

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO" UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**CRYPTOSPORIDIOSIS EN UN HATO DE OVINOS EN
DIFERENTES ETAPAS PRODUCTIVAS**

POR:

JAFET ABISAI BARRERA TORRES TESIS

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

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO.

MAYO DEL 2007

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO
NARRO" UNIDAD LAGUNA**

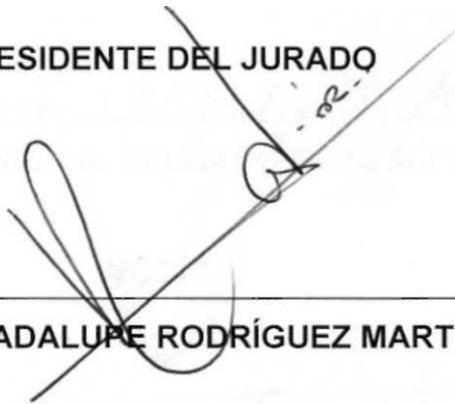
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

T E S I S

**CRYPTOSPORIDIOSIS EN UN HATO DE OVINOS EN
DIFERENTES ETAPAS PRODUCTIVAS**

APROVADA POR EL COMITÉ PARTICULAR DE REVISION

PRESIDENTE DEL JURADO



M.V.Z. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

M.C. JOSE LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELIAS



**CRYPTOSPORIDIOSIS EN UN HATO DE OVINOS EN
DIFERENTES ETAPAS PRODUCTIVAS**

TESIS ELABORADA BAJO LA SUPERVISION DEL COMITÉ PARTICULAR DE
ASESORIA Y APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA LA OBTENER

EL TÍTULO DE: **MÉDICO VETERINARIO
ZOOTECNISTA**

PRESIDENTE: *52*

J.
M.V.Z. GUADALUPE
RODRÍGUEZ
MARTÍNEZ

VOCAL:

0 | *(A - UA* | *Ai-*
M.C. | RAMON A. DELgado GONZALEZ

VOCAL:

Juan Luis Morales Cruz
M.C. JUAN LUIS MORALES CRUZ

SUPLENTE:

DEDICATORIAS:

A MI MADRE:

Francisca Torres Méndez

Este trabajo lo dedico principalmente a mi madre, luchadora incansable que da todo por mí y que en ningún momento dudo de mi capacidad, así como tampoco dudo en darme el pan que muchas veces faltó en su casa para que a mí no me faltara. Gracias por darme la oportunidad de ser alguien, por confiar en mí y por luchar siempre para que cumpliera esta meta. Sin ti no hubiera logrado nada. **TE AMO MAMÁ.**

A MIS TÍOS

Salvador Torres Zamudio, Francisco Torres Zamudio y Héctor Torres Zamudio

Dedico este trabajo a mis tíos por ser un ejemplo para mí, por que no solo conté muchas veces económicamente con ustedes si no también con su apoyo moral, ustedes me enseñaron muchas cosas que no se aprenden en la universidad, principalmente a trabajar y hacer las cosas bien y muchísimas gracias por hacerme saber que soy **"SU SOBRINO EL CONSENTIDO"**.los quiero mucho.

A LA FAMILIA BARRERA LEYVA Andrés

Barrera y a Leo bardo Barrera Ley va

Principalmente al señor Andrés Barrera Barrera, por ayudarme incondicionalmente, gracias Leobardo por ayudarme a desarrollarme profesionalmente y confiar en mi capacidad, por las experiencias vividas que jamás olvidare. Se que puedo contar con ustedes siempre que los necesite al igual que ustedes cuentan conmigo, gracias por su apoyo, amistad y dejarme ser parte de su familia lo cual para mi es un gran privilegio.

A MI COMPAÑERA:

Martha Anaí Santos Díaz

Por ser mucho mas que mi novia, por apoyarme y estar en mi corazón en este largo camino, por compartir muchos momentos algunos muy felices y otros muy difíciles, por confiar en mi, por tu paciencia, tu cariño y tu amor. Gracias chaparra por todo lo que me has dado **TE AMARE PARA TODA LA VIDA.**

AGRADECIMIENTOS:

A mi ALMA TERRA MATER, por abrirme sus puertas y por formarme como Médico Veterinario Zootecnista.

Al M.V.Z. José Guadalupe Rodríguez Martínez, con respeto y admiración le agradezco por creer en mí, por ayudarme en este proyecto, y por todos los consejos que me dio para que este trabajo fuera una realidad, de igual manera le agradezco formar parte de mi formación profesional. Pero principalmente le agradezco su amistad.

Al M.C. Ramón A. Delgado Gonzáles, con mucha admiración y respeto ya que aun sin conocerme deposito en mí su confianza. Su ayuda fue fundamental para la realización de este trabajo, gracias por su tiempo, tenderme la mano y demostrar la gran calidad de persona que es.

Al M.C. Juan Luis Morales, gracias por ser parte de mi formación y participar en este trabajo, por la confianza que deposito en mí y por la amistad que me brindo en la carrera

Al M.V.Z. Olivia Gonzáles Morales, por ayudarme desinteresadamente en este trabajo, por prestarme un poco de tu tiempo y transmitirme conocimientos para poder realizar esta investigación, por lo anterior y por todas tus atenciones mil gracias.

A mis amigos, David Ricardo Cruz Mata, Armando Valenzuela Antunez, Isabel Chávez García, Cesar Sánchez Arciniega, Arturo Alejandro Maynez Chavira, Eulogio Sánchez Flores y Alfonso Flores Coello. Con los cuales compartí muchas experiencias, casi puedo asegurar que de todo tipo, algunas tristes, algunas de **mucha** alegría y otras en las que solo puedo decir que "**FUIMOS TODOS**", aun que más que amigos todos ustedes son mis hermanos y les deseo éxito a cada uno.

INDICE

	Pag.
DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ij
I. 0.- INTRODUCCIÓN	1
2.0.- ANTECEDENTES	2
2.1.- HISTORIA	2
2.2.- DEFINICIÓN	4
2.3.- CICLO BIOLÓGICO	5
2.4.- DIAGNÓSTICO	7
2.5.- IMPORTANCIA	9
2.6.- TAXONOMÍA	10
2.7.- TRANSMISIÓN	11
2.8.- SIGNOS CLÍNICOS	12
2.9.- CONTROL Y TRATAMIENTO	14
3.0.- JUSTIFICACIÓN	16
4.0.- OBJETIVOS	18
4.1.-OBJETIVO GENERAL	18
4.2.- OBJETIVO ESPECÍFICO	18
5.0.- METAS	18
6.0.- HIPÓTESIS	19
7.0.- MATERIAL Y MÉTODOS	20
8.0.- RESULTADOS	22
9.0.- DISCUSIÓN	24
10.0.- CONCLUSIÓN	25
II. 0.- RECOMENDACIONES	25
12.0.- LITERATURA CITADA	26

1.-INTRODUCCIÓN

Los parásitos protozoarios del Phylum Apicomplexa incluyen al *Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii*, *Eimeria* spp., *Theileria* spp., y *Cryptosporidium*, además de parásitos que afectan a invertebrados, incluidos cucarachas y camarones ^(33,10). Todos los miembros del Phylum son parásitos intracelulares obligados ^(54,33). En la actualidad, 14 especies de *Cryptosporidium* están consideradas en base a las diferencias morfológicas, el sitio de infección, la clase específica de vertebrado, y las diferencias genéticas ⁽⁵¹⁾.

En la oveja, la infección por *Cryptosporios* puede tener un elevado impacto económico, causando diarrea, influyendo en el crecimiento de forma negativa, y dañando la conversión del alimento. La diarrea es común y en algunos casos causa la muerte de los corderos ^(59,60), el parásito se ha encontrado en neonatos infectados o en ovejas adultas asintomáticas ⁽¹⁶⁾. Las ovejas son susceptibles a *Cryptosporidium parvum* y la falta de calostro, la pobre higiene y otros enteropatógenos contribuyen al desarrollo de enfermedad clínica ⁽⁶²⁾.

Los oocistos de *Cryptosporidium* son resistentes al tratamiento rutinario del agua y desinfectante químico. Por lo que varias epidemias de *Cryptosporidiosis* han sido relacionadas con agua contaminada con este parásito, la más notable ocurrió en 1993 en Milwaukee la cual causo un estimado de 400,000 casos de enfermedades gastrointestinales ⁽⁵⁵⁾. La infección ocurre al ingerir ooquistes por medio del alimento o agua y ocurre cuando las sales biliares y enzimas pancreáticas provocan la liberación de 4 esporozoitos que invaden el epitelio intestinal del hospedero y sufren unos ciclos de multiplicación sexual y asexual. El ciclo de vida produce nuevos ooquistes que son liberados en grandes cantidades en las heces ⁽²⁷⁾. Los parásitos liberados por la célula

hospedadora lisan a la célula, impiden su crecimiento y reinvasen a otras células hospedadoras para sobrevivir. Los ciclos repetidos de invasión celular, replicación del parásito, lisis de las células hospedadoras e invasión de nuevas células se dan en muchos de los tejidos dañados asociados con la infección de este género ⁽³³⁾.

