

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Aislamiento e identificación de *Cryptosporidium* spp. por PCR en becerras lecheras lactantes de la comarca lagunera

POR

Eva María Castañeda Torres

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA

OCTUBRE DE 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**Aislamiento e identificación de *Cryptosporidium* spp. por PCR en becerras
lecheras lactantes de la Comarca Lagunera**

POR

EVA MARÍA CASTAÑEDA TORRES

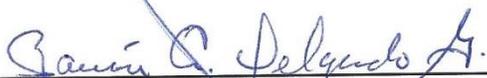
TESIS

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

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR

PRESIDENTE:


DR. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

VOCAL:


DR. FERNANDO ULISES ADAME DE LEÓN

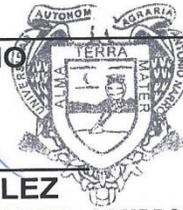
VOCAL:


M.C. OLIVIA GARCÍA MORALES

VOCAL SUPLENTE:


M.C. ARACELY ZÚNIGA SERRANO


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



TORREÓN, COAHUILA

OCTUBRE DE 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Aislamiento e identificación de *Cryptosporidium* spp. por PCR en becerras
lecheras lactantes de la Comarca Lagunera

POR

EVA MARÍA CASTAÑEDA TORRES

TESIS

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

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR

ASESOR PRINCIPAL:


DR. RAMÓN ALFREDO DELGADO GÓNZALEZ

ASESOR EXTERNO:


M.C. SUSANA FLORES VILLALVA


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



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA

OCTUBRE DE 2017

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Toño y Eva Torres, que siempre me apoyaron incondicionalmente en todos los ámbitos para poder llegar a ser una profesional.

A mi asesor el Doctor Ramón Alfredo Delgado González, por el apoyo en la realización de este trabajo y en toda la carrera como maestro y amigo, por todos sus consejos y enseñanzas.

A la M.C. Susana Flores Villalva por su asesoramiento externo, para que este trabajo se realizara satisfactoriamente.

A mis hermanos Dulce y Edgar, y demás familia en general por el apoyo que siempre me brindaron día a día en el transcurso de mi carrera universitaria.

A mis amigos, por estar conmigo 5 años y vivir muchas experiencias bonitas.

A mi Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por brindarme las posibilidades de capacitarme y estudiar una carrera, por medio de mis maestros que son una base elemental para cumplir nuestras metas. **ALMA TERRA MATER**

DEDICATORIA

A mi Tío Martin Torres, que aunque no esté presente físicamente, él estuvo y estará siempre conmigo apoyándome.

A mis sobrinas, Nathalia e Isabella, porque son mi fuente de motivación e inspiración para ser mejor persona y seguir adelante cada día.

RESUMEN

La criptosporidiosis es una enfermedad causada por el parásito protozoario *Cryptosporidium spp.*, el cual se encuentra distribuido en todo el mundo y afecta a animales recién nacidos. Los microorganismos se desarrollan y se multiplican en las células epiteliales del aparato digestivo produciendo diarrea y, por lo tanto, grandes pérdidas económicas. El presente trabajo de investigación se realizó con la finalidad de observar *Cryptosporidium spp.* en heces frescas de becerras Holstein lactantes con diarrea, utilizando la técnica de ZNm para la identificación de los ooquistes y PCR para la caracterización genotípica de *C. parvum*, en establos lecheros de la Región Lagunera. Se evaluaron un total de 850 muestras de heces de becerras lactantes con una edad de 1 a 35 días, se encontraron 561 (66%) muestras positivas con la técnica de ZNm y se tomaron 100 de éstas con una intensidad de excreción de ooquistes grado 4 (> 40 ooquistes/25 campos/40X), las cuales se analizaron por el método de PCR utilizando cebadores para *C. parvum*. El resultado fue tomado mediante electroforesis en gel de agarosa, el cual arrojó un 75% de muestras positivas a *C. parvum*. Los resultados sugieren una alta prevalencia de *C. parvum*, por lo cual es necesario analizar las mismas muestras para identificar otras criptosporidias que pudieran afectar a las becerras.

Palabras clave: *Cryptosporidium parvum*, becerras Holstein, Ziehl Neelsen modificada, PCR, Comarca Lagunera.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA	II
RESUMEN	III
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	¡Error! Marcador no definido.
2.1. Consideraciones generales.....	2
2.2. Criptosporidiosis en México.....	4
2.3. Biología molecular de criptosporidiosis.....	5
III. JUSTIFICACIÓN	¡Error! Marcador no definido.
IV. OBJETIVOS	¡Error! Marcador no definido.
4.1. Objetivo General.....	¡Error! Marcador no definido.
4.2. Objetivos específicos.....	¡Error! Marcador no definido.
V. MATERIAL Y MÉTODOS	14
5.1. Marco de referencia.....	¡Error! Marcador no definido.
5.2. Toma de muestras.....	¡Error! Marcador no definido.
5.3. Detección de ooquistes.....	¡Error! Marcador no definido.
5.4. Purificación de ooquistes.....	¡Error! Marcador no definido.
5.5. Extracción de ADN.....	16
5.6. Amplificación de una pequeña subunidad del gen ARN Ribosomal (SSU rRNA).....	177
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	¡Error! Marcador no definido.8
VII. CONCLUSIONES	¡Error! Marcador no definido.21
VIII. LITERATURA CITADA	222

I. INTRODUCCIÓN

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria producida por el protozoo *Cryptosporidium spp.*, organismo que se desarrolla y multiplica en las células epiteliales del aparato digestivo de vertebrados. Produce una infección entérica que se manifiesta con diarrea aguda y profusa que solo se observa en humanos y ruminantes (Tzipori y Griffiths, 1998). Si la diarrea se vuelve persistente, puede causar la muerte del huésped (Shing, y col., 2011). El conocimiento de la procedencia de los parásitos que causan criptosporidiosis en las becerras es esencial para el control de la enfermedad, ya que ésta es una de las principales causas de la diarrea de las becerras y produce grandes pérdidas económicas.

El género *Cryptosporidium* pertenece a la familia *Cryptosporiidae*, el orden *Eucoccidiida*, la clase *Sporozoa*, el Phylum Apicomplexa y se encuentra en el tracto intestinal del hombre y varias especies de animales y ocasionalmente en el sistema respiratorio de las aves (Kageruka y col., 1984). *Cryptosporidium spp* es un parásito intracelular y extracitoplasmático, entérico obligado, y es una importante causa de enfermedades diarreicas en el mundo. El modo de infección es por vía fecal-oral, en alimentos y agua, y es iniciada cuando los esporozoitos son liberados de los ooquistes, estos se fijan al tracto intestinal e invaden a las células epiteliales de la mucosa (Hashim y col., 2006).

La importancia y prevalencia de *Cryptosporidium* en becerras lecheras, en la Comarca Lagunera, ha sido documentada, sin embargo el estudio de las especies no, ya que el diagnóstico se ha realizado por la técnica de Ziehl Neelsen modificada (ZNm), por lo cual es de gran importancia realizar la identificación, sobretodo de *C. parvum*, ya que es un organismo de interés en salud pública debido a su carácter zoonótico y ha sido identificado con frecuencia en bovinos, en los cuales constituye uno de los principales agentes etiológicos de la diarrea neonatal (Araujo y col., 2011).

