

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS



Detección de *Cryptosporidium* spp por microscopía óptica en estanques de agua
de establos lecheros de la Comarca Lagunera

Por:

Jessica Liliana Ventura Sánchez

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México

Marzo, 2023

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

Detección de *Cryptosporidium* spp por microscopía óptica en
estanques de agua de establos lecheros de la Comarca Lagunera

Por:

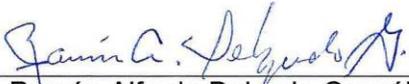
Jessica Liliana Ventura Sánchez

TESIS

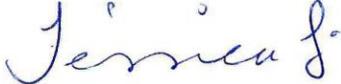
Que se somete a la consideración del H. Jurado examinador como requisito
parcial para obtener el título de:

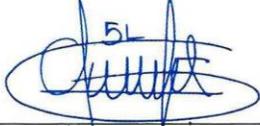
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por:


Dr. Ramón Alfredo Delgado González
Presidente


MVZ. César Octavio Cruz Marmolejo
Vocal


Dra. Jessica María Flores Salas
Vocal


Dr. Levi Norberto Espinosa García
Vocal suplente


MC. José Luis Francisco Sandoval Elías
Coordinación de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México
Marzo, 2023

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

Detección de *Cryptosporidium* spp por microscopia óptica en
estanques de agua de establos lecheros de la Comarca Lagunera

Por:

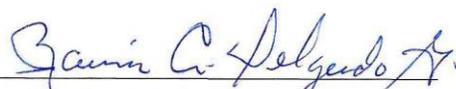
Jessica Liliana Ventura Sánchez

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Ramón Alfredo Delgado González
Asesor principal



MVZ. César Octavio Cruz Marmolejo
Coasesor



Dra. Jessica María Flores Salas
Coasesor



MC. José Luis Francisco Sandoval Elías
Coordinación de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México
Marzo, 2023

AGRADECIMIENTOS

A Dios: Por permitirme cumplir mis sueños, por la salud que me ha permitido conservar, por cuidar de mí y de mi familia.

A mis padres: Por educarme y formarme como la persona que hoy soy, por el apoyo y motivación incondicional. Gracias por ayudarme a concluir esta etapa de formación profesional.

A mi familia: Por siempre estar al pendiente de mí, por los consejos y apoyo que me brindan continuamente.

A MI ALMA TERRA MATER: Por abrirme las puertas y por haberme permitido formarme profesionalmente. Gracias por ser mi segunda casa y permitirme conocer buenos amigos y profesores en estos años.

A mis amigos: Por permitirme tomar lo mejor de cada uno, por apoyo incondicional desde el primer semestre de la carrera y por otorgarme su amistad. Tal vez no podamos estar todos juntos de nuevo, pero me llevo buenos momentos a su lado. 10/10.

A mis asesores: Por haber confiado en mí para realizar el estudio, guiarme durante el proceso y ayudarme a terminar esta etapa profesional. Gracias.

DEDICATORIAS

A Mi Madre: Eusebia Sánchez Marcial. Por ser la mujer más valiente, fuerte, inteligente y noble, por siempre confiar en mí e inculcarme a ser mejor persona cada día. Gracias por mostrarme que todo es posible, por tu apoyo incondicional y por siempre confiar en mí. Te amo mamá, eres la mujer que más admiro.

A Mi Padre: Israel Ventura Luciano. Por todas las enseñanzas y el apoyo que me has brindado, por protegerme y darme la oportunidad de seguir adelante. Gracias por enseñarme que soy capaz de hacer lo que yo me proponga y por enseñarme buenos valores junto con mi mamá. Te amo papá.

A Mi Tía: Juana Sánchez Marcial. Por el cariño, risas y todos los buenos momentos que me regalo. Gracias por cuidarme, te llevo siempre en mi mente y corazón.

A Mis Hermanos: Luis Manuel y Efrén. Por cuidar siempre de mí y ser el impulso para salir adelante. Los quiero mucho.

A Toda Mi Familia: Por siempre estar cuando lo necesito, por darme las mejores palabras de aliento, por siempre apoyarme y preocuparse por mí. Siempre he dicho que dios me bendijo con la mejor familia, llena de valores y amor incondicional. Este logro es de todos.

RESUMEN

En el presente estudio se realizó en establos lecheros de la Comarca Lagunera y en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. Para esta investigación se consideraron 40 muestras de agua de diferentes establos lecheros en las que se tomaron en cuenta diferentes factores como el uso, aspecto y presencia de materia orgánica, con el objetivo de demostrar que las biopelículas encontradas en los estanques se puede hallar ooquistes de *Cryptosporidium* spp., esto a través de la tinción de Ziehl Neelsen modificada en el periodo de septiembre-noviembre 2021. Los resultados obtenidos mostraron 5 muestras positivas, correspondientes al 12.5 % del muestreo total, lo que indica un factor importante de retención y diseminación de este parasito.

Palabras clave: Estanques de agua, Ooquiste, *Cryptosporidium* spp., Diseminación

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS	ii
RESUMEN	iii
INTRODUCCIÓN	1
1. Historia	3
2.1 Definición	3
3.1 Taxonomía	4
3.2 Morfología	6
4. Epidemiología	7
4.1 Transmisión	8
4.2 Fuentes de contaminación	8
4.3 Contaminación del agua	9
4.4 <i>Cryptosporidium spp</i> en México	10
5 Ciclo biológico	10
5.1 Ciclo biológico intracelular	11
5.2 Ciclo biológico extracelular	12
6. Biopelículas y <i>Cryptosporidium</i>	13
6.1 Patogenia	16
6.2 Signos y Lesiones	17
6.3 Prevención y control	18
6.4 Tratamiento	19
7. Métodos de diagnóstico	19
8. MATERIALES Y MÉTODOS	23
8.1 Lugar de estudio	23
8.2 Diseño experimental	23
8.3 Toma de muestras y procesamiento	25
8.4 Análisis estadístico	26
9 RESULTADOS	26
9.1 Microscopía óptica	26

9.2 Influencia de factores	27
9.3 Caracterización de los estanques	28
10. DISCUSIÓN	29
11. CONCLUSIONES	31
REFERENCIAS	32

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Especies de <i>Cryptosporidium</i> válidas confirmadas mediante análisis molecular (Zahedi et al., 2016).....	4
Cuadro 2 Ventajas y limitaciones de las técnicas utilizadas para evaluar la infectividad y la viabilidad. Modificada de Rousseau et al., 2018. (C: <i>Cryptosporidium</i> spp.; C.p: <i>C. parvum</i> ; C.h: <i>C. hominis</i> ; G: <i>Giardia duodenalis</i> ; T: <i>Toxoplasma gondii</i>).	20
Cuadro 3 Coordenadas de establos de La Comarca Lagunera donde se recolectaron muestras de agua.....	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo reproductivo de <i>Cryptosporidium</i> spp (Bouزيد et al., 2013)	12
Figura 2 Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium parvum</i> en medio libre de células huésped, (Hijjawi et al., 2004).....	13
Figura 3 Las cinco fases principales que conducen al desarrollo y dispersión de la biopelícula, (Muhammad et al., 2020).....	15
Figura 4 Representación esquemática de los parámetros que influyen en la retención/diseminación de ooquistes a partir de biopelículas. (Lefebvre et al., 2021).....	16
Figura 5 Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp. en muestra de agua de estanque de establo (aumento de 40X, tinción Ziehl Neelsen)	27
Figura 6 Ubicación geográfica de los establos estudiados. Se muestra el número de identificación del establo con un punto de color: azul= negativo, rojo= positivo, así como una escala en distancia (escala 1: 350000).....	28

INTRODUCCIÓN

Cryptosporidium spp. es un parásito que afecta a muchas especies de mamíferos, incluyendo bovinos y el ser humano. Recientemente, ha sido destacado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Organización Mundial de la Salud, como patógeno emergente transmitido por los alimentos (Rousseau et al., 2018).

En las terneras, este protozooario daña a los enterocitos, haciendo que disminuya el consumo y como consecuencia, no haya una buena nutrición. Además, la alteración gastrointestinal puede hacer que sea susceptible a infecciones secundarias por bacterias, que causarán un cuadro clínico grave y puede llevar a la muerte del animal (Santin, 2020). Regularmente, este parásito se encuentra en el medio ambiente, principalmente en el suelo. Sin embargo, en estudios de los últimos años, se ha demostrado que puede encontrarse en el agua (Koh et al., 2014). Si se considera que la mayoría de los establos tiene una fuente de agua común para todas las instalaciones, podría ser que se encuentre, prácticamente en todos lados. Los ooquistes de *Cryptosporidium* spp son robustos y resistentes al cloro, su tamaño es diminuto y tiene un potencial infeccioso considerable tanto en los animales como en el personal que puede estar en contacto con ellos. Por lo que, se convierte en una amenaza latente (Dillinghamy col., 2002). El ganado, en particular el bovino, es uno de los reservorios más importantes de infecciones zoonóticas. Los animales domésticos y salvajes pueden estar infectados de varios genotipos de *Cryptosporidium* spp. que tienen un solo rango de hospedantes y, por lo tanto, tienen un impacto importante en la salud pública (Ryan et al., 2014).

Es importante considerar la alta transmisibilidad de *Cryptosporidium* spp. ya que los ooquistes que se eliminan en las heces son inmediatamente infecciosos (Gamboa et al., 2014). En La Comarca Lagunera, este protozooario es subestimado, y cuando se ha llevado un control de desparasitación y desinfección, se limitan a los animales y a las jaulas donde habitan. El agua, por otro lado, no se somete a filtros que puedan garantizar una adecuada inocuidad de este líquido. Si consideramos que, *Cryptosporidium* spp. puede sobrevivir e incluso reproducirse en el agua, es posible que este protozooario se encuentre en los estanques de las granjas lecheras lo que conlleva a que haya una infección parasitaria a través del suministro de agua.

Objetivo general:

Identificar ooquistes de *Cryptosporidium* spp., por medio de la técnica de Ziehl Neelsen en estanques de agua de establos lecheros de La Comarca Lagunera.

Objetivos específicos:

Determinar la presencia de *Cryptosporidium* spp en muestras de agua colectadas en el bioma de estanques de agua de establos lecheros de La Comarca Lagunera.

Calcular la prevalencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., en estanques de agua de La Comarca Lagunera.

Determinar la distribución de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., en La Comarca Lagunera.

Hipótesis:

En agua de estanques de granjas lecheras de La Comarca Lagunera hay presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. Historia

Los orígenes de la identificación de este parásito se remontan a inicios del siglo pasado. La primera persona en establecer el género *Cryptosporidium spp.* y quien reconoció su naturaleza multiespecífica fue Ernest Edward Tyzzer en 1907. Él descubrió la especie *C. muris* de las glándulas gástricas de ratones de laboratorio.

Tras el descubrimiento inicial de *Cryptosporidium spp.*, más de 50 años transcurrieron durante los cuales el parásito fue comúnmente confundido con otros géneros de apicomplexa, especialmente miembros del género coccidio *Sarcocystis*. Esto, debido a que tienen ooquistes con pared delgada que a menudo se rompen, liberando esporoquistes, y debido a que cada esporoquiste contienen cuatro esporozoitos como los ooquistes de *Cryptosporidium spp.* Una variedad de especies con y sin nombre fueron erróneamente asignadas al género (Xiao et al., 2004).

Después del reconocimiento de las verdaderas diferencias entre *Cryptosporidium spp.* y *Sarcocystis*, el concepto erróneo de huésped estricto se aplicó a *Cryptosporidium spp.* Esto llevó a la creación de múltiples especies nuevas (Xiao et al., 2004; Anderson et al., 1968). Los primeros casos de criptosporidiosis humana se informaron en 1970 en pacientes con diarrea acuosa grave (Nime et al., 1976). En la década de 1980, surgió un gran interés luego de informes en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia. Con base en estudios epidemiológicos realizados de gastroenteritis entre marzo y abril de 1993 ascendía a aproximadamente 403,000 personas (Gajadhar, 2015; Pignata et al., 2019). Durante los 50 's se le asoció con enfermedades diarreicas en aves de corral y para 1971, *C. parvum* cobró interés al descubrirse que también producirá diarrea en ganado vacuno (Solarte et al., 2006).

