

DEDICATORIA

A JEHOVÁ

Jesús mi fiel amigo mi dulce caminar, quédate conmigo no quiero volver atrás, mi corazón puede sentir tu presencia, tu estas aquí; por haber llenado mi vida de bendiciones renovándome como ríos de agua viva gracias Dios.

A MIS PADRES

Sr. Telesforo Barona Orduño y Sra. María Sánchez López por darme su amor y su apoyo incondicional durante toda mi vida, por haberme inculcado principios y fe a Dios, enseñándome que el trabajo nos hace una persona de bien.

A MIS HERMANOS

José Genaro Barona Sánchez y Abraham Barona Sánchez por su amor y cariño, por tener la dicha de tenerlos como hermanos apoyándonos mutuamente, para lograr nuestras metas y sueños.

A MIS AMIGAS (OS)

Raquel Jiménez, Martha Castañeda, Salvador Sánchez, Eleazar Sánchez por su cariño, amor y apoyo incondicional que me ha brindado todo este tiempo.

A MIS COMPAÑEROS

De mi generación por los grandes momentos que hemos pasado durante estos cinco años y por que cada uno logre sus metas y sueños en la vida gracias.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por haberme brindado mi formación académica y mi estancia durante estos cinco años. Al Dpto. de laboratorio de parasitología de la Unidad de Diagnóstico por realizar las pruebas de análisis para mi tesis.

A mis Asesores M.C.V. Ramón Alfredo Delgado González y M.V.Z. José Guadalupe Rodríguez Martínez por su incondicional apoyo y asesoría que me brindaron, antes y después para la realización de esta tesis.

A mis sinodales: M.V.Z. Jorge Iturbide Ramírez, M.C. Ernesto Martínez Aranda, por brindarme sus enseñanzas durante esto cinco años.

INDICE

	Página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iiiiii
RESUMEN	iii
1.0 INTRODUCCIÓN	1
2.0 JUSTIFICACIÓN	2
3.0 OBJETIVOS	4
4.0 HIPOTESIS	5
5.0 REVISIÓN DE LA LITERATURA	6
5.1 HISTORIA	6
5.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	7
5.3 MORFOLOGÍA	8
5.4 CICLO BIOLÓGICO	9
5.5 EPIDEMIOLOGÍA	11
5.6 SIGNOS Y LESIONES	14
5.7 DIAGNÓSTICO	16
5.8 TRATAMIENTO	17
6.0 MATERIALES Y MÉTODOS	18
7.0 RESULTADOS	20
8.0 DISCUSIÓN	22
9.0 LITERATURA CITADA	24

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1 Clasificación taxonómica de <i>Cryptosporidium</i> spp	7
Cuadro 2 Estatus de <i>Cryptosporidium</i> con relación al Phylum Apicomplexa	8

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema del ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> spp.	11
Figura 2. Transmisión de <i>Cryptosporidium parvum</i> entre los mamíferos.	14
Figura 3. Porcentajes de excreción de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp y grados de intensidad de eliminación, en animales clínicamente enfermos.	20
Figura 4. Intensidad de eliminación de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp en cabritos clínicamente enfermos con diarrea, de 0 a 15 y 16 a 30 días de edad.	21
Figura 5. Intensidad de eliminación de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp en cabritos y corderos clínicamente sanos (sin diarrea), de 0 a 15 y 16 a 30 días de edad.	21

RESUMEN

Se realizó un estudio con la finalidad de conocer la frecuencia de *Cryptosporidium* spp., en hatos de ovinos y caprinos de la Comarca Lagunera, y determinar la especie más susceptible a la infección entre estas dos especies. Se tomaron 40 muestras de heces de cabritos y corderos de 2 hatos y se dividieron en 4 grupos de corderos y 4 de cabritos de 0 a 15 y de 16 a 30 días de edad. Dos grupos de corderos y dos grupos de cabritos presentaron diarrea, el resto estaban aparentemente sanos. Las muestras de heces fueron procesadas con la técnica de Ziehl Neelsen modificada y se analizó la intensidad de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* en heces. El 20% de los animales con diarrea presentó eliminación de ooquistes. El 50% reveló un grado de eliminación incipiente, mientras que el 15 %, el 5% y el 10% restante mostraron un grado leve, moderado y severo respectivamente. En el 100 % de los animales clínicamente sanos no se observó eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Los corderos clínicamente enfermos con diarrea, de 0 a 15 días de edad no manifestaron eliminación de ooquistes, mientras que los de 16 a 30 días de edad sí manifestaron la eliminación de ooquistes con grados de intensidad que fueron desde incipiente hasta severo. En cabritos, con edades de 0 a 15 y 16 a 30 días de nacidos, todos mostraron eliminación de ooquistes con grados de intensidad desde incipiente hasta severo.

1.0 INTRODUCCIÓN

Siendo especies que se identifican con una ancestral tradición ganadera en prácticamente todos los rincones de México, los caprinos y ovinos se presentan en la actualidad tanto como elementos amortiguadores del bienestar social de quienes los poseen, así como partícipes en el cambio tecnológico pecuario a través de los altos niveles de eficiencia productiva que se pueden alcanzar con ellos ⁽²²⁾. No obstante, en la República Mexicana son una de las especies más descuidadas en todos sus aspectos. Poco o nada se controlan sus cruzamientos en una forma adecuada; no se les procura las instalaciones apropiadas para su explotación; en el aspecto sanitario no se efectúan las medidas profilácticas necesarias para la conservación de la salud de los animales y menos aún, se proporciona no solamente la cantidad sino la calidad de nutrientes, factores que son de vital importancia para la prosperidad de una explotación animal ⁽²⁰⁾. Además, las enfermedades representan una importante causa de pérdidas económicas de una explotación y estas pueden ser de origen bacteriano, viral, parasitario (interno y/o externo), por problemas en el manejo general o alimenticio ⁽³⁰⁾. Dentro de las enfermedades que limitan a las explotaciones tanto ovinas como caprinas esta la criptosporidiosis. La criptosporidiosis, es una infección causada por un parásito protozoario intracelular conocido como *Cryptosporidium parvum*, causa diarrea en mamíferos, dentro de los cuales se incluye al ganado, corderos y humanos. El *Cryptosporidium parvum*, ha sido aislado mas frecuentemente en animales jóvenes y en humanos inmunosuprimidos, especialmente en pacientes con SIDA ⁽¹³⁾.

Recientemente la asociación del *Cryptosporidium* como causa de diarrea en ganado, ovinos, equinos y humanos ha estimulado el interés por este parásito ⁽⁹⁾.