En humanos, es considerada una enfermedad autolimitante, sin embargo, en pacientes inmunocompetentes la infección puede conducir a una diarrea difícil de tratar ⁽⁵⁵⁾. El impacto económico de la Cryptosporidiosis es comparable con la infección de Rotavirus. La pérdida media anual debido a la Cryptosporidiosis bovina en los Estados Unidos fue estimada por lo menos en \$6.2 millones de dólares en 1978, pero recientemente el dato se actualizó y en él se sugieren que el estimado es bajo ⁽²⁶⁾.

El *Cryptosporidium parvum* es un importante agente en la etiología del síndrome diarreico neonatal becerros, corderos y cabras jóvenes, causando considerables pérdidas económicas directa o indirectamente. Experimentalmente la Cryptosporidiosis entérica fue más severa en corderos de 5 días. Clínicamente se caracteriza por una diarrea acuosa, lenta y muerte. Los corderos infectados de más de 30 días de edad no exhibieron signos severos de la enfermedad clínica ^(25, 42, 17). El *Cryptosporidium* es albergado en ovejas y otros animales, por lo que se le considera a esta puede contribuir significativamente a la contaminación de aguas vertidas ⁽⁵¹⁾.

2.-ANTECEDENTES

2.1.- HISTORIA

Este parásito protozoario fue el primero en ser recolectado del tracto intestinal de humanos en 1976, y es una causa importante de enfermedades gastrointestinales ^(52: 43). El primer en observar y reconocer el género *Cryptosporidium* fue Ernest Edward

Tyzzar, quien describió el tipo de especies, *C. murís*, aislado de las glándulas gástricas de un ratón de laboratorio. La presencia de *Cryptosporidium*, era comúnmente confundida con otros miembros del género apicomplexa, especialmente *Sarcocystis* coccidia. Sin embargo, el *C. parvum* difiere de este no solo por infectar preferentemente al intestino delgado sobre el estomago sino también por el tamaño de los ooquistes. Una gran variedad ooquistes parecido a *Cryptosporidium* fueron erróneamente asignados al género. Después del reconocimiento de las diferencias entre *Cryptosporidium* y *Sarcocystis*, se modifico el concepto erróneo de un estricto hospedador específico aplicado a *Cryptosporidium* spp., lo que condujo a la creación de múltiples y nuevas especies incluidos *C. agni* en borregos, *C. anserinum* en gansos, *C. bovis* en becerros, *C. cuniculus* en conejos, *C. garnhami* en humanos, y *C. rhesi* en monos ^(30, 31). Lihua Xiao (2004), posteriormente publicó la descripción completa del ciclo de vida y subsecuentemente describe una segunda especie, también obtenida de un ratón de laboratorio.

En 1993, en Milwaukee, Wisconsin, una epidemia de Criptosporidiosis fue asociada con la contaminación del agua de la ciudad, la cual produjo aproximadamente 400,000 personas enfermas ^(55,52,43,20_29,53,24).

La enfermedad es auto limitante, sin embargo, en individuos inmunocompetentes (particularmente la de individuos con SIDA y pacientes con cáncer) puede provocar la muerte. En pacientes con SIDA es causa de diarrea persistente en un 10 o 20% de los pacientes, debido a que no existen tratamientos efectivos ^(43,29_53_7,32,24,39,20_52).

La *Cryptosporidium* es el mayor patógeno entérico encontrado alrededor de mundo en infantes con diarrea aguda y crónica; en niños desnutridos la enfermedad es severa, prolongada y puede ser fatal ^(45,20).

2.2.- DEFINICIÓN

El genero *Cryptosporidium* es un protozooario gastrointestinal de animales de sangre caliente y sangre fría. El estado infeccioso de los ooquistes es transmitido vía fecal-oral, comida y agua son la ruta de infección mas común ⁽⁴⁹⁾. Estos parásitos no requieren un estado de desarrollo externo, pero son inmediatamente infectivos cuando pasan en heces como ooquistes. Dentro de los hospedadores, como el ganado, tiene ambos tipos de reproducción, sexual y asexual así como también un ciclo de vida completo. Así, el *C. parvum* infecta una gran variedad de animales domésticos y a un amplio rango de mamíferos, particularmente rumiantes, también han sido reportadas un animales salvajes, y se ha sugerido como causa de contaminación de ooquistes en agua. Aunque *C. parvum* no es infeccioso para vertebrados acuáticos o semiacuáticos, estos animales poiquilotermos pueden ingerir y diseminar los ooquistes eficientemente

2,47)

El *Cryptosporidium* considerado como zoonotico y antropozonotico, es el agente etiológico mas común reportado en recolecciones en becerros diarreicos en los ELI. Así, en una inspección de 1,103 animales de un hato lechero, 48% de becerros entre 7 y 21 días estaba infectados con *C. parvum*. Los becerros infectados se consideran como transmisores potenciales hacia humanos a través de la contaminación de las vertientes de agua por las explotaciones ganaderas ^(53, 24, 9, 39, 49, 30, 36). El *C. parvum* infesta también a ratones y cerdos recién nacidos, pero no animales adultos ⁽⁷⁾. En el ganado bovino son reconocidas dos especies de este género: *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium andersoni* (sin. *C. muris* tipo bovino). El primero, coloniza el intestino delgado y constituye un importante agente etiológico del síndrome diarreico de los

becerros (1). El *Cryptosporidium parvum* es también el mas amplio enteropatógeno identificado en becerros neonatos. El 90 % de los establos lecheros de América albergan estas coccidias, y 92% de vacas adultas asintomáticas tienen anticuerpos anti-*C. parvum* específicos IgG, IgG1, IgG2, y IgM. Los becerros neonatos experimentan alta morbilidad, pero baja mortalidad con mono-infecciones, aunque una combinación con otras infecciones aumenta la mortalidad (20). En neonatos o adultos que tuvieron o adquirieron inmunodeficiencias, la enfermedad puede pasar a ser crónica y amenazar la vida del hospedero. La diseminación a sitios extra intestinales puede ocurrir en hospedadores inmunocomprometidos y contribuir a la morbilidad (7,49,36).

2.3.-CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico es monoxeno y todas sus fases asexuadas y sexuadas ocurren en el mismo hospedador (4). En los rumiantes domésticos, el ciclo comienza con la ingestión seguida por el desenquistamiento en el tracto gastrointestinal del hospedador, liberándose del ooquiste los 4 esporozoítos. La temperatura corporal de los mamíferos (en torno a 37° C), las sales biliares y posiblemente, la tripsina son los factores que mas influyen en esta fase. Una vez liberados, los esporozoitos alcanzan el borde luminal de los enterocitos mediante movimientos de contracción, extensión y deslizamiento. Allí se invaginan a manera de dedo de guante, siendo englobados por la membrana de la célula hospedadora, que encapsula al parásito en el interior de una vacuola parasitófora. La diferenciación de esporozoitos dentro de los trofozoítos esféricos, ocurre por la multiplicación asexual, formando 2 tipos de merozontes (o esquizontes). El tipo 1 contienen 6 a 8 núcleos de los cuales llegan a ser incorporados dentro de 6 a 8 merozoítos, cuando el merozonte es maduro. Cada merozoíto es capaz de infectar a

