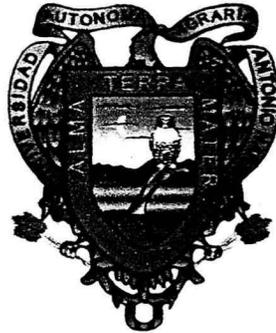


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**FRECUENCIA DE CRIPTOSPORIDIOSIS EN BECERRAS
HOLSTEIN LACTANTES CON DIARREA.**

POR:

LUCELLY MIJANGOS MATUS

T E S I S

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

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA

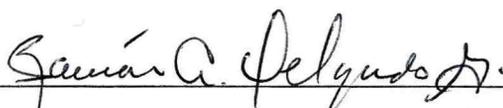
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

TESIS

FRECUENCIA DE CRIPTOSPORIDIOSIS EN BECERRAS HOLSTEIN
LACTANTES CON DIARREA.

APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR DE REVISIÓN

PRESIDENTE DEL JURADO


M.C. RAMÓN A. DELGADO GONZÁLEZ.

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL


M.C. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA.



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal
UAAAN - UL

FRECUENCIA DE CRIPTOSPORIDIOSIS EN BECERRAS HOLSTEIN
LACTANTES CON DIARREA.

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

TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESIDENTE:


M.C. RAMÓN A. DELGADO GONZÁLEZ.

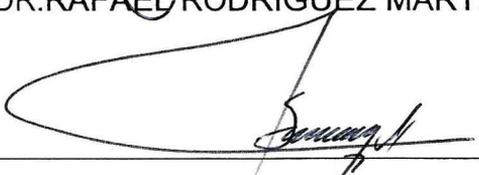
VOCAL:


M.C. JOSÉ LUIS CORONA MEDINA.

VOCAL:


DR. RAFAEL RODRÍGUEZ MARTÍNEZ.

VOCAL SUPLENTE:


M.V.Z. RODRIGO I. SIMÓN ALONSO.

DEDICATORIAS

A DIOS

A ti señor por darme la alegría de vivir e iluminar mi camino, brindarme salud y la fuerza necesaria para poder derribar todos los obstáculos, logrando así una de mis metas, hacer los momentos menos ásperos por eso te dedico cada uno de mis triunfos y derrotas, gracias por estar cuando más te necesito.

A MIS PADRES

Rosa Matus Soriano y Fausto A. Mijangos Reyes

Con amor, respeto y admiración, a ustedes como una humilde muestra de gratitud, por su comprensión y confianza que siempre me han brindado; ser mi fortaleza en los momentos más difíciles en este largo camino, a sus sabios consejos de luchar siempre por lo que en verdad se quiere, darme la oportunidad de ser alguien en la vida.

Para mi es la mejor herencia que me pudieron dar, mami, papi los amo, le pido a Dios que me los conserve con salud por mucho tiempo y agradecerle por haberme dado a los mejores padres del mundo.

A MIS HERMANOS

Nubia, Ericel y Fausto

Por su cariño y paciencia gracias por su gran apoyo e impulsarme a seguir adelante, por los momentos felices que pasamos juntos, los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

A mi Alma mater por cobijarme en su seno, alimentarme de sabiduría y brindarme un espacio, haberme formado como Médico Veterinario Zootecnista.

Al MC. Ramón A. Delgado González, con cariño y admiración, por brindarme la oportunidad para la realización de este trabajo; agradezco su valioso tiempo, sin usted no hubiera sido posible lograrlo.

Al MC. José Luis Corona Medina, al Dr. Rafael Rodríguez Martínez y al MVZ. Rodrigo I. Simón Alonso. Con Admiración y respeto, les agradezco infinitamente su paciencia, a sus acertadas correcciones en este trabajo, así como también por ser parte de mi formación como profesionista sin ustedes no hubiera sido posible culminar una de mis metas, sinceramente muchas gracias.

A mis compañeros y amigos. Por apoyarme y por pasar momentos de gran alegría y compartir nuestras penas durante este tiempo, esperando volverlos a ver algún día.

Resumen

Se determinó la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp en heces frescas de becerras Holstein lactantes con diarrea, en 20 establos lecheros de la Comarca Lagunera.