2.0 JUSTIFICACIÓN

El protozooario *Cryptosporidium* (Familia *Cryptosporidiidae*) descrito por primera vez por Tyzzer en 1907. Fue nombrado inicialmente como *Cryptosporidium muris*. Tiempo después, un segundo *Cryptosporidium* fue encontrado en el intestino de un ratón de laboratorio, *Cryptosporidium parvum*; desde entonces han sido identificados al menos 20 diferentes hospederos incluyendo mamíferos, aves y reptiles ^(14, 39). La infección con *Cryptosporidium parvum* causa una enteritis aguda autolimitante en hospederos inmunocompetentes, en inmunocomprometidos, la criptosporidiosis puede ser crónica y amenazar la vida ⁽²¹⁾. La criptosporidiosis ha sido descrita en numerosos hospedadores vertebrados, aunque afecta fundamentalmente a los rumiantes y al hombre. En estos, la especie de mayor interés es *C. parvum*, que infecta las células epiteliales del intestino delgado y tiene además importancia desde el punto de vista sanitario, puesto que debido a su escasa especificidad puede transmitirse al hombre a partir de los animales ⁽²⁹⁾. El *Cryptosporidium* es reconocido en todo el mundo como un importante patógeno causante de enfermedades diarreicas en humanos y animales ⁽³³⁾. La diarrea, sin embargo, ocurre solamente en corderos, lechones y becerros. En los corderos los más severamente afectados son aquellos con menos de 5 días post-inoculación. En aquellos que presentaron diarrea, ocurrió la muerte,

posiblemente por la asociación con otros patógenos o por la privación de calostro ⁽³⁹⁾.

Estudios previos en ovinos realizados en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, coinciden con diversos autores en el sentido de que los corderos con edades que van de 0 a 15 días después del nacimiento son los más susceptibles a la criptosporidiosis. Sin embargo, no se han realizado estudios similares en caprinos, en los cuales la literatura marca a este enteropatógeno como no importante en la especie caprina ⁽¹⁵⁾. De igual forma, no existe un estudio comparativo entre ovinos y caprinos en donde se determine la susceptibilidad a la infección por *Cryptosporidium* entre estas especies.

De acuerdo con estos antecedentes y considerando que no hay estudios de criptosporidiosis en caprinos de la Comarca Lagunera, además de que no existen estudios comparativos entre ovinos y caprinos sobre la susceptibilidad a la criptosporidiosis, se pretende realizar el presente trabajo.

3.0 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

3.1.1 Determinar la frecuencia de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp, en hatos de ovinos y caprinos de la Comarca Lagunera.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

3.2.1 Determinar la frecuencia de *Cryptosporidium* spp, en ovinos y caprinos en diferentes grupos etarios.

3.2.2. Determinar la intensidad de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp, en ovinos y caprinos.

3.2.3. Determinar la susceptibilidad de especie de ovinos y caprinos a la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

4.0 HIPOTESIS

Los ovinos son más susceptibles que los caprinos a la infección por *Cryptosporidium* spp.

Si los ovinos son más susceptibles que los caprinos,

Entonces,

La intensidad de excreción de ooquistes de este parásito es mayor en los primeros 15 días de vida de los ovinos.

5.0 REVISION DE LA LITERATURA

5.1 HISTORIA

El *Cryptosporidium* es una coccidia que pertenece al *Phylum* Apicomplexa. El género *Cryptosporidium* comprende parásitos protozoarios coccidianos que crecen y se reproducen dentro de la células epiteliales de los órganos digestivos y el tracto respiratorio de los vertebrados⁽¹⁴⁾. La primer especie de este género, la cual fue encontrada afectando a las glándulas gástricas de un ratón, fue descrita por Ernest Edward Tyzzer en 1907 y fue nombrada *Cryptosporidium muris*. *C. parvum*, una segunda especie que se encontró en el intestino delgado de un ratón, fue reconocida cuatro años después. Una lista de 20 especies han sido nombradas desde entonces ^(14, 24, 42). Usualmente han sido nombradas de acuerdo al hospedero del cual han sido aislados, e infecta a hospederos tales como: peces, víboras, aves, ratones, ratas, perros, gatos, ardillas, venados, caballos, cerdos, ovejas, vacas y otros ^(14, 37). Algunas especies (por ejemplo, ratas, ratones, cuyos) aparentemente asintomáticos tienen resistencia innata a esta infecciones, mientras que otros (por ejemplo, rumiantes) son, como los humanos, susceptibles a la enfermedad ⁽³⁷⁾. Las infecciones ocurren predominantemente en animales muy jóvenes

(neonatos), solamente los humanos parecen ser susceptibles en cualquier periodo de vida ^(6, 14).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Cryptosporidium* spp^(6, 14, 37).

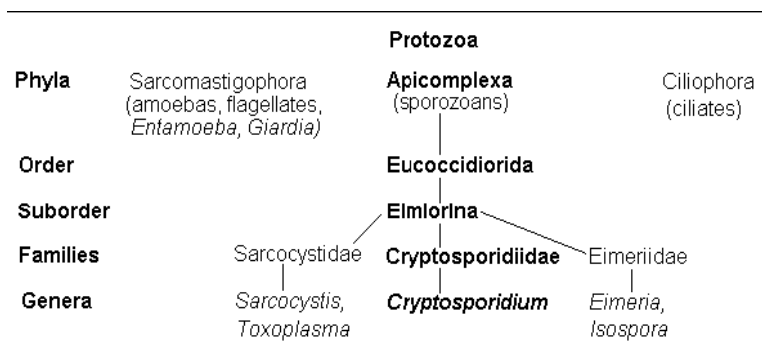
Clasificación	Nombre	Características biológicas
Phylum	<i>Apicomplexa</i>	Complejo polar con anillos polares, roptrias, micronemas, conoides y microtúbulos subpeliculares.
Clase	<i>Sporozoasida</i>	Movilidad de organismos maduros por flexión corporal, deslizamiento y ondulación
Subclase	<i>Coccidiasina</i>	Ciclo de vida con merogonia, gametogonia y esporogonia.
Orden	<i>Eucoccidiorida</i>	Merogonia presente en vertebrados
Suborden	<i>Eimeriorina</i>	Gametos machos y hembras se desarrollan independientemente
Familia	<i>Cryptosporidiidae</i>	Monoxeno con desarrollo debajo de la superficie de la membrana de la célula hospedadora; ooquistes fuera de los esporoquistes y con cuatro esporoquistes; microgametos con flagelo.

5.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Dentro de las especies reconocidas actualmente están incluidas *C. andersoni* (ganado), *C. baileyi* (pollos y algunas otras aves), *C. canis* (perros), *C. felis* (gatos), *C. galli* (aves), *C. hominis* (humanos), *C. meleagridis* (aves y humanos), *C. molnari* (peces), *C. muris* (roedores y algunos otros mamíferos), *C. parvum* (rumiantes y humanos), *C. wrairi* (cuyos), *C. saurophilum* (lagartijas

y víboras), y *C. serpentis* (víboras y lagartijas). Otros distintos *Cryptosporidium* spp., han sido encontrados en peces, reptiles, aves y mamíferos, pero no han sido nombrados ⁽²³⁾. El *Cryptosporidium molnari* fue aislado de un cultivo de róbalo marino y besugo marino. La transmisión homóloga y transmisión cruzada han sido recientemente demostradas bajo condiciones experimentales ⁽¹⁾. *C. wrairi* fue el primero descrito en cerdos ⁽⁸⁾.

