

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**Frecuencia de *Cryptosporidium* spp en caninos callejeros
de Torreón, Coahuila.**

POR

ANA KARENT GOMEZ PEREZ

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TITULO DE:**

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREON, COAHUILA

ABRIL DE 2014

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

TESIS

" Frecuencia de *Cryptosporidium* spp en caninos callejeros de
Torreón, Coahuila."

APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR DE REVISIÓN

ASESOR PRINCIPAL


M.C.V. RAMON ALFREDO DELGADO GONZALEZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL


M.C.V. RAMON ALFREDO DELGADO GONZALEZ



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

"Frecuencia de *Cryptosporidium* spp en caninos callejeros de Torreón, Coahuila."

TESIS ELABORADA BAJO LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ PARTICULAR DE ASESORÍA Y APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA



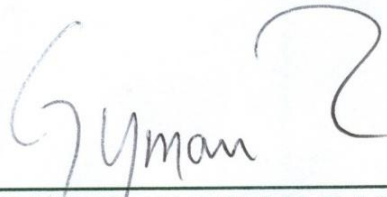
**M.C.V. RAMON ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ
PRESIDENTE**



**M.V.Z. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
VOCAL**



**M.C. JUAN LUIS MORALES CRUZ
VOCAL**



**M.V.Z. EDMUNDO GUZMAN RAMOS
VOCAL SUPLENTE**

DEDICATORIAS

A mis padres, Fernando y Victoria, que cada día de mi vida han estado conmigo, brindándome su apoyo incondicional, y que en toda mi educación siempre me han dado amor y comprensión, en cada etapa en mi vida y que nunca me cortaron las alas, y que valoro cada sacrificio que hicieron por mi dándome la mejor herencia, gracias por ser los mejores padres en mi vida y de mi mundo....LOS AMO!!

A mi esposo Enrique que empezamos una vida juntos que llegaste a mi vida en el momento exacto, que eres el hombre ideal que siempre había esperado te admiro y te respeto, pero sobre todo TE AMO..!!

A mi pequeña gran razón de mi existir y motor en mi vida..Fatima a ti, mi angelito que Dios me mando, mi luz al final de camino, eres mi gran inspiración,tú me hiciste conocer el amor puro y tierno que se puede sentir en esta vida... TE AMO BEBE..!!

A mi hermano Rodrigo que pase o que pase siempre estaremos juntos, no importa la distancia sabemos que nos tenemos el uno al otro, te quiero hermano..!!

A mi abuelita Felicitas que me enseñó a siempre luchar, que no importa la adversidad nunca me daré por vencida y que la vida es bella.

AGRADECIMIENTOS

Especialmente al M.C. Ramón Delgado González por su apoyo y dedicación para la realización de esta investigación. Gracias por su amistad.

A mi alma mater la Universidad Agraria Antonio Narro por brindarme conocimiento durante 5 años

A toda mi familia tías(Chapis, Carmen, Julia, Tere, Luz), a mi tío Juan, mis primos que son mis hermanos (Abril, Abel, Ixchel, Diego, Pepe), por su apoyo a cada uno de ustedes, de corazón gracias...!!

A mis abuelitos (Alejandro y Felicitas) que desde el cielo siempre me cuidan y me guían, (Fernando y Lupita) gracias por los buenos consejos y enseñarme el cuidado a los animales. A ustedes mil gracias....!!!

A mis amigos de la candela #79 (Edgar, Guillermo, Hugo, Daniel, Marin, Coral, Beto, Luis, Erik, Karen, Omar, Felipe) GRACIAS, por siempre regalarme una sonrisa cuando más la necesitaba, por cada aventura que anduvimos y por cada desvelada juntos los quiero amigos.!!

INDICE DE CONTENIDO

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCION	2
III.	JUSTIFICACIÓN.....	3
IV.	OBJETIVOS	3
V.	ANTECEDENTES	4
1.	Historia	4
2.	Epidemiología.....	4
3.	Transmisión	7
4.	Patogenia e inmunidad	8
	Reconocimiento de las células y la adhesión al huésped.....	8
	C. parvum adheridos a la superficie de las células.....	9
	Respuestas de las células epiteliales a la infección por C. parvum	9
	Apoptosis.....	10
	Regulación de las citocinas proinflamatorias y reguladores inmunes	11
	Regulación del factor de crecimiento transformante-b (TGF-b).....	12
	Respuesta inmune de la mucosa intestinal contra Cryptosporidium	12
5.	Signos y lesiones.....	14
6.	Ciclo biológico	17
VI.	MATERIALES Y METODOS.....	19
VII.	RESULTADOS	21
VIII.	DISCUSION.....	22
IX.	CONCLUSIONES.	24
X.	LITERATURA CITADA.....	25

INDICE DE FIGURAS

	Página
Cuadro 1. Especies reconocidas de <i>Cryptosporidium</i> , huésped específico predominante y localización primaria de la infección	7
Figura 1. Patogenia de criptosporidiosis enteropático y colangiopatía	12
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> e infección de las células epiteliales del huésped	16
Figura 3. Total de muestras, positivas y negativas plasmadas En porcentaje	21
Figura 4. Porcentaje de las muestras con resultado positivo y negativo entre machos y hembras.	22

I. RESUMEN

Este estudio fue realizado para determinar la frecuencia de *Cryptosporidium* spp. En caninos callejeros en Torreón, Coahuila entre los meses de febrero y marzo del 2014, las muestras fueron tomadas del Centro de Control Canino del Municipio de Torreón, Coahuila, con un total de 40 muestras tomadas al azar de diferentes animales, con signos clínicos y edades indiferentes, posteriormente se llevaron a la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria, Antonio Narro, Unidad Laguna, para realizar el barrido y la tinción de Ziehl Neelsen modificada, para la identificación mediante la observación a microscopio con un enfoque a 40x, los oocistos de *Cryptosporidium*. Los resultados mostraron que un total de 17 que son el 42.5% de las muestras resultaron positivas a la prueba, mientras que el 57.5% restante, fueron negativas, de las cuales, el total de muestras positivas, un 35.3% correspondieron a hembras, y el 64.7% correspondieron a machos.

Palabras clave. Frecuencia, *Cryptosporidium*spp, criptosporidiosis, caninos, callejeros.

II. INTRODUCCION

Los coccidios son parásitos obligados de vertebrados e invertebrados superiores que presentan ciclos de vida complejos, monoxenos o heteroxenos, e infectan células epiteliales del intestino, u otros órganos (Blackman y Bannister, 2001). Todas las especies de *Cryptosporidium* son parásitos intracelulares obligados, que presentan desarrollo endógeno que culmina en la producción de ooquistes eliminados por heces (O'Donoghue, 1995).

El género *Cryptosporidium* está clasificado como un eucariota perteneciente al Phylum Apicomplexa (Levin, 1984). Se consideran alrededor de 26 especies de *Cryptosporidium* válidas. *C. parvum* se ha descrito que causa la infección en humanos y otros animales. Evidencias moleculares indican que *C. parvum* se encuentra con varias diferencias genotípicas (Fayer y col., 2000). Una característica del phylum Apicomplexa es la presencia de un conjunto de organelos en la zona apical, con capacidad para invadir las células y multiplicarse como parásitos intracelulares (Blackman y Bannister, 2001).

Los ooquistes de *Cryptosporidium* se han observado en todo el mundo (Fayer y col., 2001). Los ooquistes de las heces de un perro naturalmente infectado miden 4.95 por 4.71 μm y tiene una relación, longitud/anchura de 1.05 (Fayer y col., 2001), y son morfológicamente indistinguibles de *C. parvum*. Se considera que las especies *C. canis*, *C. felis* y *C. meleagridis* encontrados en el perro pueden causar infección en el hombre. (Fayer y col. 2001).

Los animales domésticos, especialmente perros y gatos representan importantes beneficios para las personas y la sociedad. Contribuyen al bienestar del propietario en el desarrollo social, emocional y físico (Robertson y col., 2000). Sin embargo, las mascotas pueden constituir una importante fuente de infección para el hombre de criptosporidiosis, ya que esta es zoonótica (Dohoo y col., 1998).

III. JUSTIFICACIÓN

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria que afecta a animales domésticos y al hombre, siendo ésta una zoonosis. Se ha descrito que las especies de *Cryptosporidium* reconocen una gran variedad de huéspedes, tales como *C. canis* en los seres humanos.

De acuerdo a estos antecedentes y considerando la idea de que los perros pueden transmitir el parásito de *Cryptosporidium* a los humanos teniendo importantes implicaciones para la salud pública, el propósito de este estudio fue examinar heces de perros callejeros del Centro de Control Canino del municipio de Torreón, Coahuila, con la finalidad de determinar la frecuencia de la infección por *Cryptosporidium*.

IV. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

3.1.1. Determinar la frecuencia de *Cryptosporidium* spp., en caninos callejeros de diferentes edades del provenientes del norte, centro y sur del municipio de Torreón, Coahuila.