Se revisaron 1337 becerras de 1 a 20 días de edad, de las cuales 98 (7.3%) tuvieron diarrea. Se tomaron muestras de heces frescas del 100 % de éstas durante 9 meses. Se procesaron frotis y se utilizó la técnica de Ziehl Neelsen modificada para la observación de los ooquistes, y los resultados se analizaron mediante estadística descriptiva, encontrándose que 25 (25.5%) de las muestras fueron positivas a la presencia de ooquistes. De 21 becerras de 6 a 15 días de edad tuvieron presencia de ooquistes y la intensidad de excreción se manifestó en los grados 1 y 5. Los ooquistes de *Cryptosporidium* fueron encontrados en 11 (55 %) de los 20 hatos examinados y la prevalencia de infección estuvo en rangos desde 22.2 hasta 100.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
Dedicatorias-----	i
Agradecimientos-----	ii
Resumen-----	iii
1. Introducción-----	1
2. Antecedentes-----	1
2.1. Taxonomía-----	2
2.2. Etiología-----	3
2.3. Infectividad y viabilidad-----	3
2.4. Morfología-----	4
2.5. Ciclo biológico-----	4
2.6. Localización en el hospedador-----	6
2.7. Epidemiología-----	6
2.8. Transmisión-----	7
2.9. Factores predisponentes-----	8
2.10. Patogenia-----	8
2.11. Manifestaciones clínicas-----	10
2.12. Lesiones-----	10
2.13. Diagnóstico-----	11
2.14. Control y profilaxis-----	13
2.15. Tratamiento-----	14
2.16. Tratamiento de agua-----	16
2.17. Zoonosis-----	17
3. Justificación-----	18
4. Objetivo-----	18
4.1. Objetivo general-----	18
5. Marco de referencia-----	18
6. Material y métodos-----	19
7. Resultados-----	21
8. Discusión-----	24
9. Conclusión-----	26
10. Literatura citada-----	27

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS

	Página
Cuadro 1. Prevalencia de <i>Cryptosporidium</i> spp en becerras Holstein con diarrea en la Comarca Lagunera-----	22
Cuadro 2. Influencia de la edad en la ocurrencia de casos positivos a criptosporidiosis en becerras con diarrea, a partir de 20 establos en la Comarca Lagunera-----	23
Cuadro 3. Intensidad de excreción de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp -----	24

FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida del <i>Cryptosporidium</i> -----	5
Figura 2. Inmunofluorescencia de Anticuerpos (IFA) -----	12
Figura 3. Tinción de Ziehl-Neelsen -----	12
Figura 4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) -----	12

1. Introducción

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria de distribución cosmopolita cuyo principal signo clínico en los rumiantes domésticos neonatos es la diarrea causada por protozoarios incluidos en el género *Cryptosporidium*, que comprende microorganismos que se desarrollan y se multiplican en las células epiteliales de los aparatos digestivo y respiratorio de vertebrados (Ortega *et al.*, 1999).

En el ganado bovino, fueron reconocidas dos especies de este género: *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium andersoni*. La primera, coloniza el intestino delgado y constituye un importante agente del síndrome diarreico. En bovinos adultos también ha sido reportada esta especie, causando una enfermedad que generalmente cursa de forma subclínica y presenta bajos niveles de infección. La otra especie se desarrolla en el abomaso, es más común en bovinos adultos y aunque presenta amplia distribución, su prevalencia es baja. Aparentemente no causa enfermedad manifiesta, pero la producción de leche se ve significativamente reducida en las vacas afectadas (Fayer *et al.*, 2000; Lindsay *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2002).

En la Comarca Lagunera no hay estudios de investigación relacionada con criptosporidiosis en bovinos, sin embargo, la presencia de *Cryptosporidium* spp ya ha sido reportada en becerros de explotaciones ganaderas lecheras, en reportes de laboratorios de diagnóstico regionales. Existen datos referentes a la criptosporidiosis bovina en becerras lactantes y que estos animales pueden afectarse por contaminación ambiental, el objetivo de este trabajo será determinar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp en animales con diarrea.

2. Antecedentes

La criptosporidiosis es una enfermedad que inicialmente se describió en animales domésticos y principalmente en ganado vacuno. Fue Tyzzer en 1907 el primero en proponer el nombre del género *Cryptosporidium*, que es un pequeño coccidio de hábitat extracelular. Hasta 1975, los estudios sobre el parásito habían sido esporádicos y casi nunca asociados a efectos patógenos,

en medicina veterinaria, ha sido considerado como un patógeno más (Levine, 1984; Ortega *et al.*, 1999).

El primer caso de diarrea en humanos se describió en 1976, pero el panorama ha cambiado con la presencia cada vez más frecuente de enfermedades inmunodeficientes (Bustamante, 1999).