Cuadro 2. Estatus de *Cryptosporidium* con relación al Phylum Apicomplexa ⁽⁶⁾.



5.3 MORFOLOGÍA

Aun cuando los ooquistes de algunos *Cryptosporidium spp* son morfológicamente similares, las medidas morfométricas de ooquistes pueden jugar un papel importante en la diferenciación de algunos *Cryptosporidium spp*. Por ejemplo, las especies establecidas de aves y reptiles pueden fácilmente ser diferenciadas basándose en el tamaño y formas de las partes de los ooquistes. Incluso entre el intestino de especies de mamíferos son significantes las diferencias entre su morfometría ⁽⁴²⁾.

Los rangos de medidas van de 4.5 a 5.4 por 4.2 a 5.0 mm (promedio, 5.0 a 4.5 mm) y 6.6 a 7.9 por 5.3 a 6.5 (promedio, 7.4 a 5.6 mm) para *C. parvum* y *C. muris*, respectivamente. No obstante, estos valores pueden variar, y dependen si el ooquistes ha sido procesado o si no ha sido fijado ⁽²⁴⁾.

Los ooquistes contienen 4 esporozoitos, estos son móviles, con tamaños de 5 X 1mm los cuales se adhieren e invaden las células epiteliales del tracto gastrointestinal. El proceso de invasión está ligado a la descarga de moléculas por los organuelos del parásito (roptrias, micronemas, y cuerpo denso) ubicados en la porción apical final del esporozoito ⁽⁴³⁾.

5.4 CICLO BIOLÓGICO

El ciclo de vida es directo y monoxeno y sigue los patrones descritos para otras coccidias, comprende tres fases que tienen lugar en el tracto digestivo del mismo hospedador (esquizogonia, gametogonia y esporogonia) y sigue el patrón de otros coccidios entéricos, si bien presenta una serie de características diferenciales, tales como la escasa especificidad de hospedador, resistencia a fármacos, capacidad de autoinfección y la curiosa localización que ocupa el parásito en la célula hospedadora. La infección tiene lugar cuando los animales ingieren los ooquistes esporulados, que se desenquistan en el tracto digestivo permitiendo la salida de cuatro esporozoitos a través de una sutura de la pared. Los esporozoitos libres alcanzan las microvellosidades del intestino delgado y se integran en una invaginación en forma de dedo de guante de una célula epitelial para formar la vacuola parasitófora, en cuyo interior el parásito se redondea transformándose en un trofozoíto. A diferencia de otros coccidios, la vacuola parasitófora se localiza en

posición intracelular pero extracitoplasmática, aspecto que según algunos autores puede influir en la escasa eficacia de los fármacos antimicrobianos para inhibir el desarrollo del parásito. La reproducción asexual del parásito se produce mediante dos fases de esquizogonia, en el curso de las cuales se forman dos tipos de esquizontes en el interior de las células parasitadas. Los esquizontes de primera generación dan lugar a la formación de 6-8 merozoítos tipo I, que se liberan a la luz intestinal tras la ruptura de la vacuola parasitófora y penetran en las células adyacentes, dando lugar a la formación de un nuevo esquizonte tipo I o más frecuentemente a esquizontes de segunda generación, de cada uno de los cuales se liberan 4 merozoítos tipo II tras la ruptura de la célula hospedadora. La reproducción sexual o gametogonia se inicia cuando estos últimos parasitan nuevas células; la mayoría de merozoítos tipo II da lugar a la formación de gametos femeninos o macrogametos y unos pocos se transforman en microgametos. En el interior de estos últimos se forman 16 microgametos carentes de flagelo, que se liberan de la vacuola parasitófora y se introducen en células parasitadas por macrogametos, donde tiene lugar la fecundación. La formación del cigoto va seguida por la secreción de una o dos cubiertas que lo envuelven y dan lugar al ooquiste. La esporogonia se produce en el interior de la célula hospedadora y tiene como consecuencia la formación de 4 esporozoítos alargados y un cuerpo residual. Los ooquistes, de forma ovoide y pequeño tamaño (5 x 4,5 µm) son las formas de resistencia que se eliminan con las heces de los animales parasitados y al igual que en otros coccidios, son los estadios de mayor importancia para la dispersión, supervivencia e infectividad del parásito, así como para su detección e identificación. Se estima que aproximadamente un 80% de los ooquistes que

se forman tienen una pared gruesa (doble cubierta) y cuando se eliminan con las heces son directamente infectantes para otros animales. Los ooquistes restantes (20%) poseen una pared fina (una unidad de membrana) que se rompe tras su salida de la célula hospedadora, permitiendo la liberación de los esporozoitos que invaden nuevas células epiteliales. Este fenómeno, conocido como autoinfección, no se produce en la mayoría de los coccidios y se considera responsable de la persistencia de las infecciones por *Cryptosporidium* en ausencia de reinfección exógena y de una respuesta inmune protectora. El periodo de prepatencia oscila entre 2 y 7 días en corderos y en torno a 4 días en cabritos, aunque puede ser superior cuando la dosis infectante es baja o conforme se incrementa la edad del animal en el momento de la primoinfección. La dosis infectante media se ha estimado en tan sólo cinco ooquistes ^(15, 29).

