

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
División Regional de Ciencia Animal**



“Frecuencia de criptosporidiosis en becerras lactantes de la cuenca lechera de Delicias, Chihuahua”

Por

Dulce Anel Trujillo Guerrero

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE**

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México

Febrero de 2011

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



**“Frecuencia de criptosporidiosis en becerras lactantes de
la cuenca lechera de Delicias, Chihuahua”**

TESIS POR:

Dulce Anel Trujillo Guerrero

ASESOR PRINCIPAL

M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

Torreón, Coahuila, México

Febrero de 2011

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

TESIS

**“Frecuencia de criptosporidiosis en becerras lactantes de
la cuenca lechera de Delicias, Chihuahua”**

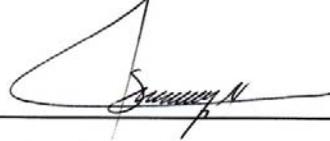
APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR DE REVISIÓN

ASESOR PRINCIPAL



M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL





M.V.Z. RODRIGO ISIDRO SIMÓN ALONSO
Coordinador de la División
Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México

Febrero de 2011

“Frecuencia de criptosporidiosis en becerras lactantes de la cuenca lechera de Delicias, Chihuahua”

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

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESIDENTE


M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

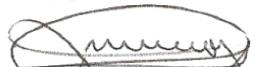
VOCAL


M.V.Z. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

VOCAL


M.C. MA. GUADALUPE DE LA FUENTE SALCIDO

VOCAL SUPLENTE


M.C. JUAN JOSÉ MUÑOZ VARELA

DEDICATORIAS

A Dios:

Padre te agradezco por tus bendiciones que le brindas a mi vida, por darme la oportunidad de concluir esta etapa.

A mi familia:

Padre (q. e. p. d) gracias por tu enseñanza en el trayecto de mi vida, por tu apoyo incondicional desde el inicio de mi carrera y la comprensión que me brindaste en todo momento, eres mi motivación para seguir adelante y te admiro por ser una persona ejemplar.

Siempre estarás en mi corazón.

A mi madre por su apoyo, comprensión, paciencia, cariño y tu esfuerzo por seguir adelante como padre y madre a la vez que hicieron que lograra terminar mis estudios, eres una mujer maravillosa, te admiro y respeto, gracias mami.

Mis hermanas por su cariño, apoyo, comprensión y por compartir los mejores momentos con ustedes.

Gracias por ser parte de mi vida:

Rosalía, Alma, Sue y Sarai.

Mis amigos:

Sandra, Adriana, Claudia, Araceli, Cecilia, Rafael, Naman, Hugo, Ramón, Néstor, Edgar, Luis, Saúl, Fernando S., Isaías, Esteban, Ramiro, Rodrigo, Fernando, Rutilio, Omar. En especial a Fabio Orlan gracias por estar a mi lado te quiero mucho.

Gracias por su amistad en estos cinco años maravillosos los cuales compartimos momentos inolvidables y recuerden que siempre estarán en mi corazón.

Mis maestros:

Gracias por sus enseñanzas y formar parte de mi formación como profesionista.

En especial a: M.C.V. Ramón Delgado González por todos los conocimientos brindados y la oportunidad para la realización de este trabajo.

“Un buen maestro sólo puede enseñarte los caminos al éxito pero eres tu quien debe explorarlos”.

INDICE

DEDICATORIAS.....	i
A Dios:.....	i
RESUMEN.....	v
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.2. Etiología	2
2.3. Especies crípticas	6
2.4. Epidemiología.....	7
2.5. Epidemiología en el ganado.....	8
2.6. Prevalencia	11
2.7. Ciclo biológico	12
2.8. Factores ambientales.....	15
2.9. Lesiones	16
2.10. Signos.....	17
2.11. Inmunopatología	17
2.12. Métodos para la detección de la infección.	19
2.13. Herramientas moleculares para la identificación de especies	20
2.14. Tratamiento	21
4. Objetivo General:	23
4.1. Objetivos Específicos:.....	23
5. Marco de referencia.....	24
6. Material y Métodos.....	25
7. Resultados y discusión.	27
8. Conclusión.....	29
9. Literatura citada.....	30

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS

	Pagina
Cuadro 1. Especies reconocidas de <i>Cryptosporidium</i> , su huésped específico predominante y localización primaria de la infección.	7
Cuadro 2. Prevalencia de <i>Cryptosporidium</i> spp. en becerras Holstein en Delicias Chihuahua.	26

FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Cryptosporidium parvum</i>	13
--	----

RESUMEN

Con el objeto de determinar la frecuencia de *Cryptosporidium* spp. en establos lecheros de Delicias, Chihuahua, se tomaron muestras de heces de 111 becerras lactantes de 13 establos, 101 hembras y 10 machos de 1 a 70 días de edad, con signos clínicos de diarrea. Las heces se tomaron directamente del recto en bolsas estériles y se transportaron en refrigeración a la Unidad de Diagnóstico de la UAAAN, UL. Se procesaron las heces realizando extendidos en portaobjetos, los cuales se secaron al aire y se tiñeron con la técnica de Ziehl Neelsen modificada para la observación de los ooquistes y los resultados se analizaron mediante estadística descriptiva, considerando positivos aquellos que se tiñeron de color rojo intenso con medidas aproximadas entre 4 a 6 μm . Se observó que 45/111 (40.54%) de las muestras fueron positivas a la presencia de ooquistes y la intensidad de excreción se manifestó en los grados 1 y 4. Los ooquistes de *Cryptosporidium* spp fueron encontrados en 11 (84.61%) de los 13 establos examinados.

Palabras claves: becerras, *Cryptosporidium*, diarrea, ooquistes, prevalencia.

1. Introducción

La criptosporidiosis es particularmente importante en becerros lactantes, es causada por un pequeño parásito coccidio que se encuentra en el intestino delgado de los animales infectados (6), en los que puede ser la principal responsable de severos cuadros diarreicos, tanto por su acción como agente etiológico único, o como oportunista en infecciones intestinales de origen bacteriano, viral o en animales inmunocomprometidos (10).

Los parásitos suelen actuar conjuntamente con otros enteropatógenos para producir lesión intestinal y diarrea (6). Los principales agentes etiológicos de diarrea en terneros lecheros son: *Escherichia coli* k99 (F5), *Salmonella* spp, *rotavirus*, *coronavirus* y *Cryptosporidium parvum*. Estos patógenos causan infecciones entéricas específicas, resultando en diarrea secretora o de malabsorción, junto con la inflamación del epitelio intestinal (4). Son de especial importancia, no solo por las altas tasas de mortalidad que en ocasiones origina, sino también debido al retraso en el crecimiento de los animales afectados, los gastos de tratamientos, demanda de tiempo y mano de obra (21).