Desde 1970, la infección por la criptosporidia ha estado reconocida en todo el mundo como una causa de diarrea en los animales neonatos, particularmente los terneros. Existen pocos datos referentes a la criptosporidiosis bovina, sin embargo, desempeña un papel importante como fuente de infección así como en la contaminación ambiental (Bednarska *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 2002).

La infección por el criptosporidia se asociaba con enterocolitis en varios animales incluyendo a pavos, el zorro común europeo, pollos, cuyos, ovejas, monos, perros, gatos, vacas, caballos, cerdos, ciervos, cabras, ardillas grises y mapaches (Parisi *et al.*, 1995).

En Milwaukee, Estados Unidos ocurrió una gran epidemia producida por *C. parvum*. Un estimado de 403.000 personas sufrieron diarrea, debido a la ingesta de agua contaminada, por otra parte, la criptosporidiosis en humanos, es una de las causas más comunes de diarrea entre personas con SIDA en EUA (Sturbaum *et al.*, 2001).

La criptosporidiosis es más frecuente en animales inmunodeficientes y los animales neonatos tienen más susceptibilidad a la enfermedad, La morbilidad es alta y la mortalidad es baja pero en algunos casos, si se asocia con bacterias, virus u hongos la mortalidad puede ser alta. (Tzipori, 1985).

2.1 Taxonomía

Reino: Protista

Phylum: *Apicomplexa*

Clase: *Sporozoa*

Subclase: *Coccidia*

Orden: *Eucoccidiida*

Suborden: *Eimeriina*

Familia: *Cryptosporiidae*

Género: *Cryptosporidium*

Especie: *Cryptosporidium parvum*

(Dubey *et al.*, 1990).

2.2 Etiología

Se han reportado 13 especies de *Cryptosporidium* que se consideran válidos en base a las diferencias en morfología de ooquistes, sitio de infección, especificidad de la clase de vertebrados, y diferencias genéticas: de *C. muris* que infecta los roedores; de *C. andersoni* que infecta el ganado; de *C. parvum* que infecta ganado, humanos, y otros mamíferos; *C. hominis* que infecta a los humanos; *C. meleagridis*, *C. baileyi*, y *C. galli* a las aves; *C. serpentis* en las serpientes y lagartos; *C. saurophilum* en las serpientes y lagartos; *C. molnari* en peces; *C. wrairi* de los cobayos; *C. felis* en los gatos; y *C. canis* en los perros (Ryan *et al.*, 2003).

El *C. parvum* que afecta a humanos es denominado tipo I (*C. hominis*) mientras que el ganado bovino suele estar infectado con el genotipo II (Gatei *et al.*, 2003).

2.3 Infectividad y viabilidad

Los ooquistes persisten en el ambiente por largos períodos pero su viabilidad y capacidad infectiva decrecen con el tiempo. La infectividad se mide por la capacidad de los ooquistes para infectar *in vitro* líneas celulares epiteliales. Por inmunofluorescencia de anticuerpos se llega a detectar un sólo ooquiste infeccioso por muestra (García *et al.*, 2004).

2.4 Morfología

Cryptosporidium es un parásito pequeño, que mide aproximadamente 3-5 μm . El genoma de *Cryptosporidium* es pequeño comparado con el genoma de una coccidia; se compone de ocho cromosomas con una estimación de su tamaño total entre 9.6 (Piper *et al.*, 1998).

Los trofozoitos miden de 2 a 5 μm de diámetro se encuentran fijas a la membrana de la célula del hospedador y dentro del citoplasma celular, solo por biopsia se puede observar; Los esporozoitos tienen forma de media luna, son cuatro, cuando se presentan en el estadio de ooquistes, en materia fecal, tienen forma esférica u ovoide y llegan a medir de 4 a 6 micras de diámetro (De Haro *et al.*, 1995); (Tay, 1995)

2.5 Ciclo biológico

C. parvum tiene un ciclo de vida monoxeno complejo, es decir puede completar su ciclo en un solo hospedador. Transmitido como ooquiste muy viable en el excremento. La existencia del ooquiste ingerido, libera esporozoitos que infectan el epitelio intestinal del íleon. El desarrollo subsecuente incluye una reproducción asexual cíclica y una sexual, la producción de gametos que dan lugar a ooquistes además se excreta o re infecta el hospedador (Bankier *et al.*, 2003).