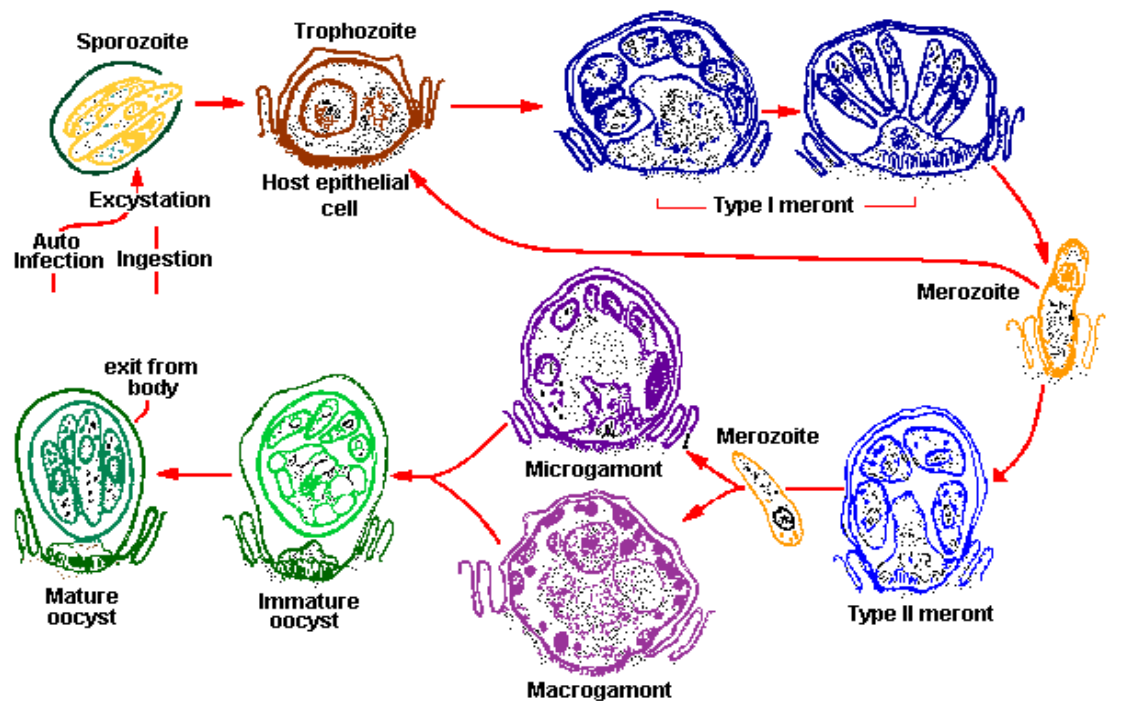


Figura 1. Esquema del ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. El esporozoquiste se desenquista y entra en las microvellosidades de las células epiteliales donde se diferencia en trofozoitos. Los trofozoitos se multiplican y forman merontes tipo I. Los merozoitos tipo I, producto de los merontes tipo I, dan origen a los merontes tipo II. El merozoito tipo II abandona al meronte tipo II para formar micro y macrogametos.

El microgameto fertiliza al macrogameto el cual se desarrolla en ooquiste. El ooquiste esporulado puede autoinfectar al huésped o ser vertido en las heces ^(6, 14).

5.5 EPIDEMIOLOGIA

La transmisión es vía fecal oral, puede ocurrir de persona a persona, animal a persona y a través de la transmisión ambiental y ocurre cuando los ooquistes que se encuentran en comida, agua o en el ambiente son ingeridos ^(21, 26, 34, 40). La importancia del agua contaminada con *Cryptosporidium* fue reconocida hace 12 años atrás; y al menos 50 epidemias de criptosporidiosis se tienen documentadas. Los ooquistes de *C. parvum* son resistentes a la desinfección del agua ^(7, 18). La fauna Silvestre y las aguas negras han sido implicadas en la contaminación de vertientes acuícolas, poblaciones humanas y animales, sin embargo, se cree que los animales de granja son uno de los mayores contribuidores. Los borregos, caballos y cerdos, los cuales son susceptibles a la infección de *C. parvum* actúan como diseminadores de ooquistes; sin embargo, los bovinos de carne y leche son considerados de gran riesgo por el número, distribución, incidencia de infección y altos niveles de excreción de ooquistes ^(10, 32).

Recientemente, ha sido estimado que cerca del 90% de los rebaños de ganado lechero en los Estados Unidos están infectados con *C. parvum* y el 92% de las vacas adultas son asintomáticas y tienen anticuerpos específicos a *C. parvum* (IgG, IgG1, IgG2, e IgM). En Europa (Polonia y Portugal), cerca de 40% del ganado con diarrea está infectado ^(3, 11, 16).

A pesar de que la criptosporidiosis es principalmente confinada a individuos jóvenes, bajos niveles de infecciones asintomáticas en ganado post-

destete y adulto han sido reportados, con arriba de 104 ooquistes por gramo de heces excretadas (OPG). Además, las ovejas peri-parturientas pueden incrementar la excreción pero bajar la concentración de ooquistes de (100 a 5,700 ooquistes g^{-1})⁽¹¹⁾. En los corderos, el número medio de ooquistes excretados durante el pico de infección puede ser de alrededor de 2×10^9 y el total de ooquistes puede ser tan elevado como 2×10^{10} . Se ha postulado que los rumiantes adultos asintomáticos (vacas y ovejas) pueden ser una fuente de infección para los neonatos y que existe el riesgo de que peri-parturientas sanas sirvan como transportadoras del parásito ⁽²⁷⁾.

Los terneros neonatos son particularmente susceptibles a la infección y puede excretar de 30 mil millones de ooquistes o más, en un periodo de 1 a 2 semanas. Se ha determinado que de 7,369 terneros de 1,103 granjas de ganado lechero localizadas en 28 estados, más del 50% de los terneros con al menos dos semanas y el 22.4% del total de los terneros (con edades, de 1 a 17 semanas) eran positivas al *C. parvum*. Estos autores concluyeron que habitualmente todas las manadas con más de 100 vacas están infectadas con *C. parvum*. Los datos sugieren que las vacas adultas también puedan verter ooquistes. Se ha encontrado que en excremento de vacas adultas aparentemente sanas 18,000 ooquistes por gramo de excremento. Basado en un volumen medio de 900 ooquistes por gramo de excremento y una excreción total de 40 kg de excremento por la vaca por día, un solo adulto bovino podría excretar potencialmente más de 36 millones de ooquistes por día ⁽³²⁾.

Sin embargo, existe alguna discordancia debido a la importancia relativa que el ganado adulto tiene con la cantidad significativa de ooquistes *C. parvum* vertido las aguas. Existe una gran cantidad de informes sobre las deposiciones

fecales de *C. parvum* en particular, por el ganado carne y de leche. Varias investigaciones indican que las deposiciones fecales del ganado clínicamente sano esta entre ~20 a ~70%, en estudios epidemiológicos seccionados cruzados se han observado prevalencias de 2% o menos en el ganado adulto asintomático ⁽²⁾.

Las moscas son reconocidas como hospederos transportadores de una variedad de parásitos de importancia en la salud pública y veterinaria. Ha sido intensamente discutida la relación de las moscas como vector mecánico en la diseminación de ooquistes de *C. parvum* en el medio ambiente y la relación en la epidemiología de la criptosporidiosis. Bajo condiciones de laboratorio las mosca casera (*Musca domestica*) transporta mecánicamente a los ooquistes de *C. parvum* y observaciones preliminares de esta muestras que puede ocurrir en situación natural ⁽³⁵⁾. La implicación en la transmisión mecánica de *C. parvum* en escenarios experimentales ha sido recientemente reportado, estas, junto con la basura son reconocidos hospedadores de una variedad de parásitos de salud pública e importancia veterinaria (*Sarcocystis* spp., *Toxoplasma gondii*, *Isospora* spp., y *Eimeria tenella*), pero no se sabe si moscas de la vida silvestre pueden llevar este patógeno. Datos moleculares demostraron que *C. parvum* puede ser transportado por moscas por al menos 3 semanas después de la eliminación de la fuente de contaminación ⁽³⁶⁾.

Los roedores pueden conseguir altas densidades de poblaciones los cuales en combinación con relativa alta prevaecía de diseminación fecal de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* puede resultar en una significativa carga ambiental para este parasito ⁽¹²⁾.