2.1 Definición

Cryptosporidium spp. es un protozoario oportunista que infecta el tracto intestinal. Puede causar una enfermedad diarreica que puede poner en peligro la vida de animales y personas inmunocomprometidas (Mead y Arrowood, 2020). Además, puede infectar una amplia gama de otros vertebrados (Das et al., 2019). Es un apicomplejo gregario epicelular facultativo, pleomórfico y ubicuo, capaz de multiplicarse en un entorno libre de células huésped (Gajadhar, 2015). Por lo tanto, puede tener una existencia prolongada en el medio ambiente, con el potencial de causar enfermedades y muertes en humanos y animales domésticos (Thompson et al., 2016).

3. Taxonomía

Este parásito pertenece al phylum *Apicomplexa*, subclase *Cryptogregarina*, orden *Eucoccidiorida*, familia *Cryptosporidiidae* y género *Cryptosporidium*. Con base en las características morfológicas, biológicas y datos moleculares, existen más de 30 especies que afectan a diferentes animales, la mayoría del tracto gastrointestinal excepto *Cryptosporidium baileyi* (Ryan et al., 2014). En el cuadro 1 se muestran las especies de *Cryptosporidium spp.* que se han identificado por pruebas moleculares.

Cuadro 1 Especies de *Cryptosporidium* válidas confirmadas mediante análisis molecular (Zahedi et al., 2016).

Especie	Huésped 1	Huésped 2	Reportado en humanos
<i>C. rubeyi</i>	Sepermophilus beecheyi (ardilla de tierra de California)	Ardillas	Ninguno reportado
<i>C. scophthalmi</i>	Scophthalmus maximus (rodaballo)	Rodaballo	Ninguno reportado
<i>C. huwi</i>	Poecilia reticulata (Guppy) Paracheirondon innesi (Neon tetra) y Puntius tetrazona (Tigre barb)	Pez	Ninguno reportado
<i>C. erinacei</i>	Erinaceus europaeus (erizo europeo)	Erizo, caballos	Reportado
<i>C. scrofarum</i>	Sus scrofa (cerdo)	Cerdos	Reportado
<i>C. viatorum</i>	Homo sapiens (humano)	Humanos	Reportado
<i>C. tyzzeri</i>	Mus musculus (ratón)	Roedores	Reportado
<i>C. cuniculus</i>	Orytolagus cuniculus (conejo europeo)	Conejos	Reportado
<i>C. ubiquitum</i>	Bos Taurus (ganado)	Rumiantes, roedores, primates	Reportado
<i>C. xiaoi</i>	Ovis aries (oveja)	Ovejas y cabras	Reportado

<i>C. rymae</i>	Bos Taurus (ganado)	Vacas	Ninguno reportado
<i>C. macropodum</i>	Macropus gigantes (canguro)	Marsupiales	Ninguno reportado
<i>C. fragil</i>	Duttaphrynus melanostictus (sapo)	Sapos	Ninguno reportado
<i>C. fayeri</i>	Macropus rufus (canguro)	Marsupiales	Reportado
<i>C. bovis</i>	Bos Taurus (ganado)	Vacas	Reportado
<i>C. suis</i>	Sus scrofa (cerdo)	Cerdos	Reportado
<i>C. galli</i>	Spermestidae, Frangillidae, Gallus, Tetrao urogallus, Pinicola enucleator (Aves)	Aves	Ninguno reportado
<i>C. hominis</i>	Homo sapiens (humano)	Humanos	Comunes en humanos
<i>C. molnari</i>	Sparus aurata (dorada) y Dicentrarchus labrax (lubuns europea)	Pez	Ninguno reportado
<i>C. canis</i>	Canis familiaris (perro)	Perros	Reportado
<i>C. andersoni</i>	Bos Taurus (ganado)	Vacas	Reportado
<i>C. varanii</i>	Varanus prasinus (monitor de espectralda)	Lagartos	Ninguno reportado
<i>C. baileyi</i>	Gallus (pollo)	Aves	Ninguno reportado
<i>C. parvum</i>	Bos Taurus (ganado)	Rumiantes	Comunes en humanos
<i>C. meleagridis</i>	Meleagris gallopavo (turquia)	Aves y humanos	Comunes en humanos
<i>C. serpentis</i>	Elaphe guttat, E. subocularis, Sanzinia madagascarensus (serpiente)	Serpientes y lagartos	Ninguno reportado
<i>C. felis</i>	Felis catis (gato)	Gatos	Reportado

<i>C. wrairi</i>	<i>Cavia porcellus</i> (conejillo de indias)	Conejillos de india	Ninguno reportado
<i>C. muris</i>	<i>Mus musculus</i> (ratón domestico)	Roedores	Reportado

3.2 Morfología

La forma de los ooquistes son pequeños esféricos y ovóides. Cada ooquiste esporulado contiene cuatro esporozoitos compuestos de numerosos gránulos pequeños, y, limitados por una membrana globular esferoide, la pared de los ooquistes es lisa y sin color. Se estima que aproximadamente un 80 % de los ooquistes que se forman tienen una pared gruesa y cuando se eliminan por las heces son muy infectantes para los animales que hay a su alrededor. El otro 20% de los ooquistes posee una pared fina que se rompe tras su salida de la célula, permitiendo la liberación de los esporozoitos que invaden nuevas células epiteliales (Fayer et al., 2005).

Los ooquistes de *Cryptosporidium spp.* son casi esféricos con un tamaño promedio pequeño de 4-6 μm con estructuras internas oscuras. El sello característico de la madurez del ooquiste son cuatro esporozoitos pero ningún esporozoite. Los esporozoitos son nucleados, tienen forma de media luna con medidas de 5.0 μm x 0.5 μm . La parte del complejo apical tiene función en la motilidad deslizante para acceder a la célula diana. Los trofozoitos producen merotes tipo I que contienen ocho merozoitos morfológicamente similares a los esporozoitos, con forma de media luna de 0.4 μm x 1.0 μm . Los merotes tipo II tienen una forma menos uniforme, ligeramente más grande que los merotes tipo I. Los merozoitos tipo I desarrollan microgametos y macrogametos, con forma esférica ovalada de 4 a 6 μm de diámetro con un gran núcleo central. El cigoto desarrolla un ooquiste de pared delgada que lo cubre solo una membrana o un ooquistes de pared gruesa que contiene dos capas de membrana (Fayer, 2010; Pumipuntu y Piratae, 2018).

4. Epidemiología

En términos epidemiológicos, los ooquistes de *Cryptosporidium spp.* presenta características biológicas trascendentes; tamaño pequeño, dureza extraordinaria, resistencia al tratamiento con cloro y con ácidos, viabilidad prolongada de hasta varios meses en el ambiente, excreción de estadios infectivos, requerimiento debajo número (1-10 ooquistes) para infectar a otros organismos y considerable potencial zoonótico (Dillinghamy col., 2002).

Los brotes transmitidos por el agua han sido un problema importante en la epidemiología de la criptosporidiosis en todo el mundo. Recientemente se ha demostrado que las biopelículas actúan como reservorios de *Cryptosporidium* en los que los ooquistes no solo puedan quedar atrapados y posteriormente liberarse en el suministro de agua, sino que también pueden actuar como entornos ricos en nutrientes en los que el parásito puede desarrollarse y multiplicarse (Thompson et al., 2016).

La prevalencia de criptosporidiosis en países industrializados está entre 0.1 y 27.1%, con una medida de 4.9%, mientras que en países en desarrollo los resultados varían entre 0.1 a 31.5%. La criptosporidiosis presenta prevalencia que va de 10.3 a 86%, principalmente en México, Guatemala, Colombia, Perú, Brasil e Indonesia (Dávila y Fernández, 2017). En la industria de producción de leche, *Cryptosporidium spp.* causa morbilidad y mortalidad en bovinos adultos y terneros, y, por lo tanto, pérdidas económicas. En México, el mayor grupo de productores de leche se encuentra en la región Lagunera, donde la infección gastrointestinal en los bovinos es frecuente; sin embargo, pocas veces se conoce la etiología (López et al., 2020).

Este parásito, es una causa importante de enfermedad diarreica, principalmente en humanos y ganado de todo el mundo. El impacto clínico es mayor en los huéspedes cuyo sistema inmunitario está disminuido, como en los lactantes y el ganado joven, los ancianos o aquellos afectados por enfermedades o estrés (Thompson et al., 2016). Se encuentra distribuido alrededor del mundo y es hallado en el epitelio gastrointestinal de aves, reptiles, peces y mamíferos (Hamnes et al., 2006).

4.1 Transmisión

La transmisión de ooquistes es por vía fecal-oral del huésped infectado, incluidas las transmisiones de animal a animal, de animal a humano (zoonótico), de humano a animal y de humano a humano. En humanos, la vía de entrada es a través del agua contaminada, frutas, verduras y por contacto en superficies expuestas al parásito. En las terneras, su principal fuente de contaminación es la cama donde habitan, ya sea de tierra, arena, madera o plástico, así como las paredes de las jaulas, utensilios y equipos mal desinfectados además del agua, alimentos y fomites como ropa y calzado (Xiao and Feng, 2008; Ryan et al., 2014). También, se produce a través de la contaminación ambiental, que generalmente implica la liberación de heces, aguas residuales o lodo, a menudo con desbordamiento después de fuertes lluvias (Xiao et al., 2000).

La transmisión se logra en casi todos los casos debido a que los ooquistes son resistentes y capaces de sobrevivir durante períodos prolongados en el medio ambiente (Thompson et al., 2016). También resisten a muchos agentes desinfectantes generales, incluidas la cloración que normalmente se usa en el tratamiento del agua (Pumipuntu y Piratae 2018). La transmisión zoonótica de criptosporidiosis provienen de brotes que involucran a estudiantes de veterinaria e investigadores que tuvieron contacto con terneros jóvenes infectados.

Los ríos son un medio de transmisión rápida y de larga distancia de microorganismos patógenos desde fuentes terrestres. Los patógenos ingresan a los arroyos y ríos a través del flujo superficial, la descarga de aguas subterráneas poco profundas y las entradas directas (Drummond et al., 2018). La infección de los bovinos en las granjas se produce por la ingestión de ooquistes, comúnmente excretados por ganado insalubre, cantidades que pueden llegar hasta 4.15×10^7 ooquistes por gramo de heces (Gajadhar, 2015).

4.2 Fuentes de contaminación

En un establo, las fuentes de contaminación dependen del área, es decir, el área de la crianza será la principal fuente de diseminación de este parásito y, por lo tanto, todo lo que tenga relación con ella estará potencialmente contaminada. Las heces de las terneras son las que excretarán los ooquistes, y estos estarán en materiales, equipos, así como la cama de arena. Una vez que están en el medio ambiente, los ooquistes de *Cryptosporidium spp.* pueden contaminar el agua, alimentos, fomites y superficies; y son capaces de sobrevivir en estos ambientes durante semanas o meses, ya que la cubierta exterior dura del ooquiste los protege de factores físicos y químicos adversos, lo que aumenta la probabilidad de infección, en comparación con otros microorganismos (Sterk et al., 2016; Drummond et al., 2018). Por lo tanto,

cualquier superficie donde hayan estado ooquistes de *Cryptosporidium spp.* pueden servir de fuentes de contaminación, de ahí la importancia de poder determinar todas las fuentes de contaminación para evitar la transmisión a mamíferos susceptibles (Xiao et al., 2000). Un área susceptible a contaminarse es el estanque de agua, ya que, por diversos medios, incluyendo el viento, puede diseminarse y comenzar a crecer dentro de estos contenedores. Mismos que, posteriormente, servirá para abastecer de agua a todas las áreas incluyendo el de las terneras, vaquillas y animales en producción.