Los animales neonatos están muy expuestos a la infección y a la enfermedad y parece ser que la resistencia está relacionada con la edad y es más sólida en todas las especies conforme esta aumenta. Se observa en becerros de todas las edades, sin embargo los menores de tres meses son los más susceptibles (21), observándose la mayor prevalencia entre los 8 a 14 días de edad (10).

Tomando en cuenta que la enfermedad es severa en neonatos de 1 a 3 semanas, la finalidad del presente trabajo fue diagnosticar criptosporidiosis en becerras con diarrea de hatos lecheros de la cuenca lechera de Delicias, Chihuahua.

2. Antecedentes

2.1. Historia

En 1910, Tyzzer propuso un nuevo género y lo nombró *Cryptosporidium* y al *Cryptosporidium muris* que se encuentra en la mucosa gástrica de ratones se le clasificó dentro de otra especie (3). En 1912, una especie más pequeña se encontró en el intestino delgado de los ratones también fue descrito por Tyzzer llamado *C. parvum*. Desde entonces, los criptosporidios se han estado identificando en todas las clases de vertebrados. *Cryptosporidium parvum* fue el primer patógeno importante reconocido en los 70, vinculado a la diarrea crónica en una vaquilla de 8 meses de edad y algunos años más tarde a diarrea en humanos (1). Hasta hace poco, la diferenciación de las especies era basada en la morfología de ooquistes y la clase del huésped (1). En los últimos años, la caracterización molecular de *Cryptosporidium* ha ayudado a aclarar la confusión en la taxonomía de *Cryptosporidium* y validar la existencia de múltiples especies en cada clase de vertebrados (8).

2.2. Etiología

Cryptosporidium es un coccidio entérico, parásito intracelular taxonómicamente incluido en el Phylum *Apicomplexa*, clase *Coccidia* y familia *Cryptosporidae* (14). Infecta el borde de las microvellosidades del epitelio gastrointestinal de una amplia variedad de huéspedes vertebrados, incluyendo humanos (8). La criptosporidiosis (diarrea debido a la infección por *C. parvum*) afecta con mayor frecuencia a los terneros de menos de un mes de edad, y los terneros afectados pueden eliminar una gran cantidad de ooquistes en las heces (20).

La patogenicidad del *Cryptosporidium* dependerá de la especie a la que pertenezca dicho parásito así como también del tipo, edad y estado de inmunidad del huésped (8).

En el ganado bovino se han reconocido dos especies, *C. parvum*, coloniza las células epiteliales del intestino delgado, es más prevalente en animales menores de 30 días (5), resulta a menudo en enteritis aguda y enfermedad diarreica (2).

Este organismo presenta interés en salud pública debido a su carácter zoonótico y ha sido identificado con frecuencia en bovinos, particularmente en los becerros, en los cuales constituye uno de los principales agentes etiológicos de la diarrea neonatal (22). *C. andersoni*, posiblemente asociado con la reducción en la producción de leche, se desarrolla en los bordes de las microvellosidades de las células epiteliales del abomaso, es más común en bovinos adultos (5). En los últimos años se han identificado dos nuevas especies, *C. bovis* y *C. ryanae*, de igual manera se han reportado numerosos subgenotipos de *C. parvum* (10).

Cryptosporidium parvum, *C. bovis*, *C. ryanae* y *C. andersoni* son las cuatro principales especies identificadas en el ganado (1).

Cryptosporidium parvum, con un tamaño promedio de ooquistes 4.5 x 5.5 µm, es común en becerros jóvenes y tiene preferencia por el yeyuno e íleon distal. El periodo prepatente, es decir, el periodo de infección hasta que el huésped comienza excretar ooquistes, es de 2 a 7 días. La eliminación ocurre aproximadamente 1-12 días (periodo patente) antes de que el sistema inmune del huésped haya eliminado la infección, y un becerro infectado puede eliminar 10¹⁰ ooquistes durante este periodo.

Criptosporidiosis clínica se encuentra principalmente en becerros de 1 a 4 meses de edad, y la gravedad de la enfermedad depende de varios factores, incluido el sistema inmune del huésped, la dosis de infección y si la infección es acompañada con patógenos como el rotavirus está presente. Infección por *Cryptosporidium* puede ser asintomática o causar diarrea pastosa o acuosa y profusa, deshidratación, inapetencia e incluso mortalidad. La diarrea es una combinación inusual de agua y alto contenido fecal y el aumento de los movimientos del intestino, resultando en heces sueltas acuosas y un aumento del número de deposiciones por día. La diarrea asociada con *Cryptosporidium* es causada por dos mecanismos patogénicos. La diarrea por malabsorción es causada por la pérdida de los enterocitos y atrofia de las vellosidades, lo que reduce la superficie intestinal y la presencia de células maduras, que conduce a la disminución de nutrientes y la absorción de agua.

Además, las prostaglandinas (principalmente PGE₂ y PGI₂) inducen la secreción de iones de cloruro y carbonato en el lumen intestinal y disminuir la absorción de cloruro de sodio. Esto produce una presión osmótica que impulsa el agua en el lumen, resultando en diarrea secretora.

El daño intestinal causado por la infección masiva puede conducir a la reducción de las tasas de crecimiento. Cuando los terneros mueren, la co-infección con otros patógenos como el rotavirus o coronavirus es común pero han sido casos mortales cuando *C. parvum* fue el único patógeno aislado (1).

Más de 150 especies de mamíferos han sido identificadas como huéspedes de *C. parvum* o parásito tipo *C. parvum*. Hasta ahora, *C. parvum* es conocido por infectar principalmente a rumiantes (vacas, ovejas, cabras y ciervos) y humanos (8).

Cryptosporidium bovis anteriormente llamado genotipo bovino B y *C. ryanae* son morfológicamente parecidos a *C. parvum*, ooquistes con tamaños aproximados de 4.6 µm x 4.9 µm para *C. bovis* (1,3) y 3.2 µm x 3.7 µm para *C. ryanae*.

Las diferencias de tamaño entre estas dos especies y *C. parvum* son demasiado pequeños para la determinación fiable de especies por microscopia y la diferenciación se debe hacer por análisis molecular. El periodo prepatente es de 10 días para *C. bovis* y 11-12 días para *C. ryanae* (1). El periodo patente es de 18 días para *C. bovis* (3). Infectan el intestino delgado, se asocian con la infección subclínica y se encuentran principalmente en becerros destetados y animales de mayor edad (1).

C. bovis ha sido encontrado en ganado lechero y de carne y en ovinos adultos en Australia Occidental (3).

Son considerados especies específicas del ganado y no ha sido demostrado que estén involucrados en la transmisión zoonótica (1).