3.2. Objetivos específicos:

3.2.1. Analizar muestra de heces de caninos callejeros del municipio de Torreón, Coahuila, colectados por el Centro de Control Canino, para la identificación de *Cryptosporidium* spp.

3.2.2. Utilizar la tinción de Ziehl Neelsen modificada para la identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

V. ANTECEDENTES

1. Historia

Aun cuando el *Cryptosporidium* fue descrito por primera vez en el laboratorio en el año 1907, los primeros casos de criptosporidiosis humana fueron comunicados en el año 1976, y solo se tomó conciencia del organismo a principios de la década de los 80's cuando se comenzó a detectar en heces de individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En las últimas dos décadas se han realizado un considerable progreso en algunas áreas de la investigación y se han secuenciado los genomas de *C. parvum* tipo II y de *C. hominis* (Xuy col., 2004). Sin embargo, muchos aspectos de la biología y naturaleza de la interacción de este parásito con el huésped son aún poco claros (Tzipori y Ward, 2002).

2. Epidemiología

El *Cryptosporidium* es un protozooario de distribución cosmopolita siendo encontrado en una amplia variedad de especies animales (Current, 1983). El amplio interés en la criptosporidiosis humana se remonta a principios de los 80's. En ese entonces se supuso que la criptosporidiosis fue principalmente un patógeno zoonótico, con el potencial de transmisión de persona a persona (Casemore, 1985). Este punto de vista fue en gran parte de la investigación de brotes de infección que generalmente se asociaron con visitas a granjas y zoológicos a través de la contaminación del agua potable, que se cree en gran parte debido a la contaminación por el ganado (Meinhardt col., 1996; Hunter, 1997). Los brotes causados por la propagación de persona a persona fueron descritos asociados a balnearios y a niños en edad preescolar. Para aquellas personas que investigaron la criptosporidiosis, un sencillo modelo de epidemiología, comenzó a desmoronarse debido en parte a una serie de importantes descubrimientos. El más importante de tales descubrimientos fue encontrar que *C. parvum* se separaba en dos genotipos (Pengy col., 1997). Aunque el estudio inicial se hizo en sólo 39 cepas detectadas

en humanos y bovinos todas las muestras del genotipo tipo 1 se encontró sólo en los humanos mientras que el genotipo tipo 2 se encontró en los humanos y el ganado. Posteriormente el genotipo tipo 1 fue llamado tipo humano (Tipo H) y el genotipo tipo 2 fue llamado tipo bovinos (tipo C). Esto planteó el punto de que *C. parvum* no era después de todo una sola especie sino se trataba epidemiológicamente de dos tipos bastante idénticos, uno de los cuales era un patógeno estrictamente humano y el otro tipo principalmente zoonótico. Esta observación fue pronto confirmada por otros grupos de investigadores con acceso a colecciones de muestras más grandes y más variadas (Morgan y col., 1998; Mc Laughlin y col., 1999; Homan y col., 1999) y también en estudios experimentales (Widmer y col., 1998). Sin embargo, el documento definitivo fue publicado en el 2000 (Mc Laughlin y col., 2000).

Aunque los animales de compañía han sido considerados fuentes potenciales de infección por *Cryptosporidium* humano, los únicos estudios en los que oocistos recuperados de perros y gatos se han determinado el genotipo y se ha demostrado que por lo general son infectados con huéspedes adaptados de especie, *C. canis* y *C. felis* (Abe y col., 2002). Así, los perros, los gatos y posiblemente otros animales de compañía pueden ser importantes reservorios zoonóticos para la infección por *Cryptosporidium*. Sin embargo, con *Cryptosporidium* hay una considerable información epidemiológica demostrando fuertes vínculos entre el contacto con ganado infectado y las infecciones humanas (Fayer y col., 2000; Stantic-Pavlinic y col., 2003).

La criptosporidiosis es una infección entérica humana de considerable incidencia tanto en países desarrollados como en desarrollo. Si bien los primeros casos fueron notificados en 1976. La enfermedad adquirió verdadera importancia a partir de 1993, debido a que se produjo el brote epidémico más importante a nivel mundial, en Milwaukee, EE.UU. que afectó a más de 400,000 personas (Fayer y col., 2004). Desde entonces, los casos de criptosporidiosis han sido informados en más de 40

países, tanto en individuos inmunocompetentes como en inmunocomprometidos (Dillinghamy col., 2002).

Las estadísticas publicadas abarcan valores desde 0.3 a 4.3% en países de América del Norte hasta cifras que cubren el rango 3.2 a 31.5% en América Central y del Sur (Fayer, 2004).

En términos epidemiológico, los ooquistes de *Cryptosporidium* presentan características biológicas transcendentales; 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 de bajo número (1 a 10 ooquistes) para infectar a otros organismos y considerable potencial zoonótico (Dillinghamy col., 2002).

La mayoría de las especies de *Cryptosporidium* parecen tener alguna especificidad de huésped, aunque no son estrictamente huésped-específicas (Fayer, 2004). Se han informado de episodios ocasionales de diarreas en seres humanos causados por *C. canis*, *C. felis*, *C. muris* y *C. meleagridis* (Carey y col., 2004).

La transmisión zoonótica y antroponótica de *C. parvum* ocurre mediante la exposición a animales infectados o al agua contaminada por las heces de esos animales. Con respecto a la transmisión antroponótica de *C. hominis*, la dispersión ocurre por contacto directo con individuos infectados o por ingesta de aguas contaminadas por heces. Estudios publicados de *Cryptosporidium* en felinos y caninos en todo el mundo, han reportado prevalencias en los caninos que van de 0.5% a 44.1% (Batchelor y col., 2000), y en felinos de 0% a 29.4% (Funada y col., 2007). Sin embargo en un estudio en Texas, de 70 perros en una perrera, se detectó una tasa de infección del 70% en los perros asintomáticos atípicamente infectados con *C. muris* (Lupo y col., 2007).

Cuadro 1. Especies reconocidas de *Cryptosporidium*, huésped específico predominante y localización primaria de la infección (Smith y col., 2005; Xiao y Fayer, 2008).

Especies de <i>Cryptosporidium</i>	Dimensión de los ooquistes (mm)	Sitio de infección	Hospedador
<i>C. andersoni</i>	5.0-6.5 x 6.0-8.1	Estómago	Bovinos, camellos
<i>C. baileyi</i>	4.6 x 6.2	Tráquea, bolsa de Fabricio, cloaca	Gallinas, pavos
<i>C. bovis</i>	4.76-5.35 x 4.17-4.76	Intestino delgado	Bovinos
<i>C. canis</i>	4.95 x 4.71	Intestino delgado	Caninos, humanos
<i>C. fayeri</i>	4.5-5.1 x 3.8-5.0	Epitelio intestinal	Canguro rojo
<i>C. felis</i>	4.5 x 5.0	Intestino delgado	Gatos
<i>C. galli</i>	8.5-8.8 x 6.2-6.4	Proventrículo	Aves
<i>C. hominis</i>	4.5 x 5.5	Intestino delgado	Humanos, monos
<i>C. macropodum</i>	No proporcionado	Intestino	Canguro gris
<i>C. meleagridis</i>	4.0-4.5 x 4.6-5.2	Intestino delgado	Pavos
<i>C. molnari</i>	4.72 x 4.47	Estómago	Peces
<i>C. muris</i>	5.6 x 7.4	Estómago	Roedores, mamíferos
<i>C. parvum</i>	4.5 x 5.5	Intestino delgado	Bovinos ovejás, cabras, humanos
<i>C. scophthaimi</i>	3.7-5.03 x 3.03-4.69	Epitelio y lumen intestinal	Peces
<i>C. serpentis</i>	4.8-5.6 x 5.6-6.6	Estómago	Serpientes, lagartijas
<i>C. suis</i>	5.05 x 4.41	Intestino delgado	Cerdos
<i>C. varanii</i>	4.2-5.2 x 4.4-5.6	Intestino y mucosa cloacal	Lagartijas
<i>C. wrairi</i>	4.0-5.0 x 4.8-5.6	Intestino delgado	Cobayos

3. Transmisión

La transmisión se produce por vía fecal-oral, por contacto directo o indirecto, de persona a persona, agua contaminada por heces, ingesta de alimentos contaminados (Fayer y col., 2000).

Los ciclos de vida de cada parásito incluyen fases asexuales de la proliferación en la superficie de la mucosa, además de una fase sexual de reproducción del *Cryptosporidium*, que también exhibe una fase intracelular inusual de desarrollo en su ciclo de vida (Thompson y col., 2000). La etapa infecciosa de los parásitos es

cuando se enquistan y cuando se liberan en las heces y la capacidad de supervivencia prolongada en el medio ambiente. La reinfección se logra cuando los ooquistes son ingeridos que puede ser directo a través del huésped o por contacto a través de material contaminado, el agua, los alimentos o los artrópodos. El vínculo entre las infecciones humanas y animales ha sido una pregunta que ha dominado gran parte del esfuerzo de investigación en *Cryptosporidium* spp.