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Consideraciones generales

La principal fuente de contaminación de los animales susceptibles es el agua, ya que se han realizado estudios que mencionan que el 10% de las infecciones pueden ser transmitidas de individuo a individuo y la mayoría de las ocasiones es debido a la contaminación del agua potable (Eisenberg y col., 2005). La prevalencia e intensidad de infecciones por *Cryptosporidium spp* en becerras lecheras, varían de 20 a 84% e indican que estos son parásitos comunes en las lecherías (Lassen y col., 2009).

Las manifestaciones patológicas de criptosporidiosis son más frecuentes en animales lactantes de 1 a 3 semanas, aunque eventualmente los animales afectados se pueden encontrar entre las 6 y 12 semanas de edad (Harp y col., 1990). La frecuencia de criptosporidiosis detectada es relativamente baja en becerras con diarrea en la primera semana pero se incrementa considerablemente la segunda semana para disminuir hasta los 45 días de edad, por lo tanto, la susceptibilidad a *Cryptosporidium* varía de acuerdo con la edad y a otros factores de riesgo que causen la diseminación de la infección, además, las infecciones mixtas con *E. coli* y Rotavirus, contribuyen en asociación con *Cryptosporidium* la presentación de diarrea en becerras, con más severidad (Harp y col., 1989; Nussbaum y col., 1999).

Se han publicado varios criterios para medir la intensidad de eliminación de *Cryptosporidium spp* en heces (Bednarska y col., 1998; Ortolani y Castro, 2003; Emre y col., 1998; Espinoza-Vargas, 2007). Al respecto, la literatura está muy limitada sobre estas comparaciones de excreción, lo importante en este caso es encontrar una relación entre los grados de intensidad de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium spp*, y los grados de infección.

El primer caso de aislamiento de *Cryptosporidium* en ganado bovino fue en un becerro con diarrea en 1971 (Panciera y col., 1971). Desde entonces, han habido numerosos reportes de criptosporidiosis en diferentes países y regiones (Chen y Huang, 2012), incluyendo infecciones en humanos.

Las especies que han sido identificadas en bovinos, incluyen *C. parvum*, *C. bovis* (Fayer y col., 2005), *C. andersoni* (Feng y col., 2011), *C. ryanae*, *C. felis*, *C. hominis* (Smith y col., 2005), *C. suis*, *Cryptosporidium* genotipo ciervo (Fayer y col., 2006), *Cryptosporidium* genotipo *suis* y *Cryptosporidium* porcino genotipo II (Langkjaer y col., 2007). Sin embargo, las primeras cuatro especies (*C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* y *C. ryanae*), son las principales responsables de criptosporidiosis bovina (Maikai y col., 2011; Šlapeta, 2011).

C. parvum coloniza el intestino delgado, es un parásito protozoario omnipresente que comúnmente infecta a los terneros neonatos, en ocasiones acompañado por depresión, inapetencia, fiebre, deshidratación y pobre condición corporal (Björkman y col., 2003), en las primeras semanas de vida. La condición puede representar un problema significativo en granjas donde la prevalencia de la infección es alta, con pérdidas económicas debido al aumento de los costos de tratamiento y ocasionalmente por la mortalidad. *C. parvum* en terneros es también de importancia zoonótica, con infecciones en personas adquiridas por contacto directo con animales infectados o por la ingestión de ooquistes por agua contaminada o alimentos (Trotz-Williams y col., 2005). En bovinos adultos también ha sido reportada esta especie causando una enfermedad que generalmente cursa en forma subclínica y presenta bajos niveles de infección (Fayer y col., 1998; Singh y col., 2006).

Existen evidencias de lesiones que ocurren en intestino delgado, y ocasionalmente en el ciego y el colon, consistentes en atrofia y fusión de vellosidades, dilatación de las criptas, e infiltración de la lámina propia con neutrófilos, además de presencia de ooquistes de criptosporidias en la superficie epitelial (Angus y col.,

1982). Sin embargo, en bovinos infectados natural y experimentalmente se han detectado grandes cantidades de ooquistes en sus excretas sin que haya una demostración de signos clínicos y el periodo infeccioso es más frecuente entre el primer y segundo mes de edad (Iseki y col., 1989, Atwill y col., 1999).

La prevalencia de criptosporidiosis en becerras lactantes de 1 a 30 días de edad, es generalmente elevada, frecuentemente mayor al 65%, observándose la mayor frecuencia entre los 7 y 21 días de edad (Delgado, 2007). La criptosporidiosis produce un significativo impacto económico debido a los costos de gastos médicos y a las pérdidas en la productividad (Xiao y col., 2004).

2.2. Criptosporidiosis en México

Estudios realizados en Delicias, Chihuahua, muestran criptosporidiosis en becerras con diarrea con una edad promedio de 14 días y rangos de 1 a 35 días. El 40.54% de las becerras con diarrea se han observado positivas a la infección en un 84.61% de los establos examinados (Trujillo-Guerrero, 2011).

En Cuauhtémoc, Chihuahua, la edad promedio observada en becerras con diarrea debido a criptosporidiosis es de 7 días con rangos de 1 a 21 días. Se ha encontrado el 60.9% de las muestras positivas a la presencia de ooquistes en 62.5% de los establos estudiados (Arreola-Hernández, 2011).

En Tijuana, Baja California la edad promedio de las becerras con diarrea debido a *Cryptosporidium* spp es de 11 días con rangos de 4 a 31 días. Se ha observado que el 65.15% de las muestras de heces, han sido positivas a la presencia de ooquistes en el 100% de los hatos estudiados (Mendoza-Delgado, 2010).

En todas las regiones los rangos de infección varían de 10 a 85% de becerras con diarreas y los animales más afectados estuvieron dentro de los 7 a 21 días de edad. Otros resultados obtenidos de estudios de diagnóstico de diarrea en

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

2.3. Biología molecular de criptosporidiosis

Desde 1977 se han descrito diversos trabajos de investigación para intentar de detectar, identificar y/o cuantificar parásitos y organismos patógenos, mediante pruebas de ADN, y se han publicado un sinnúmero de revisiones sobre el tema. En el caso de la criptosporidiosis, hasta hace poco, no había una prueba de oro para el diagnóstico y detección de criptosporidiosis bovina. La infección suele ser mayor en becerros de 2 semanas de edad, los cuales excretan un alto número de ooquistes. Estos factores pueden dar lugar a variaciones en la sensibilidad y especificidad de las diversas pruebas diagnósticas utilizadas para detectar la infección en terneros de varias edades (Waele y col., 2011).

A pesar de esto, sólo unas pocas pruebas basadas en el ADN para las enfermedades parasitarias están disponibles rutinariamente, y la mayoría de estos son pruebas opcionales utilizadas de vez en cuando en el diagnóstico de enfermedades (Hunt, 2011).