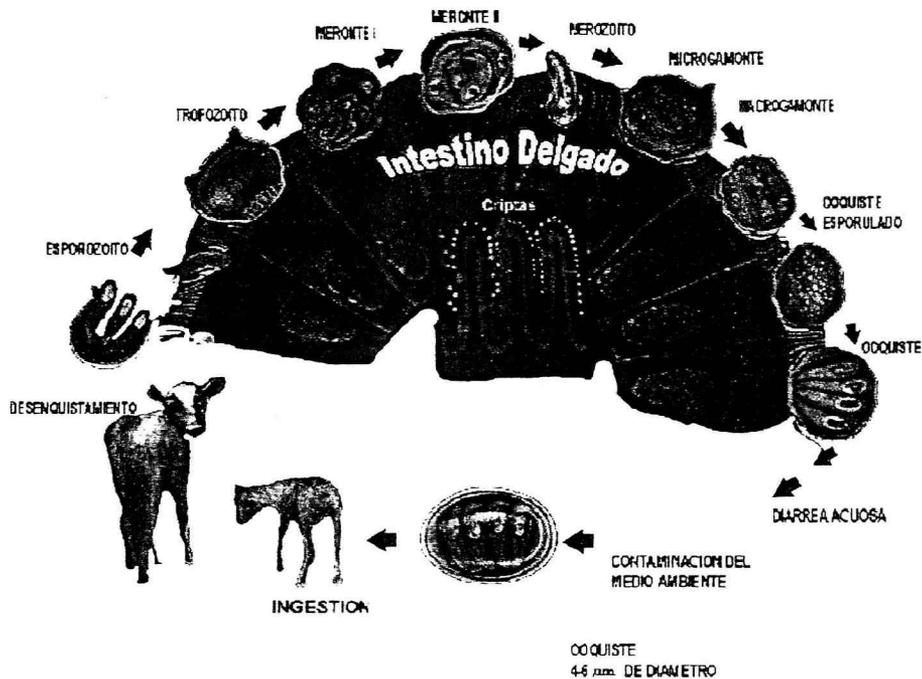


Figura 1. Ciclo de vida del *Cryptosporidium*. Tomado de:

http://www.lpsi.barc.usda.gov/awpl/images/crypto_lifecycle1.jpg

El desenquistamiento de un ooquiste entra en las microvellosidades de una célula epitelial dónde se diferencia en trofozoito. Los trofozoitos sufren proliferación nuclear para formar el meronte tipo I. Merozoito tipo I abandona al meronte para formar el meronte tipo I y tipo II (Fayer *et al.*, 1984).

El merozoito tipo II deja el meronte tipo II para formar microgamontes o macrogamontes. El microgamonte fecunda al macrogamonte (aquí ocurre la fase sexual) y se desarrolla en un ooquiste de pared gruesa que normalmente se excreta por el hospedador y los ooquistes de pared delgada están involucrados principalmente en la autoinfección. En la excreción de los ooquistes son los infectivos, mientras la transmisión fecal-oral es directa e inmediata (Fayer *et al.*, 1986).

2.6 Localización en el hospedador

El sitio primario de infección por *C. parvum* es el epitelio del intestino. aunque también pueden infectar las células epiteliales, incluso en sitios del estómago, vesícula biliar y en menor magnitud, el epitelio respiratorio, y renal de vertebrados (Graczyk *et al.*, 1999; Bankier *et al.*, 2003).

La susceptibilidad de microvellosidades de las células epiteliales son prominentes a la infección por este parásito se sugirió a investigar las células Epiteliales de las Trompas de Falopio del Bovino (BFTE) como las posibles células del hospedador. Las células de BFTE tienen microvellocidades largas y espesas en sus superficies y están estrechamente asociados con la mucosa uterina. Este descubrimiento del criptosporia fue comprendido y facilitó la habilidad y precisión del modelo completo del ciclo biológico de *C. parvum* en el cultivo de la célula (Yang *et al.*, 1996).

La infección es comúnmente reportada en becerros entre 1 y 3 semanas de edad. Los estudios llevados a cabo en diferentes grupos de investigación han revelado que el predominio de terneros con diarrea varía entre 14.4% y 63.6% y la prevalencia puede estar relacionada con la edad (Emre *et al.*, 1998)

2.7 Epidemiología

Entre las especies de animales domésticos, sin duda la más afectada por criptosporidiosis es la bovina, en especial las becerras de ganado lechero. *Cryptosporidium* ha sido manifestado en un 70 % de 1 a 3 semanas de edad con un período de incubación aproximadamente de 4 días. Los resultados de encuestas epidemiológicas son muy variables, pero por lo general indican una morbilidad alta (10 - 85%). El síndrome diarreico tiene una etiopatogenia oes baja, pero dependiendo de otros agentes oportunistas, el grado de inmunidad y el estado nutricional del hospedador, la mortalidad puede ser alta. Dentro de las edades más afectadas, conforme a la literatura es entre 4 y 30

días mientras, más malas sean las condiciones sanitarias del ambiente, principalmente en donde permanecen los becerros, mayor será el riesgo de contagio y presencia de la enfermedad (Ortolani *et al.*, 2003).