Dado que el *Cryptosporidium* spp pueden ser transmitido por el agua, la fuente de contaminación del agua sigue siendo un tema crítico para las autoridades del agua a lo largo del mundo (Fayer, 2004; Thompson, 2004). El papel de los animales infectados puede ser controvertido, en particular la del ganado y la fauna silvestre debido a su posible papel como reservorios zoonóticos de infección.

4. Patogenia e inmunidad

El *Cryptosporidium* infecta principalmente las microvellosidades del epitelio intestinal, y en menor medida a epitelios extraintestinales, causando una enfermedad gastrointestinal aguda, en una gran variedad de huéspedes mamíferos incluyendo a los humanos. Típicamente la duración de la infección y el resultado final de la criptosporidiosis intestinal, depende del estado inmunológico del huésped (Fayer y Dubey, 1997). Normalmente las células epiteliales intestinales parasitadas del huésped son células del íleon (Jenkins y Petersen, 1997).

Cryptosporidium reside en la superficie apical de las células epiteliales intestinales y es visto como un patógeno mínimamente invasivo en la mucosa, sin embargo la infección provoca una respuesta primaria mediada por células del sistema inmunológico (Riggs, 2002). La patogenia de la infección va de la mano con la inmunología del huésped y a continuación se describe.

Reconocimiento de las células y la adhesión al huésped. La infección por *C. parvum* es iniciada por la ingestión de ooquistes, que luego se someten a exquistación para liberar esporozoítos. La unión de los esporozoítos para

adherirse a las células epiteliales y posteriormente causar la invasión son los principales pasos cruciales durante la patogenia de la criptosporidiosis. La microscopía electrónica revela que los esporozoitos se adhieren a las células epiteliales por su polo superior, seguido por invaginación de la membrana de la célula huésped (Lum y col., 1988). Como la invaginación se extiende a lo largo de la superficie del esporozoíto, eventualmente rodea completamente el esporozoito, conduciendo a la formación de una vacuola intracelular, parasitófora, pero de ubicación extracitoplásmica, donde el esporozoito se somete a un mayor desarrollo. Los estudios, utilizando modelos *in vitro* demuestran que la adhesión del esporozoito a las células epiteliales del huésped y la invasión se ve afectada por diversos factores, entre ellos la dosis de esporozoitos, pH, tiempo de incubación, cationes divalentes, y el estado de diferenciación de la célula huésped (Hamer y col., 1994).

Estudios de inmunización pasiva han demostrado que una infección *in vitro* e *in vivo* con *C. parvum*, adheridos a las células epiteliales puede ser inhibida por anticuerpos monoclonales contra moléculas de superficie de esporozoitos de *C. parvum* (Riggs, 2002), lo que indica que moléculas específicas de la superficie de los esporozoitos *C. parvum* están involucrados en la interacción de la infección (Elliot y col., 1997).

***C. parvum* adheridos a la superficie de las células.** Para las interacciones de recepción/adhesión entre *C. parvum* y la superficie de las células epiteliales huéspedes, se han identificado varias proteínas de bajo peso molecular que parecen contribuir a la adhesión y motilidad del parásito (Gut y Nelson, 1994). Otros estudios han demostrado que varias proteínas de superficie de esporozoitos están implicadas en la unión de *C. parvum* y la invasión de células huésped epiteliales (Barnes y col., 1998; Joe y col., 1998; Cevallos y col., 2000).

Respuestas de las células epiteliales a la infección por *C. parvum*. Las células epiteliales de la mucosa intestinal son críticas para la iniciación de la

respuesta inmune de la mucosa a diferentes patógenos entéricos. No sólo forman una barrera que separa el medio interno del huésped al exterior y al medio ambiente, las células epiteliales producen una variedad de citocinas y quimiocinas en respuesta a componentes microbianos (Panja y col., 1995). La primera interacción de *C. parvum* con el huésped es a través de la invasión de las células epiteliales de la mucosa, los eventos que se producen posteriormente son importantes tanto para la supervivencia del parásito y el desarrollo de la inmunidad.

Apoptosis. Ha sido bien demostrado que la apoptosis de la célula hospedadora, o muerte celular programada, se produce en respuesta a la infección con patógenos microbianos. La apoptosis sirve como un mecanismo de defensa y en la regulación de las respuestas del huésped, a patógenos invasivos y no invasivos (Vaux y col., 1994).

Los estudios que implican parásitos protozoarios intracelulares han mostrado que la regulación de la apoptosis es un acontecimiento clave durante la interacción huésped-parásito (Reis y Bareinskis, 2001).

Varios estudios han investigado el papel de la apoptosis durante la infección con *C. parvum* (Cheng y col., 1998). Los efectos citopáticos directos en las células epiteliales biliares infectadas con *C. parvum* muestran apoptosis generalizada en células biliares en cuestión de horas después de la exposición a *C. parvum*.

Este efecto citopático específico en el epitelio biliar, las células se consideran relevantes para la patogénesis de la colangitis (Ojcius y col., 1999). La infección con *C. parvum* conduce a la condensación nuclear y el porcentaje de células apoptóticas aumenta en función del número de ooquistes utilizados para infectar las células huésped. Basado en el hecho de que *C. parvum* causa apoptosis tanto de una línea celular biliar y una célula epitelial ileocecal, se sugiere que *C. parvum* podría causar la apoptosis de todas las células epiteliales infectadas

y que la apoptosis puede ser una característica común de *C. parvum* (Ojcius y col., 1999).

La apoptosis se produce en dos líneas de células epiteliales infectadas con *C. parvum*, a las 6 horas después de la infección, sólo una minoría de las células infectadas sobreviven a la fase inicial del desarrollo del parásito sin perder adherencia (Widmer y col., 2000). El bloqueo de la apoptosis con un inhibidor de caspasas aumenta el porcentaje de células infectadas, más apoyo que las células infectadas pueden intentar eliminar el parásito a través de la apoptosis (Ojcius y col., 1999).

Regulación de las citosinas proinflamatorias y reguladores inmunes. El control de las infecciones parasitarias es dependiente de la producción de diversas citocinas que activan los mecanismos de defensa del huésped que limitan la reproducción invasiva o la supervivencia del parásito (Kasper y col., 2001). Así se establece que las células epiteliales intestinales producen una variedad de citocinas en respuesta a diversas infecciones microbianas (Shao y col., 2001). La infección con *C. parvum* se asocia con el reclutamiento de leucocitos a la lámina propia de la mucosa y la regulación de la expresión de citocinas proinflamatorias y varios moduladores inmunológicos, lo que sugiere un papel importante de células epiteliales intestinales en la iniciación de la respuesta inmunológica de la mucosa a la infección de *C. parvum* (Riggs, 2002).

En respuesta a las infecciones bacterianas y virales intracelulares epiteliales intestinales, rápidamente se regula la producción de muchas citocinas proinflamatorias y quimiocinas que determinan los tipos de células inmunes del huésped reclutados para el sitio de la infección (Jung y col., 1995). En el caso de la infección por *C. parvum*, se caracteriza por la inflamación de la mucosa con presencia de neutrófilos, macrófagos y linfocitos en la lámina propia subyacente del epitelio de las células propias, así como la presencia de neutrófilos intraepiteliales y linfocitos T (Theodos, 1998). Una de las citocinas proinflamatorias que está

regulada por la infección con *C. parvum*, es interleucina 8 (IL-8). IL-8, es una quimiocina de neutrófilos, es producida por una amplia variedad de células incluyendo células endoteliales, células epiteliales, y linfocitos y juega un papel importante en iniciar la respuesta inmune del huésped a la infección microbiana, reacciones por el reclutamiento de células inflamatorias al sitio de la infección (Laurent y col., 1994).

La expresión se detecta por primera vez en 16 a 24 h después de la infección y aumenta durante los siguientes 1 a 2 días. La IL-8, también se ha detectado en tejido intestinal humano infectado con *C. parvum* los 7 días siguientes a la infección de *C. parvum*, pero no en los tejidos no infectados (Seydel y col., 1997).

Regulación del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β). TGF- β es una citocina antiinflamatoria secretada por las células intestinales (Strober y col., 1997), por la síntesis de proteínas de la matriz extracelular, que regula la reparación del epitelio de la mucosa dañada por la infección patógena o eventos inflamatorios (Diagnass y Podolsky, 1994).

El TGF- β mejora la función de la barrera epitelial, mientras que la exposición a oocistos reduce notablemente la función de la barrera. A través de la inducción de la vía de la proteína quinasa C, TGF- β protege la función de barrera de células epiteliales infectadas por *C. parvum* por tanto reduce significativamente el aumento en la permeabilidad de la célula y el grado de necrosis celular causada por *C. parvum*. Los mismos enterocitos pueden secretar TGF- β in vitro cuando se infectan con *C. parvum*, y pueden representar una fuente potencialmente importante de esta citosina (Roche y col., 2000).

