R., Binder, N., Dietz, K., Joachim, A., Knobloch, J. y Zelck, U.E. (2002). Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in faecal specimens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 43:283–288.

Björkman, C., Svensson, C., Christensson, B y de Verdier, K. (2003). *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in calf diarrhoea in Sweden. *Acta Vet. Scand.* 44(3-4):145-52.

Bornay-Llinares, F.J., da Silva, A.J., Moura, N.S., Myjak, P., Pietkiewicz, H., Kruminis-Lozowska, W., Graczyk, T.K. y Pieniazek, N.J. (1999). Identification of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecular methods. *Appl. Envir. Microbiol.* 65:1455-1458.

Brogli, A., Reckinger, S., Cacció, S.M. y Nöckler, K. (2008). Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. *Vet. Parasitol.* 154:8–13.

Brook, E.J., Hart, C.A., French, N., Christley, R. (2008). Prevalence and risk factors for *Cryptosporidium* spp. Infection in young calves. *Vet. Parasitol.* 152:46–52.

Castro-Hermida, J.A., Almeida, A., González-Warleta, M., Costa, J.M.C., Rumbo- Lorenzo, C., Mezo, M. (2007). Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. *Parasitol. Res.* 101:1443–1448.

Cama, V., Gilman, R.H., Vivar, A., Ticona, E., Ortega, Y., Bern, C. y Xiao, L.H. (2006). Mixed *Cryptosporidium* infections and HIV. *Emerg. Infect. Dis.* 12:1025–1028.

Chalmers, R. y Davies, A. (2010). Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Exp. Parasitol.* 124:138–146.

Coklin, T., Uehlinger, F.D., Farber, J.M., Barkema, H.W., O’Handley, R.M., Dixon, B.R. (2009). Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from 11 farms in Prince Edward Island, Canada. *Vet. Parasitol.* 160:323–326.

Connelly, J.T., Nugen, S.R., Borejsza-Wysocki, W., Durst, R.A. y Montagna, A.J. (2008). Human pathogenic *Cryptosporidium* species bioanalytical detection method with single oocyst detection capability. *Anal. Bioanal. Chem.* 36:450–457.

Del Coco, V.F., Cordoba, M.A., Bilbao, G., de Almeida Castro, A.P., Basualdo, J.A., Fayer, R., Santin, M. (2014). *Cryptosporidium parvum* GP60 subtypes in dairy cattle from Buenos Aires, Argentina. *Res. Vet. Sci.* 96:311–314.

Delgado, G.R., Mijangos, M.L., Avila, A.S., Martínez, V.G., y Espinoza, V.J. (2007). Criptosporidiosis en becerras Holstein con diarrea de la Comarca Lagunera, México. XVI Congreso Nacional de Patología Veterinaria. Mazatlán, Sin., México.

De Waele, V., Speybroeck, N., Berkvens, D., Mulcahy, G. y Murphy, T.M. (2010). Control of cryptosporidiosis in neonatal calves: use of halofuginone lactate in two different calf rearing systems. *Prev. Vet. Med.* 96:143–151.

Díaz, P., Quílez, J., Chalmers, R.M., Panadero, R., López, C., Sánchez-Acedo, C., Morrondo, P. y Díez-Baños, P. (2010). Genotype and subtype analysis of *Cryptosporidium* isolates from calves and lambs in Galicia (NW Spain). *Parasitology*. 137:1187–1193.

Eisenberg, J.N., Lei, X., Hubbard, A.H., Brookhart, M.A. y Colfors, Jr. J.M. (2005). The role of disease transmission and conferred immunity in outbreaks: Analysis of the 1993 *Cryptosporidium* outbreak in Milwaukee, Wisconsin. *Am. J. Epidemiol.* 161:62-72.

Elsafi, S.H., Al-Maqati, T.N., Hussein, M.I., Adam, A.A., Abu Hassan, M.M. y Al Zahrani, E.M. (2013). Comparison of microscopy, rapid immunoassay, and molecular techniques for the detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. *Parasitol. Res.* 112:1641–1646.