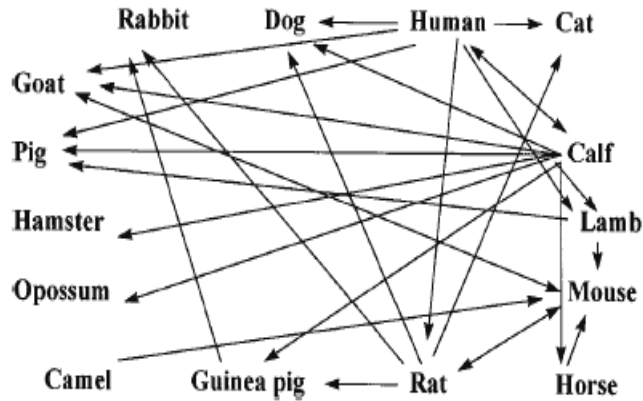


Figura 2. Transmisión de *Cryptosporidium parvum* entre los mamíferos. La dirección indica la ruta de infección ⁽²⁸⁾.

5.6 SIGNOS Y LESIONES

La diarrea neonatal es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en rumiantes jóvenes, el *Cryptosporidium* es considerado como uno de los principales agentes causales de diarrea en esta edad ⁽²⁷⁾. Experimentalmente la infección en corderos con *Cryptosporidium sp.*, aislado de ganado induce diarrea intermitente, culminando en muerte de corderos infectados al parto y el retardo del crecimiento en corderos maduros ⁽³⁸⁾. El proceso diarreico es agudo autolimitante en individuos inmunocompetentes con una duración aproximada de dos semanas y una patología crónica en pacientes inmunodeprimidos, no autolimitada y con diseminación del parásito en localizaciones extra-intestinales ⁽¹⁷⁾. Un reciente estudio en ovejas revela una prevalencia de 51.8% por rebaño y una individual de 12.2%. La infección es más frecuentemente en las dos primeras semanas de vida y decrece marcadamente en la severidad de los síntomas conforme la edad aumenta. En ovejas, la eliminación de ooquistes por portadoras asintomáticas pueden

explicar el mantenimiento de la infección por *C. parvum* entre el periodo de nacimiento de los corderos ⁽²⁷⁾.

Las diarreas causadas por criptosporidios son de tipo secretoria y de mala absorción. Producidas por una destrucción parcial de las mucosas, las cuales elevan los niveles de prostaglandinas E2 y prostaciclina, la que posteriormente activan las neuronas secreto motoras entéricas ⁽¹⁹⁾. La infección de las células epiteliales *in vitro* resulta en la separación y liberación apical de enzimas citolíticas como la lactato deshidrogenasa, pero la naturaleza exacta de este efecto citopático es pobremente entendido ⁽²⁵⁾.

En los corderos, cerdos y becerros el cambio histológico más consistente en la mucosa intestinal fue la congestión, la atrofia de las vellosidades va de moderado a severo en el área afectada, además de la fusión de los vellos y el reemplazo de los enterocitos columnares por células cuboidales, con infiltración de neutrófilos ⁽³⁹⁾.

La infección en becerros jóvenes, va acompañado de letargia, disminución del consumo de alimento, fiebre, deshidratación, y/o pobre condición. De igual forma, el *C. muris* que reportado en ganado adulto crónicamente infectado, no cursan con diarrea, a pesar de esto, estos excretan ooquistes por varios meses. La producción de leche y usualmente la ganancia de peso fueron significativamente reducidas en el ganado infectado con *Cryptosporidium muris* ⁽²⁴⁾. El *Cryptosporidium*, es comúnmente encontrado en el intestino delgado, pero también han sido infectados la parte inicial del yeyuno (corderos, cerdos, polluelos), el ciego y colon (corderos y cerdos). Las ratas, ratones, cobayos y polluelos no desarrollan diarrea ni ningún otro signo obvio de la enfermedad. La infección y la eliminación de los ooquistes en las heces

perduran durante largo periodo en ratas lactantes más que en otras especies (39).

5.7 DIAGNÓSTICO

El *C. parvum* puede ser diagnosticado por la técnica de flotación en sucrosa o sulfato de zinc. La inmunofluorescencia puede ser usada para identificar al parasito en heces. La criptosporidiosis pulmonar y o traqueal es diagnosticada por una biopsia; la intestinal es ocasionalmente diagnosticada por varios métodos (5).

El aislamiento con técnicas como la morfometría son poco fiables, esto hace necesario el uso de técnicas más depuradas y específicas para la identificación de especies (17).

Un incremento del número de reportes indican que varios parámetros medioambientales que pueden afectar la supervivencia de los ooquistes en agua, por ejemplo, temperatura extrema, pH, desecación y exposición al amonio (41).

Estudios previos han demostrado una elevada concentración de *C. parvum* en superficies de aguas después de periodos de fuerte lluvia o durante eventos de elevados flujo (31).

Las técnicas para la concentración y purificación de los ooquistes para muestras fecales incluyen concentración éter-formol, sucrosa densa, sulfato de zinc, y solución salina saturada y por densidad del gradiente discontinuo de centrifugación (5).

5.8 TRATAMIENTO

La falta de un adecuado tratamiento de este parásito y los pocos agentes que han demostrado eficacia sugieren que la profilaxis podría ser el mejor método de control para este parásito. La actividad de varios agentes en *in vivo e in vitro* (la espiramicina, el lactato de halofuginona, la eflornitina, la sinefungina, y la paromomicina) han sido probados con resultados prometedores, así como el calostro hiperinmune bovino ⁽⁴⁾. Muchos compuestos han sido evaluados en su potencial terapéutico para prevenir criptosporidiosis en vacas pero con resultados limitados. Sin embargo, muy recientemente, la halofuginona, una quinazolinona sintética, ha mostrado tener actividad contra *C. parvum*. Además, trabajos en Holanda han indicado que el lactato halofuginona es efectivo para reducir y retrasar la eliminación de ooquistes de *C. parvum* y prevenir la diarrea. El lactato de halofuginona es administrado por vía oral en becerros recién nacidos en los primeros 7 días de vida. La halofuginona es un agente antiprotozoal que es principalmente activo contra los estados libres (esporozoito, merozoito) del parásito. La morbilidad es elevada en esta enfermedad pero la mortalidad es generalmente baja. Sin embargo, los terneros necesitan cuidado intensivo, deben alojarse en un ambiente limpio, caliente y seco. Necesitan terapia fluida para prevenir la enorme deshidratación así como los electrolitos para reemplazar la pérdida de estos por la diarrea. También necesitan apoyo nutritivo que proporcione energía. Un reciente estudio no mostró el beneficio clínico al administrar el decoquinato como un tratamiento preventivo para la criptosporidiosis ⁽²⁹⁾.

6.0 MATERIAL Y MÉTODOS

Marco de referencia: La Comarca Lagunera está localizada en la parte central de la porción norte de los Estados Unidos Mexicanos, ubicada en los meridianos de 102° 22' y 104° 47' WdG longitud Oeste, y los paralelos 24° 22' y 26° 23' latitud Norte, la altura media sobre el nivel del mar es de 1139 metros. Esta formada por parte de los Estados de Coahuila y Durango y debe su nombre a los cuerpos de agua que se formaban alimentados por los ríos Nazas y Aguanaval. Está integrada por 16 municipios, 11 del Estado de Durango y 5 del Estado de Coahuila.