nuevas células del hospedero; el tipo 2 merozonte, contiene 4 merozoítos cuando madura. Los merozoítos de los merozontes tipo 2 también invaden nuevas células. En el curso de la merogonia (ectomerogonia), se forman 8 ó 4 merozoítos dependiendo de que se trate de una esquizogonia de I o II generación. Se reconoce la existencia de dos tipos de esquizontes: el tipo I es el primero en aparecer en el ciclo biológico y tiene 8 merozoítos; el tipo II tiene 4 merozoítos. Los merozoítos del tipo I pueden generar nuevas merogonias de primera generación o formar merontes de tipo II a partir de los cuales se desarrollan los macro y microgametos. La mayoría de los merozoítos de tipo II que entran a la célula hospedadora van a formar macrogametos, mientras que solo unos pocos forman microgamontes, que contienen 16 microgametos en su interior. Los macrogametos poseen granulos de polisacáridos (amilopeptina) en la parte basal y cuerpos formadores de la pared en la periferia. Los microgametos carecen de flagelo y se dirigen hacia los macrogametos siguiendo el flujo intestinal o mediante la contracción y extensión de los microtúbulos intracitoplasmáticos. La formación de la pared del ooquiste acontece antes que la esporulación, que tiene como consecuencia la formación de 4 esporozoitos. El 80 % de los ooquistes presenta una doble pared ooquistica se denominan ooquistes de pared gruesa constituyen las formas c'e resistencia que encontramos en el ambiente y son responsables de la transmisión entre los hospedadores. Los ooquistes de pared fina (20%) están rodeados de una sola unidad de membrana y son los responsables de la autoinfección. Su pared, relativamente débil, se rompe pronto tras su liberación por la célula hospedadora y los esporozoitos penetran en las células epiteliales adyacentes, reiniciándose el ciclo endógeno. Aun cuando los ooquistes de algunos *Cryptosporidium* spp son morfológicamente similares, las medidas morfométricas de ooquistes pueden jugar papel importante en la diferenciación de algunos *Cryptosporidium* spp. Por ejemplo las

especies establecidas de aves y reptiles pueden fácilmente ser diferenciadas basándose en el tamaño y formas de las partes de los ooquistes ^(30,31). Los ooquistes de *C. parvum* son aproximadamente de 4.5 a 5 micras de diámetro ⁽⁵⁶⁾.

2.4.- DIAGNÓSTICO.

La Criptosporidiosis no puede ser clínicamente distinguible de otras enfermedades diarreicas por diverso organismos infectivos. El diagnóstico requiere de la detección de los oocystos en la heces ⁽⁶³⁾. El diagnóstico de la cryptosporidiosis resulta de la identificación de los ooquistes esféricos de 5 micrómetros de diámetro o en los estadios intracelulares dentro de la biopsia de la mucosa gastrointestinal. En la secreción en tejidos, una muestra teñida con hematoxilina- eosina debería ser suficiente para identificar la morfología de los estadios de vida intracelular del parásito en su localización dentro de las células epiteliales del intestino. Se puede utilizar la técnica de auramina/rodamina, seguida por la tinción de Ziehl Neelsen ya que es muy sensible y específica aprovechada como herramienta para la identificación de los ooquistes de *Cryptosporidium* ⁽²⁷⁾. La técnica más precisa es la tinción por el método Ziehl Neelsen modificado para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* en heces sin usar calentamiento. Se observan los ooquistes ácido resistentes, de color rojo brillante sobre un fondo azul. En algunos se ven corpúsculos internos que corresponden a los esporozoitos. También se puede usar tinción Giemsa ⁽⁶⁴⁾. La técnica de anticuerpos fluorescentes no puede diferenciar especies de *Cryptosporidium* en humanos y animales vertebrados. Las pruebas moleculares tienen algunas ventajas por la

sensibilidad para detectar, y la habilidad de diferenciar especies de *Cryptosporidium* o genotipos. Sin embargo, estas pruebas son susceptibles al efecto de muchos inhibidores que se presentan en muestras con un problema mayor en el descubrimiento de biología molecular de microorganismos en las muestras medioambientales. En la identificación de este protozooario, el método que normalmente se usa es la purificación del ooquistes con la extracción de ADN ⁽²⁸⁾. Al compararse los métodos de detección por medio de Ziehl Neelsen, inmunofluorescencia y la identificación de antígenos por estudios inmunosorbentes ligado a enzimas en materia fecal, y se encontró que la sensibilidad y especificidad va de 96 a 98% para las tres pruebas. Las etapas endógenas del parásito en el borde de las células epiteliales pueden ser detectadas histológicamente con la tinción H y E, al fijar muestras intestinales de 1 a 2 horas después de la muerte ⁽⁶⁶⁾. La demostración de ooquistes en heces fijadas con metanol o teñidas por el método de Giemsa o por una técnica de Ziehl Neelsen modificada se usa ahora rutinariamente en diagnóstico de infecciones de cryptosporidias en ganado. Las observaciones de campo en terneros han mostrado excreción de ooquistes que coincide con enfermedad clínica y diarreica, y con el tiempo los ooquistes se vuelven numerosos en las heces ⁽⁶⁶⁾. El diagnóstico clínico de cryptosporidiosis está principalmente basado en la presencia de ooquistes en el excremento. Los métodos de observación incluyen las técnicas de flotación, sedimentación y tinciones de frotis de heces fecales ⁽⁶⁷⁾.

Las actuales técnicas para el aislamiento de *Cryptosporidium* del agua involucran la filtración, centrifugación y purificación de ooquistes para su observación por microscopio inmunofluorescente. Objetos con la correcta forma, dimensiones y fluorescencia son confirmados por observación de las estructuras internas por interferencia diferencial de contraste en el microscopio. Varias alternativas tecnológicas han sido investigadas en

esfuerzo para proporcionar detecciones más efectivas en agua contaminada con *Cryptosporidium*. El PCR es un potencial localizador con algunas limitaciones. Las ventajas del PCR incluyen gran sensibilidad, rápido análisis de algunas muestras, relativamente bajo costo, simultánea detección de múltiples patógenos, y la habilidad para discriminar entre especies y extraños si los primeros son seleccionados ⁽³⁷⁾. El PCR es también integrado a varios procedimientos genotípicos tales como análisis de restricción de polimorfismo de largos fragmentos, métodos al azar de amplificación, y métodos detectando polimorfismos conformacionales ⁽⁴⁵⁾.

2.5.- IMPORTANCIA

Debido a la resistencia de los ooquistes los cuales soportan al ambiente y los procesos normales de desinfección del agua, como el de cloración, su pequeño tamaño, las bajas dosis infectivas y la carencia de quimioterapias adecuadas, además, de la detección deficiente de estos organismos en aguas tratadas y no tratadas importantes en la industria del agua, con el objetivo de prevenir la Criptosporidiosis alrededor de todo el mundo ^(56, 6x22). La Criptosporidiosis es un importante problema para la salud pública en países en desarrollo donde el SIDA es endémico ⁽³⁾. El consumo de agua en individuos inmunosuprimidos está especialmente restringida ^(6, 48). La habilidad para evitar la adhesión a los filtros de las plantas tratadoras de aguas ⁽¹²⁾.

La enfermedad puede estar desestimada, ya que no es una enfermedad reportada por el sistema de salud existente. Así por ejemplo, el costo por epidemia en Milwaukee Wisconsin en 1993 fue valorada en \$96.2 millones, \$31.7 en costos médicos y \$64.6 millones en pérdidas productivas. El promedio total por persona con presencia media, moderado a severa de la enfermedad fue de: \$116, \$475, \$7808 dólares

respectivamente. Los costos estimados no incluyen litigaciones en infraestructura en el tratamiento de aguas. Pretty et, al., estimaron que el Reino Unido (UK) gasta un promedio de 23 millones de libras por año para los requerimientos de eliminación de *Cryptosporidium* del agua para beber^(52,30,31).

Las altas prevalencias y excreción de hasta 1.8×10^4 opg (ooquistes por gramo) de heces⁽¹⁵⁾. Los efectos negativos sobre peces usados en la acuicultura Ademar, la presencia de diarrea Cryptosporidiosis favorece la malnutrición e impide el desarrollo. Además de un impacto económico importante^(30,31).

2.6.- TAXONOMÍA

El *Cryptosporidium* esta clasificado de la siguiente forma:

Phylum: Apicomplexa Familia:

Cryptosporidiidae Orden:

Eucoccidiida Suborden: Eimeriina

Clase: Sporozoa Subclase:

Coccidia Genero: *Cryptosporidium*

(50)

Dentro de las especies reconocidas actualmente están incluidas *C. andersoni* (ganado), *C. baileyi* (pollos y algunas otras aves), *C. canis* (perros), *C. felis* (gatos), *C. galli* (aves), *C. hominis* (humanos), *C. meleagridis* (aves y humanos), *C. molnari* (peces), *C. muris* (roedores y algunos otros mamíferos), *C. parvum* (rumiantes y humanos), *C. wrairi* (cerdos de guinea), *C. saurophilum* (lagartijas y vivoras), y *C. serpentis* (víboras y

lagartijas). Otros *Cryptosporidium* spp., han sido encontrados en peces, reptiles, aves y mamíferos, pero no han sido nombrados en su totalidad ^(30;31). El *Cryptosporidium molnari* fue aislado de un cultivo de róbalo marino y besugo marino. La transmisión homóloga y transmisión cruzada han sido recientemente demostradas bajo condiciones experimentales *C. wrairifue* el primero descrito en cerdos ⁽⁹⁾. En humanos y ganado, primariamente becerros, corderos, y cabritos la Criptosporidiosis es causada por *Cryptosporidium parvum* ⁽⁴⁰⁾.