Cryptosporidium andersoni es una especie específica del ganado, aproximadamente 5.5 µm x 7.4 µm y morfológicamente similar a *C. muris*. El periodo prepatente es de 18-45 días. Esta especie infecta el abomaso y se encuentra principalmente en becerros destetados y vacas adultas. La naturaleza de la infección es crónica y subclínica, pero tasas de crecimiento reducidas y menor producción de leche han sido reportadas.

La infección también ha sido demostrada en camélidos. En unos pocos casos humanos con ooquistes de morfología similar y una secuencia de 18s rRNA casi idéntica a *C. andersoni* se identificaron, abriendo la posibilidad para la transmisión zoonótica de esta especie.

El papel de las vacas como una fuente posible de infección para los becerros ha sido abordado. Tal transmisión podría ser facilitada por un aumento en la eliminación de ooquistes en el periparto de las vacas infectadas (1).

Uso de criterios morfológicos, especificidad de huésped y los estudios basados en el ADN, 13 especies han sido reconocidas en el género *Cryptosporidium* (2).

C. andersoni (ganado bovino), *C. baileyi* (gallinas y otras aves), *C. canis* (perros), *C. felis* (gatos), *C. galli* (aves), *C. hominis* (humanos), *C. meleagridis* (aves y humanos), *C. molnari* (pescado), *C. muris* (roedores y otros mamíferos), *C. parvum* (rumiantes y los humanos), *C. wairi* (cobayos), *C. saurophilum* (lagartos) y *C. serpentis* (serpientes y lagartos) (8).

2.3. Especies crípticas

Hay probablemente muchas especies crípticas de *Cryptosporidium* en los mamíferos, las cuales todas fueron anteriormente consideradas como *C. parvum*. Hasta ahora, casi 20 genotipos de *Cryptosporidium* con incierto estatus de especie han sido encontrados colectivamente en cerdos (dos genotipos), ovinos, caballos, vacas, conejos, marsupiales, zarigüeyas (dos genotipos), hurones, zorros, ciervos (dos genotipos), rata almizclera (dos genotipos), ardillas, osos y ratones (8). Un número limitado de estudios de transmisión cruzada ha demostrado diferencias biológicas entre algunos de los genotipos, incluso algunos de ellos han mostrado una morfología ooquistica diferente a la de los ooquistes de *C. parvum*.

Los rápidos avances en técnicas moleculares, biológicas y bioquímicas y la información hacen inevitable el reconocimiento de nuevas especies, subespecies y cepas (11).

Por consiguiente, las diferencias biológicas y moleculares observadas en los aislamientos de *C. parvum* infectando a diferentes mamíferos permitieron reconocer dos agrupaciones principales que infectan al humano (11):

El genotipo humano (genotipo 1, genotipo H) y el genotipo zoonótico (genotipo 2, genotipo C), el primero de los cuales fue designado *C. hominis* (9).

Cuadro 1. Especies reconocidas de *Cryptosporidium*, su huésped específico predominante y localización primaria de la infección (9).

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, bursa 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	Pro ventrículos	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	Estomago	Peces
<i>C. muris</i>	5.6 X 7.4	Estomago	Roedores, mamíferos
<i>C. parvum</i>	4.5 X 5.5	Intestino delgado	Bovinos, ovejas, cabras, humanos
<i>C. scophthalmi</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	Estomago	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

2.4. Epidemiología

Varios factores son críticos en la epidemiología de *C. parvum*. Ellos facilitan la propagación de *C. parvum* y hacen difícil el control y la erradicación.

1. Los ooquistes son extremadamente resistentes, por ejemplo sobreviven en congelación a -10 °C por una semana y hasta 4 días en heces secas (1).
En el medio ambiente los ooquistes de *Cryptosporidium* son resistentes y extraordinariamente resistentes a la desinfección química (por ejemplo, la cloración del agua potable) pero son susceptibles a las temperaturas extremas de congelación y el calor (pasteurización) (11).
2. El tamaño pequeño de los ooquistes hace difícil filtrar el agua contaminada.
3. La dosis infectiva es baja, y tan solo nueve ooquistes aislados de *Cryptosporidium* han demostrado ser infecciosa para humanos. En becerros, 50 ooquistes ha sido demostrado para causar infección. En contraste, un huésped infectado puede arrojar hasta 10^{10} ooquistes, contribuyendo a una gran presión de la infección.
4. Los ooquistes esporulados son infecciosos al eliminarse, lo que significa que un nuevo huésped puede ser infectado inmediatamente.
5. La transmisión zoonótica puede fácilmente pasar a través del contacto directo o contaminación de agua, alimentos, herramientas o superficies.

2.5. Epidemiología en el ganado

Un gran número de estudios epidemiológicos han sido realizados para estimar la prevalencia de la infección por *Cryptosporidium* en el ganado. La infección ha sido encontrada en todo el mundo, pero reporto prevalencias con un rango de 0-100% en muestras, y varían con la edad de los animales.

Los estudios de prevalencia muestran puntos relacionados con el patrón de edad, con la prevalencia más alta en becerros, y luego la infección se vuelve menos común con el incremento de la edad.

La prevalencia acumulada ha sido estimada en 92% a los 21 días de edad en becerros, indicando que cada vez que *Cryptosporidium* está presente en un rebaño, todos los animales se convertirán en infectados antes del destete.

Estudios más antiguos, en que fue basado la identificación de especies en microscopía, probablemente sobreestiman la prevalencia de *C. parvum* en animales destetados porque los estudios recientes que se aplicó el análisis molecular mostraron que esta especie es poco frecuente después del destete. En cambio resultaron dominantes las especies tipo *C. parvum*, *C. bovis* y *C. ryanae* junto con *C. andersoni* siendo *C. bovis* la más común en el ganado joven y *C. andersoni* más común en ganado adulto. La infección subclínica y una menor prevalencia de *Cryptosporidium* en animales de mayor edad podría deberse a varios factores como una resistencia relacionada con la edad debido a la maduración de la mucosa intestinal. Esto fue demostrado por Harp (2003) y Akili et al. (2006), quienes encontraron que una proteína 54-kDa presente en la mucosa intestinal de ratones y bovinos adultos, previno la infección de *Cryptosporidium* en crías de ratón.

La infección podría proporcionar resistencia en la especie específica y la resistencia parcial a otras especies de *Cryptosporidium*, o repetidas exposiciones de *Cryptosporidium* puede resultar en la vacunación natural.

Otra explicación puede ser que *C. bovis*, *C. ryanae* y *C. andersoni* son realmente menos patogénicos que *C. parvum*, resultando de bajo grado la infección y una menor producción de ooquistes.