Es muy importante desde la perspectiva de salud pública, identificar las especies de *Cryptosporidium* que comúnmente infectan el ganado, ya que sólo *C. parvum* es considerado zoonótico (Santin y Zarlenga, 2009). El diagnóstico de laboratorio de la criptosporidiosis en el hombre, tanto clínico como epidemiológico requiere un

conocimiento de su naturaleza, historia y patogénesis; la biología y éstas características de la infección han sido revisados en detalle (Brook y col., 2008).

Cryptosporidium spp. es la causa principal de diarrea y enfermedad gastrointestinal de origen protozooario en terneros neonatales. Muchos estudios coprológicos se han descrito, técnicas serológicas para la detección de los parásitos con limitaciones de sensibilidad y especificidad (Paul, y col., 2009).

La investigación biológica, incluida en la investigación epidemiológica, hace el uso más amplio de diagnósticos basados en el ADN, proporcionando parásitos y directrices para el manejo de enfermedades parasitarias. A pesar de la limitada aceptación de pruebas basadas en el ADN hasta la fecha, no hay duda de que ofrecen gran potencial no sólo para detectar, identificar y cuantificar los parásitos, sino también para información importante para la implementación de estrategias de control de parásitos (Hunt, 2011).

La identificación de especies del género *Cryptosporidium spp* basadas en técnicas como la morfometría son poco fiables, esto hace necesario el uso de técnicas más depuradas y específicas para la identificación de especies, para la detección de *Cryptosporidium spp* en heces mediante el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Cordón y col., 2005). La PCR cuantitativa en tiempo real demostró ser la prueba más sensible y específica para detectar la infección independientemente de la edad del ternero (Waele y col., 2011).

Aunque la PCR es principalmente el método más sensible para la detección, su uso requiere atención al posible aumento de falsos positivos cuando las PCR no están estandarizados (Helmy y col., 2014). Los métodos de PCR se han utilizado ampliamente, pero se utilizan principalmente en la investigación (Magi y col., 2006).

Diferentes técnicas de PCR son una alternativa útil para el diagnóstico convencional de *Cryptosporidium spp* de muestras clínicas y ambientales (Paul y col., 2009), ya que tienen el potencial de abordar muchas de las limitaciones de métodos tradicionales y se introducen frecuentemente en estudios previos para el género o la detección específica de la especie (Li y col., 2010). En cuanto a la detección de los organismos a nivel tanto microscópico como inmunológico, la PCR tiene un límite de detección de hasta un ooquiste por muestra y puede asegurar un diagnóstico específico hasta el nivel de especie con un 100% de sensibilidad y especificidad diagnóstica, tanto en humanos como en bovinos (Paul y col., 2009; Hussein, 2011; Sungur y col., 2008).

La sensibilidad de la PCR tanto para muestras clínicas como ambientales se ve afectada por la presencia de inhibidores existentes en muestras fecales que pueden minimizarse con cambios en la extracción (Goncalves y col., 2008). Hay una extensa variación genética dentro del género *Cryptosporidium* con al menos 23 especies de consideradas como válidas por la mayoría de los investigadores, éstas especies son colectivamente encontradas en humano, ratón, bovino, cerdo, borrego, caballo, cabra, gato, perro, canguro, pollo, pavo, peces, hurón, lagartos, tortuga, mono y venado (Fayer, 2010; Traversa, 2010).

Dos de los géneros de *Cryptosporidium*, *C. hominis* y *C. parvum*, son responsables de la mayoría de los casos de criptosporidiosis en humanos. *C. parvum* ha sido implicado como una de las causas de criptosporidiosis en algunas poblaciones de ganado bovino. Las diferencias moleculares y biológicas fueron la base para la clasificación y diferenciación de las especies de *Cryptosporidium* que infectan a los seres humanos y animales (Hussein, 2011). Además los bovinos jóvenes presentan *C. bovis* mientras que los adultos también muestran ooquistes de *C. andersoni* siendo una fuente de infección para los terneros en la dinámica de transmisión entre y dentro de las granjas (Brook y col., 2009; Wang y col., 2011a).

La identificación presuntiva de *Cryptosporidium* puede llevarse a cabo mediante distintas técnicas de tinción como Kinyoun (Harrington, 2009), Auramina (Luján y Garbossa, 2008), para la identificación de género se pueden utilizar técnicas de detección de antígenos como inmunofluorescencia (Xiao y Herd, 1993) o enzimoimmunoensayos (Polage y col., 2011). Sin embargo, la identificación de especie requiere del uso de técnicas moleculares (Wang y col., 2011b), debido a que hay diferencias morfométricas de los ooquistes y una baja especificidad de huésped de las especies del género *Cryptosporidium* (Chen y Huang, 2012). Por tal motivo se han desarrollado varias técnicas moleculares para la identificación de las diferentes especies y genotipos del género *Cryptosporidium*, utilizando alguna región del genoma, dependiendo de la finalidad de los estudios. *Cryptosporidium* es un organismo que presenta un genoma moderadamente compacto con una densidad de aproximadamente un gen por 2 Mb (Fraser-Liggett, 2005).

El tamaño tan pequeño de los ooquistes de *Cryptosporidium* hace que en el examen microscópico se vean similares en muchas especies de *Cryptosporidium*. Para superar estas limitaciones, la identificación y diferenciación de *Cryptosporidium* es comúnmente logrado mediante enfoques moleculares (Power y col., 2011). Para determinar las especies de *Cryptosporidium* se han utilizado genes de baja variabilidad como el gen de la subunidad menor del ARN ribosomal (ARNr 18S), con fragmentos de ~830 pb a 849 pb, utilizando pruebas de reacción en cadena de la polimerasa – polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) de extractos de ADN de ooquistes y una proteína de la pared del ooquiste (COWP), usando enzimas de restricción SspI y MboI (Wang y col., 2011b). Además, con pequeñas cantidades de parásitos, no detectados por microscopía, la PCR anidado con cebadores internos ARNr 18S, son capaces de reconocer la infección (Kuzehkanan y col., 2011). También se han realizado aislamientos de ADN de heces y agua y se ha amplificado la región genómica 18S rDNA de *Cryptosporidium*, sometidos a electroforesis en un gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio (Husseini, 2011). Otro gen estudiado es la secuencia del nucleótido de la proteína de choque térmico de 70 KDa (HSP-70) el cual

proporciona otro lugar útil para el análisis filogenético del género *Cryptosporidium* (Sulaiman y col., 2006).

Otras regiones de moderada variabilidad utilizadas también, han sido los genes de la β -tubulina por medio de análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de aislamientos de *C. parvum*, los cuales permiten conocer dos subgrupos llamados H y C (Widmer y col., 1998). Los genes TRAP (C1, C2 y C4) han sido utilizados para identificar ADN de *Cryptosporidium* por medio de la PCR, detectando al parásito a partir de heces diarreicas de bovinos, y para esclarecer el papel de éstos en la diseminación y brotes de criptosporidiosis por contaminación del agua (Leng y col., 1996). Las regiones intergénicas ITS-1 e ITS-2 son utilizadas para analizar genéticamente por secuencia de la región variable en el gen 18S ARNr (Tiangtip y Jongwutiwes, 2002).