Emre, Z., Alabay, B.M., Fidanci, H., Duzgun, A. y Cerci, H. (1998). Prevalence of *Cryptosporidium* spp infection and its relation to other enteric pathogens (*Escherichia coli* K 99 and rotavirus) in cattle in Ankara, Turkey. *Tr. J. Vet. Anim. Sciences*. 22:453-457.

Espinoza-Vargas, J.J. (2007). Evaluación de la intensidad de excreción de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en becerras con diarrea. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, División Regional de Ciencia Animal. Torreón, Coah.

Esteban, E. y Anderson, B.C. (1995). *Cryptosporidium muris*: prevalence, persistency, and detrimental effect on milk production in a drylot dairy. *J. Dairy Sci.* 78(5):1068-1072.

Fayer, R. (2010). Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.* 124:90–97.

Fayer, R., Santin, M., Macarisin, D. y Bauchan, G. (2013). Adhesive-tape recovery combined with molecular and microscopic testing for the detection of *Cryptosporidium* oocysts on experimentally contaminated fresh produce and a food preparation surface. *Parasitol. Res.* 112:1567–1574.

Fayer, R., Gasbarre, L., Pasquali, P., Canals, A., Almeria, S. y Zarlenga, D. (1998). *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *Int. J. Parasitol.* 28(1):49-56.

Fayer, R., Santin, M., Trout, J.M. y Greiner, E. (2006). Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Vet. Parasitol.* 135(2):105-112.

Fayer, R., Santin, M. y Trout, J.M. (2007). Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. *Vet. Parasitol.* 145(3-4): 260-266.

Fayer, R., Santin, M y Trout, J.M. (2008). *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet. Parasitol.* 156(3-4):191-198.

Fayer, R., Santin, M. y Xiao, L. (2005). *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J Parasitol.* 91(3):624-629.

Feng, Y., Yang, W., Ryan, U., Zhang, L., Kvac, M., Koudela, B., Modry, D., Li, N., Fayer, R. y Xiao, L. (2011). Development of a multilocus sequence tool for typing *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *J. Clin. Microbiol.* 49:34-41.

García, M.D., Cruz-Vázquez, C., Quezada, T., Silva, E., Valdivis, A., Vázquez, S. y Ramos, M. (2009). *Cryptosporidium* in dairy calves from Aguascalientes, México: Risk infection in relation with the season and months of sampling. *J. Anim. Vet. Adv.* 8(8):1579-1583

Hajdusek, O., Ditrich, O. y Slapeta, J. (2004). Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. In animal and human hosts from the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 122:183–192.

Hashim, A.G., Mulcahy, B.B. y Marguerite, C. (2006). Interaction of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* with primary human and bovine intestinal cells. *Infect Immun.* 74(1):99-107.

Harp, J.A., Woodmansee, D.B. y Moon, H.W. (1989). Effects of colostral antibody on susceptibility of calves to *Cryptosporidium parvum* infection. *Am J Vet Res.* 50(12): 2117-2119.

Harp, J.A., Woodmansee, D.B. y Moon, H.W. (1990). Resistance of calves to *Cryptosporidium parvum*: Effects of age and previous exposure. *Infect. Immun.* 58(7):2237-2240.

Helmy, Y.A., Krucken, J., Nockler, K., von Samson-Himmelstjerna, G. y Zessin, K.H. (2014). Comparison between two commercially available serological tests and polymerase chain reaction in the diagnosis of *Cryptosporidium* in animals and diarrhoeic children. *Parasitol. Res.* 113:211–216.

Higgins, J.A., Fayer, R., Trout, J.M., Xiao, L., Lal, A.A., Kerby, S. y Jenkins, M.C. (2001). Real-time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum*. *J. Microbiol. Meth.* 47:323–337.

Hussein, A.S. (2011). *Cryptosporidium parvum* causes gastroenteritis epidemics in the Nablus region of Palestine. *Tropical Med. Internal. Health.* 16(1):12-17.

Iseki, M., Maekawa, T., Moriya, K., Uni, S. y Takada, S. (1989). Infectivity of *Cryptosporidium muris* (Strain RN66) In various laboratory animals. *Parasitol. Res.* 75:218-222.

Karanis, P., Kourenti, C. y Smith, H. (2007). Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J. Water Health.* 5:1–38.