2.7.- TRANSMISIÓN.

La transmisión en humanos y animales es vía fecal oral y a sido asociada con la ingestión de agua destinada a la recreación y agua de beber contaminada ^(44;35)La infección puede ocurrir de persona a persona, animal a persona y a través de la transmisión ambiental ⁽⁵²⁾. La importancia del agua contaminada con *Cryptosporidium* fue reconocida hace 12 años atrás, y al menos 50 epidemias. Los ooquistes de *C. parvum* son resistentes a la desinfección del agua. La infección ocurre cuando los ooquistes se encuentran en comida, agua o en el ambiente y son ingeridos ^(10); 23). La fauna Silvestre y las aguas negras han sido implicadas en la contaminación de vertientes acuícolas, poblaciones humanas y animales, sin embargo, se cree que los animales de granja son uno de los mayores contribuidores. Borregos, caballos y cerdos son susceptibles a la infección de *C. parvum* y diseminadores de ooquistes; sin embargo, los becerros de carne y leche son considerados como de gran riesgo por el numero, distribución, incidencia de infección y altos niveles de excreción de ooquistes (29, 13) La implicación de moscas en la transmisión mecánica de *C. parvum* en escenarios experimentales ha sido recientemente reportado estas, junto con la basura

son reconocidos hospedadores de una variedad de parásitos de salud pública e importancia veterinaria (*Coccidia Sarcocystis spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Isospora spp.*, y *Eimeria tenelia*), pero no se sabe si moscas de la vida silvestre pueden llevar este patógeno. Datos moleculares demostraron que *C. parvum* puede ser transportado por moscas por al menos 3 semanas después de la eliminación de la fuente de contaminación ⁽⁴⁸⁾. Los roedores pueden conseguir altas densidades de poblaciones los cuales en combinación con relativa alta prevalencia de diseminación fecal de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* puede resultar en una significativa carga ambiental para este parásito ⁽¹⁹⁾.

2.8.- SIGNOS CLÍNICOS

El *Cryptosporidium spp.*, infecta el tracto digestivo y/o respiratorio de mamíferos y humanos. La infección es auto limitante en individuos inmunocompetentes, pero puede causar diarrea profusa y síntomas de dolor abdominal, los cuales normalmente se resuelven en 7 a 14 días sin atención médica, En individuos con SIDA la enfermedad puede causar la muerte ⁽⁵¹⁾. Una abundante diarrea acuosa es la principal manifestación clínica. Los síntomas asociados son: calambres, dolor abdominal, fiebre, náusea y vómito con malasia, fatiga, mialgia y anorexia, son síntomas menos comunes. Lo largo del tiempo de una diarrea depende del estado inmune del individuo. ⁽³⁹⁾. Menos de 30 ooquistes pueden causar infección en personas inmunocompetentes y esto a través ¿a un simple ooquiste puede inducir enfermedad ⁽⁴⁹⁾. En humanos, el *Cryptosporidium hominis* (*Cryptosporidium parvum* genotipo 1), es el mas encontrado. Sin embargo, ha sido recolectado en primates, y experimentalmente cerdos y becerros ^(20,15).

En el ganado, la cryptosporidiosis provoca una diarrea corta y probablemente impide la vida productiva en la mayoría de los casos. Sin embargo, las muertes pueden ser a veces resultado de complicaciones de otros patógenos y varios otros factores perjudiciales. Becerros adolescentes y adultos pueden transportar *C. parvum* pero probablemente no diseminen un número importante del parásito ⁽²⁾. Sin embargo, becerros positivos de todas las edades derraman millones de ooquistes de *Cryptosporidium muris* aparentemente no zoonótico. El *Cryptosporidium muris* infecta solo las glándulas del estómago (abomaso en becerros), usualmente no causa enfermedad, pero retarda la producción del ácido y probablemente la digestión de proteínas en el abomaso, y es que en vacas crónicamente enfermas la producción láctea disminuye en cerca de 13%. El desarrollo de los becerros puede ser desfavorable ^(27,31) En estudios experimentales en cerdos sin tratamiento y que fueron expuestos a la ingestión de ooquistes viables que pueden causar de moderada a severa diarrea, deshidratación, pérdida de peso y eventualmente la muerte ⁽²⁷⁾. Semejantemente a los becerros, los borregos y cabritos son susceptibles a la infección de *C. parvum* en los días del nacimiento. Los cabritos neonatos no medicados desarrollan Criptosporidiosis clínica, con pérdida de apetito por 3 días, rápida pérdida de peso durante periodos de 4-7 días y hasta 11, y mortalidad de 1-9% una profusa diseminación de ooquistes fue asociada con diarrea en un 70% de cabritos. El 30% restante diseminó ooquistes sin diarrea. Esto fue frecuentemente observado en rumiantes como becerros ⁽⁴⁰⁾. Los becerros neonatos son positivamente susceptibles a la infección y pueden excretar arriba de 30 billones de ooquistes en un periodo de 1 a 2 semanas. En un muestreo de 7,369 becerros en 1,103 granjas lecheras en 28 estados, el 50% de los becerros mayores de 2 semanas y el 22.4% de todos los becerros fueron positivos a *C. parvum*.

Se concluyó virtualmente que todos los hatos con más de 100 vacas son infectados con

C. parvum. Datos limitados sugieren que vacas adultas también pueden diseminar ooquistes. Scott et al., encontraron arriba de 18,000 ooquistes por gramo de heces de vacas aparentemente saludables. Basado en un promedio de 900 ooquistes por gramo y una excreción total de 40 kg por vaca por día, un simple adulto pudo excretar potencialmente más de 36 millones de ooquistes por día ⁽²⁹⁾.

La Criptosporidiosis gástrica es rara en recién nacidos, la forma intestinal es omnipresente entre la población de becerros, corderos, cabritos, causando pérdidas económicas directa e indirectamente. La infección es auto-limitante y los responsables de la inmunidad son las células T, inmunoglobulinas intestinales ^(21, 17). El *C. parvum* (*Cryptosporidium parvum* genotipo 2), el cual infecta rumiantes, (becerros, borrego; cabritos) aunque presenta amplia distribución, su prevalencia es baja. Aparentemente no causa enfermedad manifiesta, pero la producción de leche se ha visto significativamente reducida en las vacas afectadas ^(18,15).

2.9.- CONTROL Y TRATAMIENTO

El calostro limita el índice de mortalidad, pero no previene el desarrollo de parásito y la enfermedad clínica. Una profilaxis de la criptosporidiosis se obtiene cuando los animales son alimentados con calostro por varios días ⁽⁴⁰⁾. Existen reportes que han demostrado la eficacia de componentes criptosporidiales entre ellos la clase de agentes químicos conocidos como moléculas dicatónicas aromáticas. Aunque el prototipo de dicatónicas tales como pentamidina y diminozina a menudo demuestran efectos tóxicos indeseables, actualmente moléculas bajo desarrollo en laboratorio poseen mejor eficacia contra un amplio rango de parásitos y reducida toxicidad o una completa ausencia de toxicidad. La elevada toxicidad contra protozoarios intra ;

extraelulares de algunos de estos componentes dicaciones son notables e incluyen, *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus neoformans*, *Mycobacterium* spp., y cierto virus ⁽⁷⁾. Ha sido reportado que la paromomicina oral (aminoglicosido) mejora los síntomas de Criptosporidiosis en pacientes con SIDA, pero un alto porcentaje de pacientes reinciden cuando el tratamiento es descontinuado. La diseminación del parásito a la mucosa biliar y el residuo de varios estados del parásito que permanecen dentro de las criptas intestinales puede servir como reservorio de los parásitos, responsables por infecciones después de un tratamiento primario de paromomicina ⁽³⁸⁾. Esta droga la cual es comercialmente viable para su uso contra otros parásitos protozoarios entéricos en humanos (*Entamoeba histolytica* y *Giardia intestinalis*), muestran ser útiles en una forma adaptada como un agente anticriptosporidial para rumiantes neonatales ⁽⁴⁰⁾. Los probióticos son microorganismos no patógenos, que cuando son ingeridos tienen efectos benéficos en la prevención y tratamiento de condiciones patológicas. Los mecanismos de acción incluyen la competencia para sitios receptores en la superficie intestinal, estimulación del sistema inmune, excreción de sustancias antimicrobiales y competencia con patógenos por los nutrientes intra-luminales. Lactobacilli y Bifidobacterias son acido lácticos comunmente encontrados en fermentación de productos lácteos tales como yogurt el cual exhibe propiedades probióticas ⁽²⁷⁾. Se ha demostrado ser limitante de la infección de *Cryptosporidium parvum* en individuos inmunocomprometidos y modelos animales. Estudios clínicos controlados muestran que los prebióticos tales como *Lactobacillus rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. casei* Shirota, y *Bifidobacterium lactis* pueden acortar la duración de la diarrea por rotavirus. En ratonas inmunodeficientes también se sugieren que el tratamiento con prebióticos reducen la carga de parásitos en el epitelio intestinal durante la Criptosporidiosis. En humanos, la rehidratación y corrección de anormalidades de electrolitos, no es una terapia definitiva

establecida. La Paromomicina o la azitromicina pueden ser benéficos para algunos pacientes y en pacientes inmunocomprometidos administrados oralmente inmunoglobulinas séricas humanas han sido benéficas ⁽³⁴⁾.