Con la caracterización molecular del parásito *Cryptosporidium* se ha hecho posible diferenciar ooquistes identificando especies, genotipos y niveles de subgenotipos. Una de estas herramientas está basada en el análisis de la secuencia del gen glicoproteína 60-kDa (GP60), el cual permite la identificación de muchas familias de genotipos y subgenotipos dentro de cada uno (Sulaiman y col., 2006). Este gen se expresa durante la fase de merogonia para producir un precursor de GP60, el cual se escinde proteolíticamente en productos de glicoproteína de 15- y 45-kDa localizada tanto en la superficie de esporozoitos y merozoitos. El gen gp15/45/60 muestra un grado muy alto de diversidad de secuencias entre aislamientos de *C. parvum*. Este gen es de utilidad para la toma de huellas digitales de los aislamientos, y para establecer una significativa relaciones entre genotipo y fenotipo de *C. parvum* (Strong y col., 2000).

Actualmente una de las herramientas de subtipificación utilizados más comúnmente se basa en el análisis de la secuencia de éste gen GP60, el cual es el más adecuado y extensamente usado como marcador genético para especies de *Cryptosporidium* que infectan a humanos, ya que permite la identificación de

subtipos de familias dentro de *C. parvum*, así como varios subtipos (alelos) dentro de cada familia (O'Brien y col., 2008). Este locus es útil para éste tipo de estudios ya que contiene múltiples regiones con la más alta resolución como un marcador único para subtipificar aislamientos de *C. parvum* que muestran altos índices de mutación, incluyendo en particular, una región microsatélite "hipervariable" (Strong y col., 2000; Chen y Huang, 2012). El entendimiento de los subgenotipos de *C. hominis* y *C. parvum* puede aportar pistas sobre los mecanismos de infección de estos organismos y sentar las bases científicas para la eficacia de las modalidades terapéuticas (Feng y col., 2007).

En general, hay once familias del genotipo GP60 encontradas en *C. parvum*. Las familias genotipos IIa y IIb son zoonóticas ya que estas dos han sido identificadas que infectan humanos y animales. Las familias genotipo IIc y IId son también comunes y ampliamente distribuidas. A la fecha, *C. hominis* comprende seis familias genotipo GP60 definidas (Ia-Ig; excluyendo Ic, la cual aún no está definida) (Hira y col., 2010).

Estudios del gen GP60 han demostrado que ciertas familias de genotipos están geográficamente relacionadas, comúnmente se encuentran las familias de genotipos Ia, Ib, Id y Ie (Strong y col., 2000).

El análisis de la secuencia del gen GP60 revela que todos los aislamientos pueden pertenecer a subtipos GP60 en humanos (O'Brien y col., 2008). Esta observación es confirmada por los polimorfismos en algunos loci de microsatélites y además apoya la hipótesis de que la mayoría de los aislados de los terneros con diarrea tienen un gran potencial zoonótico ya que también han sido identificados en humanos y en ganado de Italia, los Países Bajos, Dinamarca, Australia y el Reino Unido (Leoni y col., 2007; Hunter y col., 2008).

Los satélites han sido usados para investigar la estructura genética y rastreo geográfico de *Cryptosporidium*, aunque la escasez de datos de secuencia para la

mayoría de los loci en base de datos internacional y la diversidad en técnicas usadas para amplificar el tamaño de los alelos tiene una muy limitada comparación entre diferentes estudios (Jex y col., 2008).

El polimorfismo de satélites ha sido evaluado mediante PCR, y los alelos encontrados han sido logrados por tipificación de secuencia de multilocus (Grinberg y col., 2008), electroforesis en gel de poliacrilamida, y electroforesis capilar automatizada (CE) con cebadores etiquetados, llamados tipificación de fragmentos de multilocus (Leoni y col., 2007). Esta última técnica ha demostrado ser útil para detectar poblaciones de parásitos mixtos en muestras individuales y es una alternativa económica para secuenciar, aunque fragmentos de igual longitud pero con sustitución de nucleótidos no son diferenciadas por este método. La mayoría de los análisis CE se han basado en el uso de etiquetas fluorescentes simples, lo cual reduce el número de marcadores que pueden ser analizados en una mezcla de reacción simple.

La herramienta del análisis de CE es muy útil para detectar infecciones mixtas en muestras individuales. Una potencial limitación de las herramientas de CE se relacionan con el hecho de que éstas no dan datos de la secuencia del ADN, lo cual sustancialmente limita la comparación de diferentes estudios (Jex y col., 2008).

Las ventajas de PCR incluyen mayor sensibilidad, costo relativamente bajo, rapidez en la detección de patógenos múltiples y la capacidad de discriminar entre las especies y las cepas si los cebadores adecuados son seleccionados. Sin embargo, la secuenciación también es costosa, requiere mucho trabajo, tiempo, y necesita un asistente de laboratorio para operar el secuenciador de ADN y hacer análisis de datos, lo que lo adapta para una respuesta diagnóstica rápida (Li y col., 2010).

III. JUSTIFICACIÓN

Dado el potencial patógeno de *Cryptosporidium spp* en becerros y la dificultad de remover e inactivar los ooquistes, una vez que éstos entran al suministro de agua en hatos lecheros, y considerando que la criptosporidiosis ha sido diagnosticada en becerras de la Comarca Lagunera, de 1 a 35 días de edad, es necesario caracterizar el comportamiento de los ooquistes de las criptosporidias encontradas, para un mejor entendimiento de la fuente, proceso de transporte, y destino de los ooquistes que, en última instancia, ayudará en el desarrollo de estrategias de manejo del agua para minimizar la contaminación y la exposición del parásito.

Además con el conocimiento de la enfermedad en la región es urgente realizar estudios complementarios sobre la identificación de *Cryptosporidium* patógenos para el hombre como *C. parvum*, debido al potencial zoonótico.

Se eligió la Comarca Lagunera debido a que cuenta con más de 360 establos lecheros con un promedio de 1,400 mil cabezas de ganado por hato, siendo alrededor del 10% becerras lactantes, las cuales son más susceptibles a la infección por *Cryptosporidium spp*, además de que la prevalencia de criptosporidiosis en la región es de entre 50 y 60%.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

- a) Identificar *Cryptosporidium spp* en heces de becerras Holstein lactantes con diarrea, de la Comarca Lagunera, por métodos moleculares.

4.2. Objetivos específicos

- a) Identificar *Cryptosporidium spp* en heces, utilizando la técnica de Ziehl Neelsen modificada.
- b) Identificar *Cryptosporidium parvum* en heces, positivas a criptosporidiosis con la técnica de ZNm, utilizando PCR.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. 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' longitud Oeste, y los paralelos 24° 22' y 26° 23' latitud Norte. La Laguna, como comúnmente es conocida ésta región, está integrada por 15 municipios: 10 del estado de Durango (Gómez Palacio, Lerdo, Tlahualilo, Mapimí, San Pedro del Gallo, San Luis del Cordero, Mapimí, Rodeo, General Simón Bolívar, San Juan de Guadalupe) y 5 del estado de Coahuila (Torreón, Matamoros, San Pedro de las Colonias, Francisco I. Madero y Viesca). Debe su nombre a los cuerpos de agua, o sea a las trece lagunas que existieron en el área, entre las que estaba la Laguna de Mayrán, que se alimentaba por los ríos Nazas y Aguanaval, hasta antes de la construcción de las presas Lázaro Cárdenas y Francisco Zarco, que en la actualidad regulan su afluente, por lo que las lagunas han desaparecido (Comarca Lagunera.com).