Katanik, M.T., Schneider, S.K., Rosenblatt, J.E., Hall, G.S. y Procop, G.W. (2001). Evaluation of Color PAC *Giardia/Cryptosporidium* rapid assay and ProSpecT *Giardia/Cryptosporidium* microplate assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 39:4523–4525.

Kurniawan, A., Dwintasari, S.W., Connelly, L., Nichols, R.A., Yunihas-tuti, E., Karyadi, T. y Djauzi, S. (2013). *Cryptosporidium* species from human immunodeficiency – infected patients with chronic diarrheain Jakarta, Indonesia. *Ann. Epidemiol.* 23:720–723.

Langkjaer, R.B., Vigre, H., Enemark, H.L. y Maddox-Hyttel, C. (2007). Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology.* 134(3): 339-350.

Lassen, B., Viltrop, A., Raaperi, K y Jarvis, T. (2009). *Eimeria* and *Cryptosporidium* in Estonian dairy farms in regard to age, species, and diarrhoea. *Vet. Parasitol.* 166(3-4):212-219.

Lee, S.U., Joung, M., Nam, T., Park., W.Y., Ji, Y.H. y Yu, J.R. (2011). *Cryptosporidium parvum*: radiation-induced alteration of the oocyst proteome. *Exp. Parasitol.* 127(1):25-30.

Lindsay, D.S., Upton, S.J., Owens, D.S., Morgan, U.M., Mead, J.R. y Blagburn, B.L. (2000). *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47(1):91-95

Maikai, B.V., Umoh, J.U., Kwaga, J.K., Lawal, I.A., Maikai, V.A., Cama, V. y Xiao, L. (2011). Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in native breeds of cattle in Kaduna State, Nigeria. *Vet. Parasitol.* 178(3-4): 241-245.

Masuno, K., Yanai, T., Hirata, A., Yonemaru, K., Sakai, H., Satoh, M., Masegi, T. y Nakai, Y. (2006). Morphological and immunohistochemical features of *Cryptosporidium andersoni* in cattle. *Vet. Pathol.* 43(2):202–207.

Mendonca, C., Almeida, A., Castro, A., Delgado, M.L., Soares, S., Costa, J.M.C., y Canada, N. (2007). Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. *Vet. Parasitol.* 147:47–50.

Mendoza-Delgado, O.O. (2010). Frecuencia de criptosporidiosis en becerras lactantes de la cuenca lechera de Tijuana, Baja California. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, División Regional de Ciencia Animal. Torreón, Coah.

Misic, Z. y Abe, N. (2007). Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from calves on farms around Belgrade, Serbia and Montenegro, using the 60 kDa glycoprotein gene sequences. *Parasitol.* 134:351–358.

Morgan, U.M., Pallant, L., Dwyer, B.W., Forbes, D.A., Rich, G. y Thompson, R.C. (1998). Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human faecal specimens: Clinical trial. *J. Clin. Microbiol.* 36:995–998.

Nussbaum, D.J., Salord, J.R., y Rimmele, D.D. (1999). Evaluation of quantitative latex agglutination for detection of *Cryptosporidium parvum*, *E. Coli* K99, and Rotavirus in calf feces. *J. Vet. Diagnost. Invest.* 11:314-318.

Omoruyi, B.E., Nwodo, U.U., Udem, C.S. y Okonkwo, F.O. (2014). Comparative Diagnostic Techniques for *Cryptosporidium* Infection. *Molecules.* 2674-2683; doi:10.3390/molecules19022674

Ortolani, E.L. y Castro S.P. (2003). Aspectos epidemiológicos de la criptosporidiosis en becerros de rebaños lecheros. *Parasitol. Latinoam.* 58: 122-127.

Plutzer, J. y Karanis, P. (2009). Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Vet. Parasitol.* 165:187–199.

Samie, A., Bessong, P.O., Obi, C.L., Sevilleja, J.E., Stroup, S., Houpt, E. y Guerrant, R.L. (2006). *Cryptosporidium* species: Preliminary descriptions of the prevalence and genotype distribution among school children and hospital patients in the Venda region, Limpopo Province. *South Afr. Exp. Parasitol.* 114:314–322.