3.- JUSTIFICACIÓN

Los parásitos protozoarios del Phylum Apicomplexa incluyen al *Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii*, *Eimeria* spp., *Theileria* spp., y *Cryptosporidium*, incluye además parásitos que afectan a invertebrados, incluidos cucarachas y camarones. Todos los miembros del Phylum son parásitos intracelulares obligados ^(54,33). Varias epidemias de Cryptosporidiosis han sido relacionadas con agua contaminada con este parásito, la más notable ocurrió en 1993 en Milwaukee que causó un estimado de 400,000 casos de enfermedades gastrointestinales. Los oocistos de *Cryptosporidium* son resistentes a los tratamientos rutinarios del agua y desinfectantes químicos ⁽⁵⁵⁾. La infección ocurre al ingerir oocistos por medio del alimento o agua. La infección se da cuando las sales biliares y enzimas pancreáticas provocan la liberación de 4 esporozoitos que invaden el epitelio intestinal del hospedero y sufren unos ciclos de multiplicación sexual y asexual. El ciclo de vida produce nuevos oocistos que son liberados en grandes cantidades en las heces. ⁽²⁷⁾. Los parásitos liberados por la célula hospedadora lisan a la célula, impiden su crecimiento y reinvasan a otras células hospedadoras para sobrevivir. Los ciclos repetidos de invasión celular, replicación del parásito, lisis de las células hospedadoras e invasión de nuevas células se dan en muchos de los tejidos dañados asociados con la infección de este género ⁽³³⁾. En humanos la Cryptosporidiosis es una infección que usualmente causa enfermedades diarreicas que se presentan entre las dos y cuatro semanas pero pueden amenazar a los pacientes inmunocompetentes y puede conducir a una diarrea difícil de tratar ⁽³⁴⁾. En la actualidad, 14 especies de *Cryptosporidium* están consideradas en base a las diferencias en la morfología del oocisto, el sitio de infección, la clase específica de vertebrado, y las diferencias genéticas ⁽⁵¹⁾. El impacto económico de la coccidiosis miembro del género apicomplexa genera un costo estimado alrededor del mundo de aproximadamente \$800 millones de dólares, y solo a la industria americana le representa alrededor de \$450 millones de

dólares¹. Mientras que el de la Cryptosporidiosis es comparable con la infección de Rotavirus. La pérdida media anual debido a la Cryptosporidiosis bovina en los Estados Unidos fue estimada por lo menos en \$6.2 millones de dólares en 1978, pero recientemente el dato se actualizó y en él se sugiere que el estimado es bajo. La diarrea neonatal en los corderos es considerada una causa importante de mortalidad del cordero, experimentalmente la Cryptosporidiosis entérica fue más severa en corderos de 5 días. Clínicamente la enfermedad fue caracterizada por una diarrea lenta, acuosa y muerte. Los corderos infectados de más de 30 días de edad llegaron a ser infectados pero no exhibieron signos severos de la enfermedad clínica⁽⁴²⁾. El *Cryptosporidium parvum* es un importante agente en la etiología del síndrome diarreico neonatal en becerros, corderos y cabras jóvenes, causando considerables pérdidas económicas directa o indirectamente⁽¹⁷⁾. Especies de *Cryptosporidium* son albergados en ovejas y otros animales, por lo que se considera que la oveja puede contribuir significativamente a la contaminación de aguas vertidas⁽⁵¹⁾.

Considerando que se han analizado anteriormente bovinos en hatos lecheros de la Comarca Lagunera y que se han encontrado ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, utilizando la técnica de Ziehl Neelsen modificada, y dándole seguimiento a estas investigaciones sobre el tema en nuestra institución, se pretende en el presente estudio identificar la frecuencia de eliminación de criptosporidias en ovinos, como fuente de contaminación entre especies. Por otra parte, al tener en cuenta que un 80% de los hatos lecheros en la Comarca Lagunera están infectados con *Cryptosporidium parvum*, es importante realizar estudios sobre factores de riesgo asociados a esta enfermedad, y por lo tanto identificar al parásito en otras especies para contribuir con la epidemiología de criptosporidiosis, en la Comarca Lagunera.

4.- OBJETIVOS

4.1. -OBJETIVO GENERAL:

Analizar la presencia de Criptosporidiosis en ovinos de un hato de la Comarc; Lagunera

4.2. - OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Identificar ooquistes de *Cryptosporidium* en heces de ovinos sanos y con diarrea en un hato de la Comarca Lagunera, utilizando la técnica de Ziehl Neelser modificada.
2. Determinar la frecuencia e intensidad de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* en un hato de la Comarca Lagunera

5.- METAS

Con la presente investigación se pretende identificar a los ovinos como fuente de infección y factores de riesgo para la infección en otras especies, incluyendo al humano

6.- HIPOTESIS

.os ovinos pueden ser un factor de elevada diseminación de ooquistes de *Cryptosporidium* hacia las otras especies.

6.- HIPOTESIS

Los ovinos pueden ser un factor de elevada diseminación de ooquistes de *Cryptosporidium* hacia las otras especies.

7.- MATERIALES Y METODOS

Se recolectaron 79 muestras de heces de un hato de ovinos de la Comarca Lagunera, la cual, se localiza en la parte central de la porción norte de los Estados Unidos Mexicanos, ubicada en los meridianos de 102° 22' y 104° 47' WdG longitud Oeste, y los paralelos 24° 22' y 26° 23' latitud Norte, la altura media sobre el nivel del mar es de 1139 metros. Esta formada por parte de los Estados de Coahuila y Durangc y debe su nombre a los cuerpos de agua que se formaban alimentados por los ríos Nazas y Aguanaval. Está integrada por 16 municipios, 11 del Estado de Durango y 5 del Estado de Coahuila.

Los animales muestreados se dividieron en 6 grupos (de los cuales 4 grupos incluyeron a hembras y 2 a crías) los animales muestreados poseían diversas edades y estaban en diversos estados fisiológicos. Los grupos se dividieron de acuerdo a la edad y se clasificaron de la siguiente forma; Hembras (de -15 a -1 días preparto, 0 a 15 y de 16 a 30 días postparto - grupo 1, 2 y 3 respectivamente -); Crías (de 0 a 15 y de 16 a 30 días de nacidas - grupo 4 y 5 respectivamente -); otros (hembras con crías de mas de 30 días de nacidos -grupo 6-). De los grupos solo el grupo 4 tenía presencia de diarrea y el resto estaban aparentemente sanos. Las muestras se obtuvieron directamente del recto de los animales, se almacenaron y posteriormente fueron procesadas en el Laboratorio de Diagnostico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, con la técnica de Ziehl Neelsen modificada para determinar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidios spp.*

Las muestras se almacenaron y posteriormente fueron procesadas en el Laboratorio de parasitología de la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna en donde se realizaron los frotis con heces

frescas en portaobjetos y se dejaron secar al aire, se enjuagaron con agua, para teñirlas con la técnica Ziehl Neelsen modificada. Los pasos para la tinción son los siguientes: se sumergieron por 30 minutos en Carbol Fucsina, posteriormente en agua corriente hasta quitar el exceso de colorante, se decoloraron en alcohol ácido al 1% (alcohol al 70% al 1% de ácido clorhídrico) hasta obtener un color rosa en la tinción, se procedió a sumergir en agua corriente para quitar residuos del alcohol y ácido, así como el exceso del colorante, se realizó contra-tinción con azul de metileno por 5 minutos, después se lavó con agua corriente hasta quitar excedente de colorante. Las muestras teñidas se cubrieron con cubreobjetos, utilizando resina sintética para observarlas e interpretarlas con un microscopio fotónico.