4.3 Contaminación del agua

El agua ha estado involucrada diversos brotes de distintas enfermedades a través de la historia. Respecto a *Cryptosporidium spp.*, es el parásito que, junto a *Giardia spp.*, se encuentra con más frecuencia en aguas (Solarte et al., 2006). Se ha demostrado que el ganado (principalmente el vacuno) y la vida silvestre (venados y gansos migratorios) contribuyen de manera relevante a los ooquistes zoonóticos de *Cryptosporidium spp.* en las fuentes de agua (Widmer et al., 2020).

Las heces provenientes de la vida silvestre, los animales domésticos o los campos fertilizados con estiércol se consideran una fuente importante de patógenos zoonóticos a los que las personas y animales pueden estar expuestas (Sterk et al., 2016). Se ha pensado que la propagación de *Cryptosporidium spp.* entre establos se debe principalmente al movimiento de ganado. Sin embargo, se ha demostrado que el transporte mecánico de ooquistes de por agua o el movimiento de la vida silvestre es posible y puede resultar en problemas graves de salud y bienestar de los terneros, así como contaminación de los suministros de agua (Widmer et al., 2020).

Respecto a los almacenamientos de agua, muchos de ellos están expuestos a la intemperie y en ellos crecen algas y diferentes microorganismos. Las biopelículas que se forman en estos estanques de agua, son el modo predominante de crecimiento microbiano y pueden fungir un papel de alimento a diferentes microorganismos, incluyendo *Cryptosporidium spp.* (Prest et al., 2016). Las biopelículas representan uno de los principales problemas en los sistemas de distribución de agua. A través de diferentes reportes, el consumo de agua contaminada con biopelículas que sirven de hábitat a diferentes microorganismos patógenos se ha relacionado con infecciones en animales y humanos.

4.4 *Cryptosporidium spp* en México

Cryptosporidium spp. se notificó por primera vez en México en la década de los 80 en niños del estado de San Luis Potosí y en pacientes inmunodeprimidos de la ciudad de México y Monterrey. El consumo de agua y alimentos como los vegetales mal desinfectados, son factores de riesgo para *Cryptosporidium spp* (Galván et al., 2019).

En bovinos fue identificado por primera vez en 1983 mediante microscopía en becerras lactantes (Soave et al., 1989). Actualmente, la prevalencia de *Cryptosporidium spp.* en bovinos oscila entre el 22% y el 67%. En lugares importantes como la Región Lagunera donde se encuentra unos de los mayores productores de leche del país, *Cryptosporidium spp.* según los estudios se encuentra en 71.79 lo cual representa un dato alarmante, de ahí que las infecciones gastrointestinales en los bovinos son frecuentes con un mayor nivel de infección para los terneros (López et al., 2020).

El principal inconveniente es que se subestima la capacidad de infestación de este parásito. En los establos, muchas veces ni siquiera se toma en cuenta en el diagnóstico diferencial en terneras, lo cual contribuye a la expansión de los ooquistes en las áreas y en general en todas las instalaciones. Respecto a su lado zoonótico, las entidades encargadas de la toma de decisiones para el suministro de la infraestructura sanitaria en el país desconocen los riesgos que generan estos microorganismos y por tal motivo las intervenciones realizadas en cuanto al tratamiento de agua potable; tratamiento y disposición de excretas y aguas residuales; y a programas de educación e higiene para la población en general, aún están lejos de ser efectivos y de alcanzar los beneficios para la población (García et al., 2014).

5 Ciclo biológico

Cryptosporidium spp es un apicomplejo facultativo epicelular que puede multiplicarse en un entorno libre de células huésped (Clode et al., 2015). Son infectantes en el momento de ser excretados en las heces, siendo muy resistentes a condiciones variables excepto la desecación y la congelación. Los ooquistes son capaces de conservar su infectividad durante 2-6 meses a 4° C. Sin embargo, esta se altera por el calor (65° C durante 30 minutos) o por el frío (-18 °C durante 24 horas) (Solarte et al., 2006). El ciclo de vida a largo plazo se ha obtenido a nivel in vitro en tres especies de *C. parvum*, *C. hominis* y *Cryptosporidium andersoni* (Hijawi et al., 2002). Por lo que, se ha demostrado que puede ser ampliamente resistente. Su ciclo biológico se puede dividir en dos fases: intracelular y extracelular, mismas que a continuación se detallan.

5.1 Ciclo biológico intracelular

Después de que el huésped ingiere el ooquiste, los esporozoitos móviles se liberan dentro en el tracto gastrointestinal a través de una ruptura en la pared del ooquiste, este proceso es conocido como escisión. Se cree que este proceso se desencadena por la exposición a factores como la temperatura corporal 37° C, el pH gástrico, las enzimas pancreáticas y las sales biliares (Pumipuntu y Piratae 2018; Quilez et al., 2008).

Todo el ciclo de vida ocurre en los enterocitos, se desarrolla en una estructura que se forma llamadas vacuolas parasitóforas situadas en el borde de la celda entre la membrana plasmática y el citoplasma (Smith et al., 2005). Ocurren tres etapas de reproducción: merogonia, gametogonia y esporogonia los cuales ocurren en el mismo huésped. Los parásitos penetran la membrana de la célula epitelial intestinal sin entrar en el citoplasma (desarrollo epicelular) donde pasan por múltiples generaciones de merogonia. Los parásitos invasores hacen que la membrana de las células huésped infectadas se agrande y se rompa después de 48 – 72 horas, liberando merozoitos móviles (Gajadhar, 2015).

Después de salir de los ooquistes en la luz del intestino, los esporozoitos penetran en las células huésped y se convierten en trofozoitos dentro de las vacuolas parasitoforas confinadas en la región de las microvellosidades del epitelio mucoso. Los trofozoitos se dividen asexualmente (merogonia) para formar merozoitos. Después de ser liberados de los merotes de tipo I, los merozoitos invasivos ingresan a las células huésped adyacentes para formar merotes de tipo I adicionales o para formar merotes tipo II. Los merotes de tipo II no se reciclan, sino que entran en las células huésped para formar las etapas sexuales, microgamontes y macrogamontes.

La mayoría de los cigotos formados después de la fertilización del microgamonte por los microgametos (liberados del microgamonte) se convierten en resistentes al medio ambiente. Los ooquistes de paredes gruesas experimentan esporogonia para formar ooquistes esporulados que contienen cuatro esporozoitos. Los ooquistes esporulados liberados en las heces son las formas del ciclo de vida ambientalmente resistentes que transmiten la infección de un huésped a otro. Los ooquistes de paredes delgadas representan formas auto infecciosas del ciclo de vida que pueden mantener el parásito en el hospedador sin exposición oral repetida a los ooquistes de paredes gruesas presentes en el medio ambiente (Bouزيد et al., 2013). La descripción del ciclo puede observarse en la figura 1.

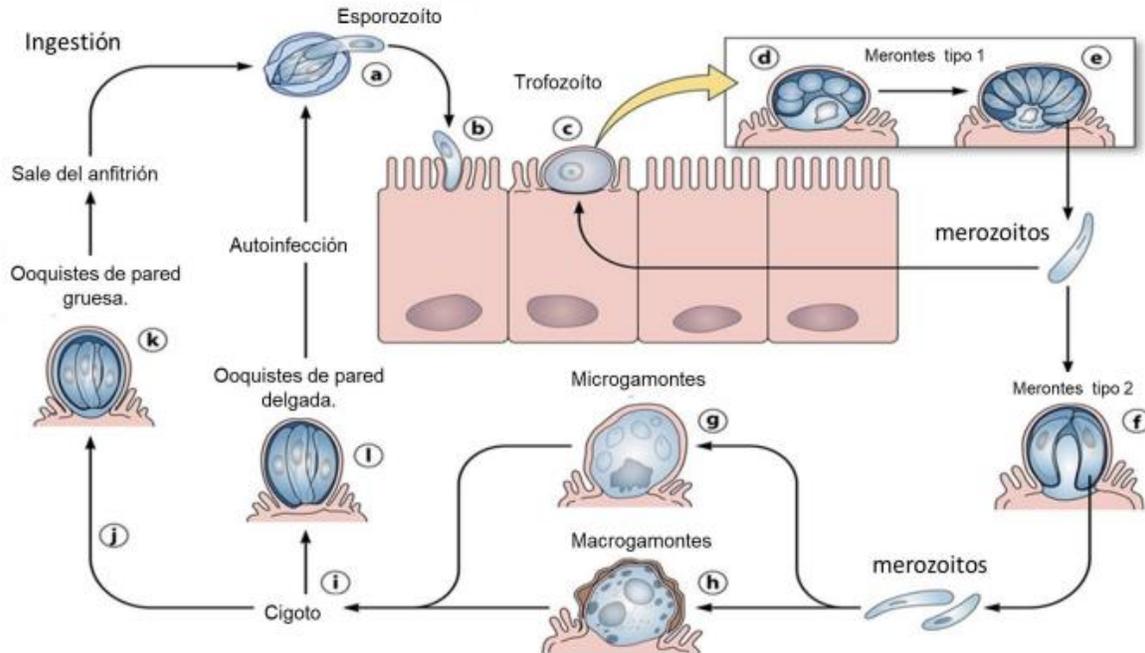


Figura 1 Ciclo reproductivo de *Cryptosporidium* spp (Bouزيد et al., 2013)

5.2 Ciclo biológico extracelular

Cryptosporidium spp. no solo puede multiplicarse dentro de los enterocitos, sino también puede desarrollarse y multiplicarse extracelularmente sin una asociación epitelial con célula huésped. Estas etapas incluyen esporozoitos, trofozoitos, merontes grandes, merozoitos, microgamontes, células tipo gamonte y células tipo gamonte extragrandes (Koh et al., 2014). Estudio realizado por Koh et al. (2014) se observaron varias poblaciones distintivas de ooquistes intactos, en biopelículas de *Pseudomonas* con un ambiente controlado por un periodo de 6 días.

Un estudio realizado por Hijjawi et al. (2004) demostró por primera vez que *C. parvum* puede completar su ciclo de vida sin necesidad de una célula huésped, con la presencia de todas las fases de desarrollo incluyendo la merogonía, gametogonía, esporogonía, así como nuevas etapas similares a gamonte que en células son predominantemente extracelulares (figura 2).