Los factores de riesgo para la infección y la enfermedad en becerros lecheros varían entre los estudios, lo que podría reflejar las variaciones en el manejo del rebaño en diferentes partes del mundo.

Por ejemplo, Trotz-Williams et al. (2007) encontraron un mayor riesgo de infección al aumentar la edad y en terneros nacidos durante el verano, mientras que becerros alimentados con coccidiostatos o los terneros nacidos de madres vacunadas contra rotavirus, coronavirus y E. coli F5+ para prevenir la diarrea en terneros y disminuir el riesgo de eliminación de ooquistes.

En el mismo estudio, la diarrea fue asociada con la infección por *Cryptosporidium* y la eliminación de altas tasas de ooquistes, el aumento de la edad, becerros que nace en verano y los becerros permanecidos más de una hora con la hembra.

Maddox-Hyttel et al. (2006) encontró una alta tasa de eliminación en becerros de rebaños orgánicos y bajas tasas de eliminación en el corral tuvo un periodo vacío entre los becerros. En el ganado vacuno, las prevalencias más altas se encontraron en rebaños con muchos becerros, densidad alta-media y una estación de parto largo.

El efecto de las estrategias de manejo en el rebaño ha sido considerada una causa para la variación en la distribución del *C. parvum* subtipo. Los estudios de áreas con manejo de rebaños cerrados (poco movimiento de animales entre rebaños) han mostrado un alto número de subtipos de GP60 en la población de becerros, pero solo un subtipo dentro de un rebaño.

En contraste, sólo se identificaron unos cuantos subtipos en áreas con mayores tasas de intercambio entre rebaños, pero varios subtipos podrían estar presentes en un rebaño.

Subtipificación de múltiples loci en muestras de becerros han mostrado el mismo patrón dentro del rebaño, con mas infecciones de varios subtipos y mas MLGs por rebaño en Turquía, donde el movimiento de animales entre rebaños ocurre con frecuencia, que en Israel, donde los rebaños cerrados son más comunes (1).

2.6. Prevalencia

Un estudio de 7369 terneros de 1103 granjas lecheras en los Estados Unidos detecto la infección en el 48% de los terneros entre 7 y 21 días de edad, con al menos un ternero positivo de las pruebas en 59% de las granjas.

De igual forma, el 59% de 386 terneras lecheras de hasta 24 semanas de edad en 20 granjas en Columbia Británica se encontraron eliminando ooquistes de *C. parvum*: se encontraron terneros infectados en el 80% de las granjas. En Quebec, la infección se detecto en el 88% de los terneros de 505 granjas lecheras. Cuando está presente en un granja, la prevalencia de la infección por *C. parvum* puede ser muy elevada. Además, *Cryptosporidium sp.* es con frecuencia el único patógeno detectado en terneros con diarrea (20).

Infección por *Cryptosporidium parvum* se detecto en 203 (40.6%) de 500 terneras lecheras de Ontario entre 7 a 21 días, una muestra de 51 granjas con un historial de diarrea en terneros.

Este parásito parece ser común en terneros lecheros de Ontario e importante como una causa de disentería en terneros lecheros de la provincia (20).

Prevalencias del 25% y 27,8% fueron observadas en becerros de explotaciones lecheras de México y Brasil respectivamente (5).

En México, otros autores han informado de prevalencias que, dependiendo del sistema de crianza, van de 22 a 67 %, estimadas a partir de un solo muestreo (10), la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en becerras con diarrea de la comarca lagunera es de 53.3% (23).

2.7. Ciclo biológico

El parásito *Cryptosporidium* tiene ciclo de vida directo, es decir todas las etapas del ciclo se llevan a cabo dentro de un huésped. *Cryptosporidium parvum* completa un ciclo de vida aproximadamente en dos días (1). La vía de infección es fecal-oral, aunque también pueden ser eliminados por la secreción respiratoria o nasal. Cada ooquiste contiene cuatro esporozoitos, estadios infectivos, que al quedar en libertad (exquistación), penetran en las células epiteliales del tracto gastrointestinal (5).

El ciclo biológico de *Cryptosporidium* consiste en 6 eventos principales en su desarrollo. Después de la ingestión de ooquistes hay exquistación (liberación de esporozoitos infecciosos), merogonia (multiplicación asexual), gametogonia (formación de gametos), fertilización, formación de la pared del ooquiste, y esporogonia (formación del esporozoíto).

Ooquistes de *Cryptosporidium spp* pueden esporular dentro de las células del huésped y son infectivos cuando pasan a las heces. La infección persiste hasta que la respuesta inmune del huésped elimina el parásito. En casos naturales y producidos experimentalmente en becerros, *Cryptosporidium* es más numeroso en la parte inferior del intestino delgado y menos común en el ciego y el colon (6).

Los esporozoítos invaden las células epiteliales del yeyuno y el íleon distal. Ciego, colon e incluso las membranas mucosas extraintestinales pueden infectarse dependiendo el estado inmune del huésped.

Dentro de las células epiteliales, cada esporozoíto se transforma rápidamente en un trofozoíto, retenida dentro de una membrana llamada vacuola parasitófora justo debajo de la membrana celular.

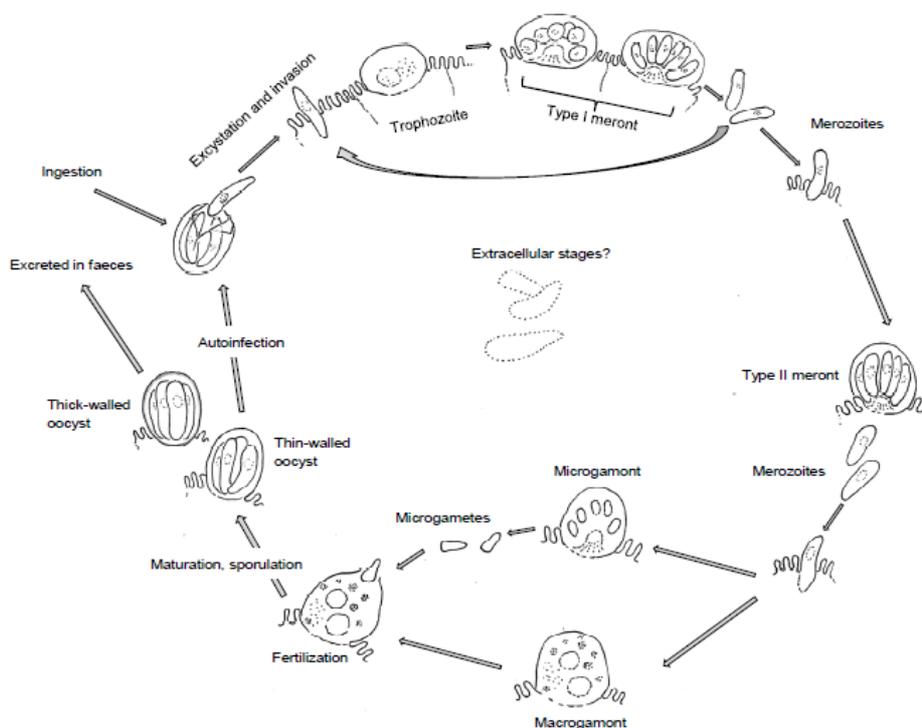


Figura 1. Ciclo biológico de *Cryptosporidium parvum* (1).