Respuesta inmune de la mucosa intestinal contra *Cryptosporidium*. La superficie de la mucosa especializado en el sistema inmune y las células epiteliales intestinales producen una serie de citocinas y quimiocinas en respuesta a diferentes patógenos entéricos. A pesar del hecho de que *C. parvum* reside en la

superficie apical de las células epiteliales intestinal y mucosa, es un patógeno mínimamente invasivo, y produce una respuesta humoral mediada por células (Riggs, 2002). Los estudios realizados en los últimos años han incrementado la comprensión de la respuesta inmune del huésped contra *C. parvum* en particular el papel de los linfocitos T (Dengy col., 2004).

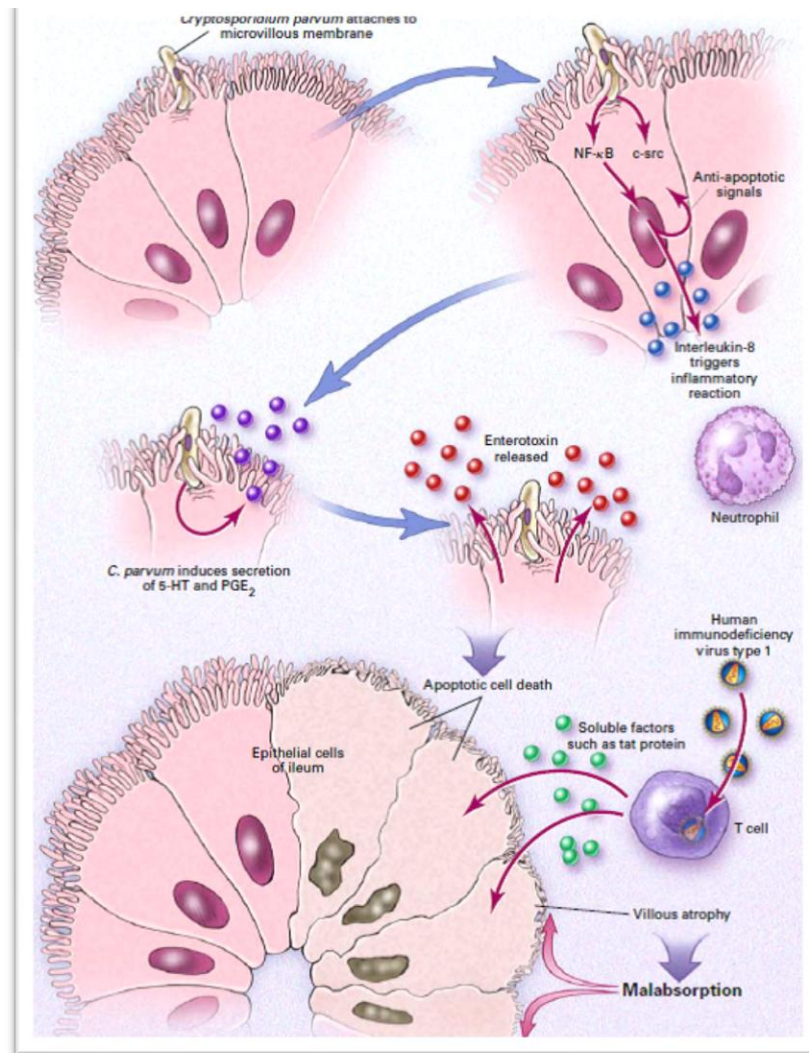


Figura 1. Patogenia de criptosporidiosisenteropático y colangiopatía.

Cryptosporidium parvum se une íntimamente a las microvellosidades de la membrana y causa la pérdida de microvellosidades, lo que resulta en mala absorción. El organismo activa señales para la activación y producción de

citocinas y quimiocinas, tales como la IL-8 , para activar una reacción inflamatoria y estimula la supervivencia anti-apoptótica en células directamente infectadas, facilitando la capacidad del organismo de sobrevivir y propagarse. La activación se asocia con la reorganización del citoesqueleto de la célula huésped y *C. parvum* induce la secreción de hidroxitriptamina y la prostaglandina E2 en el lumen. La actividad de una "enterotoxina", que produce la secreción de cloro *in vitro*, se ha detectado en extractos fecales de terneros infectados por *C. parvum* induce la apoptosis en las células epiteliales, lo que resulta en el daño a la barrera epitelial.

5. Signos y lesiones

Estudios han demostrado que la criptosporidiosis es más frecuente en países desarrollados, en huéspedes inmunocompetente, esta infección puede auto eliminarse y durar unos pocos días a tres semanas con una alta morbilidad en animales jóvenes; la infección en el huésped inmunodeficiente puede resultar crónica con diarrea, debilitamiento, deshidratación, mala absorción, emaciación y muerte (Morgan y col., 2000).

La duración y severidad de los síntomas clínicos son variables (Fayer, 2004) y depende de la edad y el estado inmunológico del infectado (Chen y col., 2002), pero también de la virulencia del parásito (Fahey y col., 2003).

La materia fecal puede contener moco pero la presencia de sangre y leucocitos es rara, debido a que se trata de una diarrea no inflamatoria (Fahey y col., 2003). Las alteraciones morfológicas del epitelio intestinal de los individuos infectados incluyen atrofia de las vellosidades, cambios mitocondriales y una actividad lisosomal aumentada en las células infectadas (Bogitsh y Cheng, 1998).

La infección experimental por *Cryptosporidium parvum* es capaz de provocar lesiones intestinales y también alteraciones en las funciones digestivas del epitelio intestinal; en consecuencia, se desarrolla diarrea por mala absorción e hipersecreción (Argenzi y col., 1990; Moore y col., 1995).

Con microscopia electrónica se observan las lesiones histológicas más notorias, reconocidas en el intestino delgado, principalmente en íleon, también se observa una severa atrofia y fusión de las vellosidades con hiperplasia en las criptas. Con mayor aumento se aprecian numerosos criptosporidias en diversos estadios de desarrollo, mayormente sobre el vértice de las vellosidades; las células parasitadas muestran un aspecto cuboidal o columnar poco diferenciado. Se identifica un discreto infiltrado inflamatorio, mayormente por linfocitos, en la lámina propia e hiperplasia del epitelio de las criptas (Moore y col., 1995). Las observaciones con el microscopio electrónico de transmisión demuestran que las células epiteliales parasitadas se encuentran degeneradas, con el retículo endoplasmático dilatado y pérdida de la estructura mitocondrial. En los sitios de adhesión de los parásitos las microvellosidades son escasas y desorganizadas, así mismo, en estos sitios se observa una región densa en la zona inmediata interna de la membrana celular de la célula parasitada. Además en la mayoría de los parásitos observados se pueden constatar las elongaciones de la membrana celular envolviendo los parásitos en la vacuola parasitófora (Moore y col., 1995).

Cryptosporidium es capaz de provocar notorias alteraciones en la estructura de las vellosidades intestinales, particularmente atrofiándolas y favoreciendo la infiltración de células inflamatorias en lámina propia (Moore R. et al., 1995). Además, las funciones del epitelio afectado se alteran, sobre todo, se encuentra impedida la absorción electrogénica de glucosa estimulada por la absorción de sodio (Argenzi y col., 1990; Moore y col., 1995).

Por otra parte, la función secretora de las células del epitelio de las criptas permanece sin cambios (Moore y col., 1995). Estas alteraciones, además de la creación de un ambiente de hiperosmolaridad intraluminal, conducen al desarrollo de una diarrea que puede ser tan grave como para provocar la muerte (Argenzi y col., 1990).