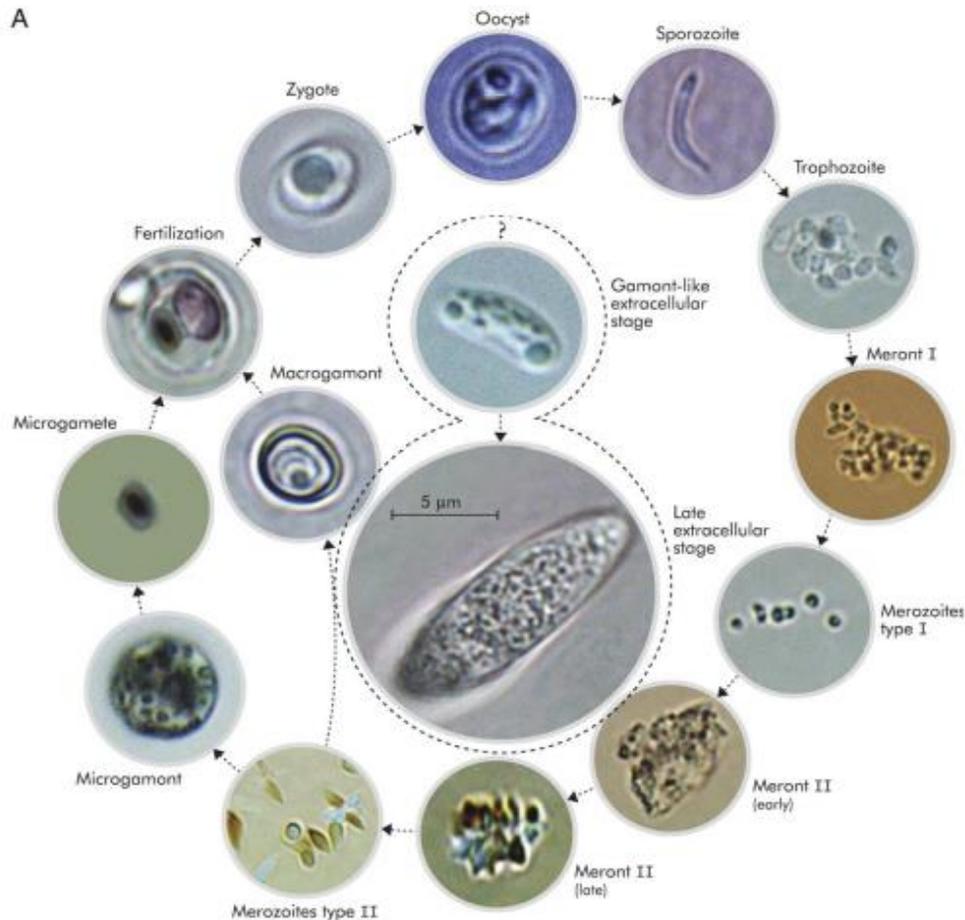


Figura 2 Ciclo de vida de *Cryptosporidium parvum* en medio libre de células huésped, (Hijawi et al., 2004).

6. Biopelículas y *Cryptosporidium*

Las biopelículas bacterianas son comunidades complejas de bacterias adheridas a una superficie, que se mantienen unidas por matrices poliméricas de producción propia compuestas principalmente de polisacáridos, proteínas secretadas y ADN extracelular (Tremblay et al., 2013). Puede consistir en una sola especie microbiana o una combinación de diferentes especies bacterias, protozoos, arqueas, algas, hongos filamentosos y levaduras que se adhieren fuertemente entre sí y a superficies bióticas o abióticas (Raghupathi et al., 2017).

Las bacterias forman biopelículas en respuesta al estrés ambiental, como la radiación ultravioleta, la desecación, los nutrientes limitados, el pH extremo, la temperatura extrema, las altas concentraciones de sal, la alta presión y los agentes antimicrobianos (Lopez et al., 2010; Galie et al., 2018). La arquitectura y la organización de las biopelículas dependen de las especies bacterianas. Múltiples factores están involucrados en la formación de estructuras particulares en las

biopelículas. Y, la misma especie bacteriana, puede formar diferentes estructuras de biopelícula en diferentes condiciones ambientales y/o nutricionales (Tolker, 2015).

La formación de biopelículas bacterianas es un proceso complejo y se puede describir en cinco fases principales:

- Fase de unión reversible, en la que las bacterias se adhieren de manera no específica a las superficies.
- Fase de unión irreversible, que implica la interacción entre las células bacterianas y una superficie utilizando adhesinas bacterianas como fimbrias y lipopolisacáridos (LPS).
- Producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) por las células bacterianas residentes.
- Fase de maduración de biopelículas, en la que las células bacterianas sintetizan y liberan moléculas de señalización para detectar la presencia de las demás, lo que conduce a la formación de micro colonias y maduración de biopelículas.
- Fase de dispersión/desprendimiento, en la que las células bacterianas se separan de las biopelículas y regresan a un estilo de vida planctónico independiente.

Como se observa en la figura 3.

La formación de biopelículas es perjudicial en el cuidado de la salud, los sistemas de distribución de agua potable, las industrias alimentaria y marina, etc. (Muhammad et al., 2020).

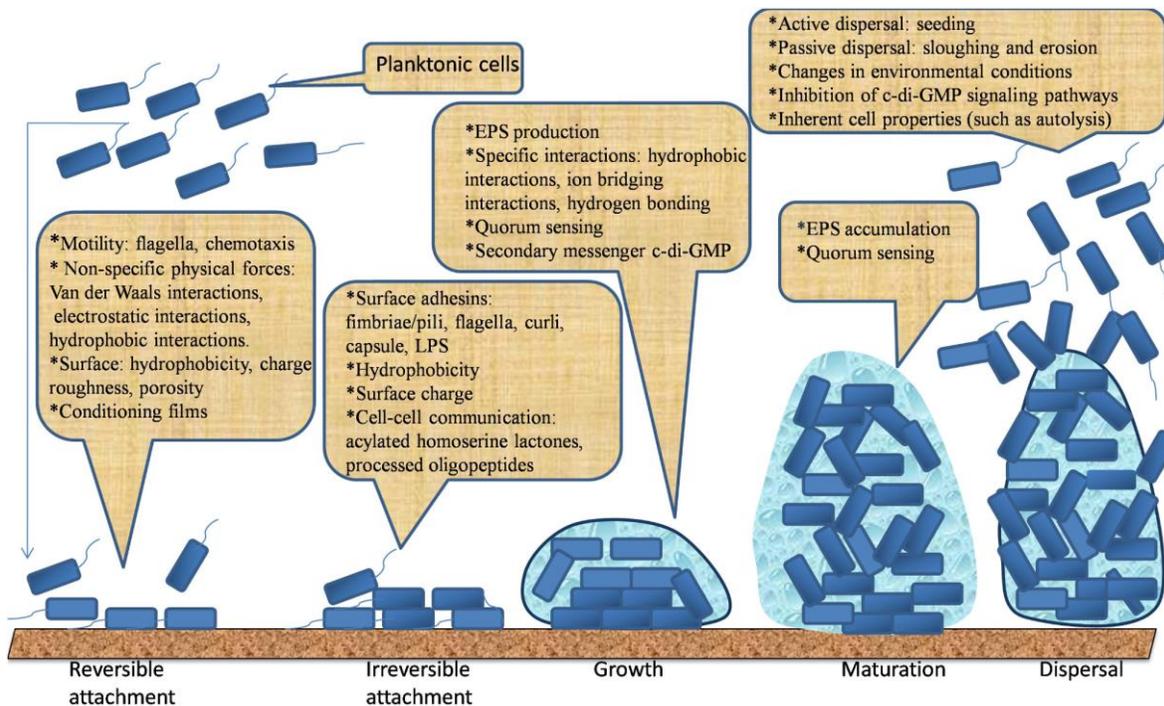


Figura 3 Las cinco fases principales que conducen al desarrollo y dispersión de la biopelícula, (Muhammad et al., 2020).

Una vez conocidas las biopelículas, es importante mencionar la capacidad de *Cryptosporidium spp.* para replicarse en sistemas libres de célula huésped, como las biopelículas acuáticas. Lo cual plantea un riesgo ambiental que rara vez se considera al evaluar la propagación de la enfermedad (Clode et al., 2015).

Las biopelículas acuáticas a menudo sirven como reservorios ambientales para los microorganismos y les proporcionan un entorno de crecimiento rico en nutrientes en condiciones adversas. Con respecto a *Cryptosporidium spp.*, las biopelículas pueden servir como reservorios ambientales para los ooquistes, pero también pueden respaldar el crecimiento de etapas adicionales de *Cryptosporidium spp.*. La unión de los ooquistes a las biopelículas está controlada por la arquitectura de las biopelículas y las interacciones químicas de la superficie que dependen de la química del agua (Koh et al., 2014).

Las características de una biopelícula específica, incluida la composición, el grosor y la morfología, dependen del número y la diversidad de organismos en el agua, la concentración y naturaleza de la materia orgánica biodegradable y las características de soporte (Koh et al., 2014). En estudios al respecto, se ha visto que los ooquistes expuestos al sol son menos infecciosos que los ooquistes en la oscuridad. La infectividad de los ooquistes adheridos a la parte superior de las biopelículas es significativamente menos que la infectividad de los ooquistes en la parte inferior de la biopelícula, lo que significa que las biopelículas proporcionan una

barrera protectora para los ooquistes contra la radiación solar (figura 4) (Lefebvre et al., 2021).

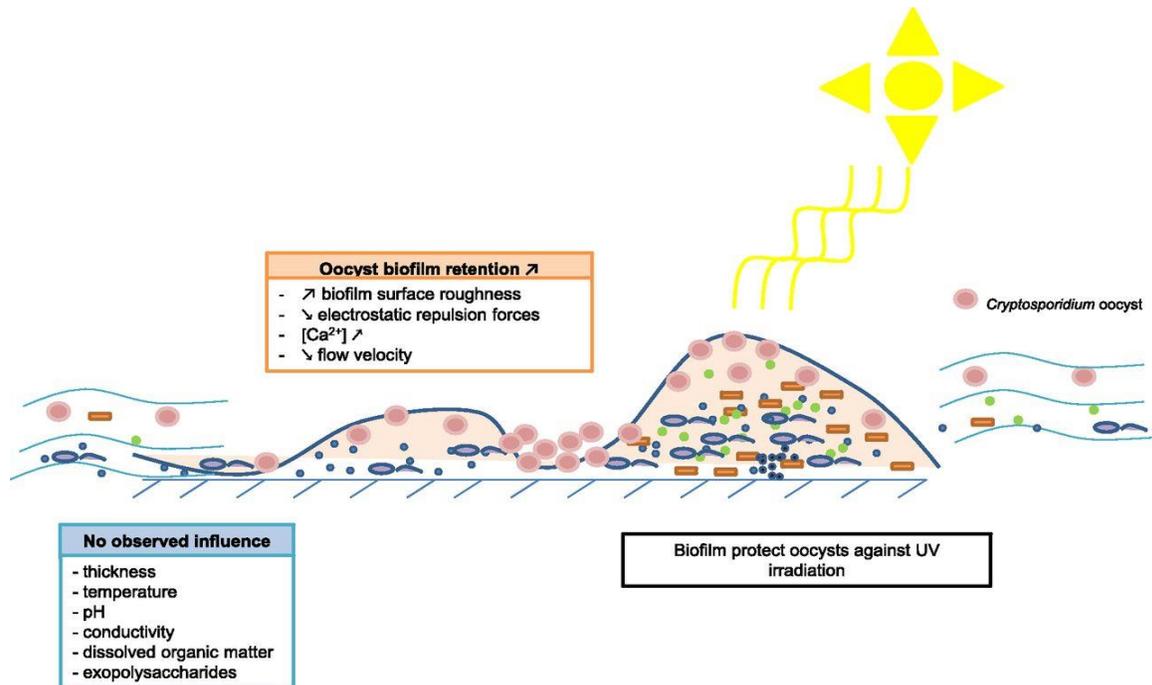


Figura 4 Representación esquemática de los parámetros que influyen en la retención/diseminación de ooquistes a partir de biopelículas. (Lefebvre et al., 2021).

6.1 Patogenia

Una vez ingerido el ooquiste, el parásito invade a los enterocitos, daña y destruye las células absorbentes y ocasiona que ese daño se extienda en todo el lumen intestinal (Ortega-Mora et al., 2002). La destrucción del epitelio intestinal resulta en la reducción de vellosidades y microvellosidades de las células epiteliales produciendo pérdida de la absorción intestinal y de enzimas digestivas unidas a la membrana, alteración de transporte de nutrientes y electrolitos, disminución de absorción de la glucosa y aumento de cloruro de sodio (Klein, 2008). La mucosa intestinal padece lesiones directas provocadas por el desarrollo de las fases de esquizogonia en los enterocitos y la pérdida de enzimas digestivas del borde luminal, quedando la superficie de absorción claramente disminuida (Quilez et al., 2003). Después de la infección por *Cryptosporidium spp.*, la autólisis es evidente a partir de las 12 h, la autólisis completa y la destrucción del tejido con pérdida de las vellosidades e incluso la estructura de la cripta se aprecia a las 18 h (Drinkall et al., 2017).