En ovejas y cabras jóvenes el *C. parvum* también es un patógeno entérico frecuente, el patrón de edad de la infección y la excreción de microorganismos es similar a las terneras, con tasas de mortalidad elevada en corderos de 4 a 10 días de nacidos. En cerdos tiene un rango de edad más amplio que en rumiantes, en cerdos se observa entre la primer semana de vida, la mayor parte de las infecciones son asintomáticas y el microorganismo no parece ser un patógeno importante para esta especie, aunque puede contribuir a la diarrea posdestete por mala absorción (Radostits *et al.* 1999).

Se ha estimado que más del 90% de hatos lecheros en los Estados Unidos son infectados por *C. parvum* y en dos partes diferentes de Europa (Polonia y Portugal), aproximadamente 40% de terneros con diarrea se encontró como causante de infección. Debido a su amplia distribución y la cantidad de hospedadores, la criptosporidiosis se ha seguido estudiando ya que afecta tanto a diversos animales como al hombre (Bednarska *et al.*, 1998).

2.8 Transmisión

Los brotes en Estados Unidos han ocurrido en la comunidad Waterparks, en piscinas y centros recreativos, la transmisión puede ser zoonótica y antropozoonótica de *C. parvum* y la transmisión antropozoonótica de *C. hominis* ocurren a través de la exposición de animales infectados o exposición de agua contaminada con heces de animales infectados (Current *et al.*, 1991).

En los humanos, estos organismos pueden causar diarrea persistente de 1 a 3 semanas. Una forma más común de transmisión de infección se adquiere por vía oral y es de origen fecal. Puede proceder de personas infectadas que contaminan a través de sus manos, contaminación al cosechar hortalizas, y

estas no sean desinfectadas de manera adecuada y sean consumidas, la ingesta de agua contaminada etc. La infección también puede transmitirse por materia fecal de animales que sufren la parasitosis los ooquistes son resistentes al medio ambiente y pueden permanecer infestantes durante 2 a 3 meses o mucho más tiempo bajo condiciones favorables (Ryan *et al.*, 2003).

El parásito se transmite por vía fecal-oral y la infección puede adquirirse de diversas formas:

- a) Por medio de agua contaminada (la fuente principal de brotes registrados)
- b) De los animales, particularmente los corderos y terneros, a través del contacto con su excremento infectado.
- c) Contacto directo entre personas
- d) Por comidas crudas o contaminadas, por ejemplo la carne cruda, leche no pasteurizada, frutas y verduras (Juránek, 1995).

2.9 Factores predisponentes

Los factores que hacen que los animales sean susceptibles a la infección no han sido aclarados de manera convincente. Las infecciones intercurrentes por otros patógenos especialmente rotavirus y coronavirus así como los animales inmunodeprimidos, la estación del año, sugiere la existencia de contaminación no obstante, la enfermedad clínica puede presentarse en cualquier estación del año, la relación con la edad, las implicaciones zoonóticas son también de gran interés (Blood, 2000).

Se ha demostrado en terneros que no reciben calostro tienen más probabilidad de infectarse por *Cryptosporidium*, que terneros que si lo han adquirido. por eso se debe cerciorar que el suministro de calostro sea el adecuado tanto en calidad como la cantidad así los becerros adquieran la inmunidad necesaria para poder sobrevivir (Harp *et al.*, 1995).

2.10 Patogenia

La infección se caracteriza por diarrea acuosa. Su mecanismo de *C. Parvum* no se ha definido la causa de diarrea. Algunos estudios sugirieron que la

enfermedad esta mediada por una enterotoxina, pero se ha sugerido que la principal causa de ella, sería la mala absorción de nutrientes, que se daba por la alteración de las vellosidades. Circunstancialmente, esta mala absorción llevaría a un sobre crecimiento bacteriano que complicaría esta condición (Robinson *et al.*, 2001).

