

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO-

UNIDAD LAGUNA DIVISIÓN REGIONAL DE
CIENCIA ANIMAL



Evaluación de la intensidad de excreción de ooquistes de
Cryptosporidium parvum en becerras con diarrea

POR:

JUAN JOSE ESPINOZA VARGAS

TESIS:

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México.

Enero 2007

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Evaluación de la intensidad de excreción de ooquistes de
Cryptosporidium parvum en becerras con diarrea

POR:

JUAN JOSE ESPINOZA VARGAS

ASESOR PRINCIPAL:

M.C. RAMON ALFREDO DELGADO GONZÁLES.

COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

M.C.

LUIS FRA

SANDOVAL ELIAS



00036

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO-

UNIDAD LAGUNA DIVISIÓN REGIONAL DE
CIENCIA ANIMAL



PRESIDENTE DEL JURADO v.I.C.

RAMÓN ALFREDO D'ALGADO GONZÁLES.


VOCAL

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Ramón D'Algado", written over a horizontal line.

2
1 #1

JVtC^JtJAN LUÍS MORALES CRUZ.

VOCAL



D.R. RAFAEL RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

SUPLENTE



M.V.Z. JUAN JOSÉ MUÑOZ VERELA.

AGRADECIMIENTOS.

A mi Aftna Terra Mater:

Of haberme abierto (aspuestas, dándome (a oportunidaddeprepararme ai ser una persona con preparación profesional y ser átii a (a sociedad, en esta gran institución. Estaré eternamente agradecido.

A mi asesor:

M.C. Ramón Aifredo Deigado Gonzáies, por (a oportunidad, su tiempo, dedicación y su asesoramiento ai poder reaizar este importante trabajo, y deser más que un maestro todo un amigo, que con sus consejos siempre ios tendré presente y elpoder convivir. No me queda más que decirie GRACIAS.

A mis profesores:

Por ser parte de mi jormación profesional, dándome sus conocimientos en especial ai Dr. Garios Eizondo, M.C. Garios Ley va, M.C. Juan Luís Moraies, M.C Margarita Mendoza, ai Dr. Horacio Hernández Hernández, Gerardo Areüano, Jesús Gaéta, Marco A. Hernández Vera y a todos ios demás profesores quefueronparte de mi Jormación profesional.

Aijurado:

M.C. Juan Luís Morales Cruz. Dr. Rafael Rodríguez Martínez y M.V.Z. Juan José Muñoz Vareia

DEDICATORIAS

A mis compañeros:

A los Médicos Veterinarios Rafael Rodríguez, Rubicel García, Floriberto Soriano, Delmar Aguilar, Rooney Villaseñor, Juan Miguel Martínez, Jonathan Martínez, Santos Luna, Félix Castañeda, Anatolio Días, Minerva Martínez y Alma Socorro Salinas, amigos, Jehová, Karina, Sara, Lupe, Laura, Rosendo, Bernardo y Elias.

A mi madre

Francisca Jahuey Melchor, y Hortensia Vargas Melchor por haberme guiado, por sus consejos que siempre los tendré presentes, y por alentarme al ser una persona de bien, por estar en los momentos mas difíciles, siempre las tendré presente.

A mis hermanos:

Anel, soledad, Sofía, y sobre todo a mi hermano, Abel, gracias a ustedes por todo lo vivido, al haberme alentado y estar en los momentos mas difíciles, y por dejarme ser parte de esta gran familia.

A mis tíos:

José Lozano, Teresa Morgado, Salvador Vargas, Robería Martínez y Guadalupe Vargas y primos Agustín Lozanos, Nallelí vargas, Ariel vargas, Jesús Lozano y a todos los demás gracias.

A la Familias:

Martínez Vigil, Vargas Martínez, Salinas Ávila y Lozano Morgado.

RESUMEN

En la presente investigación se determinó la intensidad de excreción de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en heces de becerras holstein de 1 a 60 días de edad, con signos clínicos de diarrea. Se tomaron muestras de heces frescas el 100% de becerras que presentaron diarrea, en 20 establos lecheros de la Comarca Lagunera, el trabajo de laboratorio se llevó a cabo en la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna en Torreón Coahuila. Donde se realizaron frotis. Las muestras de 205 laminillas se procesaron con la técnica de Ziehl Neelsen modificada para la observación de *Cryptosporidium parvum* de las cuales 65 fueron positivas. La interpretación fue visual bajo un microscopio de luz fotónico. Para categorizar la intensidad de eliminación de acuerdo a cuatro criterios. El análisis de los resultados se realizó mediante estadística descriptiva, a través de análisis de varianza y de porcentajes. Considerando este análisis, el mejor método para conocer la intensidad de eliminación de ooquistes de *C. parvum* acuerdo a los resultados descritos es el Grupo 1 ya que detecta bien los grados de infección incipiente (+), leve (++) , moderada (+++) y severa (++++) (Otolani y Castro, 2003).

INDICE

DEDICATORIAS.....	i
AGRADECIMIENTOS	ü
RESUMEN.....	ï"
1. INTRODUCCION.....	1
2. JUSTIFICACION	2
3. OBJETIVOS	3
3.1 Objetivo General.....	3
3.2 Objetivos Específicos	3
4. ANTECEDENTES	3
4.1 Etiología	4
4.2 Epizootiología	5
4.3 Ciclo Biológico.....	7
4.4 Transmisión.....	8
4.5 Patogenia	9
4.6 Signos y Lesiones	10
4.7 Diagnóstico.....	11
4.8 Tratamiento	12
4.9 Control y Prevención.....	13
5. MATERIAL Y METODOS	14
6. RESULTADOS	16
7. DISCUSIÓN.....	20
8. CONCLUSIÓN.....	22
9. LITERATURA CITADA	23

ÍNDICE DE TABLAS

Cuadro 1. Frecuencia <i>Cryptosporidium</i> spp en becerras Holstein con diarrea en la Comarca Lagunera.....	17
Cuadro 2. Edades en días y ocurrencia de becerras con diarrea, positivas y negativas a <i>Cryptosporidium</i> spp	18
Cuadro 3. % de la intensidad de eliminación de ooquistes	18
Cuadro 4. Comparación entre los métodos para la evaluación de la Intensidad de excreción de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp	19
Cuadro 5. Diferencias encontradas de acuerdo a la eliminación de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp, en cuatro grados de evaluación (probabilidad)	20

1. INTRODUCCION

Las especies de *Cryptosporidium* son parásitos del Phylum Apicomplexa, que infectan la lámina basal de las vellosidades del epitelio gastrointestinal afectando a una amplia variedad de hospedadores vertebrados, incluyendo al humano (Sweitzer *et al.*, 1997; Hashim *et al.*, 2006).