El organismo responde activando el factor nuclear-KB (NF-KB) y otros sistemas. La activación de NF-KB induce la producción de citocinas y quimiocinas, como la

interleucina-8, para desencadenar una reacción inflamatoria y anti-apoptótica de supervivencia, señales directamente en las células infectadas. La actividad de la enterotoxina, que produce la secreción de cloruro, se ha detectado en extractos de heces de los terneros infectados con *C. parvum* induce la apoptosis en las células epiteliales (Xiao et al., 2007). Con ello aumenta más el daño endotelial haciendo que quede susceptible ante otros patógenos oportunistas, lo que puede agravar la enfermedad.

6.2 Signos y Lesiones

Cryptosporidium spp. son capaces de causar enfermedades clínicas de leves a graves en humanos y animales. La infección por *Cryptosporidium spp.* puede ser esporádico y autolimitado o bien, crónico. Aunque la mayoría de las infecciones por *Cryptosporidium spp.* son asintomáticas, se han notificado enfermedades clínicas graves manifestadas por diarrea en humanos, rumiantes, perros, gatos, y caballos. En el ganado, causa diarrea neonatal y deshidratación que lleva a la muerte del animal y además a grandes pérdidas económicas (Gajadhar, 2015). Es un agente etiológico importante en el síndrome de diarrea neonatal en becerros, corderos y cabritos, causando considerables pérdidas económicas directas e indirectas, debido a su mortalidad, retraso en el crecimiento y asistencia veterinaria (De Graaf et al., 1999).

En el ganado bovino, el resultado de descripciones puntuales, brotes en explotaciones y estudios epidemiológicos muestran que la cryptosporidiosis afecta tanto a razas de carne como de leche y que la prevalencia de la infección en terneros con diarrea es del 10 al 80% (Dixon et al., 2011). Se pueden distinguir dos especies del género *Cryptosporidium*: *Cryptosporidium parvum* que infecta el intestino delgado distal y *Cryptosporidium muris* que infecta el abomaso (De Graaf et al., 1999), lo que provoca el retardo la producción del ácido y probablemente la digestión de proteínas del abomaso. En vacas crónicamente enfermas, la producción láctea disminuye en cerca de 13% (Xiao et al., 2004). En animales domésticos, las infecciones por *Cryptosporidium parvum* se presentan con alta morbilidad y eventualmente con diarrea en becerros y menos frecuente en lechones (Lim et al., 2007). Las características clínicas de las infecciones incluyen diarrea acuosa, ocasionalmente acompañada de calambres intestinales, náuseas, vómito, pérdida de peso y aumento de temperatura corporal (Solarte et al., 2006).

Las lesiones histológicas se observan a la mitad de yeyuno e íleon, con vellosidades cortas desnudas o con células epiteliales columnares bajas o cúbicas e hiperplasia en lámina propia. En el borde superficial de las microvellosidades de las células que recubren la parte media superior de las vellosidades en el yeyuno medio posterior e íleon, se observan organismos con características morfológicas

de *Cryptosporidium*, y están presentes lesiones con criptitis (Pohlenz et al., 1978). Se observa que las etapas de desarrollo se encuentran con frecuencia en la superficie del epitelio de las vellosidades en la parte distal del íleon. Las vellosidades se acortan y se expanden, y el tejido conectivo de la submucosas está infiltrado por células inflamatorias, principalmente de eosinófilos (Fischer, 1982). La infección en el epitelio intestinal puede producir vellosidades rotas, hiperplasia de la cripta, destrucción del citoesqueleto y disminución de la absorción de sodio (Ananta et al., 2014).

En animales inmunodeprimidos se observan varios estadios de parásitos protozoarios, característicos de criptosporidias, como cuerpos esféricos de 1.5 a 4.0 um de diámetro en estómago, en el borde de las microvellosidades de la mucosa intestinal, duodeno, yeyuno, íleon y colon, principalmente sobre las puntas y a lo largo de los lados de las vellosidades intestinales, en las criptas, en las glándulas de Brunner, en los conductos biliares y pancreáticos y en la vesícula biliar. *Cryptosporidium spp* ocupan la superficie apical intracelular de los enterocitos (Knight y Wright, 1978).

6.3 Prevención y control

Este protozooario es muy resistente ante los efectos de la intemperie y de algunos desinfectantes, por ejemplo, los ooquistes de *Cryptosporidium spp* no son afectados por los niveles de cloro (1.3 mg/L) que por lo general se emplean para desinfectar el agua, así que son mucho más resistentes que las bacterias entéricas y los virus. Es necesario usar entre 8.000 y 16.000 mg/L de cloro contra los ooquistes de *Cryptosporidium spp.*, mientras la ozonización inactiva el 99% de los ooquistes. Con 15 mg/L de cloro, disminuye en 47 % la infectividad de ooquistes y con 80 mg/L y 90 minutos de contacto hay una disminución en la infectividad del 99% (Brosseur, 1997).

La mejor forma de enfrentar esta situación es promoviendo el uso de la pasteurización del agua. Mediante este procedimiento, el agua se somete a una alta temperatura por un espacio de tiempo y el parásito se destruye. Hasta hoy, la pasteurización sigue siendo la manera más apropiada (García et al., 2014).

En los terneros, la mejor medida profiláctica es la higiene para prevenir el contagio. El becerro debe recibir calostro dentro de las primeras 4 horas de nacimiento y aislado en su corral o en una becerra individual para evitar estar en contacto con la madre y ambiente contaminado. Además, con esa cantidad de calostro se mejora la respuesta inmune del organismo, lo que mejora la respuesta ante este patógeno. En los establos, las medidas higiénicas como: limpieza de becerras; lavado de utensilios destinados para alimentación con agua caliente; así como la

administración correcta de calostro en las primeras horas de vida, contribuye a prevenir la transmisión en becerros neonatos (Flores, 2011).

6.4 Tratamiento

Existen diversos tratamientos ante este protozoario, la efectividad y el modo de acción varía notablemente entre ellos. Los principales fármacos se mencionan a continuación:

Lactato de halofuginona (HFL): su mecanismo de acción aún no se tiene claro, pero se piensa que afecta la etapa del esporozoito y el merozoito. El tratamiento con HFL no cura la enfermedad, pero reduce el desprendimiento del ooquiste y la duración de la diarrea, por tanto, se utiliza tanto en la prevención como en el tratamiento de criptosporidiosis. Se debe administrar dentro de las 48 horas de nacimiento como agente terapéutico, dentro de las 24 horas de inicio de los síntomas y se debe administrar por 7 días consecutivos (Thomson et al., 2017).

Nitazoxanida (NTZ): es un producto comercial, que está indicado para uso humano, con aplicación en ganado. La NTZ penetra a la vacuola parasitófora por difusión, y es reducida por enzimas piruvato-NAD oxidoreductasa (PNO), produciendo un radical libre biotóxico que daña al oocisto (Flores, 2011).

Inhibidor de la quinasa potenciada (BKI): En estudios de este tratamiento, se ha visto que los terneros infectados tratados una hora después con BKI, con una administración cada 12 horas por 5 días, han tenido una reducción en el desprendimiento de ooquistes en comparación con animales no tratados. Esta reducción es importante para disminuir la carga del parásito hacia el medio ambiente y por tanto la posible infección a organismos entornos agrícolas y urbanos. Sin embargo, no se eliminaron por completo los signos clínicos de criptosporidiosis, la consistencia fecal era un poco más firme y el volumen fecal fue reducido (Schaefer et al., 2016).

7. Métodos de diagnóstico

Se puede detectar rutinariamente por métodos microscópicos en las heces frescas del ganado infectado; sin embargo, en los últimos 25 años, las técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la secuenciación y análisis de fragmentos se han empleado cada vez más para identificar especies y genotipos de *Cryptosporidium spp.* Esto debido a que, las técnicas microscópicas frecuentemente distinguen otros microorganismos que de igual forma comparten características morfológicas y tamaños, lo que ocasionalmente arroja falsos positivos (Thompson et al., 2016; López et al., 2020).

Las técnicas inmunológicas para la detección de ooquistes en las heces se encuentra la aglutinación en látex, ELISA captura antígenos parasitarios en heces y la técnica de inmunofluorescencia para examinar la prevalencia del parásito en las heces y fuentes de agua. Entre las técnicas de tinción histológicas se ha empleado la hematoxilina-eosina, azul de toluidina, tinción de Masson, tinción de Maquiavelo y técnicas inmunohistoquímicas como la peroxidasa-antiperoxidasa (Ortega-Mora et al., 2002).

Los protocolos de laboratorio de rutina para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., tanto en heces como en muestras de medio ambiente (ej. agua), incluye la examinación microscópica de estas extensiones, previa concentración de la muestra, con el objeto de aumentar la sensibilidad, realizando una tinción posterior ya sea con Giemsa, Heine o Zielh-Neelsen (Fayer, 2004). Dentro de estas, la técnica más difundida para la detección de ooquistes en heces, es la de Zielh-Neelsen modificada (Neira et al., 2013). A continuación, en el cuadro 2 se resume algunas características de los diferentes métodos de diagnóstico ante *Cryptosporidium*.

Cuadro 2 Ventajas y limitaciones de las técnicas utilizadas para evaluar la infectividad y la viabilidad. Modificada de Rousseau et al., 2018. (C: *Cryptosporidium* spp.; C.p: *C. parvum*; C.h: *C. hominis*; G: *Giardia duodenalis*; T: *Toxoplasma gondii*).

Métodos	Parásitos	Ventajas	Limitaciones
Bioensayos	C. p y C. h./ G / T	Requiere un solo ooquiste Aplicación en matrices complejas de alimentos Evaluación confiable de la exposición de humanos a protozoos infecciosos. Evaluación confiable de la eficiencia de la inactividad	Preocupaciones éticas Método costoso y trabajo intensivo Falta de confiabilidad con un número bajo de ooquistes Discriminación de diferencias grandes, pero no finas entre tratamientos Larga duración de los resultados (una semana como mínimo).
Cultivo celular	C.p y C. h	Correlación con bioensayos Requiere un solo ooquiste Evaluación de	Falta de ensayos estandarizados Tiempo medio (48/72h) a largo (10 días) para obtener resultados No se aplica a <i>Giardia</i> No se aplica en matrices

		exposición confiable de humanos a protozoos infecciosos Evaluación confiable de eficiencia de inactivación	alimentarias complejas
Métodos basados en morfología y propiedades físicas	C/G	Correlación entre electrorrotación y métodos de exclusión de PI (yoduro de propidio) Rápido Requiere un solo ooquiste	Requiere ooquistes purificados No hay datos sobre la viabilidad relativa a la medida de infectividad No se aplica en la evaluación de la exposición en los alimentos
Escisión	C/G/T	Correlación con el método de exclusión de PI Rápido No costoso	Requiere una gran cantidad de ooquistes purificados Tasa de escisión variable Sobre / subestimación de la exposición de humanos a protozoos infecciosos Sobre / subestimación de la eficiencia de inactividad Sin aplicación en matrices complejas de alimentos
Exclusión de tintes vitales	C/ G /T	Correlación con escisión para colorante PI (C) Rápido y relativamente simple No costoso Requiere un solo ooquiste Aplicación en matrices complejas de alimentos	Requiere ooquistes purificados Sobreestimación de la exposición de humanos a protozoos infecciosos Subestimación de la eficacia de inactividad
RT-PCR	C/G/T	Rápida Identificación de ooquistes de importancia para la salud humana	Límite de la variable de detección en función de las matrices Sobre estimulación de la exposición de los seres humanos a protozoos infecciosos

		Fácil de estandarizar Requiere un número reducido de ooquistes Aplicación en matrices alimentarias complejas	Subestimación de la eficiencia de inactividad
Pescado	C	Rápido No costoso Rápido No costoso Requiere un número bajo de ooquistes	Requiere ooquistes purificados Sobreestimación de la exposición de los seres humanos a protozoos infecciosos Subestimación de la eficacia de inactividad Sin aplicación en matrices alimentarias complejas
NASBA	C	Correlación con el método de exclusión de PI Rápido No costoso Requiere un número bajo de ooquistes	Sobreestimación de la población viable No cuantitativo No hay datos sobre la viabilidad relativa a la media de la infectividad No se aplica en la evaluación de la exposición en los alimentos
PMA-PCR	C	Rápido Requiere un número bajo de ooquistes Se puede acoplar al genotipo Fácil de estandarizar	Sobre estimulación de la población viable No hay datos sobre la viabilidad relativa a la medida de infectividad No se aplica en la evaluación de la exposición en los alimentos

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Lugar de estudio

La Comarca Lagunera es una región del norte-centro de México, situada en el suroeste del estado de Coahuila y el noroeste del estado de Durango. Está conformada por 15 municipios: cinco municipios pertenecientes a Coahuila y diez municipios pertenecientes a Durango. Ubicada en los meridianos de 102°22' y 104°47' Oeste, y a los paralelos 24° 22' y 26° 23' latitud Norte, la altura media sobre nivel del mar es de 1139 metros. Las muestras fueron recolectadas de establos situadas en esta región. El área muestreada se realizó en un radio de 52.98 Km, tomando como punto central la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna.