Se realizó una observación bajo el microscopio de luz visible con el objetivo 40X observando los ooquistes de color rojo brillante con medidas de 3.0 a 5.0 um de diámetro sobre un fondo azul. Para medir la intensidad de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* en heces se utilizó el criterio utilizado por Ortolani y Castro (2003): (-) Ausencia de ooquistes; (+) 1 a 4 ooquistes; (++) 5 a 20 ooquistes; (+++) 21 a 84 ooquistes; (++++) mas de 84 ooquistes. Se observaron con el objetivo 40X, se contabilizaron 50 campos ópticos antes de considerar un caso negativo. La intensidad de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* se interpretó como sigue:

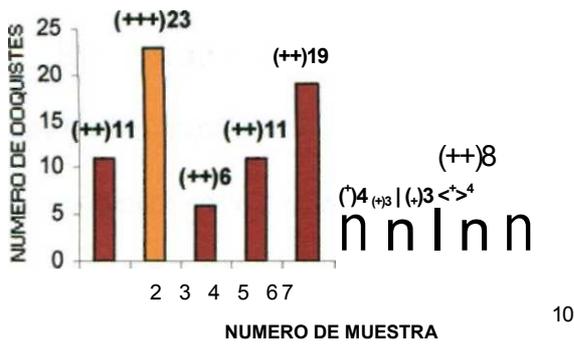
GRADO	LECTURA
Grado 1 (+)	Incipiente
Grado 2 (++)	Leve
Grado 3 (+++)	Moderado
Grado 4 (++++)	Severo

8.- RESULTADOS

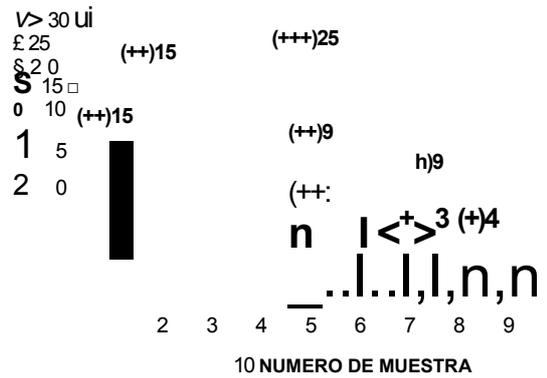
El 100% de los 60 ovinos muestreados presentaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Así por ejemplo, en el grupo 1, el 40% reveló una intensidad de eliminación de ooquistes incipiente, el 50% mostró una intensidad leve y solo el 10% una intensidad moderada. En el grupo 2, el 30% reveló una eliminación de ooquistes con grado incipiente, el 60% leve, y el 10% restante mostró una intensidad moderada. En el grupo 3 se evidenció que el 90% tenía un grado de eliminación leve, y el 10% restante una intensidad moderada. En el grupo 4, el 40% de las muestras manifestaron una intensidad leve y el 60% una intensidad moderada. En el grupo 5, el 20% presentó grado de eliminación un incipiente, el 60% un grado moderado y el 20% un grado severo. En el Grupo 6 se observó en el 20% de las muestras un grado incipiente de eliminación, mientras que el 80% mostró una intensidad moderada. Del total de muestras observadas se evidenció que solo un 18% contó con un grado de intensidad de eliminación a ooquistes de *Cryptosporidium* spp incipiente, el 54% mostró una intensidad leve, el 25% mostró una intensidad moderada, mientras que solo un 3% expresó una intensidad de eliminación severa.

GRUPOS	INCIPIENTE	LEVE	MODERADO	SEVERO
HEMBRAS -15 A - 1 DIAS PREPARTO	4	6	1	
HEMBRAS 0 A 15 DIAS POSTPARTO	3	5	1	-
HEMBRAS 16 A 30 DIAS POSTPARTO	--	9	1	-
CORDEROS 0 A 15 DIAS DE NACIDOS	2	~	6	2
CORDEROS 16 A 30 DIAS DE NACIDOS	2	8	-	-
HEMBRAS DE + DE 1 MES POSTPARTO	-	4	6	-

HEMBRAS -15 A -1 DIAS PREPARTO

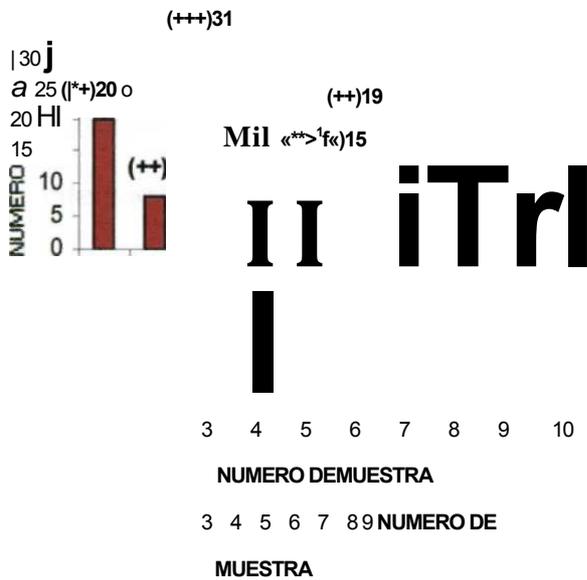


HEMBRAS 0 A 15 DIAS POSTPARTO

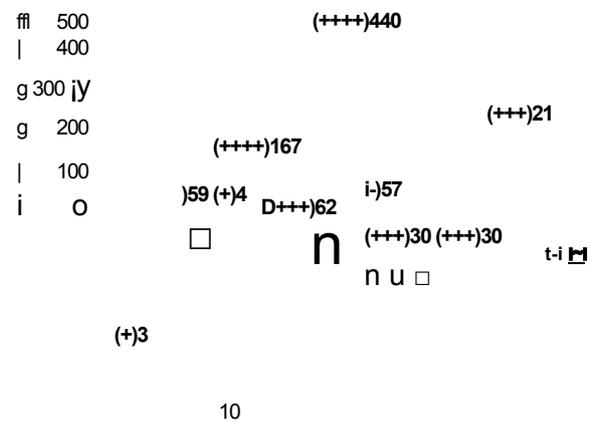


B

HEMBRAS DE 16 A 30 DIAS

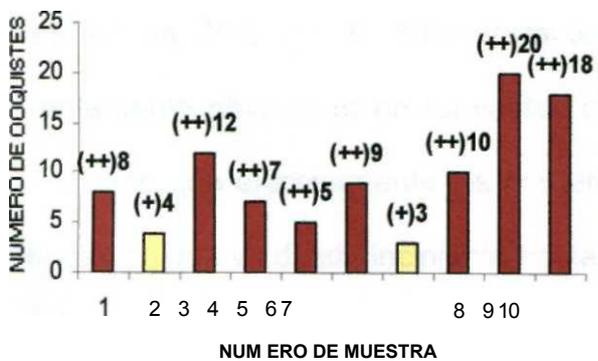


CORDEROS DE 0 A 15 DIAS DE NACIDOS



D

CORDEROS DE 16 A 30 DIAS DE NACIDOS



HEMBRAS DE +DE 1 MES DEPARTO

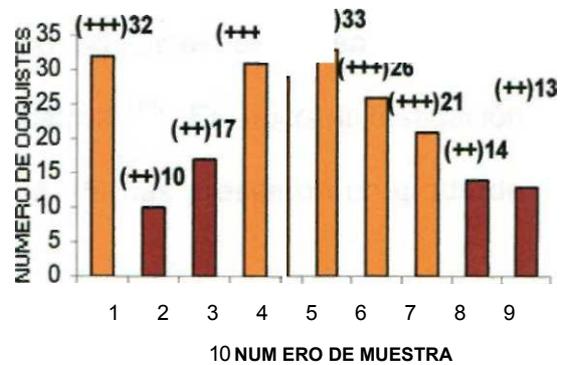


FIGURA 1.- Se observa la cantidad de muestras de cada grupo (A,B,C,D,E,F) y la intensidad de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium*. Donde □ muestra una intensidad incipiente; ■ una intensidad leve; ◻ una intensidad moderada y ▣ una intensidad severa.