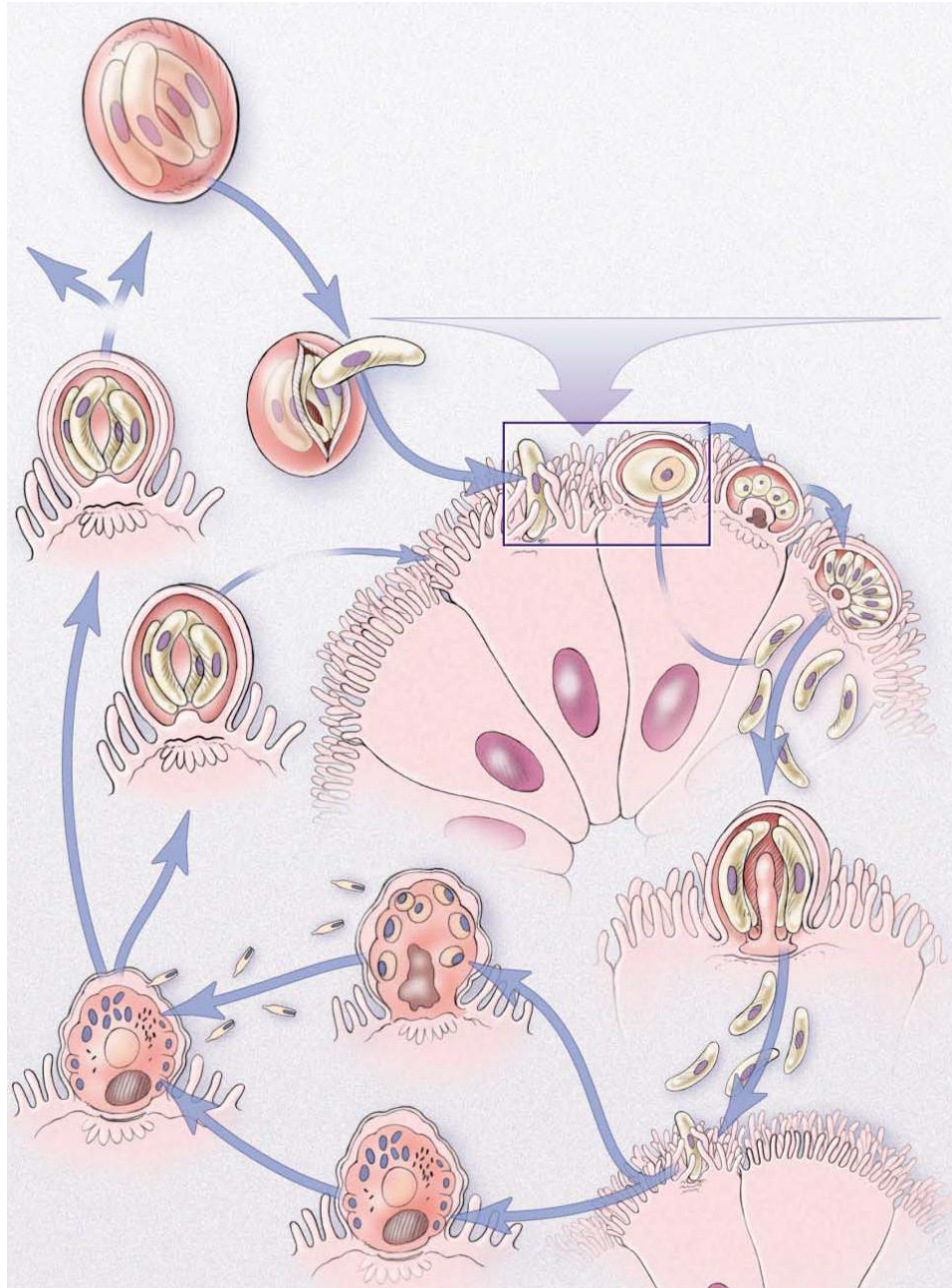
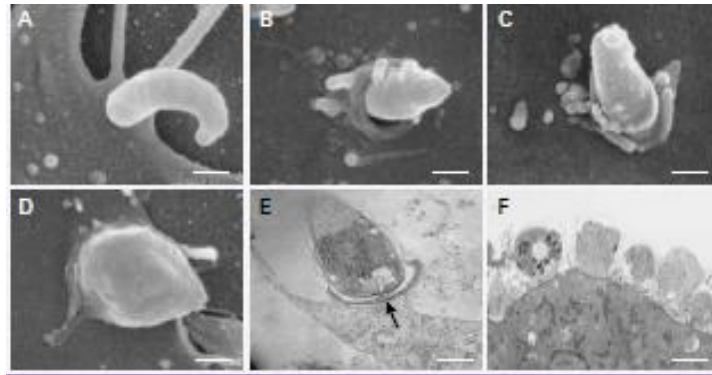


Figura 2.Ciclo de vida de *Cryptosporidium* e infección de las células epiteliales del huésped.

Después de ser ingerido, los esporozoitos son liberados, se unen al borde de cepillo de las células epiteliales, invaden a las células y forman trofozoítos .



Los paneles A y E muestran un esporozoito de *Cryptosporidium parvum* adherido a una célula epitelial en un hospedador modelo *in vitro* de la criptosporidiosis biliar.

Los paneles A, B, C, y D son micrografías electrónicas de barrido, y los paneles E y F son micrografías electrónicas de transmisión. El panel A muestra la fijación de un esporozoito a la superficie de la membrana apical de una célula epitelial biliar.

Los paneles B y C muestran un esporozoito que invade a una célula huésped y la protrusión de la membrana de la célula epitelial alrededor de todo el parásito en su sitio de unión. Los paneles D y E muestran un organismo envuelto por la membrana de la célula huésped y la formación de un vacuola. En el panel E, el zoito se ha puesto en contacto con la microvellosidades del borde de cepillo de la célula epitelial, con su extremo anterior insertado en la membrana de la célula huésped (flecha), y está en el proceso de ser internalizado. Se forma una banda densa donde el parásito se adhiere a la célula epitelial. El panel F muestra un intestino con criptosporidiosis intestinal.

6. Ciclo biológico

Los coccidios del género *Cryptosporidium* tienen un ciclo de vida monoxeno pues todas las etapas de su desarrollo (sexual y asexual) se completan dentro del tracto gastrointestinal de un único huésped. Presentan un estadio exógeno que corresponde a los ooquistes esporulados excretados por las heces de los

huéspedes infectados, u otros materiales biológicos como las secreciones respiratorias. Los ooquistes contienen cuatro estadios haploides o esporozoítos, los cuales escapan a través de una fisura que se abre en la pared del ooquiste. Al parecer las fluctuaciones de pH en el tracto gastrointestinal, las sales biliares, las enzimas pancreáticas y la temperatura favorecen el desenquistamiento, probablemente, a causa del aumento de la permeabilidad de la pared del ooquiste (Smith y col., 2005), la movilidad de los esporozoítos dentro del ooquiste y la consecuente exposición de receptores (Carey y col., 2004). El esporozoíto se adhiere a receptores de la membrana apical de la célula epitelial del huésped mediante diversos ligandos (Tzipori y Ward, 2002).

Este proceso induce a la reorganización del citoesqueleto de actina y la protección de la membrana de la célula huésped, alrededor del esporozoíto para formar una vacuola parasitófora donde el microorganismo permanece en posición intracelular pero extracitoplasmático(Chen y col., 2002).

Dentro de la vacuola, el parásito que en este estadio recibe el nombre de trofozoito, comienza un ciclo de multiplicación asexual (esquizogonia o merogonia) y luego continúa con una multiplicación sexual (gametogonia). Durante el ciclo de proliferación asexual se forman merontes de los cuales emergen merozoitos capaces de infectar otras células del huésped, en las que iniciará otra merogonia o, alternativamente, una gametogonia para diferenciarse en estadios sexuales llamados gamontes (gametocitos). Durante la gametogénesis los gametocitos masculinos liberan varios microgametos mientras que los gametocitos femeninos se diferencian en un único microgameto. Luego de la fertilización el estadio diploide resultante (zigoto) sufre meiosis, mecanismo que restaura el estado haploide. A partir de aquí se inicia el proceso de esporogonia en el cual el zigoto sufre uno o más ciclos de división mitótica para formar un ooquiste que contiene los esporozoítos infectivos (Smith y Walliker, 2002). Si bien se asume que la localización normal en un huésped inmunocompetente es el tracto gastrointestinal,

en individuos inmunocomprometidos se han descrito fases extraintestinales en vías aéreas, conductos biliares, hígado, vejiga y páncreas (Tzipori y Ward, 2002).

Se estima que aproximadamente un 80% de los ooquistes tienen una pared gruesa (doble cubierta) y son directamente infectantes para otros animales cuando se eliminan por heces, mientras que los ooquistes restantes (20%) poseen una pared fina (una unidad de membrana) que se rompe tras su salida de la célula hospedadora y permite la liberación de los esporozoítos que invaden nuevas células epiteliales. Este fenómeno conocido como autoinfección, no se produce en la mayoría de los coccidios y se considera responsable de la persistencia de las infecciones por *Cryptosporidium* en ausencia de reinfección exógena de una respuesta inmune protectora. El periodo de prepatencia (tiempo que transcurre entre la ingestión de los ooquistes infectantes y la excreción de los mismos varía de acuerdo al hospedador. Experimentalmente se ha demostrado que oscila entre 2 y 7 días en rumiantes y entre 4 y 22 días en humanos (Fayer y col., 1997).

VI. MATERIALES Y METODOS

Marco de referencia. El presente estudio fue diseñado para determinar la frecuencia e *Cryptosporidium* spp en caninos callejeros, del municipio de Torreón Coahuila, México. Torreón forma parte de la Comarca Lagunera, ésta abarca el suroeste de Coahuila y una gran parte del norte de Durango. Torreón es una ciudad mexicana del estado de Coahuila, ubicada al norte del país, latitud Norte 21° 31´ 11”, longitud Oeste 103° 25´ 52”, altitud 1,123 msnm. Tiene un desarrollo económico alto, sustentado en la industria agrícola, industria textil, metalúrgica, química, el comercio y los servicios. Tiene una superficie de 1,948 km², un promedio de temperatura anual de 28 °C, vientos del Este con promedio de 6 km/h, y una humedad relativa anual de 19%.