Los individuos infectados han demostrado una gran variedad de manifestaciones clínicas, algunas de ellas asintomáticas, esto comúnmente se presenta en individuos jóvenes de la población de los hospedadores y siendo una enfermedad importante de humanos y terneros (Fayer y Ungar, 1986). La patogenicidad de *Cryptosporidium* varía con la especie del parásito involucrado, el tipo, la edad, y el estado inmune del hospedador. Las principales fuentes de infección de *C. parvum* en los recién nacidos y en los animales jóvenes no han sido identificadas (Sweitzer *et al.*, 1997). En algunos animales, como los reptiles infectados con *C. serpentis* o individuos que están inmunodeprimidos, la infección es frecuentemente crónica y puede eventualmente ser fatal (Xiao *et al.*, 2004).

El género de *Cryptosporidium* consiste en diferentes especies y genotipos. En las primeras investigaciones casi todos los aislamientos en humanos fueron asignados como *C. parvum*. Dentro del *C. parvum*, dos genotipos fueron descritos: el genotipo tipo I (humano), y el genotipo tipo II (del ganado), los dos genotipos difieren significativamente en sus genes y en la variedad en los hospedadores (Xiao *et al.*, 1999,47; Hashim *et al.*, 2006).

En animales de establos, la presencia y las manifestaciones clínicas y patológicas de *Cryptosporidium* spp ocurre junto con interacciones de otros patógenos, *C. parvum* es considerado como un importante agente en la etiología del síndrome diarreico neonatal en becerros, borregos y cabras jóvenes, causando pérdidas económicas indirectas o directas (Dirk *et al.*, 1999).

2. JUSTIFICACION

La escasa literatura nacional acerca de las diarreas de los bovinos relacionados con *Cryptosporidium* spp nos permite abrir el campo del conocimiento sobre esta enfermedad, en busca de la epidemiología en la Comarca Lagunera para que con los resultados obtenidos delimitemos y controlemos el problema en los establos lecheros de la región.

Existen datos referentes a la cryptosporidiosis bovina en la Comarca Lagunera, como causante de pérdidas económicas por la diarrea que produce en los becerros.

De acuerdo a estos antecedentes la finalidad de la presente investigación es encontrar el mejor método para cuantificar la intensidad de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en becerros con diarrea en la Comarca Lagunera.

La presentación de la cryptosporidiosis ocurre entre los 4 a 30 días de edad, mientras las malas condiciones sanitarias del ambiente principalmente donde se encuentra los becerros, es mayor el riesgo de contagio y presencia de la enfermedad.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar cuatro métodos con diferentes criterios para evaluar la intensidad de eliminación de ooquistes de *C. parvum*.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

3.2.1. Identificar ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, en heces de becerras con diarrea, por medio de análisis microscópico con la tinción de Ziehl-Neelsen modificada.

3.2.2. Comparar cuatro métodos para medir la intensidad de excreción de ooquistes de *C. parvum* a partir de heces diarreicas de becerras Holstein con cryptosporidiosis.

4. ANTECEDENTES.

En el ganado bovino, han sido reconocidas dos especies del género *Cryptosporidium*, *C. parvum* y *C. andersoni* (*C. muris* tipo bovino). El primero, coloniza el intestino delgado y constituye un importante agente etiológico del síndrome diarreico de los becerros. En los bovinos adultos también ha sido reportada esta especie, en los que generalmente cursa de forma subclínica y presenta bajos niveles de infección. La otra especie, se desarrolla en el abomaso, es más común en bovinos adultos y aunque presenta amplia distribución, su prevalencia es baja. Aparentemente no causa enfermedad manifiesta, pero la producción de leche se ha visto significativamente reducida en las vacas afectadas (Pedraza-Díaz *et al.*, 2000).

El género de *Cryptosporidium* consiste en varias especies diferentes y genotipos que afecta a una amplia variedad de hospedadores. Inicialmente, casi todos los aislamientos en humanos fueron asignados como *C. parvum*. Dentro de este

género se han descrito dos genotipos: el tipo 1 (el genotipo humano), y el tipo 2 (genotipo del ganado), ambos son responsables de iniciar una infección en humanos. Los dos genotipos difieren significativamente en sus genes y en la variedad en los hospedadores (Sweitzer *etal.*, 1997; Xiao *et al.*, 1999 47).

Estos parásitos infectan una amplia variedad de hospedadores vertebrados. En algunas especies son limitadas como grupos de hospederos individuales, como es el caso de *Cryptosporidium baileyi*, que infecta a los pollos (Spano *etal.*, 1997).

4.1 Etiología

Las especies de *Cryptosporidium* que son frecuentemente consideradas como especies válidas hoy incluyen a *C. andersoni* (ganado), *C. baileyi* (pollos y pájaros), *C. canis* (perros), *C. felis* (gatos), *C. galli* (pájaros), *C. hominis* (humanos), *C. meleagridis* (pájaros y humanos), *C. molnari* (peces), *C. muris* (roedores y algunos otros mamíferos), *C. parvum* (rumiantes y humanos), *C. wrairi* (cuyos), *C. saurophilum* (lagartos y serpientes), y *C. serpentis* (serpientes y lagartos). Otros morfológicamente distinto de *Cryptosporidium* spp ha sido encontrados en peces, reptiles, pájaros y mamíferos, pero tienden a no ser nombrados (Xiao *et al.*, 2000: Xiao *etal.*, 2001).

Las especies de *Cryptosporidium* son parásitos protozoarios intracelulares que causan diarrea en humanos y animales. La existencia *Cryptosporidium* en el medio ambiente son ooquistes de 5 u de diámetro, el cual contiene cuatro esporozoitos, los cuales son móviles de 1 a 5 um el cual se adhiere e invade las células epiteliales del tracto gastrointestinal, aquí el parásito se replica a ocho merozoitos de los cuales salen rompiendo las células infectando a otras células del hospedador y completando un ciclo asexual en el ciclo biológico (Dirk *et al.*, 1999). Así mismo, *C. hominis* en humanos ha sido conocido, una variedad mucho más estrecha en los hospederos, siendo morfológicamente similar a *C. parvum* y los estudios de la transmisión cruzada han ayudado a distinguir entre ambos. (Akiyoshi *etal.*, 2002).

Las primeras conclusiones de *C. hominis* que no infectan experimentalmente a animales como ratones, becerros, corderos y lechones prematuros, estudios recientes han demostrado claramente que becerros, corderos y lechones pueden ser infectados con *C. hominis* (Akiyoshi *et al.*, 2002).