Estudio de campo: Se recolectaron 40 muestras de heces de cabritos y corderos de 2 hatos que de la Comarca Lagunera. Los animales muestreados se dividieron en 8 grupos (de los cuales 4 grupos incluyeron corderos y 4 a cabritos) los animales muestreados presentaron edades de 0 a 15 y de 16 a 30 días de nacidos. Dos grupos de corderos mostraron diarrea durante el muestreo (uno de 0 a 15 y otro de 16 a 30 días de nacidos) y dos grupos estuvieron aparentemente sanos (uno de 0 a 15 y otro de 16 a 30 días de nacidos). La distribución de los grupos de cabritos se realizó de forma similar. Las muestras se obtuvieron directamente del recto de los animales, se almacenaron y se transportaron en refrigeración hasta su procesamiento.

Análisis de laboratorio. Posteriormente las muestras de heces fueron procesadas en el laboratorio de parasitología de la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, Unidad Laguna, con la técnica de Ziehl Neelsen modificada para determinar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

Se realizaron los frotis en portaobjetos con las heces obtenidas y se dejaron secar al aire, se enjuagaron con agua, para posteriormente teñirlas.

Los pasos para la tinción fueron los siguientes: se sumergieron por 30 minutos en Carbol Fucsina, posteriormente en agua corriente hasta quitar el exceso de colorante, se decoloraron en alcohol ácido al 1% (alcohol al 70% al 1% de ácido clorhídrico) hasta obtener un color rosa en la tinción, se procedió a sumergir en agua corriente para quitar residuos del alcohol y ácido, así como el exceso del colorante, se realizó contra-tinción con azul de metileno por 5 minutos, después se lavó con agua corriente hasta quitar excedente de colorante. Las muestras teñidas se cubrieron con cubreobjetos, utilizando resina sintética para observarlas e interpretarlas con un microscopio fotónico.

La interpretación se realizó por medio de observación directa con un microscopio fotónico, observando los ooquistes de color rojo brillante sobre un fondo azul. Para medir la intensidad de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* en heces se utilizó el siguiente criterio: (-) Ausencia de ooquistes; (+) 1 a 4 ooquistes; (++) 5 a 20 ooquistes; (+++) 21 a 80 ooquistes; (++++) mas de 81 ooquistes. Se observaron con el objetivo 40X, se contabilizaron 50 campos ópticos antes de considerar un caso negativo. La intensidad de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* se interpretó de acuerdo al siguiente criterio:

INTENSIDAD DE EXCRECIÓN	GRADO
(-)	Negativo
Grado 1 (+)	Incipiente
Grado 2 (++)	Leve
Grado 3 (+++)	Moderado
Grado 4 (++++)	Severo

7.0 RESULTADOS

Los resultados muestran que del 100% de los animales clínicamente enfermos, el 20% de estos no manifestó eliminación de ooquistes. El 50% reveló un grado de eliminación incipiente, mientras que el 15 %, el 5% y el 10% restante mostraron un grado leve, moderado y severo respectivamente.

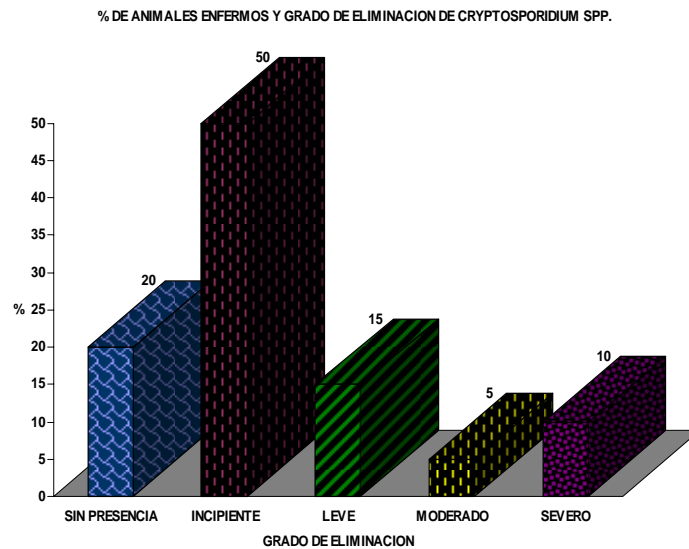


Figura 3. Porcentajes de excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., y grados de intensidad de eliminación, en animales clínicamente enfermos. Sin ooquistes (0), incipiente (1), leve (2), moderado (3), severo (4) respectivamente, El mayor porcentaje manifestó un grado de eliminación incipiente (50%), solo un 10% mostró intensidad severa.

Ninguno de los animales clínicamente sanos (sin presencia de diarrea) manifestó la eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

Mientras que en los clínicamente enfermos (con presencia de diarrea), solo los corderos de 0 a 15 días de nacidos no manifestaron la eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

Mientras el grupo de corderos (16 a 30 días de nacidos) y cabritos (0 a 15 y 16 a 30) manifestaron la eliminación de ooquistes con grados de intensidad que fueron desde incipiente hasta severo (de grado 1 a 4).

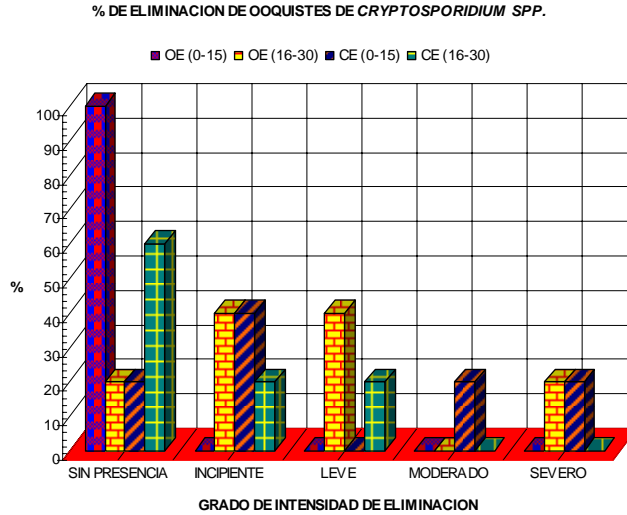


Figura 4. Intensidad de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium spp*, en cabritos clínicamente enfermos con diarrea, de 0 a 15 y 16 a 30 días de edad. El 100% de los corderos de 0 a 15 días de edad, no manifestaron eliminación de ooquistes, mientras corderos (0 a 15) y cabritos (0 a 15 y 16 a 30 días de nacidos), presentaron una intensidad de eliminación que va desde incipiente a severo.