La Comarca Lagunera es una zona que se caracteriza por sus limitados recursos hídricos y por su clima seco templado. Esta región, que se localiza en la zona norcentral de México, en llanuras y planicies de una altitud media de 1.100 msnm, circundadas por cadenas montañosas de 2.800 a 3.700 msnm, consiste predominantemente en zonas áridas y semiáridas, donde por razones climáticas y de relieve se tiene de manera permanente un problema de baja o reducida disponibilidad de agua. La escasa precipitación y las características del terreno sólo favorecen la aparición de corrientes intermitentes y efímeras. Sólo los principales ríos tienen flujos permanentes (INEGI, 2005).

En la región se observan cuatro principales usos del agua, que en orden de importancia son: Agrario (89 %); público urbano (7 %); pecuario (2 %) e industrial

(2 %). Del total del volumen utilizado para satisfacer estas demandas, el 60,6 % se extrae del subsuelo mediante el aprovechamiento de los acuíferos

5.2. Toma de muestras

La presente investigación se realizó en la Comarca Lagunera, tomando una muestra de 20 hatos lecheros, los cuales fueron seleccionados aleatoriamente, realizando visitas entre junio y agosto del 2016. Las muestras se colectaron por única vez, del 100% de becerras de 0 a 35 días con signos clínicos de diarrea directamente del recto, mediante masaje rectal con el uso de guantes desechables y recipientes de plástico con tapa e inmediatamente fueron analizadas, en las próximas 24 horas después de la colecta.

5.3. Detección de ooquistes

La detección de ooquistes fecales de *Cryptosporidium spp* se llevó a cabo mediante la preparación de extendidos fecales a partir de cada muestra, y teñidas utilizando la técnica Ziehl Neelsen modificada. Los extendidos fecales fueron tratados con una solución de carbol fucsina (1 g de fucsina, 1 mL de etanol 96%, 5 ig de fenol, 95 mL de agua destilada) durante 30 minutos, se desteñeron con una solución al 1% de ácido clorhídrico- alcohol 70%, durante 1 minuto, se lavaron con agua corriente, y se contratiñeron con una solución de azul de metileno al 1% durante 5 min. Después de un lavado final con agua corriente, los extendidos se secaron a temperatura ambiente y se examinaron por microscopía de luz usando un lente con objetivo de 40X, para verificar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium*.

Se registraron las características de tinción de los ooquistes de acuerdo al tamaño, forma y promedio de ooquistes (rojo brillante) en 25 campos visuales con un aumento de 40X y se clasificaron de la siguiente manera: (+) de 1 a 10

ooquistes, (++) de 11 a 20, (+++) de 21 a 40, (+++++) más de 40 y (-) para ningún ooquiste (Espinoza-Vargas, 2007).

5.4. Purificación de ooquistes

Las muestras positivas fueron almacenadas a 4°C en una solución de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) al 2.5%. Para su purificación, cada muestra fue filtrada a través de un cedazo de malla de poro de 0.035 mm, para remover los residuos grandes, y el filtrado fue procesado dentro de 24 horas de la toma de muestras de la siguiente manera: El $K_2Cr_2O_7$ se eliminó mediante tres ciclos de precipitación con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS; 0.1 M, PH 7.4) y suspendida en PBS. Los ooquistes se aislaron a continuación, utilizando una solución saturada de sacarosa por la técnica de flotación (Scott y col.1995) y se purificó por gradiente de centrifugación discontinua con sacarosa (Thompson y col., 2007).

5.5. Extracción de ADN

Los ooquistes de *Cryptosporidium* fueron lavados tres veces con PBS y se suspendieron en 0.2 mL de agua destilada estéril antes de la extracción de ADN. El genoma de ADN fue extraído usando un protocolo que consiste en suspender el aglomerado (pelet) de ooquistes en DNAzol®, se agregan perlas de vidrio y se agita (vortexear), luego se incuba a 90°C, se agregan isopropanol, se vuelve a vortexear y se agrega etanol al 75%. El sobrenadante conteniendo ADN fue diluido en 25 µL de agua grado molecular y almacenado a -20°C antes de ser usada para el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa. El genoma de ADN fue extraído de una muestra negativa como control negativo (Chen y Huang, 2012).

5.6. Amplificación de una pequeña subunidad del gen ARN Ribosomal (SSU rRNA)

Se utilizó un protocolo de PCR anidado en dos etapas para amplificar un fragmento de 4430 pb del gen SSU rRNA usando cebadores F1 5'GATTAAGCCATGCATGTCTAAG-3' Y R1:5' TTCCATGCTGGAGTATTCAAG- 3' para PCR primario, y F2: 5' CAGTTATAGTTTACTTGATAATC- 3' Y R2: CCTGCTTTAAGCACTCTAATTTTC-3' para el PCR secundario. La PCR se llevó a cabo en un volumen de 25 μL conteniendo 1 μL (10 $\text{ng}/\mu\text{L}$) de ADN genómico, 1 μL de cada cebador, 12.5 μL de My Taq mix® (polimerasa), y 9.5 μL de agua libre de nucleasas. El primer paso del programa de PCR incluyó 30 ciclos, desnaturalización 94°C 50 seg, templar cebadores 53°C 50 seg, y extensión de cebadores 72°C por 1 min, y el segundo paso de PCR incluyó 30 ciclos (94°C 50 seg, 58-60°C 50 seg, y 72°C por 1 min), usando el producto de ADN del primer paso como plantilla (Lindergard y col., 2003).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluaron un total de 850 muestras de heces de becerras lactantes con una edad de 1 a 35 días, de 20 establos lecheros, y se encontraron 561 (66%) muestras positivas con la técnica de ZNm, se tomaron 100 de éstas muestras con una intensidad de excreción de ooquistes grado 4 (>40 ooquistes/25 campos/40X), las cuales se analizaron por el método de PCR utilizando cebadores para *C. parvum*. El resultado fue tomado mediante electroforesis en gel de agarosa, el cual arrojó un 75% de muestras positivas (Figura 1).