Toma de muestras. Se tomaron muestras de heces directamente del recto de caninos del Centro de Control Canino del municipio de Torreón, Coahuila, entre

los meses de febrero y marzo del año 2014. Los caninos fueron seleccionados aleatoriamente, visitando el Centro tres días a la semana y tomando muestras de un total de 40 animales. Las muestras se colectaron por única vez de los animales con o sin signos clínicos de diarrea directamente del recto, se colocaron en recipientes estériles e inmediatamente se transportaron en refrigeración para su análisis en las próximas 24 horas después de la colecta.

La detección de oocistos de *Cryptosporidium* spp se llevó a cabo mediante la preparación de extendidos fecales a partir de cada muestra, y teñidos utilizando la técnica de Ziehl Neelsen modificada. Los extendidos fecales fueron tratados con una solución de carbolfucsina (1 g fucsina, 10 mL de etanol al 96%, 5 g de fenol y 95 mL de agua destilada) durante 30 minutos, se destiñeron con una solución al ácido clorhídrico al 1% y alcohol al 70% durante 2 minutos o hasta que decolora el extendido, se lavaron con agua corriente, y se hizo contraste al teñirlos con una solución de azul de metileno al 1% durante 1 minuto.

Después de un lavado final con agua, los extendidos se secaron a temperatura ambiente, se montaron con resina sintética y se examinaron por microscopía de luz usando un lente con objetivo de 40X, para verificar la presencia de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Los oocistos se identificaron observando sus características morfológicas y utilizando un control positivo a la presencia de criptosporidias, los oocistos se tiñen de color rojo brillante y la contra tinción muestra un fondo azul intenso. Se revisaron 25 campos al observar un caso positivo hasta 40 campos, si no se encontraron oocistos. Se clasificaron en negativo (-) al no encontrarse oocistos en 40 campos, (+) cuando se observaron de 1 a 10 oocistos en 25 campos, (++) cuando se observaron de 11 a 20 oocistos en 25 campos, (+++) cuando se observaron de 21 a 40 oocistos en 25 campos, y (+++++) cuando se observaron más de 40 oocistos en 25 campos. Un canino fue clasificado como positivo si al menos se observaba un solo oocisto.

VII. RESULTADOS

Se determinó la frecuencia de *Cryptosporidium* spp en caninos callejeros sin signos clínicos de enfermedadgastroentérica, de los cuales se obtuvieron los siguientes resultados.

Se analizaron 40 muestras de heces, 23machos y 17 hembras. Se encontraron 17 (42.5%) muestras positivas y 23 (57.5%) negativas. De las muestras positivas, 6 (35.3%) correspondieron a hembras y 11 (64.7%)fueron machos.

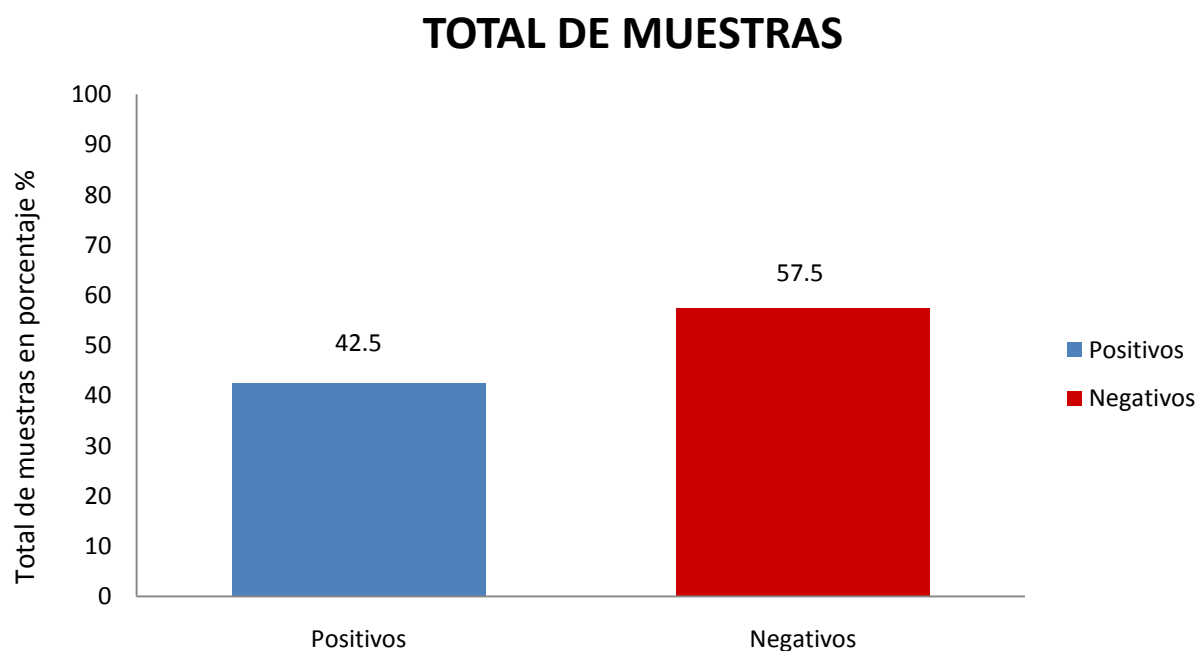


Figura 3.Total de muestras, positivas y negativas plasmadas en porcentaje.

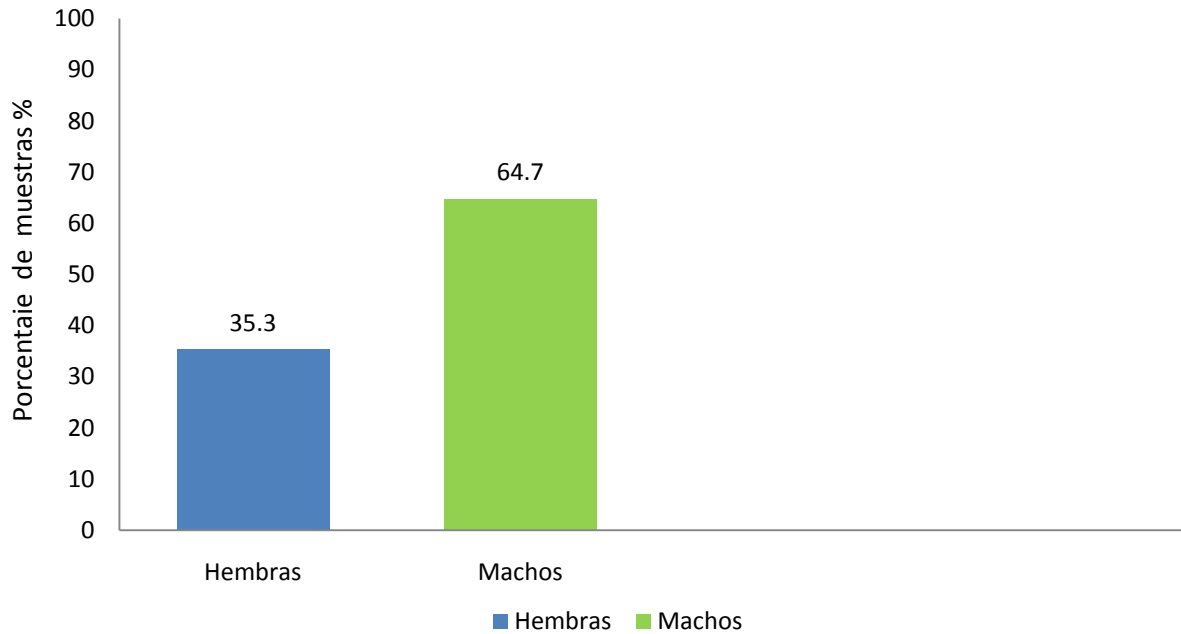


Figura 4. Porcentaje de las muestras con resultado positivo y negativo entre machos y hembras.

VIII. DISCUSION

De acuerdo a estudios llevados a cabo en diferentes países de todo el mundo, la estimación de la prevalencia de ooquistes de *Cryptosporidium* caninos varía de 1% a 20% (Grimason y col., 1993) y algunos factores, tales como la ubicación geográfica, el estado clínico de los animales, los protocolos de muestreo, factores demográficos, uso de antihelmínticos y técnicas de diagnóstico son responsables de la variación de un amplio rango de prevalencia de *Cryptosporidium* (Barhami y col., 2011).

Con respecto a la tasa de infección por *Cryptosporidium* spp., difiere a lo observado por Papazahariadou (2007), quien reportó la presencia de *Cryptosporidium* spp en un 2.8% en muestras de heces de perros, recogidas en la Prefectura de Serres, en el norte de Grecia.