4.2 Epizootiología

Las especies de *Cryptosporidium* spp. son parásitos protozoarios intracelulares que tienden hacer una importante causa de diarrea y daños gastrointestinales en una gran variedad de mamíferos, incluyendo al humano (Dirk *et al.*, 1999; Mackenzie *etal.*, 1994), ganado bovino, ovejas, cerdos, caballos y pollos. También puede presentarse en varias especies de animales salvajes, reptiles, conejos y ratones. En el ganado bovino, fueron reconocidas dos especies de este género: *C. parvum* y *C. andersoni*. La primera, coloniza el intestino delgado y constituye un importante agente del síndrome diarreico. En bovinos adultos generalmente cursa de forma subclínica y presenta bajos niveles de infección. La otra especie se desarrolla en el abomaso, es más común en bovinos adultos y su prevaencia es baja. La producción de leche se ve significativamente reducida en las vacas afectadas (Díaz de Ramírez *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2004).

Se han informado fuentes *C. parvum* en bovinos, que pueden causar la enfermedad al personal del laboratorio, estudiantes de veterinaria y trabajadores de los establos. Ahora se reconoce como una infección que se observa principalmente en los becerros jóvenes de 1 a 30 días de edad. (Fayer y Ungar, 1986).

Los ooquistes se fijan a la tierra y al estiércol afectando frecuentemente a los bovinos en un modo complejo y teniendo implicaciones en el transporte de éstos ooquistes a través a del estiércol (Kuczynska *et al.*, 2005).

Una de las mayores causas de diarrea neonatal en los terneros es *C. parvum* y se le contribuyen pérdidas económicas significativas en la industria ganadera de carne y leche. Los ooquistes de *C. parvum* que están ampliamente distribuidos en el ambiente de muchas explotaciones ganaderas, son ingeridos por el ternero recién nacido. Seguido por un período de incubación de 72 a 96 horas, se observa la diarrea en horas durante 2 a 10 días y durante este tiempo son observados los ooquistes en las heces (Anusz *et al.*, 1990).

Los becerros recién nacidos son particularmente más susceptibles a la infección y pueden excretar billones de ooquistes en dado caso de que ellos desarrollen cryptosporidiosis. Estudios recientes indican que en los animales adultos, el ganado asintomático también excreta ooquistes. A través de la excreción, el número total de ooquistes excretados puede ser aun considerable debido a la cantidad de heces producidas (Morrissette y Sibley, 2002).

Un factor importante que se ha tenido en cuenta es la resistencia de los ooquistes ya que mantiene su capacidad infectiva por períodos de tiempo prolongados, esto le da una mayor resistencia hacia las condiciones medioambientales y a los desinfectantes usuales. Dicho lo anterior, ellos pueden sobrevivir en el ambiente, paredes, comederos, bebederos, los utensilios utilizados en las unidades de producción. Esto facilita la difusión de la enfermedad gradualmente. Las únicas condiciones físicas que afectan su potencial infectiva son las temperaturas extremas y sobre todo desecación (Robertson *et al.*, 1992).

Los ooquistes de *Cryptosporidium* son muy resistentes a los desinfectantes más comunes, y pueden sobrevivir por meses bajo el frío y la humedad. Un estudio realizado para evaluar la eficiencia de desinfectantes comerciales demostró que la exposición al amonio (50% o mas) y formalina (10% o mas) por 30 minutos puede matar los ooquistes de *Cryptosporidium* (Current y García, 1991).

4.3 Ciclo biológico

Los ooquistes en su estado de transmisión infectan al hospedero susceptible por la ruta fecal - oral. Otras rutas de transmisión pueden ser de individuo a individuo o por contacto directo - indirecto, posiblemente incluyendo actividades sexuales, de animal a animal, en las albercas, agua y alimento. (Fayer y Trout, 2000). *Cryptosporidium* spp tiene un ciclo de vida monoxeno donde todos los estados de desarrollo (asexual y sexual) ocurren en un solo hospedero (O'Donoghue, 1995; Dirk *et al.*, 1999). Diferentes estudios de aislamientos (becerros y humanos) de *C. parvum* en ratones revelaron que el ciclo de vida de este parásito es similar al de otras coccidias (e.g., *Eimeria* e *Isospora* spp) (Current y García, 1991).

La esporulación de los ooquistes es solo en estado exógeno y consiste en 4 esporozoitos con una pared de dos capas; estas son excretadas en heces que infectan al hospedero. La fase endógena empieza después de la ingesta por el hospedero. La pared de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp, como la de otras coccidias, tienen una capa interna y otra externa, las cuales se abren y los esporozoitos salen del ooquiste. Estos parasitan las células epiteliales del tracto gastrointestinal y respiratorio (Fayer, 1997). Los esporozoitos libres se adhieren a las células epiteliales donde ellos se internan dentro de vacuolas, parasitan y se desarrollan a estados de trofozoitos (O'Donoghue, 1995).

El trofozoito pasa a ser Meronte I, donde la multiplicación es asexual, a la que se llama esquizogonia o merogonia, cuando el trofozoito se divide en núcleos, *C. parvum* tiene 2 tipos de esquizogonia o merontes. Para *C. parvum* el tipo I desarrolla de 6 a 8 núcleos, mientras se incorporan dentro del merozoito a un estado estructuralmente similar al esporozoito. Mientras maduran los merozoitos, permiten a la esquizogonia infectar a otras células del hospedador desarrollando dentro otros tipos: tipo I y II en el cual se producen 4 merozoitos, solo los merozoitos de tipo II inician la multiplicación sexual (gametogonia) habiendo infectado nuevas células al hospedador a estado de microgametos, masculino y macrogametos, femenino (Fayer, 1997).

La mayoría de los ooquistes son de pared gruesa y se eliminan con las heces, lo cual permite la diseminación del parásito en el medio ambiente y la infección de otros hospedadores. Sin embargo, un porcentaje significativo de ooquistes (un 20% aproximadamente) poseen una pared fina, lo que facilita su desenquistamiento dentro del mismo hospedador, dando lugar a un nuevo ciclo (autoinfección). Este fenómeno, que no se observa en otros coccidios, se considera responsable del desarrollo de infecciones graves en ausencia de reinfección del medio ambiente, y puede ser causa de infecciones crónicas en algunos individuos (Marshall *etal.*, 1997).

Cada generación de parásito puede desarrollarse o madurar dentro de 12 a 14 horas. El ciclo de vida es rápido autoinfectivo, puede verse un gran número de células parasitadas y el sitio de infección secundarias en el duodeno y a lo largo del intestino delgado. En individuos inmunodeprimidos, parasitados tienden a ser encontrados en el estómago, conducto biliar, ducto pancreático, y tracto respiratorio (Dirk *etal.*, 1999).