8.2 Diseño experimental

Durante el periodo del 13 de septiembre al 11 de noviembre de 2021, en La Comarca Lagunera se realizó la toma de muestras de agua. Los establos estudiados estaban ubicados a una distancia promedio de 5.84 km. Se tomaron 40 muestras de cuatro litros de agua de cada estanque en el radio de estudio; se muestrearon 40 establos al azar.

Se colectaron muestras de agua de los estanques que suministran el agua a las instalaciones de los establos, incluyendo, el área de crianza de becerras. El criterio de selección de los establos fue la presencia de *Cryptosporidium spp.* los cuales, según estudios anteriores de la región la mayoría de los establos tienen prevalencia de este parásito.

En el cuadro 3 se observan los establos muestreados y su ubicación a través de coordenadas (para consultar el mapa satélite, haga clic en el siguiente enlace: <https://earth.google.com/earth/d/15gMCaE3dPh0A8rC6aVV7UL7ox0Q54q1E?usp=sharing>).

Cuadro 3 Coordenadas de establos de La Comarca Lagunera donde se recolectaron muestras de agua.

No.	Establo	Coordenadas
1	La Partida	25°35'36.1"N 103°18'38.1"W
2	San Vicente	25°29'37.7"N 103°17'32.4"W
3	Guadalupe	25°45'00.8"N 103°13'36.0"W
4	El Rocío	25°44'22.5"N 103°18'41.4"W
5	El Fénix (noria)	25°41'34.4"N 103°17'37.5"W

6	La Llana	25°39'22"N 103°25'58"W
7	Coyote	25°41'10.2"N 103°18'08.7"W
8	Gaviotas	25°48'02.6"N 103°22'53.7"W
9	El Bercial	25°38'46.5"N 103°35'36.4"W
10	La Montañesa	25°46'44.8"N 103°18'03.9"W
11	Gema	25°45'16.4"N 103°23'32.0"W
12	Valenciana	25°44'39.0"N 103°21'54.0"W
13	Las Águilas	25°44'29.7"N 103°20'12.1"W
14	El Pilar	25°43'29.9"N 103°21'46.3"W
15	Campanario	25°30'17.3"N 103°09'05.7"W
16	California	25°44'51.7"N 103°24'40.7"W
17	El Edén	25°39'37.8"N 103°26'27.7"W
18	Eucaliptos (noria)	25°41'38.9"N 103°26'54.0"W
19	Ampuero	25°27'50.6"N 103°22'09.9"W
20	Campo Sagrado	25°28'02.4"N 103°19'55.6"W
21	El Chorrillo	25°23'12.4"N 103°20'11.8"W
22	La Victoria	25°32'26.6"N 103°16'37.0"W
23	Paredón	25°38'16.6"N 103°18'41.5"W
24	El Compás	25°40'35.4"N 103°22'33.5"W
25	Providencia del Norte	26°00'21.7"N 103°11'58.8"W
26	Solima	25°39'45.8"N 103°17'57.2"W
27	Fresnedo	25°44'27.3"N 103°33'34.6"W
28	Gibraltar	25°36'42.5"N 103°35'42.3"W
29	Buenavista	25°49'26.0"N 103°19'12.2"W
30	San Antonio	25°44'45.4"N 103°14'41.2"W
31	La Cabaña	25°22'39.3"N 103°20'12.0"W
32	Paredones	25°21'25.3"N 103°26'37.8"W
33	Urquizo	25°46'13.1"N 103°08'29.4"W
34	Enramada (noria)	25°23'46.5"N 103°19'58.6"W
35	El Crótalo	25°21'37.5"N 103°20'27.4"W
36	Sector Solima	25°39'04.2"N 103°16'22.7"W
37	Sector Purísima	25°39'06.9"N 103°17'44.4"W
38	Lanchares	25°54'25.3"N 103°17'46.3"W
39	Victoria 1	25°43'12.7"N 103°28'49.8"W
40	Victoria 2	25°43'12.7"N 103°28'49.8"W

8.3 Toma de muestras y procesamiento

Antes de colectar la muestra, se hizo una descripción del agua y sus usos, en donde se tomó en cuenta distintos factores como: uso de agua (consumo de becerras, consumo de vacas, cultivo agrícola), aspecto del agua (clara, medio turbia o muy turbia), presencia de peces, presencia de materia orgánica flotante, y presencia de burbujas de fermentación.

Para la toma de los cuatro litros de agua, se utilizaron galones de plástico previamente lavados y desinfectados. El agua se colectó del lado contrario de la entrada de agua al estanque. En esa área, se identificó algún indicio de microbioma y/o materia orgánica, el cual se agitó levemente el agua para poder desprender los ooquistes. Una vez desprendidos, se procedió a tomar la muestra.

Cada galón se identificó, y se trasladó, a temperatura ambiente, al Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. Se asignó un área específica para el almacenamiento de los galones y se dejó reposar 24 h con el fin sedimentar la materia orgánica. Una vez transcurrido el tiempo, se descartó el sobrenadante por medio de succión, al final, el sedimento se recuperó en frascos de 80 mL, y, nuevamente, se dejó sedimentar por 24 horas en refrigeración.

Trascurrido este tiempo, se hizo el mismo procedimiento para quitar el excedente y recuperar aproximadamente 10 mL del sedimento en tubos graduados de 15 mL de tapón de rosca. El volumen recuperado se centrifugó a 2500 X g/min durante 10 minutos (equivalentes a 3500 rpm). Una vez centrifugado, se descartó el sobrenadante, y se recuperó el sedimento (4-7 mL aproximadamente), al cual se agregó 0.5 mL de dicromato de potasio al 2.5 % y se dejó reposar durante 5 min para después, filtrar con ayuda de un tamiz del número 37 μm , el resto, se colocó en tubos de 6 ml. Posteriormente, con ayuda de una pipeta, se colocaron 30 μl de cada muestra en laminillas portaobjetos y se dejaron secar al aire libre. Una vez secas, se procedió a realizar la técnica de Ziehl Neelsen modificada para determinar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Dicha técnica se detalla a continuación:

1. Filtrar Fucsina
2. Colocar 30 μm de muestra en la laminilla y realizar un frotis
3. Dejar secar al aire libre
4. Cubrir las laminillas en Fucsina por 30 minutos
5. Enjuagar con agua corriente
6. Cubrir las laminillas 10 segundos en Alcohol ácido resistente
7. Enjuagar con agua corriente

8. Cubrir las laminillas con Azul de metileno por 5 minutos
9. Enjuagar con agua corriente
10. Dejar secar al aire libre
11. Colocar 2 o 3 gotas de Xilol (solo para hidratar)
12. Montar con resina
13. Dejar secar al aire libre

Terminada la técnica, los cubreobjetos se observaron en un microscopio óptico (Microscopio binocular Labomed CXL-LED), enfocando en un aumento de 40x y se buscaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

8.4 Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS ver. 25.0 IBM Corp. (2017). Por la naturaleza de los datos, no se utilizaron pruebas de normalidad ni homocedasticidad. Para ver si el estado del agua y sus características influían en la aparición de los ooquistes, se determinó la frecuencia de estas características, para ello, se utilizó una prueba chi cuadrada. Para relacionar los estanques de los establos positivos con el aspecto del agua o presencia de materia orgánica, se hizo una regresión lineal utilizando un análisis de correspondencias canónicas. Se consideró estadísticamente diferente un valor de $p \leq 0.05$.

9 RESULTADOS

9.1 Microscopía óptica

De acuerdo a los resultados de la microscopía óptica, de los 40 establos, cinco resultaron positivos a ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en el agua de sus estanques (figura 10), lo que corresponde al 12.5 % prevalencia.

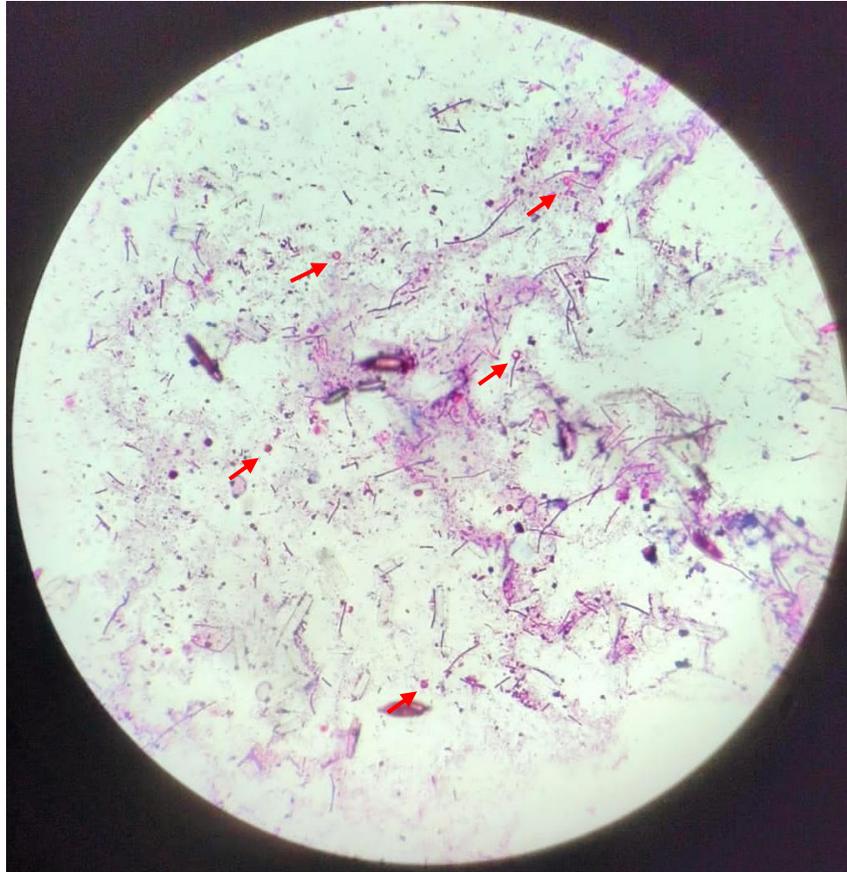


Figura 5 Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en muestra de agua de estanque de establo (aumento de 40X, tinción Ziehl Neelsen)

9.2 Influencia de factores

A la luz de las pruebas estadísticas, se determinó que el aspecto del agua (clara, turbia, muy turbia) y la presencia de peces, materia orgánica o burbujas de fermentación, no influyen en el hallazgo de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (X^2 2.45, GL 3, $p=0.45$). Dichos establos se encuentran a una distancia promedio de 14.8 km entre cada uno (figura 5).