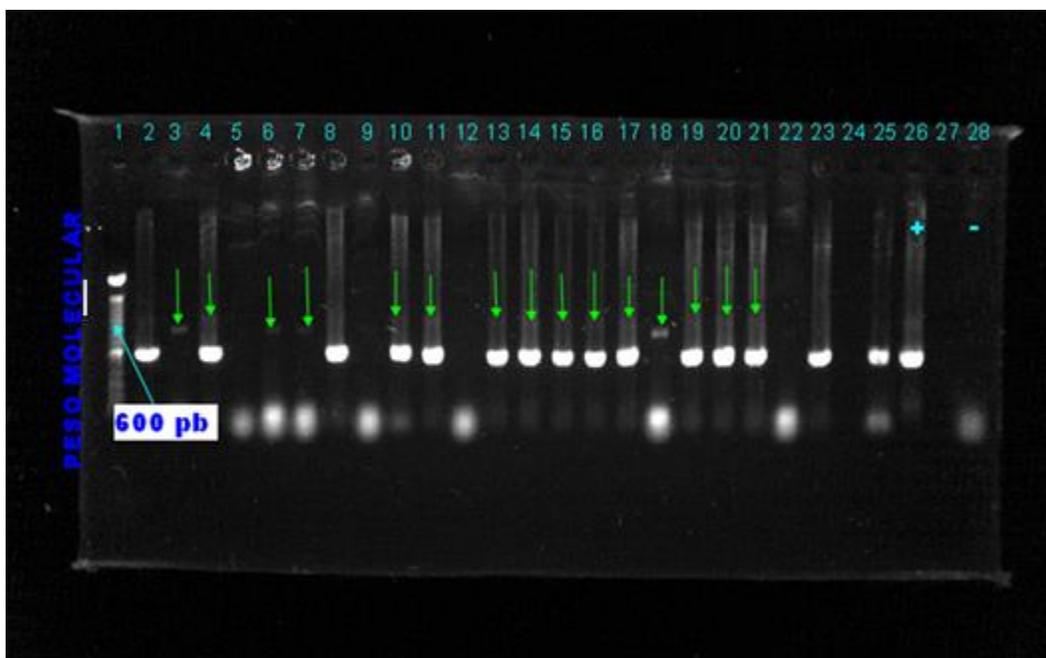


Figura 1. Resultados de la PCR en gel agarosa para la identificación de *Cryptosporidium parvum*

El criterio tomado en nuestros estudios ha sido aplicado con muy poca variación en la interpretación, ya que se observaron 25 campos a 400 aumentos y se graduaron en negativo, grado 1 de 1 a 10 ooquistes, grado 2 de 11 a 20 ooquistes, grado 3 de 21 a 40 ooquistes, y grado 4 con más de 40 ooquistes. Algunos investigadores comentan que el grado 1 se presenta en animales asintomáticos o prepatentes, mientras que los grados 2 a 4 predominan en becerros con diarrea.

Podemos entonces inferir que entre los grados de intensidad de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp, se detectan los grados de infección en forma. incipiente (grado 1), leve (grado 2), moderada (grado 3) y severa (grado 4) (Bednarska y col., 1998; Ortolani y Castro, 2003; Emre y col., 1998; Espinoza-Vargas, 2007).

Las muestras estudiadas por la técnica de ZNm arrojaron un 100% positivas a la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., sin embargo los resultados de PCR mostraron un 25% de muestras negativas, al respecto Muñoz y col. (2011) mencionan que las posibles explicaciones para los resultados PCR negativos serían: a) Una inadecuada extracción del DNA desde los ooquistes del parásito, b) degradación del DNA extraído y c) inhibición de la PCR. Con relación a las dos últimas, es posible afirmar que el material fecal puede contener DNAsas bacterianas que pueden degradar el material genético liberado, además, se consideran inhibidores del PCR a las sales biliares, bilirrubina y algunos complejos polisacáridos.

La prevalencia en becerras lactantes de entre 1 a 35 días de edad, es generalmente elevada, observándose la mayor prevalencia entre los 8 a 14 días de edad. En México, la enfermedad ha sido reconocida desde cuando se documentó su presencia en bovinos lactantes, posteriormente, se ha informado de esta parasitosis en hatos lecheros de los estados de México, Hidalgo, Jalisco, Querétaro y Guanajuato, Chihuahua y la Comarca Lagunera entre otros (Castillo y col., 2009). Solano (2008) refiere que la edad es un factor de riesgo, asociado con la infección de *Cryptosporidium* spp y ha señalado que los primeros 30 días de vida de los animales se corresponden con el periodo de máximo riesgo de infección con *C. parvum*.

Asadpour y col. (2013) en su estudio utilizaron la técnica de la PCR anidado, para detectar *C. parvum* y ver la prevalencia *Cryptosporidium*, demostrando con ésta técnica tiene una alta sensibilidad y especificidad comparada con otras técnicas.

Un estudio realizado en Mashhad (Irán), donde se utilizaron un total de 300 muestras fecales de becerros de 1 a 30 días de edad, tomadas de 10 granjas, mostró un 28.3% (85 muestras) positivas a *Cryptosporidium spp.* analizadas mediante PCR-anidada, resultados muy por debajo de nuestro estudio (Hong y col., 2013).

Muñoz y col. (2011), mediante el método de PCR, mostraron que el límite de detección fue superior que al de ZN, demostrando también que la PCR es el método más sensible al ser capaz de detectar una menor cantidad de ooquistes que el método microscópico. Estos mismos investigadores, de 205 muestras obtuvieron 102 (49.8%) positivas con la técnica de ZN, de las cuales seleccionaron aleatoriamente 58 ZN positivas y 10 ZN negativas, y fueron procesadas mediante PCR género-específica, mostrando que todas las muestras ZN positivas también fueron positivas a la prueba de PCR, de igual manera, las 10 muestras ZN negativas no dieron reactividad con PCR.

Tahvildar y Salehi (2014) reportaron que ZN mostró una sensibilidad del 94% y especificidad del 100%, pero la sensibilidad y especificidad del método PCR fue de 100%.

VII. CONCLUSIONES

Las muestras positivas a *Cryptosporidium spp.* con la técnica ZNm muestran una positividad diferente que con la técnica de PCR, la cual detectó *C. parvum*, probablemente por la contaminación bacteriana que pueden contener enzimas degradadoras del DNA o a una mala conservación de las muestras, o porque hay otras especies involucradas que no se estudiaron en la presente investigación.

Los resultados de *C. parvum* positivos a PCR (75%), nos indican una alta prevalencia del patógeno en becerras lo cual resulta en un problema de zoonosis.

Es necesario realizar estudios complementarios para identificar otras especies de *Cryptosporidium* que afectan a las becerras, como *C. andersoni*, *C. bovis*, y *C. ryane*.

VIII. LITERATURA CITADA

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

Araujo, A.V., Gómez, M.M.A. y Milano, A.M.F. (2011). Prevalencia de la infección por *Cryptosporidium spp.* en bovinos de dos establecimientos del nordeste argentino. *REDVET.* 12(10):1-8.

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

Asadpour, M., Razmi, G., Mohammadi, G. y Naghibi, A. (2013). Prevalence and molecular identification of *Cryptosporidium spp* in pre-weaned dairy calves in Mashhad area, Khorasan Razavi Province, Iran. *Iranian J. Parasitol.* 8(4):601-607.

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

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

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

Brook, E.J., Christley, R.M., French, N.P. y Hart, C.A. (2008). Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fresh and frozen cattle faeces: comparison of three methods. *Letters Appl. Microbiol.* 46:26-27.