4.4 Transmisión

La transmisión en terneros y humanos, ocurre cuando un individuo infectado excreta ooquistes a través de las heces al ambiente y un individuo susceptible ingiere ooquistes de forma directa o indirecta a través de agua contaminada. La excreción de ooquistes puede durar de 3 a 12 días en los terneros (Anderson, 1998), permitiendo concentraciones altas de ooquistes en construcciones confinadas. Una vez en el corral, estos ooquistes infectivos son inmediatamente ingeridos por otro individuo, permitiendo rápido crecimiento de este parásito dentro de los hospedadores susceptibles (Fayer, 1994).

Una fuente importante para la infección de *C. parvum* a individuos es la contaminación de agua para beber, alimentos o el ambiente contaminado. Así como los ooquistes de *C. parvum* presentes en agua de río (la fase infecciosa se

encuentra fuera del huésped) puede permanecer viable durante varios meses, también se han implicado la fauna y salidas de aguas contaminadas de las alcantarillas como fuente de transmisión (Hansen y Ongerth, 1991)

Este parásito microscópico se encuentra en heces fecales. En beceras y en humanos, y es transmitido por la ruta oral-fecal. La enfermedad comienza cuando un individuo susceptible ingiere agua o alimento contaminado con los ooquistes de este parásito. Luego el parásito invade el epitelio del intestino, se reproduce y entra a una secuencia de ciclos reproductivos que dan como resultado la excreción de ooquistes en heces. Dado al gran número de ooquistes liberado en heces, el ambiente es contaminado con esto, estos ooquistes inmediatamente infectan a otro individuo, permitiendo la rápida diseminación de este parásito hacia un grupo susceptible de individuos. La infección por criptosporidiosis afecta al intestino produciendo diarreas severas (Riggs *et al.*, 2002).

Los resultados indican que los ooquistes que se fijan a la tierra están afectando frecuentemente al estiércol de los bovinos en un modo complejo y debería tener implicaciones por como los ooquistes pueden ser transportados a través el estiércol. (Hansen y Ongerth, 1991).

4.5 Patogenia

El síndrome diarreico tiene una etiopatogenia compleja, pues cuando el *Cryptosporidium* es el único causante la mortalidad es baja, pero dependiendo de su asociación con otros agentes infecciosos, del grado de inmunidad y del estado nutricional del hospedero. La mortalidad puede ser alta (Ortolani y Castro, 2003).

Se ha observado dos tipos de presentaciones de diarrea por criptosporidiosis en forma natural que son la malabsorción y la secretora, producido por la destrucción parcial de la mucosa, baja en la absorción de NaCl así como elevado nivel de prostaglandinas provenientes de tejidos inflamados, que activan a las neuronas entérica secretomotoras (Hunt *et al.*, 1998).

El ooquistes *C. parvum* más pequeño que *C. muris* y se ha encontrado infectando intestino delgado. Una especie *C. muris* infecta abomaso que al parecer ha sido reportado en infecciones crónicas en ganado adulto. Los animales infectados con esta especie no tienen diarrea, aunque ellos excretan el ooquistes durante varios meses. En la Ordeña la producción y las ganancias de peso usuales están significativamente reducidas en el ganado infectado con *Cryptosporidium* spp. Infecciones naturales causadas por ambas especies son muy prevalentes en el ganado, ratones salvajes, y ratas en todo el mundo (Fayer, 1997).

4.6 Signos y lesiones

Cryptosporidium spp. causa una enfermedad zoonótica emergente, cryptosporidiosis, en una amplia variedad de animales, incluso los rumiantes recién nacidos y personas. La enfermedad se caracteriza clínicamente por diarrea profusa, acompañada por heces amarillentas de consistencia blanda o líquida y de olor desagradable (Ortega-Mora y Wright, 1994), a veces diarrea mucosa con manchas de sangre, deshidratación, apatía, depresión, emaciación, anorexia, tenesmo y dolor abdominal. La enfermedad es más severa y fatal si se complica con la interacción con otros enteropatógenos como *E. coli*, *Salmonella*, Rotavirus, Coronavirus y en los individuos inmunodeprimidos. Cryptosporidiosis es prevalente en los terneros y parece estar relacionada con la edad. La infección con *Cryptosporidium* se reporta más comúnmente en los terneros entre 1 y 3 semanas de edad (Arslan y Yunus, 2001).

La infección por *C. parvum* en el epitelio intestinal puede producir vellosidades romas, hiperplasia de la cripta, destrucción del citoesqueleto y disminución de la absorción de sodio (McCole *et al.*, 2000). El abomaso con frecuencia contiene leche sin digerir formando coágulos, y el intestino delgado presenta enteritis congestiva, la mucosa hiperémica, pero no hemorrágica. El contenido intestinal en ocasiones es amarillento y acuoso y puede existir acumulo de gas en ciego y colón (Ortega *et al.*, 1999).

4.7 Diagnóstico

El diagnóstico de cryptosporidiosis se realiza con la identificación de los ooquistes, esféricos, de 5 um o los estadios intracelulares en biopsia de la mucosa gastrointestinal teñida con hematoxilina-eosina la cual debería de ser suficiente para identificar la morfología de los estadios del parásito intracelular y su localización dentro de las células del epitelio intestinal (Pañsi y Tierno, 1995).

En frotis de heces se puede realizar con tinción con Aramina Raditidina y la tinción de Ziehl-Neelsen las cuales son muy sensibles y específicas, son aprovechadas como herramientas para la identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp (Rochelle *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 1991; Clark, 1999).

Los ooquistes de *Cryptosporidium* son difíciles de ver en frotis fecales por que son incoloros, transparentes y pequeños pues *Cryptosporidium parvum* miden 5.0 por 5.6 um y *C. andersoni* 7.4 por 5.6 um (Current *et al.*, 1986). Con la solución de sacarosa concentrada por medio de flotación, los ooquistes presentan una imagen de minúsculos objetivos subesféricos que pueden estar arrugados por la extracción osmótica que el agua provoca por el medio hipertónico (Rodríguez, 2004)

La técnica mas precisa es la coloración por el método Ziehl-Neelsen modificado para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* en heces sin usar el calentamiento de frotis. Se observan los ooquistes, ácido resistentes de color rojo brillante sobre un fondo azul. También se utiliza la prueba inmunoabsorbente ligada a enzimas (Parisi y Tierno, 1995).

Se han comparado los tres métodos diagnósticos más utilizados: visualización de los ooquistes con Ziehl-Neelsen o con inmunofluorescencia y la identificación de antígenos por ELISA en materia fecal, y se ha encontrado que todos tienen sensibilidad y especificidad de 96 a 98% (Quilez *et al.*, 1996).