El *Cryptosporidium* se encuentra a lo largo de todo el tracto digestivo, desde la faringe hasta el recto, siendo el yeyuno el sitio de mayor predilección. Además, se ha descrito en vesícula biliar, vía pancreática y aparato respiratorio. Los hallazgos histológicos son inespecíficos, observándose en el intestino distintos grados de alteración con atrofia de vellosidades que va de leve a severa, y aumento de las criptas (Xiao *et al.*, 1994; Graczyk *et al.*, 1999; Bankier *et al.*, 2003).

Se dice que un solo rumiante neonato puede eliminar hasta 1010 ooquistes durante el curso de la infección (Gómez *et al.*, 2000).

La infección ocurre después de la ingestión del ooquiste infestante, el esporozoito del parásito se libera para penetrar células epiteliales del intestino delgado. Aquí el parásito prolifera, mientras a menudo produce diarrea. La invasión del esporozoito en la célula del hospedador se le considera un evento dinámico de colosal interés donde involucran procesos de secreción secuencial de los volúmenes de esporozoitos dentro de compartimientos discretos. Los materiales liberados se pensaba que participaba de diversas maneras, incluso el evento de penetración y la formación de la vacuola que inicialmente rodea la membrana del parásito intracelular (Tetley *et al.*, 1998).

El parásito completa sus fases asexuales y sexuales de su ciclo de vida. Durante el proceso de invasión establece un único compartimiento intracelular del hospedador en el que se divide. Desde que es separado del hospedador de el citoplasma apical de la célula y protuberancias en el lumen

del intestino. Inicialmente, las microvellosidades que normalmente cubren la célula del epitelio intestinal están ausentes en el área de invasión del parásito. Posteriormente, las células del epitelio normalmente son columnares a menudo son acortadas significativamente después de la invasión por el parásito (Elliott *et al.*, 2000).

2.11 Manifestaciones clínicas

La infección puede ser asintomática o puede producir diarrea a veces acompañada de vómito, dolores espasmódicos en el abdomen, y fiebre en los hospedadores aparentemente sanos (Okhuysen *et al.*, 2004).

La enfermedad es caracterizada clínicamente por diarrea profusa y acuosa, a veces mucosa teñida con sangre, deshidratación, emaciación, anorexia, tenesmo. La enfermedad es más severa y letal cuando se complica con otros enteropatógenos como *E. coli*, *Salmonella*, *Rotavirus*, infecciones de *Coronavirus*, en los hospedadores inmunosuprimidos (Arslan *et al.*, 2001).

En Terneros de una a cuatro semanas de edad; presentan debilidad, letárgia, heces acuosas la intensidad puede ser de severa a moderada. El excremento puede contener leche no digerida, o bilis (Harp *et al.*, 1995).

La diarrea, dolores espasmódicos abdominales, vómito, aunado con la fiebre y dolor de cabeza se presenta en la criptosporidiosis de humanos. Aunque el parásito normalmente se enquista en el intestino después de 1-2 semanas, la infección persiste en pacientes inmunodeficientes, con riesgo de muerte (Bankier *et al.*, 2003).

2.12 Lesiones

La infección por *C. parvum* en el epitelio intestinal puede producir vellosidades romas, hiperplasia de la cripta, destrucción del citoesqueleto y disminución de la absorción de sodio (McCole *et al.*, 2000).

El abomaso con frecuencia contiene leche sin digerir formando coágulos, y el intestino delgado presenta enteritis congestiva, la mucosa hiperemica, pero no hemorrágica. El contenido intestinal en ocasiones es amarillento y acuoso y puede existir acumulo de gas en ciego y colón (Ortega *et al.*, 1999)

2.13 Diagnóstico

La criptosporidiosis no puede ser diagnosticada solo por los signos, ya que la diarrea puede ser un signo de muchas enfermedades intestinales causadas por bacterias, virus o parásitos. Si se sospecha de *Cryptosporidium* se requerirá de pruebas específicas de diagnóstico. Esta afección se diagnostica por hallazgo de ooquistes en materia fecal o en contenido del duodeno por la cuerda de Beal esto se realiza en humanos. En las preparaciones con solución salina y lugol, se pueden observar unas estructuras redondas u ovoides de pared definida que parecen huecos vacíos, de tamaño uniforme, refringentes. que algunas veces contienen estructuras granulares, que no son fáciles de identificar (Avery *et al.*, 1996).

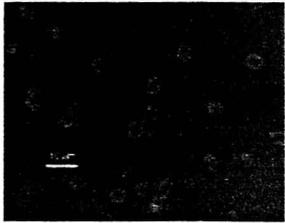
La técnica más precisa es la coloración por el método Ziehl-Neelsen modificado se considera la mejor tinción para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* en heces sin usar el calentamiento de placa. Se observan los ooquistes ácido-resistentes, de color rojo brillante sobre fondo azul como se muestra en la figura 3. En algunos se ven corpúsculos internos que corresponden a los esporozoitos. También se puede usar tinción Giemsa (Parisi *et al.*, 1995).