Santin, M., Trout, J.M. y Fayer, R. (2008). A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Vet. Parasitol.* 155:15–23.

Santin, M., Trout, J.M. y Fayer, R. (2008). A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Vet. Parasitol.* 155(1-2):15-23.

Satoh, M., Hikosaka, K., Sasaki, T., Suyama, Y., Yanai, T., Ohta, M. y Nakai, Y. (2003). Characteristics of a novel type of bovine *Cryptosporidium andersoni*. *Appl. Envir. Microbiol.* 69:691-692.

Shing, I., Carville, A. y Tzipori, S. (2011). Cryptosporidiosis in *Rhesus Macaques* challenged during acute and chronic phases of SIV infection. 27:DOI:10.1089/aid.2010.0229.

Shrestha, R.D., Grinberg, A., Dukkipati, V.S.R., Pleydell, E.J., Prattley, D.J. y Frencha, N.P. (2014). Infections with multiple *Cryptosporidium* species and new genetic variants in young dairy calves on a farm located within a drinking water catchment area in New Zealand. *Vet. Parasitol.* 202:287–291.

Singh, B.B., Sharma, R., Kumar, H., Banga, H.S., Aulakh, R.S., Gill, J.P. y Sharma, J.K. (2006). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in Punjab (India) and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Vet. Parasitol.* 140(1-2):162-165.

Silverlas, C., Bosaeus-Reineck, H., Naslund, K. y Bjorkman, C. (2013). Is there a need for improved *Cryptosporidium* diagnostics in Swedish calves? *Internal. J. Parasitol.* 43:155–161.

Šlapeta, J. (2013). Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow? *Int. J. Parasitol.* 43:957–970.

Šlapeta, J. (2011). Naming of *Cryptosporidium pestis* is in accordance with the ICZN Code and the name is available for this taxon previously recognized as *C. parvum* 'bovine genotype'. *Vet. Parasitol.* 177(1-2):1-5.

Smith, H.V., Nichols, R.A.B., Mallon, M., Macleod, A., Tait, A., Reilly, W.J., Browning, L.M., Gray, D., Reid, S.W.J. y Wastling, J.M. (2005). Natural *Cryptosporidium hominis* infections in Scottish cattle. *Vet. Rec.* 156:710-711.

Sulaiman, I.M., Morgan, U.M., Thompson, R.C.A., Lal, A.A. y Xiao, L.H. (2000). Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2385–2391.

Trotz-Williams, L.A., Jarvie, B.D., Martin, S.W., Leslie, K.E. y Peregrine, A.S. (2005). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in southwestern Ontario and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Can. Vet. J.* 46(4): 349-351.

Trujillo-Guerrero, D.A. (2011). Frecuencia de criptosporidiosis en becerras lactantes de la cuenca lechera de Delicias, Chihuahua. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, División Regional de Ciencia Animal. Torreón, Coah.

Tumwine, J.K., Kekitiinwa, A., Nabukeera, N., Akiyoshi, D.E., Rich, S.M., Widmer, G., Feng, X. y Tzipori, S. (2003). *Cryptosporidium parvum* in children with diarrhoea in Mulago Hospital, Kampala, Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68:710–715.

Tzipori, S. y Griffiths, J. (1998). Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. *Adv. Parasitol.* 40:5-36.

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

Wang, R., Zhang, X., Zhu, H., Zhang, L., Feng, Y., Jian, F., Ning, C., Qi, M., Zhou, Y., Fu, K., Wang, Y., Sun, Y., Wang, Q. y Xiao, L. (2011b). Genetic characterizations of *Cryptosporidium* spp and *Giardia duodenalis* in humans in Henan, China. *Exp. Parasitol.* 127(1):42-45.

Weber, R.R.T., Bryan, H.S., Bishop, S.P., Wahlquist, J.J., Sullivan, D.D. (1991). Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. *J. Clin. Microbiol.* 29:1323–1327.

Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U. y Upton, S. (2004). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:72–97.

Xiao, L. (2010). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp. Parasitol.* 124:80–89.

Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, L., Gilman, R. y Lal, A. (2001). Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J. Infect. Dis.* 183:492–497.

Xiao, L. y Feng, Y. (2008). Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immuno. Med. Microbiol.* 52:309–323.