En la identificación de los ooquistes de *Cryptosporidium* por la técnica de Azul metileno-Safranina estos aparecen como cuerpos redondos de color naranja brillante, por lo general dentro de un círculo claro, contra un fondo azul (Emre *et al.*, 1998).

La técnica de detección de *Cryptosporidium* mediante inmunofluorescencia alcanza hasta un 100% de sensibilidad y de especificidad y el límite de detección son 100.00 ooquistes/g de heces (Rochelle *etal.*, 1999).

4.8 Tratamiento

Dado que la cryptosporidiosis es una enfermedad autolimitante en individuos inmunodeprimidos, únicamente es un tratamiento de soporte para esta enfermedad. La rehidratación intravenosa y el replazo de electrolitos pueden ser necesarios principalmente para la diarrea. En el tratamiento de la rehidratación oral pueden incluirse soluciones que contenga glucosa al 5%, bicarbonato de sodio 5 a 10 grs. y potasio. La terapia no es segura ni efectiva en una enteritis por *Cryptosporidium*. (Morgan-Ryan, 2002). El tratamiento generalmente es necesario para individuos con el sistema inmune normal (Ortega-Mora y Wright, 1994).

Para la eficiencia parcial en el tratamiento y prevención de la cryptosporidiosis en los rumiantes se incluyen lactato de halofuginona se usa 5mg en 10 ml administrarse entre 10 a 15 minutos antes de dar la leche, paronomicina se usa en 4 dosis de .5 -2.0g/día con una mejora en síntomas y decoquinato usado en USA principalmente en pollos. La importancia de la protección calostrala en rumiantes neonatos que antagoniza la infección por *C. parvum*, es un punto muy valioso a seguir. En condiciones de campo los anticuerpos adquiridos pasivamente no dan protección a los becerros y la infección se adquiere naturalmente. Sin embargo los becerros alimentados con calostro de madres inmunizadas con altos títulos de anticuerpos específicos son parcialmente protegidos a la infección del agente (Dirk *etal.*, 1999).

4.9 Control y prevención

Los ooquistes de *Cryptosporidium* son muy resistentes a los desinfectantes mas comunes, y pueden sobrevivir por meses bajo el frío y la humedad. Un estudio realizado para evaluar la eficiencia de desinfectantes comerciales demostró que la exposición al amonio (50% o mas) y formalina (10% o mas) por 30 minutos puede matar los ooquistes de *Cryptosporidium* (Moon y Woodmansee, 1986).

En algunos estudios, con ozono (otro método muy usado para el tratamiento del agua) ha demostrado la eliminación de la infectividad de los ooquistes de *Cryptosporidium* donde se mantuvo a una concentración de 1 ppm por 10 min. (Current y García, 1991).

Así, la mejor medida actualmente disponible en la práctica clínica para tratar con esta enfermedad es la implementación de medidas higiénicas adecuadas y de manipulación, con el propósito de evitar el contacto de los neonatos con el parásito, prevenir la propagación de la enfermedad a otros animales (Harp y Goff, 1998). Consecuentemente, la atención especial debe enfocar en lo siguiente:

La desinfección de las instalaciones se debe llevar a cabo por lo menos una vez a la semana para prevenir la acumulación de ooquistes y otros patógenos en la ropa, las camas, los pisos, las paredes, contenedores de alimento, agua de bebida y las unidades de producción (Harp y Goff, 1998). También han encontrado efectos beneficiosos de factores de crecimiento (presente en el suero y calostro) reforzando la reparación del intestino en la diarrea del Rotavirus y después de la lesión isquémica intestinal (Moon y Woodmansee, 1986).

5. MATERIAL Y METODOS

Fase de Campo. El presente trabajo se realizó en 20 establos de la Comarca Lagunera de los estados de Durango y Coahuila, los cuales al momento del muestreo contaban con una población de 3444 becerras. Se colectaron muestras de heces fecales de 205 becerras que presentaron diarrea. Se utilizaron bolsas de plástico estériles, las heces fueron tomadas directamente del recto, estimulando la defecación, se mantuvieron en refrigeración para ser llevadas al laboratorio para su procesamiento.

Fase de Laboratorio. El trabajo de laboratorio se realizó en el laboratorio de parasitología de la Unidad de Diagnóstico del Departamento de Ciencias Médico Veterinarias de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, ubicado en Torreón, Coahuila.

Preparación de la tinción de Ziehl Neelsen. Se preparó Carbol Fucsina utilizando 10 g de Fucsina básica (Hycel) diluida en 1 L de agua destilada, 100 mL de alcohol absoluto (Analytica) y 50 mL de cristales de fenol (Merck). Para la solución madre de azul de metileno se utilizaron 1.4 g de colorante azul de metileno (Golden Bell) y se diluyeron en 100 mL de alcohol de 96% (Analytica). Para la solución de trabajo se diluyó la solución madre en 90 mL de agua destilada. Se preparó alcohol ácido al 1% utilizando ácido clorhídrico (Merck) en alcohol etílico al 70% (Analytica).

Procedimiento de la tinción de Ziehl Neelsen. Se realizaron frotis de heces diarreicas en portaobjetos, se secaron al aire y se procesaron con la técnica de Ziehl-Neelsen modificada. Las muestras se enjuagaron en agua corriente para eliminar residuos y polvos, se sumergieron en Carbol Fucsina por 30 minutos, se lavaron en agua corriente hasta eliminar el exceso de colorante. Se decoloraron en alcohol ácido hasta obtener una tinción de color rosa, se continuó con enjuague con agua corriente para eliminar residuos del alcohol ácido, se utilizó el colorante

azul de metileno por 2 minutos con la finalidad de hacer un contraste en la tinción y se enjuagó con agua corriente con el fin de eliminar el exceso de azul de metileno. Las muestras teñidas se cubrieron con cubreobjetos, utilizando resina sintética para observarlas e interpretarlas con un microscopio fotónico.

Interpretación de las observaciones. Los criterios de evaluación se basaron en la observación de los ooquistes de color rojo brillante sobre un fondo azul.

Se formaron cuatro grupos para medir la intensidad de eliminación de *Cryptosporidium* spp en heces de acuerdo a las siguientes categorías:

Grupo 1. (-) Ausencia de ooquistes; (+) 1 a 4 ooquistes; (++) 5 a 20 ooquistes; (+++) 21 a 84 ooquistes; (++++) con más de 84 ooquistes. Se observaron con el objetivo 40X, se contabilizaron 25 campos ópticos, al encontrar ooquistes, y fueron observados como mínimo 50 campos antes de considerar un caso negativo (Ortolani y Castro, 2003).