9.- DISCUSIÓN:

En nuestra investigación encontramos que de el 100% de los ovinos muestreados excretaron de un 10 hasta un 90% de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., esto coincide con lo encontrado por Alonso-Fresan, M. V. et al., 2005, ellos encontraron prevalencias que van de 34.3%, y en rebaños de mas de 100 animales significativamente mas grandes como 40.6%. Ellos encontraron una correlación entre el tamaño del rebaño y la presencia de *Cryptosporidium* spp. Esto también coincide con lo encontrado por Majewska, A.W. et.al., 2000. Del total de muestras observadas se evidenció que solo un 18% contó con un grado de intensidad de eliminación a ooquistes de *Cryptosporidium* spp incipiente, el 54% mostró una intensidad leve, el 25% mostró una intensidad moderada, mientras que solo un 3% expresó una intensidad de eliminación severa. Semejantemente a los becerros, los borregos y cabritos son susceptibles a la infección de *C. parvum* en los días del nacimiento. En los cabritos neonatos no medicados en los primeros 4 a 7 días y hasta 11, la mortalidad va de 1 hasta 9%, con una profusa diseminación de ooquistes es asociada en cabritos con diarrea en un 70% de. El 30% restante disemino ooquistes sin diarrea. Esto fue frecuentemente observado en rumiantes como becerros⁽⁴⁰⁾. En nuestra investigación encontramos que efectivamente los corderos de 0 a 15 días presentaron un grado de diseminación que va desde incipiente hasta severo.

10.-CONCLUSIONES

Podemos concluir que los ovinos son más susceptibles a la infección de Criptosporidiosis.

Los jóvenes son más susceptibles a la Criptosporidiosis que los adultos.

La elevada mortalidad de los corderos probablemente se deba a una asociación Criptosporidium con otros factores como *E. coli*.

La elevada cantidad de ovinos por corral puede ser un factor desencadenante de la elevada presencia de Criptosporidium.

11.- RECOMENDACIONES

Evitar en lo posible el hacinamiento de los animales, ya que en estudios realizados por otros investigadores se hace referencia a la relación que existe entre el hacinamiento (>100 animales por corral) y la presencia de Cryptosporidiosis.

Proporcionar tratamiento medico a los animales enfermos de manera que se reduzca la mortalidad de animales enfermos.

Como es una enfermedad zoonotica, enfatizar en los trabajadores el uso de medios de protección adecuados para la posible infección con el parásito.

Realizar estudios subsecuentes para tratar de disminuir el problema que se tiene con el parásito, y así evitar asociaciones que puedan incrementar la mortalidad en el hato.

12. - LITERATURA CITADA

- 1) A. Sitja Bobadilla, F. Padro's, et al. (2005). "Epidemiology of *Cryptosporidium molnari* in Spanish Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) and European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) Cultures: from Hatchery to Market Size." American Society for Microbiolgy. **Vol. 71, No. 1**:p. 131-139
- 2) Andersom B. C. (1998). "Cryptosporidiosis in Bovine and Human Health." J Dairy Sci **81**: 3036-3041.
- 3) Agne's Delaunay, Gilés Gargala, et al. (2000). "Quantitative Flow Cytometric Evaluation of Maximal *Cryptosporidium parvum* Oocyst Infectivity in a Neonate Mouse Model." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **66**(10): 4315-4317.
- 4) Alan T. Bankier, Helen F. Spriggs, et al. (2003). "Integrated Mapping, Chromosomal Sequencing and Sequence Analysis of *Cryptosporidium parvum*." Genome Research **13**: 1787-1799.
- 5) Alien, P. C. and a. R. H. Fetterer (2002). "Recent Advances in Biology and Immunobiology of *Eimeria* Species and in Diagnosis and Control of Infection with These Coccidian Parasites of Poultry." CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS **15**: 58-65.
- 6) Arrowood, M. J. (2002). "In Vitro Cultivation of *Cryptosporidium* Species." CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS **15**: 390-400.
- 7) Byron L. Blagburn, K. L., T. M. L. Drain, et al. (1998). "Comparative Efficacy Evaluation of Dicationic Carbazole Compounds, Nitazoxanide, and Paromomycin against *Cryptosporidium parvum* Infections in a Neonatal Mouse Model " ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY **42**(11): 2877-2882
- 8) Cíancy, R. M. M. a. J. L. (2003). "Modifications to United States Environmental Protection Agency Methods 1622 and 1623 for Detection of *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts in Water " APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **69**:267-274.
- 9) Clarence E. Chrisp, Pat Manson, et al. (1995). "Comparison of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium wrairi* by Reactivity with Monoclonal Antibodies and Ability To Infect Severe Combined Immunodeficient Mice " INFECTION AND IMMUNITY **63**: 360-362.
- 10) Clark, D. P. (1999). "New Insights into Human Cryptosporidiosis." CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS **12**(4): 554-563.
- 11) Corine Ong, William Moorhead. et al. (1996). "Studies of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in Two Adjacent Watersheds." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **62**(8): 2798-2805.

- 12) Charles F. Brush, Michael F. Walter, et al. (1998). "Influence of Pretreatment and Experimental Conditions on Electrophoretic Mobility and Hydrophobicity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **64**(11): 4439-4445.
- 13) Cheryl M. Davies, C. K., Daniel Deere, and Nicholas .1. Ashbolt (2003). "Recovery and Enumeration of *Cryptosporidium parvum* from Animal Fecal Matrices " APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **69**(5): 2842-2847.
- 14) Chirstian P. Chauret, Chris Z. Radminski, et al. (2001). "Chlorine Dioxide Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts and Bacterial Spore Indicators." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **67**(7): 2993-3001.
- 15) Díaz de Ramírez, Adelina; Ramírez-Iglesia, et al. (2002). "EXCRECIÓN DE OOQUISTES DE *Cryptosporidium* spp. DURANTE EL POSTPARTO, EN VACAS MESTIZAS DE DOBLE PROPÓSITO." Revista Científica . Octubre. **12**: 614-616.
- 16) DIRK C. DE GRAAF, H. D. C, FRANZ PETR, ILKA B. EECKHOUT Y JOHAN E. PEETERS (2002). "Specific bovine antibody response against a new recombinant *Cryptosporidium parvum* antigen containing 4 zinc-fínger motifs." The Korean Journal of Parasitology **40**: 59-64.
- 17) Dirk C. de Graff, Hans de Coninck, et al. (2002). "Specific bovine antibody response against a new recombinant *Cryptosporidium parvum* antigen containing 4 zinc-fínger motifs." The Korean Journal of Parasitoloizy **40**: 59-64.
- 18) Donato Traversa, A. G., Umberto Molini, Raffaella Iorio, and D. O. Barbara Paoletti, and Carla Giansante (2004). "Genotyping of *Cryptosporidium* Isolates from *Chamelea gallina* Clams in Italy." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **70**(7): 4367-4370.
- 19) Edward R. Atwill Sergio Maldonado Camargo, et al. (2001). "Quantitative Shedding of Two Genotypes of *Cryptosporidium parvum* in California Ground Squirrels (*Spermophilus beecheyi*)." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **67**(6): 2840-2843.
- 20) Elaine Hunt, Martha U. Armstrong, et al. (2002). "Oral Bovine Serum Concéntrate Improves *Cryptosporidial* Enteritis in Calves." PEDIATRIC RESEARCH **Vol. 51, No. 3**: 370- 376.
- 21) G. J. Medema, F. M. Schets, et al. (1998). "Sedimentaron of Free and Attached *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts in Water" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **64**(11): 4460-4466
- 22) Gregory D. Sturbaum. Patricia T. Klonicki, et al. (2002). "Immunomagnetic Separation (IMS)-Fluorescent Antibody Detection and IMS-PCR Detection of Seeded *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Natural Waters and Their Limitations" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **68**(6): 2991-2996.

- 23) H.V. Smith, B. M. C, C. A. Patón, and R. A. B. Nichols (2002). "Significance of Enhanced Morphological Detection of *Cryptosporidium* sp. Oocysts in Water Concentrates Determined by Using 4D,6D-Diamidino-2-Phenylindole and Immunofluorescence Microscopy." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **68**(10): 5198-5201.
- 24) Harp. J. A. and a. J. P. Goff (1998). "Strategies for the Control of *Cryptosporidium parvum* Infection in Calves 1.2 " J Dairy Sci **81**: 289-294.
- 25) Holland, R. E. (1990). "Some Infectious Causes of Diarrhea in Young Farm Animals." CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS **3**(4): 345-375.
- 26) Isabel Villacorta. Johan E. Peeters, et al. (1991). "Efficacy of Halofuginone Lactate against *Cryptosporidium parvum* in Calves." ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY **35** (2): 283-287.
- 27) James C.Foster A, Matthew D.Glass a, et al. (2003). "Effect of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability." Food Microbiology **20**: 351-357.
- 28) Jianlin Jiang, Kerri A. Alderisio, et al. (2005). "Development of Procedures for Direct Extraction of *Cryptosporidium* DNA from Water Concentrates and for Relief of PCR Inhibitors." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **71**(3): 1135-1141.
- 29) Kuczynska, E. and A. D. R. Shelton (1999). "Method for Detection and Enumeration of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Feces, Manures, and Soils " APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **65**(7): 2820-2826
- 30) Lihua Xiao, Una M. Ryan, et al. (2004). "Genetic Diversity of *Cryptosporidium* spp. in Captive Reptiles." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. **70**(2): 891-899.
- 31) Lihua Xiao, R. F., Una Ryan, et al. (2004). "*Cryptosporidium* Taxonomy: **Recetit** Advances and Implications for Public Health " American Society for Microbiology. **17**: 72-97.
- 32) Michael W. Riggs, Deborah A. Schaefer, et al. (2002). "Efficacy of Monoclonal Antibodies against Defined Antigens for Passive Immunotherapy of Chronic Gastrointestinal *Cryptosporidiosis*" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY **46**: 275-282.
- 33) Morrissette, N. S. and a. L. D. Sibley (2002). "Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. " American Society for Microbiology. All Rights Reserved. Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites **66** 21-38.
- 34) N Pickerd, D. T. (2005). "Resolution of *cryptosporidiosis* with probiotic treatment." Postgrad Med J **80**: 112-113.