Trofozoítos pasan por un ciclo asexual y se convierten en merontes tipo I, que suelta de seis a ocho merozoítos en el lumen intestinal para infectar nuevas células epiteliales, y empezar un nuevo ciclo asexual o convertir en merontes tipo II y pasan por un nuevo ciclo sexual.

Los merontes tipo II maduro contiene cuatro merozoitos, que después de la liberación y la infección de nuevas células epiteliales se convertirá en un microgamonte macho o un macrogamonte (óvulo).

Microgamontes liberan microgametos (esperma) que fertiliza macrogamontes, produciendo cigotos que desarrollan ooquistes infecciosos. Los ooquistes esporulan in situ y son infecciosos al liberarse de las células epiteliales (1).

Aproximadamente el 80% de los ooquistes producidos, presentan doble pared y luego de la esporulación pasan inalterados a través del intestino y son eliminados con las heces.

Cerca del 20% de los ooquistes están rodeados solamente por una membrana que se desarrolla alrededor de los esporozoitos. A estas formas se las denomina ooquistes de paredes delgadas estimándose que pueden liberar los esporozoitos cuando aun están dentro del intestino e infectar nuevas células (5).

Los ooquistes de paredes delgadas no pasan en las heces, pero inician otro ciclo endógeno en el huésped original. Se cree que estos ooquistes de pared delgada son la razón por la que los hospedadores acumulan una infección tan masiva de criptosporidios (autoinfección).

2.8. Factores ambientales

Con el fin de identificar el riesgo potencial de contaminación, se requieren los conocimientos sobre la supervivencia de los ooquistes de *Cryptosporidium* en el medio ambiente.

Ooquistes de *Cryptosporidium* pueden mantener durante meses la infectividad y resistir las presiones ambientales más fácilmente que muchos otros patógenos debido a una pared dura de protección.

En general, la inactivación de los ooquistes de *Cryptosporidium* en el medio ambiente disminuye exponencialmente con el tiempo, presentando una disminución de los efectos en los residuos.

King y Monis revisaron muchos factores ambientales críticos que afectan la supervivencia de los ooquistes de *Cryptosporidium*, desde las presiones abióticas de la temperatura, pH, amoníaco, salinidad, desecación y radiación solar hasta el antagonismo biótico.

La supervivencia de los ooquistes en los suelos y en heces ha recibido menos atención que en el agua, tal vez debido a que las presiones terrestres sean más complicadas que las de ambientes acuáticos. Aparte de la temperatura, humedad del suelo (o potencial de agua del suelo), mineralogía, pH, la composición de la materia orgánica y la presencia de otras propiedades físicas, químicas y biológicas podrían desempeñar un papel potencial en la infectividad de ooquistes en el suelo. Las presiones adicionales como la composición del estiércol, la concentración de amoníaco, y el estilo de apilamiento pueden influir también en el destino de los ooquistes en las heces y en la suspensión extendida sobre la tierra.

Por lo tanto, en cualquier entorno, múltiples factores concomitantes, como los anteriormente mencionados complican cualquier intento de predecir la supervivencia de los ooquistes de *Cryptosporidium*.

La temperatura ha sido considerada como uno de los factores más importantes que rigen el destino de los ooquistes en el medio ambiente.

Esto se debe a la capacidad de los ooquistes para iniciar la infección está ligada a reservas finitas de energía procedente de carbohidratos en forma de amilopectina, la cual se metaboliza como respuesta directa a la temperatura medioambiental.

La inactivación a temperaturas más altas es una función del aumento de la actividad metabólica de ooquistes, con una estrecha relación entre la infectividad y el nivel de ATP en el ooquiste (18).

2.9. Lesiones

Las becerras con diarrea persistente presentan atrofia de las vellosidades en el intestino delgado. Histológicamente, un gran número de parásitos se incrustan en las microvellosidades de los enterocitos absorptivos (6). La mayoría de la especies de *Cryptosporidium* infectan el epitelio intestinal pero en infecciones severas puede ocurrir una diseminación extraintestinal (15). En las infecciones de bajo grado, solo unos pocos parásitos están presentes, sin aparentes cambios histológicos en el intestino. Las vellosidades son más cortas de lo normal, con hiperplasia de las criptas y una infiltración de varias células inflamatorias (6).

Infecciones experimentales de *C. parvum* de diferentes líneas celulares humanas y modelos de ratones neonatos han demostrado la apoptosis en las células epiteliales y la reducción de las vellosidades del intestino delgado.

Se ha visto que la infección por *C. parvum* induce la activación de caspasas y la apoptosis mediada por ligando Fas. Este proceso se asocia a una dramática reducción del número de parásitos intracelulares, lo que indica que la apoptosis de la célula del huésped altera el desarrollo in vitro de *C. parvum* (19).

2.10. Signos

Aunque se observa una variedad de signos clínicos, el más común es la diarrea, que puede ser moderada e intermitente en algunos casos, pero profusa y acuosa en otros, con presencia de mucus, rara vez teñida de sangre y con una duración de 2 a 14 días. A veces, la diarrea puede estar acompañada de fiebre, anorexia, deshidratación, debilidad y pérdida de peso (5).

La morbilidad tiende a ser superior al 50% en los terneros de menos de 3 semanas de edad, y la mortalidad es baja. Cuando *C. parvum* es el único patógeno, la diarrea generalmente dura hasta 7 días (7).

2.11. Inmunopatología

La patogénesis de criptosporidiosis es indudablemente compleja, resultante de una combinación de daños del parásito a la superficie luminal y la respuesta inmune mucosal contra la infección.

C. parvum normalmente infecta el inferior del intestino delgado, colon y ciego y en humanos o animales como ovejas o ganado (vacuno), leves a pronunciados cambios histológicos puede llevarse a cabo.

Se produce infiltración de la lámina propia por linfocitos, macrófagos y neutrófilos y, además, atrofia de las vellosidades, hiperplasia de las criptas y es común la formación de células epiteliales cuboidales o escamosas (12).