Grupo 2. (-) Ausencia de ooquistes; (+) 1 a 5 ooquistes; (++) 5 a 10 ooquistes; (+++) con más de 10 ooquistes. Se observaron con el objetivo 40X, se contabilizaron 20 campos ópticos, al encontrar ooquistes, y fueron observados como mínimo 50 campos antes de considerar un caso negativo (Bednarska *et al.*, 1998).

Grupo 3.: (-) Ausencia de ooquistes; (+) 1 a 5 ooquistes; (++) 6 a 20 ooquistes; (+ + +) más de 20 ooquistes. Se observaron con el objetivo 100X, se contabilizaron 20 campos ópticos, al encontrar ooquistes, y fueron observados como mínimo 40 campos antes de considerar un caso negativo (Emre *et al.*, 1998).

Grupo 4. (-) Ausencia de ooquistes; (+) 1 a 10 ooquistes; (++) 11 a 20 ooquistes; (+++) 21 a 40 ooquistes; (++++) 41 a 80 ooquistes; (+++++) más de 81 ooquistes. Se observaron con el objetivo 40X, se contabilizaron 25 campos ópticos, al

encontrar ooquistes, y fueron observados como mínimo 50 campos antes de considerar un caso negativo (Unidad de Diagnóstico de la UAAAN.UL).

Para el análisis estadístico se utilizó el software estadístico de *Sistat*, para determinar el predominio de *C. parvum* infección y diarrea, y para investigar las relaciones entre la infección, diarrea, e intensidad de excreción del ooquistes por los terneros infectados así como la evaluación de los diferentes criterio para clasificar al grado de severidad de la infección.

Nota:

Grado 1 (+) incipiente. Grado 2 (++)

leve. Grado 3 (+++) moderado.

Grado 4 (+++++) severo.

6. RESULTADOS

De los 20 hatos muestreados, 16 (80%) hatos fueron positivos a *Cryptosporidium*, los cuales tenían una población de 2851 becerras. Se encontró que 205 (7.19%) de las mismas presentaron heces diarreicas, de éstas 65 (31.70%) fueron positivos a *Cryptosporidium* spp con la técnica de Ziehl Neelsen modificada. La frecuencia de la infección estuvo en rangos desde 9 hasta 83% por hatos (Cuadro

Cuadro 1. Frecuencia de *Cryptosporidium* spp en becerras Holstein con diarrea en la Comarca Lagunera.

Establo	N	n	+	%(+)
1	488	24	12	50.00
2	230	16	13	81.25
3	176	13	3	23.07
4	250	23	7	30.43
5	72	3	2	66.66
6	150	12	10	83.30
7	117	15	3	20.00
8	68	14	0	0
9	73	6	1	16.60
10	150	4	0	0
11	220	4	2	50.00
12	150	5	2	40.00
13	200	8	0	0
14	200	14	5	35.70
15	75	6	1	16.60
16	200	5	2	40.00
17	175	2	0	0
18	100	3	2	66.60
19	180	6	2	33.30
20	170	22	2	9.20
Total	3444	205	65	

N = Número total de becerras en el hato.

n = Números de becerras muestreadas con diarrea.

+ = Positivo a *Cryptosporidium* spp.

Las becerras presentaron diarrea entre 1 y 45 días de edad. La edad en que mas se presentó la cryptosporidiosis fue entre 8 y 16 días, siendo los becerros de 8 (75%) y 10 (62%) días los más afectados (Cuadro3), esto se ajusta a lo observado por otros investigadores (Reynolds *et al* 1986; Ortolani y Castro, 2003), los cuales

han sugerido que en este periodo aumente la probabilidad de que un mayor número de patógenos cause trastornos entéricos, en la primera semana no se presentaron casos positivos, mientras que en la segunda y tercera semana hubo un aumento significativo (Cuadro 2), disminuyendo la presentación de la cuarta semana en adelante.

Cuadro 2. Edad en días y ocurrencia de becerras con diarrea, positivas y negativas a *Cryptosporidium* spp.

Edad (días)	No. Becerras	Positivas	% positivas
8	8	6	75
9	20	11	55
10	16	10	62.5
11	19	9	47.3
12	7	4	57
13	13	7	53.9
16	7	3	42.9

Cuadro 3. % de la intensidad de eliminación de ooquistes.

Grupo/grado	+	++	+++	++++	+++++
Grupo 1	23	21.5	24.61	30	NA
Grupo 2	23	3	73.84	NA	NA
Grupo 3	38.46	18.46	43	NA	NA
Grupo 4	26	18.46	16.9	7.6	30

NA= No aplica

En la evaluación de la intensidad de excreción de ooquistes de acuerdo a los cuatro métodos utilizado se observó que la presentación fue: Grupo 1 en grado 1 (+) 23%, en grado 2 (++) 21.5%, grado 2 (+++) 24.61% y grado 4 (++++) 30%. Grupo 2 en grado 1 (+) 23%, en grado 2 (++) 3%, y en grado 3 (+++) 73.84%. Grupo 3 en grado 1 (+) 38.46% en grado 2 (++) 18.46%, en grado 3 (+++) 43%. Grupo 4 en grado 1 (+) 26%, en grado 2 (++) 18.46%, en grado 3 (+++) 16.9%, en grado 4 (++++) 7.6% y en grado 5 (+++++) 30%. La distribución entre Grupo 1 y 4 son muy similares, mientras que entre los grupos Grupo 2 y 3 hay diferencia de acuerdo a los porcentajes observados (Cuadro 3).

Cuadro 4. Comparación entre los métodos para la evaluación de Intensidad de excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

No. Becerras con diarrea	becerra con ooquistes	Intensidad de excreción						Grupo
		-	+	++	+++	++++	+++++	
205	65	140	15	14	16	20		1
205	65	140	15	2	48	-		2
205	65	140	25	12	28	-		3
205	65	140	17	12	11	5	20	4

Grupo 1: 25 campos en 40x

Grupo 3: 25 campos en 100x

Grupo 2: 20 campos en 40x

Grupo 4: 25 campos en 40x

El estudio comparativo sobre la intensidad de eliminación de ooquistes entre los 4 criterios utilizados de acuerdo a la probabilidad, que evalúa la intensidad de excreción por grados, en el grado 1(+) no hubo diferencias significativas ($P>0.05$) entre los 4 grupos. En grado 2 (++) la diferencia fue entre los Grupo 1 y 2 (0.054); Grupo 2 y 4 (0.009). En grado 3 (+++) hubo diferencia entre los Grupos 1 y 2 (0.016); Grupo 1 y 4 (0.0001); Grupo 1 y 3 (0.021); Grupo 3 y 4 (0.002). En grado 4 (++++) la diferencia fue manifiesta entre Grupo 1 y 4 (0.001), por ende la diferencia fue mas marcada entre Grupo 1 y 4 donde hubo diferencias significativas en relación de Grupo 2 y 3 (cuadro 5).