Los ooquistes de *Cryptosporidium* son difíciles de ver en los frotis de materia fecal porque son incoloros transparentes y pequeños. Para concentrar ooquistes del parásito, se realizan las técnicas de Ritchie modificada, que usa formol-éter y la de Sheather que es un método de flotación con azúcar. Es necesario tener precaución en la manipulación de muestras de pacientes con

SIDA. La identificación de los ooquistes también se hace con inmunofluorescencia directa (Bowman *et al.*, 2004).

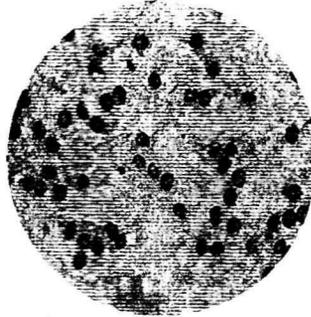
La técnica de flotación es el método más fácil de observar los ooquistes. Estos aparecen como organismos de color rosa, esféricos y débiles. (La concentración de Sheather). Una variedad de pruebas como inmunoensayo de inmunofluorescencia ligado a enzimas (ELISA) y anticuerpos de inmunofluorescencia (IFA) (los dos son métodos indirectos) pueden descubrir un criptosporidia, aunque ellos no son particularmente específicos cuando exige distinguir entre *C. parvum* y otras especies de *Cryptosporidium*, la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las pocas maneras de distinguir con precisión el *C. parvum* como se muestra en la figura 4 (Khan *et al.*, 1997).

Figura 2. Inmunofluorescencia de Anticuerpos (IFA)



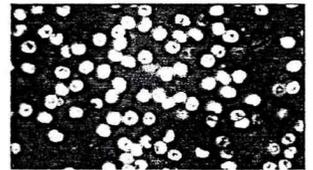
Tomada de:
de:<http://www.yale.edu/env/cryptosporidium.jpg>

Figura 3. Tinción de Ziehl-Neelsen.



Tomada de:
de:<http://www.yale.edu/env/cryptosporidium.jpg>

Figura 4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)



Tomada de Ryan, 2004

Los IFA no puede diferenciar especies de *Cryptosporidium* en los humanos y de varios animales vertebrados. PCR tiene algunas ventajas sobre inmunofluorescencia microscópica (IMS) en la sensibilidad de detección y la habilidad de diferenciar especies de *Cryptosporidium* o genotipos. Sin embargo, PCR es susceptible 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 protozoario, el método que normalmente se usa es la purificación del ooquistes previo a inmunofluorescencia microscópica (IMS) en la extracción de ADN (Jiang *et al.* 2005)

Se han comparado los tres métodos diagnósticos más utilizados: visualización de los ooquistes con Ziehl-Neelsen o con inmunofluorescencia y la identificación de antígenos por ELISA en materia fecal, y se ha encontrado que todos tienen sensibilidad y especificidad de 96 a 98%, de acuerdo a las posibilidades de los laboratorios y de los costos de los reactivos. (Quílez *et al.* 1996).

2.14 Control y profilaxis

Todas las infecciones por criptosporidiosis se deben a la ingestión e inhalación de ooquistes. Por consiguiente, las medidas de prevención deben ser restringidas y evitar el contacto directo entre el agente causal y el organismo. Las temperaturas bajas no son adecuadas para asegurar la eliminación del ooquistes. Aunque no se garantiza que el agua embotellada comercial este libre de ooquistes (Graczyk *et al.* 1996).

Se ha estado llevado a cabo con gran éxito en el desarrollo de una vacuna pasiva contra criptosporidiosis en rumiantes. De tal forma que se asemeje a una vacuna pasiva a los recién nacidos para la protección contra la infección a través del calostro (De Graaf *et al.* 2002).

El suministro de calostro al neonato ayuda a prevenir brotes de *Cryptosporidium* y disminuir la mortalidad y morbilidad en los hatos infectados. Para la destrucción de ooquistes en los corrales usados para el parto se les debe aplicar calor húmedo y/o los desinfectantes químicos, el uso de paja limpia y abundante (De Graaf *et al.* 1999).