Las citoquinas como la IL-12, IFN-g y TNF-a son los promotores principales de daño a la mucosa y parecen estar involucrados en el desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal. IL-2 y IFN-g son factores importantes en la eliminación de la infección por *Cryptosporidium*, y la infección por *C. parvum* de ratones y ganado fue demostrado que mejoran la expresión de IL-12 y IFN-g en la mucosa intestinal. Se conoce relativamente poco sobre el mecanismo de la diarrea asociada con la infección por *Cryptosporidium*.

La malabsorción debida a pérdida de células epiteliales maduras y también la correspondiente depleción del cotransporte de Na/glucosa han sido reportados que contribuyen a la diarrea.

Las citoquinas proinflamatorias también pueden estar involucrados en el mecanismo de la diarrea por el aumento de la permeabilidad del epitelio ya sea directamente o indirectamente mediante la inducción de la producción de secretagogos como las prostaglandinas, péptidos neurales, intermediarios reactivos de oxígeno y subproductos de NO (óxido nítrico) (12).

2.12. Métodos para la detección de la infección.

El diagnóstico de la infección por *Cryptosporidium*, se realiza generalmente por métodos de identificación morfológica de los ooquistes por microscopía, e inmunológicos, principalmente inmunofluorescencia indirecta e inmunoensayo enzimático (ELISA), los cuales pueden proporcionar información sobre la prevalencia, pero tienen como limitante su capacidad para identificar con precisión la especie o genotipo involucrado; recientemente, las técnicas moleculares, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), han venido a proporcionar una herramienta que permite realizar esta identificación con certeza (10).

Ooquistes pueden ser detectados sin tinción, utilizando un microscopio de contraste de fases, pero usando un tinte facilita la detección. Tinte Zielh Neelsen modificado, donde aparecen ooquistes púrpura en un fondo azul, es comúnmente usado (1).

Una variedad de reactivos y anticuerpos (tanto policlonal y monoclonal) han sido utilizados para la visualización por inmunofluorescencia las etapas del ciclo biológico (11).

Se describe un procedimiento modificado de un kit de tinción carbol-fucsina disponible en el mercado para examinar frotis fecales para *Cryptosporidium*.

Este kit puede ser utilizado para confirmar preparaciones de flotación o como una prueba diagnóstica primaria. El *Cryptosporidium* aparece como esferas rojas sobre un fondo verde (13).

Chek es un inmunoensayo desarrollado para permitir la detección simultánea y cualitativa de antígenos de giardia y *Cryptosporidium* en muestras fecales.

Es una placa de microtitulación (ELISA) que detecta los antígenos de Giardia y *Cryptosporidium* de muestras fecales con quistes.

Ya existen pruebas rápidas de diagnóstico para *Cryptosporidium* y Giardia que incluyen la prueba InmunoCard Stat (Meridian Bioscience, Inc), la prueba ColorPAC (Becton Dickinson), y el panel Triage parásito (Biosite Diagnostics, San Diego, CA) (17).

2.13. Herramientas moleculares para la identificación de especies

El análisis molecular es fundamental para determinar las especies cuando la morfología de los ooquistes es compatible con varias especies. Un número de genes altamente conservados han sido objeto de este propósito, incluyendo la subunidad pequeña ARN (ARNr 18S), 70 kilo Dalton (kDa) proteínas de choque térmico (hsp 70), proteínas de la pared del ooquiste de *Cryptosporidium* (cowp) y el gen actina.

El gen ARNr 18S es útil porque además de las regiones que varían entre las especies, contiene varias regiones que se conservan dentro del género *Cryptosporidium*. Esto hace posible desarrollar cebadores para la mayoría de las especies.

El hsp 70, cowp y los genes de actina de diferentes especies de *Cryptosporidium* son muy variables a lo largo de sus secuencias.

Esto significa que son de uso limitado para la identificación de especies.

El ADN extraído de los ooquistes puede ser amplificado por uno o varios métodos, incluyendo protocolos de reacción en cadena de polimerasa estándar o anidada (1).

2.14. Tratamiento

Los cuidados generales es la base para el tratamiento de la criptosporidiosis clínica. Terneros diarreicos no deben estar privados de su alimento de leche normal y además se les debe ofrecer soluciones de electrolitos orales.

A los terneros que están demasiado deprimidos como para beber se les debe administrar fluidos intravenosos.

Halofuginona es la única sustancia aprobada para utilizarse en terneros contra la criptosporidiosis. La droga afecta las etapas invasivas del parásito, pero el exacto mecanismo de acción es desconocido. El medicamento está aprobado para el tratamiento y la profilaxis. Varios medicamentos, incluyendo la paromomicina y el calostro bovino hiperinmune han sido probados en humanos y terneros con efectos variables (1).

Actualmente tratamientos disponibles para la criptosporidiosis con la excepción de nitazoxanide, en su mayoría son de apoyo, acompañado de efectos secundarios indeseables o inaceptables para el uso en animales (16).

Calostro bovino hiperinmune (HBC) ha sido previamente utilizado con un éxito limitado para tratar la criptosporidiosis. HBC ha sido eficaz en la reducción de los síntomas clínicos y la eliminación de ooquistes en numerosas especies animales.

En humanos, tanto HBC como el calostro no inmune han demostrado ser eficaces en el tratamiento de pacientes de SIDA con criptosporidiosis (16).

Estos resultados demuestran que los terneros que reciben una inyección única de MEL (meloxicam) en el inicio de la diarrea han mejorado el apetito y el rendimiento en comparación con los terneros tratados con PLA (placebo). Por lo tanto MEL es una terapia de apoyo eficaz para el complejo diarreico neonatal del ternero (4).

Un lípido previamente no identificado, que se demostró que inhibe la adhesión de las células del huésped causada por la acción de los esporozoítos del *Cryptosporidium parvum*, fue originariamente aislado en el laboratorio a partir de raspados de mucosa del intestino delgado de terneros neonatos (16).

3. Justificación

De acuerdo a los antecedentes descritos, donde se menciona la importancia de esta enfermedad en becerras lactantes, las infecciones por *Cryptosporidium* spp son cruciales para los establos lecheros ya que producen una disminución de los reemplazos y pérdidas económicas para los productores, y tomando en cuenta que en el estado de Chihuahua se están realizando una serie de estudios sobre criptosporidiosis para abrir una línea de investigación con la cual, se pretende ampliar los conocimientos de ésta enfermedad, la finalidad del presente trabajo es obtener la prevalencia de *Cryptosporidium* spp, en la cuenca lechera de Delicias, Chihuahua.

4. Objetivo General:

Investigar la prevalencia de *Cryptosporidium* spp en becerras Holstein lactantes, con diarrea, en la cuenca lechera de Delicias, Chihuahua.