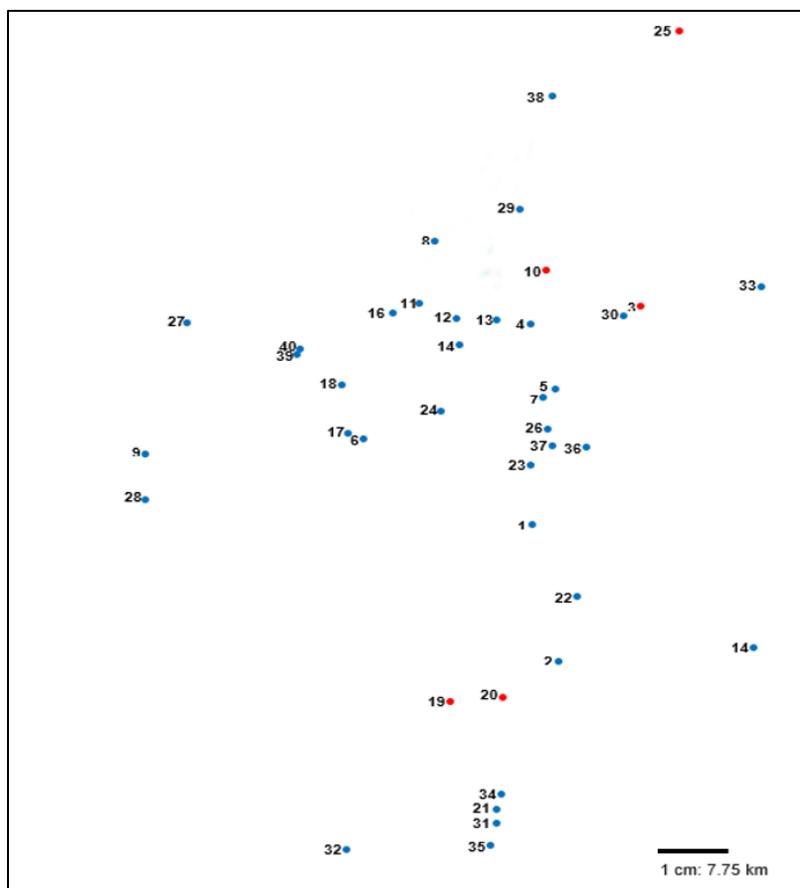


Figura 6 Ubicación geográfica de los establos estudiados. Se muestra el número de identificación del establo con un punto de color: azul= negativo, rojo= positivo, así como una escala en distancia (escala 1: 350000)

9.3 Caracterización de los estanques

Previo a la toma de muestra, se caracterizaron aspectos importantes de cada establo. Estos incluyeron el uso del agua, aspecto del agua y presencia de materia orgánica. En el cuadro 4 se presenta el porcentaje de establos que dieron positivo a cada factor.

Cuadro 4. Porcentaje de establos que resultaron positivos en la caracterización de cada factor que describe: el uso de agua, el aspecto y presencia de materia orgánica.

Característica	Uso del agua			Aspecto del agua			Presencia orgánica		
	Consumo vacas	Consumo becerras	Uso agrícola	Clara	Medio turbia	Muy turbia	Peces	Materia orgánica flotante	Burbujas fermentación
Porcentaje	87.5	85	72	47.5	50	2.5	27.5	22.5	5

10. DISCUSIÓN

Cryptosporidium spp. se reconoce en gran medida como una causa común de brotes de enfermedades diarreicas transmitidas por el agua y los alimentos en todo el mundo. La transmisión a través del agua es una ruta importante en la epidemiología del parásito (Widmer et al., 2020). López et al. (2020) nos menciona que en México la prevalencia de *Cryptosporidium spp.* se encuentra entre el 22% y 67%, y como dato primordial nos indica que la Comarca Lagunera se encuentra en una prevalencia de 71.79%, en estudios realizados en bovinos de diferentes edades. Xiao (2004) nos dice que la prevalencia de *Cryptosporidium spp.* en heces de bovinos se encuentra entre 1-85% en animales de 1 día hasta mayores de 2 años de edad en condiciones de explotaciones extensivas e intensivas.

El mayor número de investigaciones que se han realizado en México se han centrado en hallar ooquistes en heces tomadas directamente del recto, sin embargo, omiten la importancia que tiene el agua y las biopelículas en la sobrevivencia y dispersión de *Cryptosporidium spp.* El presente estudio será el primero que se realiza específicamente en estanques de agua de establos lecheros en la Comarca Lagunera.

Los resultados obtenidos en el presente estudio favorecen la hipótesis planteada, debido a la presencia de *Cryptosporidium spp.* en estanques de agua de establos lecheros, el 12.5 % de prevalencia con la técnica de tinción Ziehl Neelsen modificada, en presente estudio nos indica que el agua puede ser el un factor importante de contaminación, ya que por su mayoría se utiliza para el riego agrícola y para su consumo de vacas y becerras. Olivas et al., (2012) realizó un estudio similar en Valle de Juárez, Chihuahua, donde se muestreo 10L de agua de las llaves instaladas en los patios de diferentes casas, para *Cryptosporidium parvum* consideraron 38 muestras, de las cuales 19 resultaron positivas (50%), dichas muestras fueron identificado con la técnica de separación inmunomagnética de anticuerpos.

Las biopelículas parecen representar una fuente potencialmente de contaminación significativa a largo plazo de ooquistes de *Cryptosporidium spp.* que pueden ser atrapados y pueden contaminar los suministros de agua a través de su posterior liberación de forma gradual (Chan et al., 2019)

Daraei et al., (2020) nos menciona que la calidad del agua y los parámetros microbianos como la turbidez, la temperatura, el color, los residuos de desinfectantes, así como la geografía, los animales locales y la lluvia, son esenciales en la supervivencia de *Cryptosporidium spp.* en agua. De acuerdo al análisis estadístico las características que se consideraron en el presente estudio no fueron relevantes, ya que no influyeron en el hallazgo de los ooquistes, sin

embargo, pueden ser de importancia por el uso que se le da en los establos de esta región.

El alto índice de muestras positivas a *Cryptosporidium spp.* en suelos de tipo orgánico (100%) y limoso (70% a 96%), confirma que son texturas óptimas para el mantenimiento de la humedad, temperatura, flujo de oxígeno y gas carbónico, así mismo facilita el transporte de los ooquistes a través de las biopelículas y la filtración de estos en el subsuelo (Peng et al., 2011).

La presencia de *Cryptosporidium* en pozos de agua cruda está relacionada con la cercanía de las letrinas (menos de 3 metros del pozo), ya que puede existir un desplazamiento de estos protozoarios por debajo de la superficie y causar la contaminación del agua (Cermeño et al., 2008).

La Comarca Lagunera al ser unos de los principales estados en producción láctea, tiene diversos establos lecheros con un gran número de vacas y becerras, los cuales en caso de estar contagiados llegan a desechar los ooquistes por medio de las heces, por lo que se considera que los mismos llegan al suelo y por factores como el viento, agua, materiales, personal de trabajo e incluso la filtración a subsuelos, llegando a pozos de agua o los estanques cercanos de establos.

La criptosporidiosis en medicina veterinaria ocasiona una malabsorción y diarrea, principalmente en animales jóvenes, lo que provoca pérdidas económicas directamente relacionadas con la inversión generada por tratamientos, retraso en crecimientos, mortalidad y morbilidad.

11. CONCLUSIONES

La presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en agua de estanques muestra alta diseminación de este parásito en el medio ambiente. La técnica de tinción que se utilizó en este estudio no es muy sensible, por lo que se recomienda hacer estudios con técnicas moleculares para determinar con mayor precisión la prevalencia en los estanques de agua.

Si este protozoario se encuentra en estanques, y considerando que el agua se usa para el suministro de las vacas y becerras, es importante considerarlo como un factor de riesgo importante en la presentación y control de la criptosporidiosis.

REFERENCIAS

1. Anderson, DR, DW Duszynski y WC Marquardt. 1968. Tres nuevos coccidios (Protozoa: Telosporea) de Kingsnakes, *Lampropeltis* spp., en Illinois, con una nueva descripción de *Eimeria zamenis* Phisalix, 1921. *J. Parasitol.* 54: 577-581.
2. Ananta, S. M., Hidayat, A., & Matsubayashi, M. (2014). Survey on gastrointestinal parasites and detection of *Cryptosporidium* spp. on cattle in West Java, Indonesia. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7(3), 197-201. doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60020-1
3. Brasseur, P. (1997). Waterborne cryptosporidiosis: A major environmental risk. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44(6), 67S-68S. doi: 10.1111/j.1550-7408.1997.tb05784.x
4. Bouzid, M., Hunter, PR, Chalmers, RM y Tyler, KM (2013). Patogenicidad y virulencia de *Cryptosporidium*. *Revisiones de microbiología clínica*, 26 (1), 115-134. doi.org/10.1128/CMR.00076-12
5. Cermeño, J., Arenas, J., Yori, N., & Hernández, I. (2008). *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en aguas crudas y tratadas del estado Bolívar, Venezuela. *Universidad, Ciencia y Tecnología*, 12(46), 39-42.
6. Chan, S., Pullerits, K., Persson, K. M., Paul, C. J. & Radstrom, P. (2019). Bacterial release from pipe biofilm in a full-scale drinking water distribution system. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 5(1). doi 10.1038/s41522-019-0082-9.
7. Clode, P. L., Koh, W. H., & Thompson, R. A. (2015). Life without a host cell: what is *Cryptosporidium*? *Trends in parasitology*, 31(12), 614-624. doi.org/10.1016/j.pt.2015.08.005
8. Darei, H., Oliveri, G., Sahlabadi, F., Nam, V., Gholipour, S., Turki, H., Fakhri, Y., Moradi, A. & Mousavi, A. (2020) Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in water: a global systematic review and meta-analysis . *Environmental Science and Pollution Research*, 28 (1).
9. Das, K., Nair, L. V., Ghosal, A., Sardar, S. K., Dutta, S., & Ganguly, S. (2019). Genetic characterization reveals evidence for an association between water contamination and zoonotic transmission of a *Cryptosporidium* sp. from dairy cattle in West Bengal, India. *Food and waterborne parasitology*, 17, doi:10.1016/j.fawpar.2019.e00064
10. Dávila, P. G., & Fernández, N. R. (2017). El ciclo biológico de los coccidios intestinales y su aplicación clínica. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 60(6), 40-46.
11. De Graaf, D. C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L. M., Abbassi, H., & Peeters, J. E. (1999). A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *International Journal for parasitology*, 29(8), 1269-1287. doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00076-4