Cuadro 5. Diferencias encontradas de acuerdo a la eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp, en cuatro grados de evaluación (probabilidad).

Grupo/Grado	+	++	+++	++++
Grupo 1-Grupo 1	-	-	-	-
Grupo 1-Grupo 2	1.00	0.054	0.016	-
Grupo 1-Grupo 3	0.850	0.850	0.021	-
Grupo 1-Grupo 4	0.404	0.084	0.002	0.0001
Grupo 2-Grupo 2	-	-	-	-
Grupo 2-Grupo 3	0.850	0.202	0.409	-
Grupo 2-Grupo 4	0.547	0.009	0.0001	-
Grupo 3-Grupo 3	-	-	-	-
Grupo 3-Grupo 4	0.547	0.468	0.065	-
Grupo 4-Grupo 4	-	-	-	-

La probabilidad significativa es

7. DISCUSIÓN

El uso de la tinción de Ziehl-Neelsen modificada es la forma mas económica y rápida para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium*. spp de acuerdo a Kehl *et al.*, (1995), el análisis microscopio de frotis fecales teñidos es el método mas utilizado para el muestreo tamiz de heces para el diagnóstico de *Cryptosporidium* en los laboratorio de diagnostico clínico. Además otras investigaciones han demostrado que los métodos de detección basados Inmunológicamente, no son más sensibles que la microscopía convencional (Clark, 1999J.

La alta prevalencia e intensidad de la infección por *Cryptosporidium* en las becerras de algunos hatos en la Comarca Lagunera indica que son parásitos muy comunes en esta región, Otros estudios muestran altas prevalencias que van desde 20 al 80 % (Bednarska *et al.*, 1998; Emre *et al.*, 1998; Ortolani y Castro, 2003J. La frecuencia de diarrea asociada a *Cryptosporidium* spp es baja en las primeras semanas, en comparación con la 2 y 3 semana aumenta de manera significativa y después disminuye significativamente hasta los 60 días.

Analizando los resultados obtenidos, la susceptibilidad a *Cryptosporidium* varia de acuerdo a la edad, y a otros factores de riesgo atribuyendo a la expansión de la infección, alterando la mucosa intestinal en becerros de mayor edad. La ausencia de críptosporidiosis en la primera semana coincide con la ingestión precoz de calostro (Ortolani y Castro, 2003). Mientras que Emre menciona que *E. coli*, *Rotavirus* contribuye a la asociación con *Cryptosporidium* para la presentación de la diarrea en becerros.

Ortolani y Castro (2003) mencionan que el grado 1 se presenta en animales asintomáticos o prepatentes, mientras que los grados 1 y 2 predominaron en becerros con diarrea. Mientras Emre (1998) observo que en los grados +, ++, +++ se presentaron mas frecuentemente entre los 20 días y 5 meses de edad.

En nuestro estudio se observa la intensidad de eliminación Grado 1 (+) o incipiente, se detecta en forme similar por los grupos 1, 2, 3 y 4. El Grupo 2 no detecta animales con infecciones Grado 2 (++) o leve, a diferencia con lo grupos 1, 3 y 4, por lo cual esta técnica de conteo no es útil para el propósito de medir la intensidad de excreción de Criptosporidios. En la intensidad de eliminación Grado 3 (+++) o moderada, el Grupo 3 tienen una tendencia a sobre estimar la severidad de la infección debido a que se utiliza el objetivo de 100X aumentos y esto contrasta con los Grupos 1 y 4, ya que mientras el Grupo 3, el Grado 3 severo, es para el grupo 1 es moderado y para el Grupo 4 es leve. En el caso del grupo 4 el grado 5 (+++++), no es necesario ya que la severidad clínica se refleja desde el Grado 4.

8. CONCLUSIONES

Considerando este análisis, el mejor método para conocer la intensidad de eliminación de ooquistes de *C. parvum* acuerdo a los resultados descritos es el Grupo 1 ya que detecta bien los grados de infección incipiente (+), leve (++) , moderada (+++) y severa (++++) (Otolani y Castro, 2003).

La comparación entre los criterios de evaluación nos da una pauta para hacer un muestreo de un solo hato con antecedentes de positivo a *Cryptosporidium* para hacer un estudio de identificación y evaluación la intensidad de excreción de ooquistes con el fin de comparar los criterios a fin de tener información en que grado ocurren la mayoría de las muertes en becerros.

9. LITERATURA CITADA

1. Akiyoshi, D.E., Feng, X., Buckholt, M.A., Widmer, G. y Tzipori, S. 2002. Genetic analysis of a *Cryptosporidium parvum* human genotype 1 isolate passaged through different host species. *Infect. Immun.* 70:5670-5675.
2. Anderson B.C. 1998. Cryptosporidiosis In bovine and human health. *J Dairy Sci:* 81:3036-3041.
3. Anusz, K.L., Masón, P.H., y Lance, E.P. 1990. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in bovine feces by monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol:* 28 (12): 2770-2774.
4. Arlan, M.Z. y Yunus. 2001. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in diarrhoeic calves in Turk. *J VetAnim Se:* 133 (3); 161-164.
5. Bednarska, M. Bajer, A y Sinski, E. 1998. Calves as a potential reservoir of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* spp. *Ann Agrie Environ Med:* 5 (2): 135-138.
6. Clark, D.P. 1999. New insights into human cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol Rev.* 12(4): 554-563.
7. Current, W.L. y García, L.S. 1991. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiolo Rev;* 4; 325-358.
8. Current, W.L., Upton, S.J. y Haynes T.B. 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (*Apicomplexa, Cryptosporidiidae*) infecting chickens. *J. Protozool.* 33:289-296.

9. Díaz de Ramírez, Ramírez, I., Nelson, L, Magali, R. y Román, R. 2002. Excretion of *Cryptosporidium* spp. oocysts during post-parturient, in crossbred cows of dual-purpose. *Revista Científica*. 12; 614-616.
10. Dirk, C.D., Vanopdenboscha G.E., Ortega-Mora, L.M. y Hayet, A.C. 1999. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals parasitologie. *Aveterinary and Agrochemical*. 99: B-1180.
11. Emre, Z., Alabay, B.M., Duzgun, A.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. *J. of Veterinary and Animal Sciences*: 453-457.
12. Fayer, R, Trout, J.M. 2000. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on three Maryland farms. *Vet. Parasitol*. 93:103-112.
13. Fayer, R. 1994. Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium* oocysts in water. *Environ. Microbiol*. 60: 2732-2735.
14. Fayer, R. 1997. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *CRC science*. (1): 1-166.
15. Fayer, R. y Ungar, B.L.P. 1986. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiological Rev*: 50: 458-483.
16. Hansen, J.S y Ongerth, J.E. 1991. Effects of time and watershed characteristics on the concentration of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *Appl. Environ. Microbio*]. 57:2790-2795.