4.1. Objetivos Específicos:

1. Identificar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp en heces, utilizando la técnica de Ziehl neelsen modificada.
2. Evaluar la intensidad de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. de acuerdo al grado de severidad.

5. Marco de referencia

Delicias es una ciudad agrícola, ganadera e industrial, ubicada a 65 km al sur de la capital Chihuahua y a 70 km al norte de Camargo. Es el municipio más pequeño del Estado. Tiene una superficie de 335.43 km², localizándose en la latitud norte de 28°11´ y longitud oeste de 105°28´, a una altitud de 1.170 metros sobre el nivel del mar. Es una de las principales cuencas lecheras del país, en el norte del país hay 3 importantes: En Cd. Juárez, en Cd. Delicias, en el estado de Chihuahua, y la Comarca Lagunera de los estados de Coahuila y Durango, destacando la cuenca de Delicias, por su rápido desarrollo en tan corto tiempo de existencia, la alta calidad del producto es reconocido a nivel nacional. Existen aproximadamente en esta región más de 100 establos de más de 50 cabezas en producción. Hay 29 establos con infraestructura de tecnología de punta. 28 de estos son parte de la segunda cooperativa lechera más grande del país, ALPURA, estos establecimientos cuentan con más de 300 cabezas en producción y un solo establo que presenta 15,000 vacas en producción. Solo en los mejores establos se producen más de 1.200.000 litros al día.

6. Material y Métodos

Fase de campo. Se realizó en becerras Holstein de 2 a 45 días de edad, con o sin diarrea, de 13 establos lecheros de la cuenca lechera de Delicias, Chihuahua. Se tomaron muestras de heces del 100% de los animales con diarrea, durante la época de invierno, primavera y verano. En total fueron 111 muestras de heces fecales.

Las muestras se tomaron con guantes estériles directamente del recto y se guardaron en bolsas de plástico estériles y se transportaron en refrigeración al lugar de procesamiento de las mismas.

Fase de laboratorio. En el laboratorio de parasitología de la Unidad de Diagnóstico se realizó frotis de heces, se secaron al aire y se tiñeron con la técnica de Ziehl Neelsen (Anexo 1) modificada para la identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. La interpretación fue visual bajo un microscopio de luz, para la observación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp que tiñeron de un color rojo intenso.

El análisis fue de tipo descriptivo y el estudio estadístico de los resultados se analizó mediante porcentajes.

Técnica de Ziehl Neelsen. Se filtró la fucsina, se colocaron los portaobjetos con los frotis de heces y se dejaron 30 minutos, se lavaron en agua corriente y se decoloraron en alcohol ácido al 1% hasta que dejaron de soltar colorante. Posteriormente se tiñeron con azul de metileno durante cuatro minutos y se enjuagaron en agua corriente. Se aclararon con alcohol del 96%, alcohol absoluto y xilol, para después cubrir con cubreobjetos utilizando resina sintética.

Para medir la intensidad de excreción de ooquistes se observaron 25 campos cuando encontraron ooquistes (positivo a excreción de ooquistes) y hasta 40 campos cuando no se encontraron (negativo a excreción de ooquistes), se utilizó el objetivo seco fuerte (40X) y la interpretación de la observación de ooquistes se llevó a cabo considerando el siguiente criterio:

Intensidad de excreción de ooquistes

Criterio	Grado de severidad	Intensidad de excreción
No se observaron ooquistes	Negativo	(-)
1 a 10 ooquistes	Incipiente	(+)
11 a 20 ooquistes	Leve	(++)
21 a 40 ooquistes	Moderado	(+++)
Más de 41 ooquistes	Severo	(++++)

7. Resultados y discusión.

De las 111 muestras de heces analizadas, 45 (40.54%) resultaron positivas a *Cryptosporidium* spp. La intensidad de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. observada en esta investigación fue 20% (9/45) incipiente, 13.3% (6/45) leve, 13.3% (6/45) moderado, 53.3% (24/45) severo, y 59.46% (66/111) resultaron negativos.

Cuadro 2. Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en becerras Holstein de Delicias, Chihuahua.

Establo	n	Por hato n (+)	Por hato % (+)
1	5	3	60%
2	5	5	100%
3	5	1	20%
4	7	3	42%
5	9	8	88.8%
6	10	4	40%
7	10	2	20%
8	10	0	0
9	10	0	0
10	10	3	30%
11	10	5	50%
12	10	8	80%
13	10	3	30%
Total	111	45	40.54%

n = Número de animales muestreados por hato

n (+) = Número de animales positivos por hato

% (+) = Porcentaje de positivos por hato

Se encontraron 84.61% (11/13) establos positivos a criptosporidiosis, los animales tuvieron una edad promedio de 14 días con rangos de 1 a 70 días de edad, 10 machos y 101 hembras.

Las manifestaciones patológicas de criptosporidiosis son más frecuentes en animales lactantes de 5 a 21 días de edad (24), aunque eventualmente los animales afectados se encuentran entre las 6 y 12 semanas de edad (25). Los resultados obtenidos en el presente estudio utilizando la histopatología de muestras de intestinos de animales sacrificados en rastro, y de acuerdo a las referencias de otros investigadores se concluye que la criptosporidiosis se caracteriza por destrucción de células epiteliales superficiales de las vellosidades, enteritis necrótica, hemorragias, criptitis y enteritis catarral, coincidencias que se muestran en las figuras presentadas.

Se observó que las becerras entre 5 a 21 días fueron más susceptibles a sufrir criptosporidiosis.

La intensidad de la excreción de ooquistes en las heces fue muy manifiesta en el grado 1 (+) y el 5 (+++++).

Se utilizó la técnica de Ziehl Neelsen modificada, se documentó la frecuencia de presentación por edad en días de las becerras y se manifestó la intensidad con la que se eliminaron ooquistes en las heces diarreicas.

Se encontraron varios criterios para categorizar los grupos para medir la intensidad de eliminación de *Cryptosporidium* spp en heces.

Bednarska et al. (1998)(26) los clasifican en tres grupos:

(+) < 5 ooquistes, (++) 5 a 10 ooquistes, (+++) > 10 ooquistes observados en 20 campos microscópicos a 400 aumentos.

Ortolani et al., (2003) (27) contabilizan 25 campos ópticos y evalúan la intensidad en: (-) ausencia de ooquistes, (+) de 1 a 4, (++) de 5 a 20, +++ de 21 a 84 y ++++ arriba de 84, utilizando 400 aumentos.

Emre y col. (1998) (28) observan 20 campos a 1000 aumentos y los gradúan en (-) negativo, 1 a 5 (+), 6 a 20 (++) , > 20 (+++).