Esta variación puede ser debido a las diferencias en los sistemas de manejo de la salud, atención y el grado de contaminación ambiental con fases infecciosas.

La frecuencia de la infección por *Cryptosporidium* spp. en nuestro estudio, coincide con un estudio realizado por Huber y col., (2005) con respecto a la predisposición por sexo, reportando que no hubo diferencias estadísticamente significativas.

Otros estudios muestran una frecuencia mayor de la infección por *Cryptosporidium* spp. en perros cachorros que en perros adultos, lo que coincide con otros estudios (Fayer y col., 2001; Miller y col., 2003).

Por el contrario, May y col., (2007), no encontró ninguna diferencia estadística en la prevalencia entre los perros por debajo de un año de edad y los perros de edad superior a un año.

Cryptosporidium canis ha sido identificado como la especie más común de las especies de *Cryptosporidium* en los perros alrededor del mundo, a pesar de que se han presentado algunos casos de infección por *C. parvum*, *C. muris*, y *C. meleagridis* (Fayer, 2010; Miller, 2010; Molloy y col., 2010; Yoshiuchi, 2010). Sin embargo, en nuestro estudio solo se realizó un estudio microscópico para la identificación de ooquistes con la tinción de Ziehl Neelsen modificada y no se determinó la especie.

C. canis parece tener un nivel relativamente alto de adaptabilidad, ya que algunos casos de *C. canis* han sido reportados en individuos, tanto inmunocomprometidos como inmunocompetentes, en los últimos años (Scorzay col., 2011; Xiao, 2001; Leoni y col., 2006).

Aunque un reciente estudio sugirió que la criptosporidiosis de perros y gatos plantea sólo un riesgo zoonótico mínimo, para una posible implicación en la salud

pública, la importancia económica de infecciones por *C. canis* en perros y otros animales no puede ser ignorada (Dwight y Araceli, 2010).

IX. CONCLUSIONES.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la criptosporidiosis en caninos callejeros de Torreón, Coahuila, representa un riesgo importante para la salud pública.

Cryptosporidium es un patógeno entérico que desencadena una enfermedad diarreica cuya morbilidad y mortalidad son significativas tanto para los seres humanos como para los animales.

Las rutas de transmisión son múltiples (persona a persona, animales a personas, agua, alimentos, aire) y la infección puede afectar a individuos sanos e inmunocomprometidos. Es un microorganismo emergente cosmopolita cuya aparición no está limitada a ninguna región geográfica o al grado de desarrollo tecnológico de la misma.

Los animales de compañía, son muy importantes dentro de la sociedad en la actualidad, pero también son importantes reservorios de enfermedades como la transmisión de *Cryptosporidium*.

Los procesos de urbanización acelerados, la expansión de la pobreza, las migraciones no controladas de gran número de refugiados, la facilidad y rapidez en los desplazamientos, el movimiento creciente de los animales y de productos de origen animal, la falta de saneamiento ambiental, son algunos factores que, sumados a la escasez de normas legales regulatorias, han posibilitado la dispersión de la infección por *Cryptosporidium*.

La resistencia a los antibióticos incrementa las tasas de morbilidad y mortalidad y los gastos de atención médica asociados con el control de brotes epidémicos. La

criptosporidiosis, entonces, representa una amenaza de alcance mundial que exige una respuesta coordinada de los servicios de salud pública de todos los países.

X. LITERATURA CITADA

1. Abe N, Sawano Y, Yamada. K ,Kimata, Seki. *Cryptosporidium* infection in dogs in Osaka, Japan. *Vet. Parasitol.*(2002).185-193.
2. Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrahante JE, Zhu G, Lancto CA. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science.* (2008). 195-201.
3. Aji, T. Flanigan, MarshallR, KaetzelC, AikawaM. Ultrastructural study of asexual development of *Cryptosporidium parvum* in a human intestinal cell line. *J. Protozool.*(1991). 82S– 84S.
4. Argenizo RA, Liacos, Levy ML, Meuten, DJ, Lecce JG. Villous atrophy, crypt hiperplasia, celular Infiltration and impaired glucosa- Na absorption in enteric cryptosporidiosis of pigs. *Gastroenterology.*(1990). 1129-1140.
5. Barnes A, Bonnin JX, Huang L, Gousset J, Wu J, Gut P, Doyle JF, Dubremetz, H. Ward, Petersen C. novel multi-domain mucin-like glycoprotein of *Cryptosporidium parvum* mediates invasion. *Mol. Biochem. Parasitol.*(1998). 93– 110.
6. Bahrami A, Doosti, Nahravanian H, AM & Asbchin Noorian SA. Epidemiological survey of gastrointestinal parasites in stray dogs and cats. *Aust J Basic Appl Sci,* (2011).1944-1948.

7. Barta JR, Thompson RCA. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends Parasitol.* (2005). 463-468.

8. Batchelor, D.J. Detection of endoparasites with zoonotic potential in dogs with gastrointestinal disease in the UK. *Transbound. Emerg. Dis.* (2008). 99–104.

9. Blackman MJ, Bannister LH. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol Biochem Parasitol.* (2001). 11–25.

10. Bonnin A, Ojcius DM, Souque P, Barnes DA, Doyle PS, Gut J, Nelson RG, Petersen C, Dubremetz JF. Characterization of a monoclonal antibody reacting with antigen-4 domain of gp900 in *Cryptosporidium parvum* invasive stages. *Parasitol.* (2001). 589–592.

11. Casemore DP, Sands RL, Curry A. *Cryptosporidium* species a new human pathogen. *J. Clin Pathol.* (1985). 1321-1336.

12. Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts. *Water Res.* (2004). 620-818.

13. Chen XM, Keithly JS, Paya CV, LaRusso NF. Cryptosporidiosis. *N Engl J Med* (2002). 1723-3105.

14. Chen XM, Levine SA, Tietz P, Krueger E, Jefferson MA, Jefferson DM, Mahle M, LaRusso MF. *Cryptosporidium parvum* is cytopathic for cultured human biliary epithelia via an apoptotic mechanism. *Hepatology.* (1998). 906–913.

15. Coupe S, Sarfati C, Hamane S, Derouin F. Detection of *Cryptosporidium* and identification to the species level by nested PCR and restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol.* (2005). 1017-2340.

16. Current WL. Human cryptosporidiosis. *N Engl J Med.* (1983). 309:614.
17. Deng M, Lancto CA, Abrahamsen MS. *Cryptosporidium parvum* regulation of human epithelial cell gene expression, *Int. J. Parasitol.* (2004). 73–82.
18. Dignass AU, Podolsky DK. Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor- α . *Gastroenterology.* (1994). 1323–1332.
19. Dillingham RA, Lima AA, Guerrant RL. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes Infect.* (2002). 1059-6621.
20. Dohoo IR, McDonnell WN, Rhodes CS, Elazhary YL. Veterinary research and human health. *Can Vet J.* (1998). 548-561.
21. DosReis GA, Barcinski MA. Apoptosis and parasitism: from the parasite to the host immune response, *Adv. Parasitol.* (2001). 133–161.
22. Dwight DB, Araceli LF. Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: veterinary and public health importance. *Exp Parasitol.* (2010). 121–127.
23. Elliot AV, Wisniewski J, Johnson D, Fenwick-Smith, Wiest P, Hamer D, Kresina T, Flanigan TP. In vitro inhibition of *Cryptosporidium parvum* infection by human monoclonal antibodies, *Infect. Immun.* (1997). 3933–3935.
24. Fayer R, Trout JM, Xiao L, Morgan UM, Lai A, and Dubey JP. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J. Parasitol.* (2001). 1415–1422.
25. Fayer R, Morgan UM, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol.* (2000). 1305-2200.

26. Fayer R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol.*(2004).37–56.
27. Fayer R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*.*ExpParasitol.*(2010). 90–97.
28. Fayer R, Speer C A, Dubey J P. The general biology of *Cryptosporidium*. In: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *CRC Press.*(1997). 1-41.
29. Funada, M.R. Frequency of gastrointestinal parasites in dogs and cats referred to a veterinary school hospital in the city of Sao Paulo. *Bras. Med. Vet. Zootec.*(2007).1338–1340.
30. Gracenea M, Gómez MS, Torres J. Prevalence of intestinal parasites in shelter dogs and cats in the metropolitan area of Barcelona (Spain). *ActaParasitol.*(2009). 73–77.
31. Grimason AM, Smith HV, Parker JFW, Jackson MH, Smith PG, Girdwood RWA. Occurrence of *Giardia* sp. cysts and *Cryptosporidium* sp. oocysts in faeces from public parks in the west of Scotland. *Epidemiol Infect.* (1993). 641-645.
32. Gut, Nelson RG. *Cryptosporidium parvum* sporozoites deposit trails of 11A5 antigen during gliding locomotion and shed aaA5 antigen during invasion of MDCK cells in vitro. *J. Eukaryot. Microbiol.*(1994). 42S.
33. Hamer H, Ward S, Tzipori, ME, Pereyra JP, Alroy, GT. Attachment of *Cryptosporidium parvum* sporozoites to MDCK cells in vitro, *Infect. Immun.* (1994).2208– 2213.