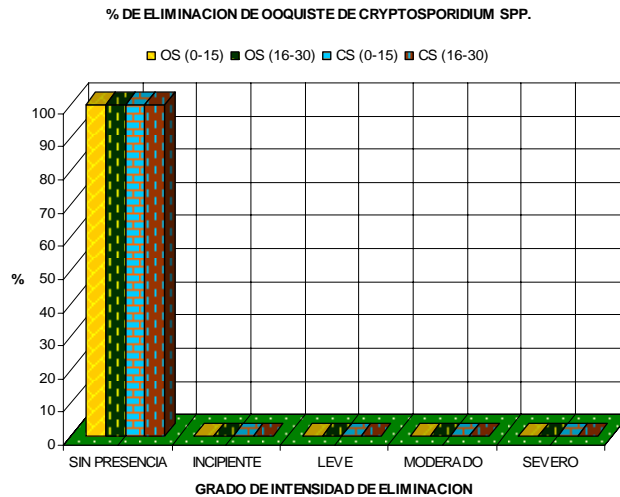


Figura 5. Intensidad de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium spp.*, en cabritos y corderos clínicamente sanos (sin diarrea), de 0 a 15 y 16 a 30 días de edad. En ninguno de estos se observó la eliminación de ooquistes, sin importar la edad de los animales.

8.0 DISCUSION

Fayer, 1986; refiere que en Escocia *Cryptosporidium spp*, fue la mayor causa de diarrea que afecto a un 40% de 1,064 corderos en in 1981. Donde los

neonatos son los más susceptibles a la infección natural. La diarrea, es el signo clínico más prominente de criptosporidiosis ovina, en los 2 a 12 días. En cabras, en un rebaño de 29 crías con menos de 3 semanas, 21 mostraron diarrea severa y 3 eventualmente murieron; 11 fueron detectados con *Cryptosporidium* en heces y en secreciones del intestino delgado ⁽¹⁴⁾.

Según un estudio realizado en explotaciones del noroeste de España, *C. parvum* fue identificado en el 65% de los brotes de diarrea neonatal en corderos. *E. coli* potencialmente patógena en el 61% y rotavirus en un 7%. La criptosporidiosis también fue la causa más frecuente de diarreas neonatales en cabritos (40% de los brotes), seguido por *E. coli* (36%), rotavirus (14%), *Clostridium perfringes* (20%) y *Salmonella* spp., (7%) ⁽²⁹⁾. Además, al menos en las ovejas, se ha demostrado que la eliminación de ooquistes es significativamente mayor durante el peri-parto, como consecuencia con la inmunodepresión que parecen originar los cambios hormonales durante el parto y la lactación, estimándose que cada oveja parasitada puede eliminar diariamente al medio durante ese período entre 20.000 y 440.000 ooquistes ⁽²⁹⁾.

De acuerdo con un reciente estudio epidemiológico realizado en 89 explotaciones de la provincia de Zaragoza sobre un total de 583 corderos de 1 a 3 meses de edad, la infección es significativamente más frecuente en los corderos de 1 a 21 días (66,4%) que en los de 22 a 90 días (23%) y la prevalencia es máxima en corderos de 8 a 14 días (76,2%) ⁽²⁹⁾.

El porcentaje de animales afectados en los brotes de diarrea es variable, aunque en general suele incrementarse a lo largo del período de partos y la morbilidad suele alcanzar el 100% al final de la paridera, cuando el medio se encuentra altamente contaminado. Los síntomas generalmente remiten en

aproximadamente 3-5 días, aunque en los casos más graves puede prolongarse entre 1 y 2 semanas. La diarrea habitualmente coincide con la eliminación de un elevado número de ooquistes, que alcanza el máximo entre el día 5-6 post-infección (pi.) y desaparece entre los días 10-15 pi. En algunas zonas, la criptosporidiosis se ha señalado como un grave problema de mortalidad neonatal en cabritos, con un número de bajas que puede alcanzar el 50% de los animales especialmente en explotaciones con condiciones higiénicas deficientes ⁽²⁹⁾.

9.0 LITERATURA CITADA

- 1.- Alvarez-Pellitero, Sitja'-Bobadilla A., F. P. S., C. Aguilera and P., 2005. Epidemiology of *Cryptosporidium molnari* in Spanish Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata L.*) and European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax L.*) Cultures: from Hatchery to Market Size. *American Society for Microbiology*. v. 71, p. 131-139.

- 2.- Atwill Edward R., B. H., M. Das Gracias., Cabral Pereira, K. W. Tate, F. Rulofson and G. Nader, 2003. Improved Quantitative Estimates of Low Environmental Loading and Sporadic Periparturient Shedding of *Cryptosporidium parvum* in Adult Beef Cattle: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 4604–4610.
- 3.- Beednarska, M., Bajer, A., and Sinski, E., 1998. Calves as a potential reservoir of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* sp: *Ann Agric Environ Med*, v. 5, p. 135-138.
- 4.- Benbow, J. W., Bernberg, E. L., Korda, A., and Mead, J. R., 1998. Synthesis and Evaluation of Dinitroanilines for Treatment of Cryptosporidiosis: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, p. 339–343.
- 5.- Bukhari, Z., and Smith, H. V., 1995. Effect of Three Concentration Techniques on Viability of *Cryptosporidium parvum* Oocysts Recovered from Bovine Feces: *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, p. 2592–2595.
- 6.- Butler, B. J., and Mayfield, C. I., 1996. *Cryptosporidium* spp., A review of the organism, The Disease and Implications for Managing Water Resources, p. 1-80.
- 7.- Foster C., J., a, M. D. G., D. Courtney, P., and A. Ward, L., 2003. Effect of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability: *Food Microbiology*, v. 20, p. 351–357.
- 8.- Clarence E. Chrisp., P. M., and Lance E. Perryman, 1995. Comparison of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium wrairi* by Reactivity with Monoclonal Antibodies and Ability To Infect Severe Combined Immunodeficient Mice: *Infection and Immunity*, v. 63, p. 360-362.
- 9.- Clark, D. P., 1999. New Insights into Human Cryptosporidiosis: *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, p. 554–563.
- 10.- Cheryl M. Davies, C. K., Daniel Deere, and Nicholas J. Ashbolt, 2003. Recovery and Enumeration of *Cryptosporidium parvum* from Animal Fecal Matrices: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 2842–2847.
- 11.- Davies, C. M., Kaucner, C., Deere, D., and Ashbolt, N. J., 2003. Recovery and Enumeration of *Cryptosporidium parvum* from Animal Fecal Matrices: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 2842–2847.
- 12.- Edward R. Atwill, S. M. C., Ralph Phillips, Laura Herrera Alonso, Kenneth W. Tate, Wayne A. Jensen, Joe Bennet, Scott Little, and Terrell P. Salmon, 2001. Quantitative Shedding of Two Genotypes of *Cryptosporidium parvum* in California Ground Squirrels (*Spermophilus beecheyi*): *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 2840–2843.