- 35) Nichols, P. R. H. a. G. (2002). "Epidemiology and Clinical Features of Cryptosporidium Infection in Immunocompromised Patients " American Society for Microbiology. **15**: 145-154
- 36) Pablo C. Okhuysen, G. Aaron Rogers, et al. (2004). "Antibody Response of Healthy Adults to Recombinant Thrombospondin-Related Adhesive Protein of Cryptosporidium 1 after Experimental Exposure to Cryptosporidium Oocysts " American Society for Microbiology **11**: 235-238.
- 37) Paul A. Rochelle, Donna M. Ferguson, et al. (1997). "An Assay Combining Cell Culture with Reverse Transcriptase PCR To Detect and Determine the Infectivity of Waterborne Cryptosporidium parvum." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **63**(5): 2029-2037.
- 38) Philippe Gobet. Jean Christophe Buison, et al. (1997). "Detection of Cryptosporidium parvum DNA in Formed Human Feces by a Sensitive PCR-Based Assay Including Uracil-N Glycosylase Inactivation." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. **35**: 254-256
- 39) R. B. Duncan, D. Caudell, et al. (1999). "Cryptosporidiosis in a Black Bear in Virginia." Journal of Wildlife Diseases" **35**: 381-383.
- 40) Roselyne Mancanssola, Jean-Michel Reperant, et al. (1995). "Chemoprophylaxis of Cryptosporidium parvum Infection with Paromomycin in Kids and Immunologkul Study." American Society for Microbiology **39**: 75-78.
- 41) Ryan C. Kuhn, Channah M. Rock, et al. (2002). "Occurrence of Cryptosporidium and Giardia in Wild Ducks along the Rio Grande River Valley in Southern New México " American Society for Microbiology" **68**: 161-165.
- 42) S. Tzipori, K. W. Aangus, et al. (1981). "Diarrhea Due to Cryptosporidium Infection in Artificially Reared Lambs." OURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY **14**(1): 100-105.
- 43) Shiang Yang, Mark C. Healey, et al. (1996). "Complete Development of Cryptosporidium parvum in Bovine Fallopian Tube Epithelial Cells." INFECTION AND IMMUNITY American Society for Microbiology **64**: 349-354.
- 44) Sonia A. Kjos, Mark Jenkins, et al. (2005). "Evaluation of Recombinant Oocyst Protein CP41 for Detection of Cryptosporidium-Specific Antibodies." CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY **12**: 268-272.
- 45) Sultán Tannverdi, Atila Tanyeli, et al. (2002). "Detection and Genotyping of Oocysts of Cryptosporidium parvum by Real-Time PCR and Melting Curve Analysis " JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY **40**(9): 3237-3244.
- 46) Tarek K. Zaalouk, M. B.-E., John T. George, and Vincent McDonald (2004). "Differential Regulation of D-Defensin Gene Expression during Cryptosporidium parvum Infection" INFECTION AND IMMUNITY **72**(5): 2772-2779.

- 47) Thaddeus K. Graczyk, R. F. Michael R. Cranfield, et al. (1996). "Viability and Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts Are Retained upon Intestinal Passage through a Refractory Avian Host" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **62**(9): 3234-3237.
- 48) Thaddeus K. Graczyk, Barbara H. Grimes, et al. (2003). "detection of *cryptosporidium parvum* and *giardia lamblia* carried by synanthropic flies by combined fluorescent in situ hybridization and a monoclonal antibody." the american society of tropical medicine and hygiene **68**: 228-232.
- 49) Thaddeus K. Graczyk, Ronald Fayer, et al. (2000). "Mechanical transport and transmission of *Cryptosporidium parvum* oocysts by wild filth flies." The American Society of Tropical Medicine and Hygiene **63**: 178-183
- 50) Tzipori, S. (1983). "Cryptosporidiosis in Animals and Humans." MICROBIOLOGICAL REVIEWS Vol. **47**(No. 1): p. 84-96.
- 51) Una M. Morgan, Anthony P. Sturdee, et al. (1999). "The *Cryptosporidium* "Mouse" Genotype Is Conserved across Geographic Areas." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY **37**(5): 1302-1305.
- 52) Vanee Dietz, Duc Vugia, et al. (2000). "ACTIVE, MULTISITE, LABORATORY-BASED SURVEILLANCE FOR *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* " Am. J. Trop. Med. Hyg The American Society of Tropical Medicine and Hygiene **62**(3): pp. 368-372.
- 53) W. R. Waters, B. Frydman, et al. (2000). ^M[IN,12N]Bis(Ethyl)-cis-6,7-Dehydrospermine: a New Drug for and Prevention of *Cryptosporidium parvum* Infection of Mice Deficient in T-Cell Receptor Alpha " ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY **44**(10): 2891-2894.
- 54) Wilson, R. J. M. and a. D. H. Williamson (1997). "Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa." MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS **61**(1): 1-16.
- 55) Yeuk-Mui Lee, Patrick W. Johnson, et al. (2001). "Development and application of a quantitative, specific assay for *cryptosporidium parvum* oocyst detection in high-turbidity environmental water samples." The American Society of Tropical Medicine and Hygiene **65**(1): 1-9.
- 56) Z. Bukhari, M. M. Marshall, et al. (2000). "Comparison of *Cryptosporidium parvum* Viability and Infectivity Assays following Ozone Treatment of Oocysts " APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **66**(7): 2972-2980.
- 57) Z. Bukhari, R. M. Mccuin, et al. (1998). "Immunomagnetic Separation of *Cryptosporidium parvum* from Source Water Samples of Various Turbidities." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **64**(11): 4495-4499.

- 58) Z. Bukharil, R. M. Mccuin, et al. (1998). "Immunomagnetic Separation of *Cryptosporidium parvum* from Source Water Samples of Various Turbidities." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **64**(11): 4495-4999.
- 59) Casemore, D. P., S. E. Wright. and R. L. Coop. 1997: Cryptosporidiosis human and animal epidemiology. In: Fayer, R. (ed.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. pp. 6-92. CRC Press, Boca Ratón, FL.
- 60) Olson, M. E., C. L. Thorlakson, L. Deselliers, D. W. Morck, and T. A. McAllister, 1997: *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. *Vet. Parasitol.* **68**, 375-381.
- 61) De Graaf, D. C, E. Vanopdenbosch. L. M. Ortega-Mora, H. Abbassi, and J. E. Peeters, 1999: A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int. J. Parasitol.* **29**,1269-1287.
- 62) Joachim. A.. 2004: Human cryptosporidiosis: an update with special emphasis on the situation in Europe. *J. Vet. Med. B* **51**, 251-259.
- 63) Fayer, R.. and B. L. P. Ungar. 1986. *Cryptosporidium* spp. And cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.* **50**:458-483.
- 64) Parisi, M. T. y P. M. Tierno. Jr. 1995. "Evaluation of new rapid commercial enzyme immunoassay for detection of *Cryptosporidium* oocysts in untreated stool specimens." *J Clin Microbiol.* **33**(7): 1963-5.
- 65) Quílez, C. J., A. C. Sánchez, M. E. Del Cacho y B. F. López. 1996. "Prevalence of *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragón." *Vet. Parasitol* **67**: 83-88.
- 66) Angus KW. 1998. Cryptosporidiosis in man, domestic animals and birds: a review. *J R Soc Med;* **76**:62-70.
- 67) Wee S., Joo h.y Kang Y. 1996. evaluation for detection of cryptosporidium oocysts in diarrheal feces of calves. *The Korean Journal Parasitology.* **34** (2). 121-126.