- Brook, E.J., Hart, C.A., French, N.P. y Christley, R.M. (2009).** Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. *Vet. J.* 179(3):378-382.
- Castillo, C.G., Cruz, C.V., López, R.R., Sánchez, G., Rosario, R.C., Mendoza, I.V. y Esparza, L.M. (2009).** Frecuencia e identificación molecular de *Cryptosporidium spp* en becerras lactantes mantenidas en confinamiento en Aguascalientes México. *Téc. Pecu. Méx.* 47(4):425-434.
- Chen, F. y Huang, K. (2012).** Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium spp*. In dairy cattle from farms in China. *J. Vet. Sci.* 13(1):15-22.
- Cordón, G.P., Lombardo, M.J.R. y Moreno, M.S. (2005).** Procesamiento de muestras fecales en el estudio de *Cryptosporidium spp* mediante PCR. *Perú Biol.* 12(1):158-159.
- Delgado, G.R., Mijangos, M.L., Avila, A.S., Martínez, V.G., y Espinoza, V.J. (2007).** Criptosporidiosis en becerras Holstein con diarrea de la Comarca Lagunera, México. XVI Congreso Nacional de Patología Veterinaria. Mazatlán, Sin., México.
- Eisenberg, J.N., Lei, X., Hubbard, A.H., Brookhart, M.A. y Colfors, Jr. J.M. (2005).** The Role of Disease Transmission and Conferred Immunity in Outbreaks: Analysis of the 1993 *Cryptosporidium* Outbreak in Milwaukee, Wisconsin. *Am. J. Epidemiol.* 161:62-72.
- Emre, Z., Alabay, B.M., Fidanci, H., Duzgun, A. y Cerci, H. (1998).** Prevalence of *Cryptosporidium spp* infection and its relation to other enteric pathogens (*Escherichia coli* K 99 and rotavirus) in cattle in Ankara, Turkey. *Tr. J. Vet. Anim. Sciences.* 22:453-457.
- Espinoza-Vargas, .J.J. (2007).** Evaluación de la intensidad de excreción de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en becerras con diarrea. Tesis de Licenciatura. Asesor: Delgado, G.R. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, División Regional de Ciencia Animal. Torreón, Coah.
- Fayer, R. (2010).** Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol.* 124:90–97.

- Fayer, R., Gasbarre, L., Pasquali, P., Canals, A., Almeria, S. y Zarlenga, D. (1998).** *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *Int. J. Parasitol.* 28(1):49-56.
- Fayer, R., Santin, M. y Xiao, L. (2005).** *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J Parasitol.* 91(3):624-629.
- Fayer, R., Santin, M., Trout, J.M. y Greiner, E. (2006).** Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Vet. Parasitol.* 135(2):105-112.
- Feng, Y., Alderisio, A.K., Yang, W., Blancero, A.L., Kuhne, G.W., Nadareski, C.A., Reid, M., y Xiao, L. (2007).** *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(20):6475–6483.
- Feng, Y., Yang, W., Ryan, U., Zhang, L., Kvác, M., Koudela, B., Modry, D., Li, N., Fayer, R. y Xiao, L. (2011).** Development of a multilocus sequence tool for typing *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *J. Clin. Microbiol.* 49:34-41.
- Fraser-Liggett, C.M. (2005).** Insights on biology and evolution from microbial genome sequencing. *Genome Res.* 15:1603-1610.
- García, M.D., Cruz-Vázquez, C., Quezada, T., Silva, E., Valdivis, A., Vázquez, S. y Ramos, M. (2009).** *Cryptosporidium* in dairy calves from Aguascalientes, México: Risk infection in relation with the season and months of sampling. *J. Anim. Vet. Adv.* 8(8):1579-1583
- Goncalves, E.M.N., Araujo, R.S., Orban, M., Matté, M.H. y Corbett, C.E.P. (2008).** Protocol for DNA extraction of *Cryptosporidium spp* oocysts in fecal samples. *Inst. Méd. Trop S. Paulo.* 50(3):165-167.
- Grinberg, A., Lopez-Villalobos, N., Pomroy, W., Widmer, G., Smith, H. y Tait, A. (2008).** Host-shaped segregation of the *Cryptosporidium parvum* multilocus genotype repertoire. *Epidemiol. Infect.* 136:273–278.
- Harp, J.A., Woodmansee, D.B. y Moon, H.W. (1989).** Effects of colostral antibody on susceptibility of calves to *Cryptosporidium parvum* infection. *Am. J. Vet. Res.* 50(12):2117-2119.

- Harp, J.A., Woodmansee, D.B. y Moon, H.W. (1990).** Resistance of calves to *Cryptosporidium parvum*: Effects of age and previous exposure. *Infect. Immun.* 58(7):2237-2240.
- Harrington, B.J. (2009).** The staining of oocysts of *Cryptosporidium* with the fluorescent brighteners Uvitex 2B and Calcofluor White. *Science.* 40(4):219-223.
- 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.
- Helmy, Y.A., Krücken, J., Nöckler, K., Himmelstjerna, G.S. y Zessin, K.H. (2014).** Comparison between two commercially available serological test and polymerase chain reaction in the diagnosis of *Cryptosporidium* in animals and diarrhoeic children. *Parasitol Res.* 113:211-212.
- Hira, K.G., Mackay, M.R., Hempstead, A.D., Ahmed, S., Karim, M.M., O'Connor, R.M., Hibberd, P.L., Calderwood, S.B., Ryan, E.T., Khan, W.A. y Ward, H.D. (2010).** Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. from Bangladeshi children. *J. Clin. Microbiol.* 49(6):2307-2310.
- Hong, S.H., Anu, D., Jeong, Y.J., Abmed, D., Cho, S.H., Lee, W.J. y Lee, S.E. (2013).** Molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples of individuals in Mongolia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 90(1):43-47.
- Hunt, P.W. (2011).** Molecular diagnosis of infections and resistance in veterinary and human parasites. *Vet. Parasitol.* 4:180(1-2):12-46.
- Hunter, P.R., Wilkinson, D.C. Lake, I.R., Harrison, F.C.D., Syed, O., Hadfield, S.J. y Chalmers, R.M. (2008).** Microsatellite typing of *Cryptosporidium parvum* in isolates from a waterborne outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 46(11):3866-3867.
- Hussein, A.S. (2011).** *Cryptosporidium parvum* causes gastroenteritis epidemics in the Nablus region of Palestine. *Tropical Med. Internal. Healt.* 16(1):12-17.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2005).**
Marco Geoestadístico Nacional.
<http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/geoestadistica/default.aspx>

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

Jex, A.R., Smith, H.V., Monis, P.T., Campbell, B.E. y Gasser, R.B. (2008). *Cryptosporidium*—biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnol. Adv.* 26:304–317.

Kageruka, P., Brandt, J.R.A., Taelman, H. y Jonas, C. (1984). Modified koster staining method for the diagnosis of criptosporidiosis. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 64:171-175.