- 13.- Esteban, E., and Anderson, B. C., 1995. *Cryptosporidium muris*: Prevalence, Persistency, and Detrimental Effect on Milk Production in a Drylot Dairy: *Journal of Dairy Science*, v. 78, p. 1068-1072.
- 14.- Fayer R., B. L. P. U., 1986. *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis: *Microbiological Reviews*, v. 50, p. 458-483.
- 15.- Graaf, D. C. d., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L. M., Abbassi, H., and Peeters, J. E., 1999. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals: *International Journal for Parasitology*, v. 29, p. 1269-1287.
- 16.- Graczyk, T. K., Fayer, R., Knight, R., Mhangami-Ruwende, B., Trout, J. M., Silva, A. J. D., and Pieniazek, N. J., 2000. Mechanical transport and Transmission of *Cryptosporidium parvum* oocysts by wild filth flies: *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 63, p. 178–183.
- 17.- Gregorio Pérez-Cordón, M. J. R.-L. y. M. S.-M., 2005. Procesamiento de muestras fecales en el estudio de *Cryptosporidium* spp. mediante PCR: *Rev. Perú. Biol.*, v. 12, p. 158-160.
- 18.- Smith H.V., B. M. C., C. A. Paton, and R. A. B. 2006. Significance of Enhanced Morphological Detection of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in Water Concentrates Determined by Using 4,6-Diamidino-2-Phenylindole and Immunofluorescence Microscopy: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 5198–5201.
- 19.- Hunt, E., Fu, Q., Armstrong, M. U., Rennix, D. K., Webster, D. W., Galanko, J. A., Chen, W., Weaver, E. M., Argenzio, R. A., and Rhoads, J. M., 2002. Oral Bovine Serum Concentrate Improves Cryptosporidial Enteritis in Calves: *International Pediatric Research Foundation*, v. 51, p. 370-376.
- 20.- Instituto Nacional de Ovinos y Lanos, S. D. A. y. R. H., 1980. Necesidades Alimenticias de los Ovinos: Universidad Autónoma de San Luís Potosí, v. 5.
- 21.- Isaac-Renton, J., Blatherwick, J., Bowie, W. R., Fyfe, M., Khan, M., Li, A., King, A., Mclean, M., Medd, L., Moorehead, W., Ong, C. S., and Robertson, W., 1999. Epidemic and Endemic Seroprevalence of Antibodies to *Cryptosporidium* and *Giardia* in Residents of three Communities with Different Drinking Water Supplies: *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 60, p. 578–583.
- 22.- Jiménez, E. C., 2005. Aspectos Clínicos, Patológicos y Preventivos: Memorias del curso Internacional sobre Enfermedades de Caprinos y Ovinos., p. 2-12.
- 23.- Lihua Xiao, R. F., Una Rya, and Steve J. Upton, 2004. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health: *American Society for Microbiology*, v. 17, p. 72-97.

- 24.- Llinares, F. J. B., Silva, A. J. D., Moura, I. N. S., Myjak, P., Pietkiewicz, H., Łozowska, W. K., Graczyk, T. K., and Pieniazek, N. J., 1999. Identification of *Cryptosporidium felis* in a Cow by Morphologic and Molecular Methods: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 1455–1458.
- 25.- Mccole, D. F., Eckmann, L., Laurent, F., and Kagnoff, M. F., 2000. Intestinal Epithelial Cell Apoptosis following *Cryptosporidium parvum* Infection: *Infection and Immunity*, v. 68, p. 1710–1713.
- 26.- Nichols, P. R. H. a. G., 2002. Epidemiology and Clinical Features of *Cryptosporidium* Infection in Immunocompromised Patients. *American Society for Microbiology*, v. 15, p. 145–154.
- 27.- Ortega-Mora, L. M., Fernandez, J. A. R., Izquierdo, M. P., and Bueno, J. P., 1999. Role of adult sheep in transmission of infection by *Cryptosporidium parvum* to lambs: conformation of periparturient rise: *International Journal for Parasitology*, v. 29, p. 1261-1268.
- 28.- Pell, A. N., 1997. Manure and Microbes: Public and Animal Health Problem: *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 2672-2681.
- 29.- Quílez, J., Sánchez-Acedo, C., and Cacho, E. D. 2003. Criptosporidiosis de los pequeños rumiantes: XOPOL, v. 4.
- 30.- Rodríguez, O. R., Quintero, R. F. B., Morales, J. U., Olmedo, M. M., and López, S. B., 2006. Prácticas de Manejo de Ovinos de Pelo en la Huasteca, p. 1-98.
- 31.- Searcy, K. E., Packman, A. I., Atwill, E. R., and Harter³, T., 2006. Deposition of *Cryptosporidium* Oocysts in Streambeds: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, p. 1810–1816.
- 32.- Shelton, E. K. a. D. R., 1999. Method for Detection and Enumeration of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Feces, Manures, and Soils: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 2820–2826.
- 33.- Shepherd, K. M., and Jones, A. P. W., 1996. An Evaluation of Methods for the Simultaneous Detection of *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts from Water: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 1317–1322.
- 34.- Sonia A. Kjos, M. J., Pablo C. Okhuysen, and Cynthia L. Chappell, 2005. Evaluation of Recombinant Oocyst Protein CP41 for Detection of *Cryptosporidium*-Specific Antibodies: *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 12, p. 268–272.
- 35.- Szostakowska, B., Łozowska, W. K., Racewicz, M., Knight, R., Tamang, L., Myjak, P., and Graczyk, T. K., 2004. *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* Recovered from Flies on a Cattle Farm and in a Landfill: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, p. 3742–3744.

- 36.- Thaddeus K. Graczyk, B. H. G., Ronald Knight, Alexandre J. Da Silva, Norman J. Pieniazek, and Duncan A. Veal, 2003. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* Carried by Synanthropic flies by Combined Fluorescent in situ Hybridization and a Monoclonal Antibody: *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 68, p. 228-232.
- 37.- Tzipori, S., 1983. Cryptosporidiosis in animals and humans: *Microbiological reviews*, v. 47, p. 84-96.
- 38.- Tzipori, S., Angus, K. W., Campbell, I., and Clerihew, L. W., 1981. Diarrhea Due to *Cryptosporidium* Infection in Artificially Reared Lambs: *Journal of Clinical Microbiology*, v. 14, p. 100-105.
- 39.- Tzipori, S., Angus, K. W., Campbell, I., and Gray, E. W., 1980. *Cryptosporidium* Evidence for a Single-Species Genus: *Infection and Immunity*, v. 30, p. 884-886.
- 40.- Vance Dietz, D. V., Randall Nelson, Julie Wicklund, Joelle Nadle, Katherine Gibbs McCombs, Sudha Reddy, and the Foodnet Working Group, 2000. Active, Multisite, Laboratory-based Surveillance for *Cryptosporidium parvum*: *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 62, p. 368-372.
- 41.- Walker, M., and Redelman, D., 2004. Detection of *Cryptosporidium parvum* in Soil Extracts: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, p. 1827-1829.
- 42.- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., and Upton, S. J., 2004. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health: *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, p. 72-97.
- 43.- Zhu, G., Keithly, J. S., and Philippe, H., 2000. What is the Phylogenetic position of *Cryptosporidium*: *Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, p. 1673-1681.