34. Homan W, Van Gorkom T, KanY, Hepener J. Characterization of *Cryptosporidium parvum* in human and animal feces by single tube nested polymerase chain reaction and restriction analysis. *Parasitol.* (1999). 707-712.
35. Huber F, Bomfim TBC, Gomez RS. Comparison Between Natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. in dogs in two living Situations in the West Zone of the municipality of Rio de Janeiro. *Vet Parasitol.* (2005). 69-72.
36. Jenkins MC, Petersen C. Molecular biology of *Cryptosporidium*. *Science.* (1997). 225– 232.
37. Joe R, VerdonS, Tzipori GT, Keusch HD, Ward. Attachment of *Cryptosporidium parvum* sporozoites to human intestinal epithelial cells. *Infect Immun.* (1998). 3429– 3432.
38. Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka E.-Wroblewska, Kagnoff MF. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion, *J. Clin. Invest.* (1995). 55– 65.
39. Kasper LH, Buzoni-Gatel D, Ups and downs of mucosal cellular immunity against protozoan parasites, *Infect. Immun.* (2001). 1–8.
40. Leoni F, Amar C, Nichols G, Pedraza-Diaz S, McLauchlin J. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhea in England between 1985 and 2000. *J Med Microbiol.* (2006). 703–707.
41. Levine ND. Taxonomy and review of the coccidiogenus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). *J Protozool.* (1984). 94-98.

42. Lumb R, Smith K, O'Donoghue PJ, Lanser JA. Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells. *Parasitol. Res.* (1988). 531–536.
43. Lupo PJ, Langer-Curry RC, Robinson M, Okhuysen PC, Chapell CL. *Cryptosporidium muris* in a Texas canine population. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (2008). 917–921.
44. May, Dubna S, Langrova I, Napravnik J, Jankovska I, Vadlejch J, Pekar JS, Fechtner. The Prevalence of intestinal parasites in dogs from Prague, rural areas, and shelters of the Czech Republic. *Vet Parasitol.* (2007). 120-128.
45. Mc Laughlin J, Amar C, Pedraza-Diaz, Nichols GL. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. In 1705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *J. Clin. Microbiol.* (2000). 3984-3990.
46. Meinhardt PL, Casemore DP, Miller KB. Epidemiologic aspects of human cryptosporidiosis and the role of water borne transmission. *Epidemiol.* (1996). 118-136.
47. Méndez OC. Lecciones prácticas sobre enteroparasitosis humanas. *Acta Bioquím Clin Latinoam.* (1998). 65-69.
48. Miller A, Liggett ZA, Radi & Branch LO. Gastrointestinal cryptosporidiosis in a puppy. *Vet Parasitol.* (2003). 199-204.
49. Molloy SF, Smith HV, Kirwan P, Nichols RA, Asaolu SO, Connelly L, Holland CV. Identification of a high diversity of *Cryptosporidium* species genotypes and subtypes in a pediatric population in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg.* (2010). 608–613.

50. Moore R, Tzipori S, Griffiths J, Johnson K, Montigny de L, Lomakina I. Temporal changes in permeability and structure of piglet ileum after site-specific infection by *Cryptosporidium parvum*. *Gastroenterology*.(1995). 1030.
51. Morgan UM, Sargent KD, Deplazes D, Forbes DA, Spano F, Hertzberg H, Elliot A, Thompson R. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitology* (1998). 31-37.
52. Morgan U.M, Xiao L, Monis P, Fall A, Irwin PJ, Fayer R, Denholm K.M., Limor J, Lal A. & Thompson R.C. *Cryptosporidium* spp. In domestic dogs: the “dog” genotype. *Appl Environ Microbiol.* (2002). 2220-2223.
53. O’Donoghue PJ. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int J Parasitol.*(1995). 95-195.
54. Ojcius DM, Perfettini JL, Bonnin A, Laurent F. Caspase dependent apoptosis during infection with *Cryptosporidium parvum*. *Microbes Infect.* (1999). 1163–1168
55. Okhuysen PC, Chappell CL. *Cryptosporidium* virulence determinants. Are we there yet? *Int J Parasitol.*(2002). 250-517.
56. Overgaauw, P.A.M. Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. *Vet. Parasitol.* (2009). 115–122.
57. Palmer, C.S. National study of the gastrointestinal parasites of dogs and cats in Australia. *Vet. Parasitol.* (2008).181–190.
58. Panja A, Siden E, Mayer L. Synthesis and regulation of accessory/proinflammatory cytokines by intestinal epithelial cells. *Immunol.*(1995). 298–305.

59. Papazahariadou M, Founta A, Papadopoulos E, Chliounakis S, & Antoniadou-Sotiriadou Theodorides Y. Gastrointestinal parasites of shepherd and hunting dogs in the Serres Prefecture, northern Greece. *Vet Parasitol.* (2007). 170-173.
60. Peng MM, Xiao LH, Freeman AR, Arrowood MJ, Escalante A, Beard CB. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: Evidence of two distinct human transmission cycles. *Emergen-Intect.* (1997). 567-573.
61. Riggs M.W. Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response, *Microbes Infect.* (2002). 1067–1080.
62. Robertson ID, Irwin PJ, Lymbery AJ, Thompson RCA. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *Int J Parasitol.* (2000). 1369-1771.
63. Seydel KB, Zhang T, Champion GA, Fichtenbaum C, Swanson PE, Tzipori S, Griffiths JK, Stanley Jr SL. *Cryptosporidium parvum* infection of human intestinal xenografts in SCID mice induces production of human tumor necrosis factor α and interleukin-8, *Infect. Immunol.* (1998). 2379–2382.
64. Shao L, Saerrano D, Mayer L. The role of epithelial cells in immune regulation in the gut, *Semin. Immunol.* (2001). 163–175.
65. Smith HV, Nichols RAB, Grimason AM. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends Parasitol.* (2005). 42-133.
66. Smith TG, Walliker D, Ranford-Cartwright LC. Sexual differentiation and sex determination in the Apicomplexa. *Inmunol.* (2005). 65-70.
67. Shukla R. *Cryptosporidium* spp. and other zoonotic enteric parasites in a sample of domestic dogs and cats in the Niagara region of Ontario. *Can. Vet. J.* (2006). 1179–1180.

68. Scorza AV, Duncan C, Miles L, Lappin MR. Prevalence of selected zoonotic and vector-borne agents in dogs and cats in Costa Rica. *Vet Parasitol.*(2011). 178–183.
69. Stantic-Pavlinic M, Xiao L, Glaberman S, Lal AA, Orazen T, Rataj-Verglez A, Logar JJ, Berce I. Cryptosporidiosis associated with animal contacts. *Wien Klin Wochenschrift.* (2003). 125-127.
70. Strober B, Kelsall I, Fuss T, Marth B, Ludviksson R, Ehrhardt M, Neurath. Reciprocal IFN- γ and TGF- β responses regulate the occurrence of mucosal inflammation, *Immunol.* (1997). 61–64.
71. Theodos M.C. Innate and cell-mediated immune responses to *Cryptosporidium parvum*. *Adv. Parasitol.* (1998). 87–119.
72. Thompson R.C.A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet. Parasitol.* (2004). 15-35.
73. Tilley M, Upton SJ. Both CP15 and CP25 are left astrails behind gliding sporozoites of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa). *FEMS Microbiol. Lett.*(1994).275– 278.
74. Tzannes S. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Isospora* species infections in pet cats with clinical signs of gastrointestinal disease. *J. Feline Med. Surg.* (2008).1–8.
75. Tzipori S, Ward H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect.*(2002). 58-1047.

76. Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell*. (1994). 777– 779.
77. Widmer G, Corey EA, Stein B, Griffiths JK, Tzipori S. Host cell apoptosis impairs *Cryptosporidium parvum* development in vitro. *J. Parasitol.* (2000). 922– 928.
78. Widmer G, Tzipori S, Fichtenbaum CJ, Griffiths JK. Genotypic and phenotypic characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates from people with AIDS. *J. Infect. Dis.* (1998). 834-840.
79. Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, Checkley W, Cabrera L, Gilman RH, Lal AA: Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J Infect Dis.* (2001). 492–497.
80. Xiao L, Fayer R. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission, *Int J. Parasitol.* (2008).
81. Xu P, Widmer G, Wang Y, Ozali LS, Alves JM, Serrano MG, *et al.* The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature*. (2004). 1107-1220.
82. Yoshiuchi R, Matsubayashi M, Kimata I, Furuya M, Tani H, Sasai K: Survey and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in owned companion animal, dogs and cats, in Japan. *Vet Parasitol* (2010). 313–316.