12. Dieguez, L., Winter, M., Molan, S., Monis, P., King, B. & Thierry, B. (2018). Disposable microfluidic micromixers for effective capture of *Cryptosporidium parvum* oocysts from water sample. *Journal of Engineering*, 12 (1). doi: 10.1186/s13036-018-0095-6
13. Dillingham, R. A., Lima, A. A., & Guerrant, R. L. (2002). Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and infection*, 4(10), 1059-1066. doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01630-1
14. Dixon, B., Parrington, L., Cook, A., Pintar, K., Pollari, F., Kelton, D. y Farber, J. (2011). El potencial de transmisión zoonótica de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. de ganado vacuno y lechero en Ontario, Canadá. *Parasitología veterinaria*, 175 (1-2), 20-26. doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.032
15. Drinkall, E., Wass, M. J., Coffey, T. J. & Flynn, R. J. (2017). A rapid IL-17 response to *Cryptosporidium parvum* in the bovine intestine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 191, 1-4. doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.07.009
16. Drummond, JD, Boano, F., Atwill, ER, Li, X., Harter, T. y Packman, AI (2018) *Cryptosporidium* oocyst persistence in agricultural streams –a mobile-immobile model framework assessment. *Sci Rep*, 8 (1), 1-8. doi.org/10.1038/s41598-018-22784-x
17. Fayer R. 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet. Parasitol.* 126:37-56. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.09.004
18. Fayer, R. (2010) Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.*, 124: 90-97 doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.005
19. Fayer, R., Santín, M., & Xiao, L. (2005). *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Journal of parasitology*, 91(3), 624-629. doi.org/10.1645/GE-3435
20. Fischer, O. (1982). Cryptosporidiosis in calves during the period of milk nutrition. *Veterinari Medicina*, 27(8), 465-471.
21. Flores, s. V. Capítulo 3. Criptosporidiosis en bovinos. *Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos*, 20. (2011)
22. 1Gajadhar, AA (Ed.). (2015). *Foodborne Parasites in the Food Supply Web*. Editorial Woodhead, 110-116, doi.org/10.1016/C2014-0-02593-2
23. Galie, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, EM, Villar, CJ, & Lombó, F. (2018). Biopelículas en la industria alimentaria: aspectos sanitarios y métodos de control. *Fronteras en microbiología*, 9, 898. doi.org/10.3389/fmicb.2018.00898
24. Gamboa, M. I., Giambelluca, L. A., & Navone, G. T. (2014). Distribución espacial de las parasitosis intestinales en la ciudad de La Plata, Argentina. *MEDICINA (Buenos Aires)*, 74(5), 363-370.
25. Galván R. M., Madriz E. A., Cardona L. M. (2019). Enteroparasitism and risk factors associated with clinical manifestations in children and adults of Jalisco

- State in Western Mexico. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 10(1), 39.
26. García-Sánchez, E., Valladares-Carranza, B., Talavera-Rojas, M. & Velázquez-Ordóñez, V. (2014). Cryptosporidiosis. Importancia en salud pública. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 15(5).
 27. Hamnes, I. S., Gjerde, B., & Robertson, L. (2006). Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in three areas of Norway. *Veterinary parasitology*, 140(3-4), 204-216. doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.024
 28. Hijjawi, N. S., Meloni, B. P., Ryan, U. M., Olson, M. E., & Thompson, R. C. A. (2002). Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology*, 32(14), 1719-1726. doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00199-6
 29. Hijjawi, NS, Meloni, BP, Ng'Anzo, M., Ryan, UM, Olson, ME, Cox, PT, & Thompson, RCA (2004). Desarrollo completo de *Cryptosporidium parvum* en cultivo libre de células huésped. *Revista internacional de parasitología*, 34 (7), 769-777. doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.04.001
 30. IBM Corp. Released. (2017) 'IBM SPSS Statistics for Windows'. Armonk, NY: IBM Corp.
 31. Klein, P. (2008). Preventive and therapeutic efficacy of halofuginone lactate against *Cryptosporidium parvum* in spontaneously infected calves: a centralised, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Vet. J* 177: 429-31. doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.05.007
 32. Koh, W., Thompson, A., Edwards, H., Monis, P., & Clode, P. L. (2014). Extracellular excystation and development of *Cryptosporidium*: tracing the fate of oocysts within *Pseudomonas aquatic* biofilm systems. *BMC microbiology*, 14(1), 1-13. doi.org/10.1186/s12866-014-0281-8
 33. Knight, R. y S.G. White. (1978). Progress report intestinal protozoa. *Gut*. 19:940-953. doi: 10.1136/gut.19.10.940
 34. Lefebvre, M., Razakandrainibe, R., Villena, I., Favennec, L., & Costa, D. (2021). *Cryptosporidium*-biofilm interactions: a review. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(3), e02483-20. doi.org/10.1128/AEM.02483-20
 35. Liu, S., Gunawan, C., Barraud, N., Rice, S. A., Harry, E. J., & Amal, R. (2016). Understanding, monitoring, and controlling biofilm growth in drinking water distribution systems. *Environmental science & technology*, 50(17), 8954-8976. doi.org/10.1021/acs.est.6b00835
 36. Lim, Y. A. L., Wan Hafiz, W. I., & Nissapatorn, V. (2007). Reduction of *Cryptosporidium* and *Giardia* by sewage treatment processes. *Tropical Biomedicine*, 24(1), 95-104.
 37. López, D., Vlamakis, H. y Kolter, R. (2010). Biopelículas. *Perspectivas de Cold Spring Harbor en biología*, 2 (7).

38. López Torres, LL, López Cuevas, O., Vázquez Vázquez, C., Alvarado Gómez, OG, Vázquez Alvarado, RE, Rodríguez Fuentes, H. & Vidales Contreras, JA (2020). Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en ganado lechero de la región lagunera, México. *Revista biociencias*, 7. doi.org/10.15741/revbio.07.e881
39. Mead, J. R., & Arrowood, M. J. (Eds.). (2020). *Cryptosporidium: Methods and Protocols*. Springer New York.
40. Muhammad, M. H., Idris, A. L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X. & Huang, T. (2020). Beyond risk: bacterial biofilms and their regulating approaches. *Frontiers in microbiology*, 11, 928. doi.org/10.3389/fmicb.2020.00928
41. Neira P. 2005. Acerca de *Cryptosporidium* spp en Chile. *Rev. Med. Chil.* 133: 847- 849 doi.org/10.4067/S0034-98872005000700014
42. Nime, F. A., Burek, J. D., Page, D. L., Holscher, M. A., & Yardley, J. H. (1976). Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, 70(4), 592-598.
43. Olivas Enríquez, E., Flores Márgez, J. P., Di Giovanni, G. D., Corral Díaz, B., & Osuna Avila, P. (2013). Contaminación fecal en agua potable del Valle de Juárez. *Terra Latinoamericana*, 31(2), 135-143.
44. Ortega, L., Gomez, B. U., (2006). Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7548-7553. doi.org/10.1128/AEM.01352-06
45. Peng, X., Macdonald, S., Murphy, T. M., & Holden, N. M. (2011). The Fate and Transport of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in the Soil. In (Ed.), *Principles, Application and Assessment in Soil Science*. doi.org/10.5772/30570
46. Pignata, C., Bonetta, S., Bonetta, S., Cacciò, S. M., Sannella, A. R., Gilli, G., & Carraro, E. (2019). *Cryptosporidium* Oocyst contamination in drinking water: a case study in Italy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(11), 2055. doi.org/10.3390/ijerph16112055
47. Pohlenz, J., W.J. Bemrick, H.W. Moon y N.F. Cheville 1978. *Cryptosporidiosis* as a probable factor in neonatal diarrhea of calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172 (4) 452-547.
48. Pumipuntu, N. y Piratae, S. (2018). *Criptosporidiosis: una enfermedad zoonótica preocupante*. *Mundo veterinario*, 11 (5), 681. doi:10.14202/vetworld.2018.681-686
49. Prest, E. I., Hammes, F., Van Loosdrecht, M. C., & Vrouwenvelder, J. S. (2016). Biological stability of drinking water: controlling factors, methods, and challenges. *Frontiers in microbiology*, 7, 45. doi.org/10.3389/fmicb.2016.00045
50. Quilez, J., Sanchez, C. & Cacho, E. (2003). *Criptosporidiosis de los pequeños rumiantes*. 4 (2)
51. Quilez, J., Torres, E., Chalmers, R. M., Robinson, G., Del Cacho, E., & Sanchez-Acedo, C. (2008). *Cryptosporidium* species and subtype analysis from

- dairy calves in Spain. *Parasitology*, 135(14), 1613-1620. doi.org/10.1017/S0031182008005088
52. Rousseau, A., La Carbona, S., Dumetre, A., Robertson, L. J., Gargala, G., Escotte-Binet, S., y Aubert, D. (2018). Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne stages (cysts/oocysts) of *giardia duodenalis*, *Cryptosporidium*, spp., and *Toxoplasma gondii*: a review of methods. *Parasite*, 25, 14.
 53. Raghupathi, PK, Liu, W., Sabbe, K., Houf, K., Burmølle, M. y Sørensen, SJ (2018). Las interacciones sinérgicas dentro de una biopelícula de múltiples especies mejoran la protección de especies individuales contra el pastoreo de un protozoo pelágico. *Fronteras en microbiología*, 8, 2649. doi.org/10.3389/fmicb.2017.02649
 54. Ryan, U. N. A., Fayer, R., & Xiao, L. (2014). *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*, 141(13), 1667-1685. doi:10.1017/s0031182014001085
 55. Schaefer, d. A., betzer, d. P., smith, k. D., millman, z. G., michalski, h. C., menchaca, s. E., riggs, m. W. (2016). Novel bumped kinase inhibitors are safe and effective therapeutics in the calf clinical model for cryptosporidiosis. *Journal of Infectious Diseases*, 214(12), 1856–1864. https://doi.org/10.1093/infdis/jiw488
 56. Soave, R., Ruiz, J., Garcia-Saucedo, V., Garrocho, C., & Kean, B. H. (1989). Cryptosporidiosis in a rural community in central Mexico. *The Journal of infectious diseases*, 159(6), 1160-1162.
 57. Solarte, Y., Peña, M., & Madera, C. (2006). Transmisión de protozoarios patógenos a través del agua para consumo humano. *Colombia médica*, 37(1), 74-82.
 58. Santin, M. (2020). *Cryptosporidium* and *Giardia* in ruminants. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. Elsevier Inc, 36(1), 223–238. doi: 10.1016/j.cvfa.2019.11.005.
 59. Smith, H. V., Nichols, R. A. B., Mallon, M., Macleod, A., Tait, A., Reilly, W. J. & Wastling, J. M. (2005). Natural *Cryptosporidium hominis* infections in Scottish cattle. *Veterinary Record*, 156(22), 710-711. doi.org/10.1136/vr.156.22.710
 60. Sterk, A., Schijven, J., de Roda Husman, A. M., & de Nijs, T. (2016). Effect of climate change on runoff of *Campylobacter* and *Cryptosporidium* from land to surface water. *Water research*, 95, 90-102. doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.005
 61. Tolker-Nielsen, T. (2015). Desarrollo de biopelículas. *Espectro de microbiología*, 3 (2), 3-2. doi.org/10.1128/microbiolspec. MB-0001-2014
 62. Thomson, S., Hamilton, C. A., Hope, J. C., Katzer, F., Mabbott, N. A., Morrison, L. J., & Innes, E. A. (2017). Bovine cryptosporidiosis: impact, host - parasite interaction and control strategies. *Veterinary Research*, 1–16. https://doi.org/10.1186/s13567-017-0447-0

63. Thompson, R. A., Koh, W. H., & Clode, P. L. (2016). Cryptosporidium—what is it?. *Food and Waterborne Parasitology*, 4, 54-61, <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2016.08.004>
64. Tremblay, YD, Levesque, C., Segers, RP & Jacques, M. (2013). Método para cultivar biopelículas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* sobre una superficie biótica. *Veterinario BMC. Res.* 9:213. doi: 10.1186/1746-6148-9-213
65. Wingerder, J. y Flemming, H.-C. (2011). Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214 (6), 417-423. Doi:10.1016/j.ijheh.2011.05.009
66. Xiao, L., Alderisio, K., Limor, J., Royer, M., & Lal, A. A. (2000). Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Applied and environmental microbiology*, 66(12), 5492-5498. doi.org/10.1128/AEM.66.12.5492-5498.2000
67. Xiao, L., & Feng, Y. (2008). Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52(3), 309-323. doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00377.x
68. Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., & Upton, S. J. (2004). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical microbiology reviews*, 17(1), 72-97, doi:10.1128/CMR.17.1.72-97.2004
69. Xiao, L., Zhou, L., Santin, M., Yang, W. & Fayer, R. (2007). Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States. *Parasitol. Res.* 100: 701-6
70. Widmer, G., Carmena, D., Kváč, M., Chalmers, R. M., Kissinger, J. C., Xiao, L. & Favenec, L. (2020). Update on *Cryptosporidium* spp.: highlights from the seventh international *Giardia* and *Cryptosporidium* conference. *Parasite*, 27. doi: 10.1051/parasite/202