Al respecto, la literatura es limitante con lo que se dice sobre estas comparaciones de excreción. El criterio tomado por nosotros es diferente y ha sido aplicado con muy poca variación en la interpretación, ya que se observaron 25 campos a 400 aumentos y se graduaron en (-) negativo, 1 a 10 (+), 11 a 20 (++) , 21 a 40 (+++) y > 40 (++++).

8. Conclusión

El presente estudio aporta información sobre la incidencia de la eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* en becerras de 13 establos lecheros de Delicias, Chihuahua muestreadas durante la época de invierno, primavera y verano. La intensidad de la excreción de ooquistes en las heces se manifestó en los grados 1 (+) y 4 (++++). Los ooquistes de *Cryptosporidium* fueron encontrados en 11 (84.61%) de 13 establos examinados. La frecuencia de *Cryptosporidium* spp. en Delicias, Chihuahua fue de 40.54%.

De acuerdo a los resultados obtenidos se sugiere realizar estudios de tratamientos específicos para este patógeno ya que no es fácil erradicar la enfermedad de un hato infectado.

9. Literatura citada

- (1) Silverlås, C. 2010. *Cryptosporidium Infection in dairy cattle*. Tesis Doctoral. Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Clinical Sciences.
- (2) Santín, M., Trout, M.J., Xiao Lihua, Zhou Ling, Greiner, E., Fayer, R. 2004. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Veterinary Parasitology*. 122 (2):103-117.
- (3) Fayer R, Santín M., Xiao Lihua. 2005. *Cryptosporidium Bovis* N. SP. (Apicomplexa: Cryptosporididae) in cattle (*Bos Taurus*). *J. parasitol.* 91 (3): 624-629.
- (4) C. G. Todd, S. T. Millman, D. R. McKnight, T. F. Duffield and K. E. Leslie. 2010. Nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy for neonatal calf diarrhea complex: Effects on calf performance. *J Anim Sci.* 88: 2019-2028.
- (5) Díaz de Ramírez, A. Sanidad Animal. En: Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal (IX, 2002, ULA- Trujillo). Criptosporidiosis en el ganado bovino, 2002. 1-10.
- (6) Kahn, C.M. Criptosporidiosis. 2007. *The Merck Veterinary Manual*. P 165-167.
- (7) Rebhun, William C. Enfermedades del ganado vacuno lechero. Acribia, Zaragoza España, 1995, pp. 216-218.
- (8) Xiao Lihua, Fayer R., Una Ryan, and J. Upton Steve. 2004. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clinical Microbiology Reviews*. 17: 72-97.

- (9) Zanaro, L. N., Garbossa, G. 2008. *Cryptosporidium*: cien años después. Acta Bioquím Clín Latinoam. 42 (2): 195-201.
- (10) García, C., et al. 2009. Frecuencia e identificación molecular de *Cryptosporidium* spp. en becerras lactantes mantenidas en confinamiento en Aguascalientes, México. Tec pecu Mex. 47 (4): 425-434.
- (11) Arrowood, M. 2002. In Vitro Cultivation of *Cryptosporidium* Species. Clin. Microbiol. Rev. 390-400.
- (12) Mcdonald, V. 2002 Host cell-mediated responses to infection with *Cryptosporidium*. Parasite Immunology. 22: 597-604.
- (13) Ridley, K. R., Olsen M. R. 1991. Rapid diagnosis of bovine cryptosporidiosis with a modified commercial acid-fast staining procedure. J Vet Diagn Invest. 3:182-183.
- (14) García Tapia Ana María et al. 2004. Brotes epidémicos de Criptosporidiosis. Control Calidad SEIMC. 1-10.
- (15) Certad, G. et al. 2007 *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma. Infectious Agents and Cancer. 2:22.
- (16) Schmidt, J. and Kuhlenschmidt M. 2008. Microbial adhesion of *Cryptosporidium parvum*: Identification of a colostrum-derived inhibitory lipid. Mol Biochem Parasitol. 162(1): 32–39.
- (17) Youn Sojin, Kabir Mamun, Haque Rashidul, and Petri William A. 2009. Evaluation of a Screening Test for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* Parasites. J Clin Microbiol. 47(2): 451–452.

- (18) X. Peng, T. Murphy, and N. M. Holden. 2008. Evaluation of the Effect of Temperature on the Die-Off Rate for *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Water, Soils, and Feces. *Applied and Environmental Microbiology*, Dec. 74 (23): 7101–7107.
- (19) Liu Jin, Enomoto Shinichiro, Lancton Cheryl, Abrahamsen Mitchell, and Rutherford Mark S. 2008. Inhibition of Apoptosis in *Cryptosporidium parvum*-Infected Intestinal Epithelial Cells Is Dependent on Survivin. *Infection and Immunity*. 76 (8): 3784–3792.
- (20) Trotz Lise A., Jarvie Brenna D, Wayne S, Leslie Kenneth E, Peregrine Andrew S. 2005. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in southwestern Ontario and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Can Vet J*. 46:349–351.
- (21) Díaz de Ramírez Adelina. 2009 Protozoosis gastroentericas emergentes en el Ganado bovino. *Mundo pecuario*. 2:122-135.
- (22) Díaz de Ramírez Adelina, Ramírez, L. N., Morillo, J. G. y Barreto, A. J. 2007. Infección con *Cryptosporidium* sp. y su asociación con diarrea becerros de ganadería de doble propósito. *Zootecnia Tropical*. 25(1):29-36.
- (23) Solano R. 2008. Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en becerras Holstein de 9 establos lecheros en la comarca lagunera. Tesis de licenciatura. Torreón, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 27 p.
- (24) Mijangos, M.L. (2006). Prevalencia de criptosporidiosis en bovinos Holstein de la Comarca Lagunera. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria, Antonio Narro. Torreón, Coah.

- (25) Reynolds, D.J. y Morgan, J.H., (1986). Microbiology of calf diarrhea in Southern Britain. *Vet. Rec.* 119: 34-39.
- (26) Bednarska, M., Bajer, A. y Sinsky, E. (1998). Calves as a potential reservoir of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* sp. *Ann. Agric. Environ. Med.* 5 (2):135-138.
- (27) Ortolani, E.L. y castro, S.P. (2003). Aspectos epidemiológicos de la criptosporidiosis en becerros de rebaños lecheros. *Parasitol Latinoam.* 58: 122-127.
- (28) Emre, Z., Alabay, B.M., Fidanci, H., Duzgun, A. y Cerci, H. (1998). Prevalence of *Cryptosporidium* spp infection and its relation to other enteric pathogens (*Escherichia coli* K 99 and rotavirus) in cattle in Ankara, Turkey. *Tr. J. Vet. Anim. Sciences.* 22: 453-457.