17. Harp, J.A. y Goff, J.P. 1998 Strategies for the Control of *Cryptosporidium parvum* Infection in Calves. *J Dairy Sci.*: 81: 289-294.
18. 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.
19. Hunt, E., Qiang, F., Armstrong, M.U. y Derralyn, K. 1998. Oral Bovine Serum Concentrate Improves Cryptosporidial enteritis In Calves. *Pediatric Research*. 51(3): 370-376.
20. Kehl, K.S., Cicirello, H. y Havens, P.L. 1995. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *J Clin Microbiol*. 33 (2): 416-414.
21. Kuczynska, E., Shelton, D.R., y Pachepsky, Y. 2005. Effect of bovine manure on *Cryptosporidium parvum* oocyst attachment to soil. *Applied and Environmental Microbiology*; 71 (10): 6394-6397.
22. Mackenzie, W., Hoxie, N.J., Proctor, ME., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Rose, J.R y Davis, J.P. 1994. Massive outbreak of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med* 331:161-167.
23. Marshall, M.M., Naumovitz, D., Ortega, Y y Sterling. 1997. CR Waterborne protozoan pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 10(1): 67-85.
24. McCole, D.F., Eckmann, L, Laurent F. y Kagnoff, M.F. 2000. Intestinal epithelial cell apoptosis following *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun*. 68(3): 1710-1713.

25. Moon, H. y Woodmansee, D.B. 1986. Cryptosporidiosis. *J. Am. Vet. Assoc.* 120 (6); 500-510.
26. Morgan-Ryan U.M., Fall, A, Ward LA, Hijjawi, N, Sulaiman, I, Fayer, R, 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J Eukaryot Microbiol.* 49:433-440.
27. Morrissette, N.S. y Sibley, L.D. 2002. Cytoskeleton of apicomplexan *Parasites*. *Microbio! Molecular Biol.* 66; 21-38.
28. O'Donoghue, P.J. 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int J Parasitol.* 25(2): 139 - 195.
29. Ortega, M.L.M., Gómez, B.M. y Rojo, V.F.A. 1999. Parasitología veterinaria. España, McGraw - HUI interamericana.
30. Ortega-Mora, LM. y Wright, S.E. 1994. Age-Related Resistance in Ovine Cryptosporidiosis: Patterns of Infection and Humoral Immune Response. *Infect Immun.* 62 (11): 5003-5009.
31. Ortolani, E. y Castro, S.P. 2003. Aspectos epidemiológicos de la criptosporidiosis en becerros de rebaños lecheros. *Parasitol Latinoam* 58: 122-127.
32. Parisi, M.T. y Tierno, P.M. 1995. Evaluation of newrapid commercial enzyme immunoassay for detection of *Cryptosporidium* oocysts in untreated stool specimens. *J Clin Microbio:* 33 (7): 1963-1965.
33. Pedraza-Diaz, M.J., Amar, C.S. y Nichols, G.L 2000. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from

humans and 105 fecal samples from livestock animals. *J. Clin. Microbiol*: 38:3984-3990.

34. Quílez, C.J., Sánchez, A.C., Del Cacho, M.E. y López, B.F. 1996. Prevalence of *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragón. *Vet. Parasitol*: 67: 83-88.
35. Reynolds, D.J., Morgan, J.H. y Charter, N. 1986. Microbiology of calf diarrhea in Southern in Britain. *Vet Rec*: 119: 34-39.
36. Riggs, M.W., Schaefer, D.A., Kapil, S.J., Barley-Maloney, L. y Perryman, L.E. 2002. Efficacy of monoclonal antibodies against defined antigens for passive immunotherapy of chronic gastrointestinal cryptosporidiosis. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*: 46: 275-282.
37. Robertson, L.J., Campbell, A.T. y Smith, H.V. 1992. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Applied and Environmental Microbiology*: 58; 3494-3500.
38. Rochelle, P.A., De León, R., Johnson, A., Stewart, M.H, Wolfe, R.L. 1999. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts from environmental samples. *Appl Environ Microbiol*: 65: 841-845.
39. Rodríguez V.R.I. 2004. Enfermedades de importancia económica en producción animal. *Me Graw HUI*: 102-105.
40. Spano, F., Putignani, L, Mclauchlin, J., Casemore, D., y Crisanti, A. 1997. PCR-RFLP Analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) *C. parvum* Isolates of human and animal origin. *Microbiol*. 150:209-217.

41. Sweitzer, A.R., Pereira, R.A., Gardner, I.A., Van, V.D., y Boyce, W.M. 1997. Prevalence of and associated risk factors for shedding *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* cysts within feral pig populations in California. *Appl Environ Microbiol*: 63: 3946-3949.
42. SYSTAT 2000. User's guide: Versión 10 SAS institute., Inc, Cary, NC.
43. Weber, R., Bryan, R.T., Bishop, H.S., Wahlquist, S., Sullivan, A., y Juranek, J. 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.
44. Widmer, G., Tzipori, S., Fichtenbaum, C.J., y Griffiths, J.K. 1998. Genotypic and phenotype characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates from people with AIDS. *J. Infect Dis.* 178:834-840.
45. Xiao, L., Bern, C., Limor, I., Sulaiman, Roberts, J., Checkley, L., Cabrera, R.H. y Gilman, A. A. 2001. Identification of 5 Types of *Cryptosporidium* Parasites in Children in Lima, Perú. *Journal of Infectious Diseases*. 183: 492-497.
46. Xiao, L., Limor, J., Morgan, U., Sulaiman, I.M., Thompson, R.C, y Lal, A.A. 2000. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. *Environ. Microbiol.* 66:5499-5502.
47. Xiao, L.H., Escalante, L., Yang, C.F., Sulaiman, I., Escalante, A. A., Montali, R.J., Fayer, R., y Lal, A.A., 1999. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1578-1583.

48. Xiao, L.H., Morgan, U.M., Limor, J, Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R. C. A, Fayer, R., y Lal, A.A. 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol*: 65:3386-3391.
49. Xiao, L.R., Fayer, U., Ryan, y Steve, J. 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Society For Microbiology*. 17: (1): 72-97.