Kuzehkanan, A.B., Rezaeian, M., Zeraati, H., Mohebbali, M., Meamar, A.R., Babaei, Z., Kashi, L., Heydarnezhadi, M y Rezaie, S. (2011). A sensitive and specific PCR based method for identification of *Cryptosporidium* sp. using new primers from 18S ribosomal RNA. *Iranian J. Parasitol.* 6(4):1-7.

La Comarca Lagunera. Información General.

<http://www.comarcalagunera.com/portal/laguna/comarca.php>

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

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

Leng, X., Mosier, D.A. y Oberst, R.D. (1996). Simplified method for recovery and PCR detection of *Cryptosporidium* DNA from bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:643–647.

Leoni, F., Mallon, M.E., Smith, H.V., Tait, A. y McLauchlin, J. (2007). Multilocus analysis of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* from sporadic and outbreak-related human cases and *C. parvum* from sporadic cases in livestock in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.* 45:3286–3294.

Li, W., Zhang, N., Gong, P., Cao, L., Li, J., Su, L., Li, S., Diao, Y., Wu, K., Li, H. y Zhang, X. (2010). A novel multiplex PCR coupled with Luminex assay for the

simultaneous detection of *Cryptosporidium* spp., *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis*. *Vet. Parasitol.* 11;173(1-2):11-18.

Luján, Z.N. y Garbossa, G. (2008). *Cryptosporidium*: cien años después. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 42(2):195-201.

Magi, B., Canocchi, V., Tordini, G., Cellesi, C. y Barberi, A. (2006). *Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques. *Parasitol. Res.* 98:150-151.

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

Muñoz, P., Fredes, F., Diaz-Lee, A., Mercado, R. y Ozaki, L.S. (2011). Detección de *Cryptosporidium* spp. en terneras de lecherías de la región metropolitana mediante Ziehl Neelsen y confirmada por inmunocromatografía y ensayo molecular. *Arch. Med. Vet.* 43:111-116.

Mendoza-Delgado, O.O. (2010). Frecuencia de criptosporidiosis en becerras lactantes de la cuenca lechera de Delicias, Chihuahua. Tesis de Licenciatura. Asesor: Delgado, G.R. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, División Regional de Ciencia Animal. Torreón, Coah.

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

O'Brien, E., McInnes, L. y Ryan, U. (2008). *Cryptosporidium* GP60 genotypes from humans and domesticated animals in Australia, North America and Europe. *Experimental Parasitol.* 118:118-121.

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

Pancieri, R.J., Thomassen, R.W. y Garner, F.M. (1971). Cryptosporidial Infection in a Calf. *Vet. Pathol.* 8:479-484.

Paul, S., Chandra, D., Tewari, A.K., Banerjee, P.S., Ray, D.D., Boral, R. y Rao, J.R. (2009). Comparative evaluation and economic assessment of coprological

diagnostic methods and PCR for detection of *Cryptosporidium spp.* in bovines. *Vet. Parasitol.* 14;164(2-4):291-295.

Polage, C.R., Stoddard, G.J., Rolfs, R.T. y Petti, C.A. (2011). Physician use of parasite tests in the United States from 1997 to 2006 and in a Utah *Cryptosporidium* outbreak in 2007. *J. Clin. Microbiol.* 49(2):591–596.

Power, M.L., Holley, M., Ryan, U.M., Worden, P. y Gilling, M.R. (2011). Identification and differentiation of *Cryptosporidium* species by capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism. *FEMS Microbiol. lett.* 314:34-36.

Santin, M. y Zarlenga, D.S. (2009). A multiplex polymerase chain reaction assay to simultaneously distinguish *Cryptosporidium* species of veterinary and public health concern in cattle. *Vet. Parasitol.* 3;166(1-2):32-37.

Scott, C.A., Smith, H.V., Mtambo, M.M.A. y Gibbs, H.A. (1995). An epidemiological study of *Cryptosporidium parvum* in two herds of adult beef cattle. *Vet. Parasitol.* 57:277-288.

Shing, I., Carville, A. y Tzipori, S. (2011). Cryptosporidiosis in *Rhesus Macaques* challenged during acute and chronic phases of SIV infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 27(9):989–997.

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

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

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

Solano, G.R. (2008). Prevalencia de *Cryptosporidium spp* en becerras Holstein de 9 establos lecheros de la Comarca Lagunera. Tesis de Licenciatura. Asesor:

Delgado, G.R. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, División Regional de Ciencia Animal. Torreón, Coah. Pp. 34-36.

Strong, W.B., Gut, J. y Nelson, R.G. (2000). Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. *Infect. Immun.* 68(7):4117-4134.

Sulaiman, I.M., Hira, P.R., Zhou, L., Al-Ali, F.M., Al-Shelahi, F.A., Tanriverdi, S., Markovics, A., Arslan, M.O., Itik, A., Shkap, V. y Widmer, G. (2006). Emergence of distinct genotypes of *Cryptosporidium parvum* in structured host populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:2507–2513.

Sungur, T., Kar, S., Guven, E., Aktas, M., Kararer, Z. y Vatansever, Z. (2008). *Cryptosporidium spp* nin diskidan nested PCR ve carbol fuchsin boyama yöntemi ile tesis edilmesi. *Türkiye parazitoloji dergisi.* 3(4):305-306.

Tahvildar, F.B. y Salehi, N. (2014). Detection of *Cryptosporidium* infection by modified Ziehl Neelsen and PCR methods in children with diarrheal samples in pediatric hospital in Tehran. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench.* 7(2):125-130.

Thompson, H.P., Dooley, J.S.G., Kenny, J., McCoy, M., Lowery, C.J., Moore, J.E. y Xiao, L. (2007). Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium spp.* in neonatal calves in Northern Ireland. *Parasitol. Res.* 100:619-624.

Tiangtip, R. y Jongwutiwes, S. (2002). Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. *Trop. Med. Int. Health.* 7:357–364.

Traversa, D. (2010). Evidence for a new species of *Cryptosporidium* infecting tortoises: *Cryptosporidium ducismarci*. *Parasit. Vectors.* 25;3:21

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

Trujillo-Guerrero, D.A. (2011). Frecuencia de criptosporidiosis en becerras lactantes de la cuenca lechera de Delicias, Chihuahua. Tesis de Licenciatura.

Asesor: Delgado, G.R. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, División Regional de Ciencia Animal. Torreón, Coah.

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

Waele, V.D., Berzano, M., Berkvens, D., Speybroeck, N., Lowery, C., Mulcahy, G.M., Murphy, T.M. (2011). Age-stratified bayesian analysis to estimate sensitivity and specificity of four diagnostic tests for detection of *Cryptosporidium* oocysts in neonatal calves. *J. Clin. Microbiol.* 40(1):76-77.

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

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

Widmer, G., Tchack, L., Chappell, C.L. y Tzipori, S. (1998). Sequence polymorphism in the beta-tubulin gene reveals heterogeneous and variable population structures in *Cryptosporidium parvum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4477–4481.

Xiao, L. y Herd, R.P. (1993). Quantitation of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples by direct immunofluorescence assay. *J. Clin. Microbiol.* 31(11):2944-2946.

Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U. y Upton, S.J. (2004). *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(1):72-97.