Aunque el organismo es muy resistente, se deben separar los terneros a un área limpia y lejos de los terneros afectados así puede prevenir que se disemine la enfermedad en toda la granja. Las prácticas sanitarias también son un método de control primario que rinde altos resultados. Algunas vacunas han demostrado clínicamente resultados significativos, no sólo previniendo la enfermedad clínica pero reduciendo la contaminación medioambiental con el organismo. (Harp *et al.*, 1995).

El Halocur (lactato de halofuginona) este producto está probado como auxiliar en la prevención de criptosporidiosis en Europa y no esta disponible en Canadá y EU. El producto es administrado una vez al día durante los primeros 7 días de vida en dosis recomendada en la etiqueta del producto y no repercute en la ingesta de comida ni en la conversión alimenticia, y dio por resultado en el retraso significativo en el inicio de eliminación de ooquistes y la infestación por *Cryptosporidium* se redujo en becerras que fueron medicadas durante la primera semana de vida (Trotz-Williams *et al.*, 2005).

2.15 Tratamiento

No hay ningún tratamiento efectivo o aceptado para criptosporidiosis. Sin embargo, los terneros necesitan cuidados intensivos y los que estén enfermos deben alojarse en un ambiente seco y limpio. Necesitan una terapia de fluidos para neutralizar y prevenir la deshidratación extensa así como los electrólitos para reemplazar esas pérdidas causadas por diarrea. También necesitan aporte de nutrientes para darles energía y combatir la enfermedad, restablecer su condición corporal (Moore *et al.*, 2003).

Los probióticos son microorganismos viables no patógenos que cuando son ingeridos tienen efectos benéficos en la prevención y tratamiento de condiciones patológicas. En general los mecanismos de acción que se han prescrito a los probióticos incluyen la competencia por los sitios de recepción en la superficie intestinal, estimulando al sistema inmunológico, la excreción de

substancias antimicrobianas, y competencia con patógenos por los nutrientes intraluminal (Duggan *et al.*, 2002).

Lactobacillus y *Bifidobacteria* son las Bacterias Ácidas Lácticas (LAB), normalmente se encuentran en productos lácteos. Además, numerosos estudios *in vitro* en los humanos y animales han ilustrado claramente el potencial preventivo o terapéutico de (LAB) pueden poseer ciertas propiedades terapéuticas potenciales contra el *C. parvum* (Foster *et al.*, 2003).

El tratamiento con decoquinato-basado a razón de 2.5 mg/Kg./día (es decir 50 g del Deccox 6 premix por Kg. de leche) que se administre a los animales enfermos disminuye la diarrea en un lapso de tres días y pueden recuperarse en una semana. El tratamiento en algún tiempo fue reiterado con éxito, mientras siempre se apreció un retroceso de los signos y mejora en el crecimiento en los casos cuando el tratamiento se continuaba por un tiempo más largo (4 a 5 semanas) pero a una proporción activa de 0.5 mg/Kg de peso corporal). El decoquinato también es aceptado en EU como el aditivo de alimento, como coccidiostato para la prevención de coccidiosis en pollos de engorda (20-40 ppm) (Navetat *et al.*, 2003).

El problema grave de la diarrea se presenta en humanos inmunodeprimidos, principalmente en pacientes con SIDA, en los cuales se han ensayado aproximadamente 100 fármacos diferentes y no se ha encontrado alguno realmente efectivo. Un fármaco que ha demostrado mejoría clínica y parasitológica, es la paromomicina, aminoglucósidos que se absorben poco en el intestino, y se administra en dosis de 25-35 mg/Kg/día por 14 días. Aún continúa en experimento, con resultados clínicos alentadores, el calostro bovino hiperinmune. El tratamiento no específico depende del uso de antidiarreicos (loperamida, difenoxilato, etc.), manejo nutricional y reemplazo de líquidos (Sánchez *et al.*, 2005).

Aunque ningún antibiótico ha sido eficaz en el uso clínico, se sugirió que la paromomicina cuando se usa en 4 dosis de 1.5 -2.0g/día se logra una mejora de síntomas, y erradicación igual del parásito. Sin embargo, dosis exigidas para producir este efecto en todos los pacientes se acercarían a la toxicidad. Aunque Azitromicina y Lactobin-R (concentrado de inmunoglobulinas de calostro de bovinos) tuvo algún éxito experimental, ningún agente terapéutico se ha identificado claramente como eficaz (Fayer *et al.*, 2000).

2.16 Tratamiento de agua

El ozono es un oxidante muy importante que puede producirse industrialmente de forma económica, desinfectante potente que destruye a los protozoarios si se usa en dosis suficiente por un tiempo de contacto adecuado, pero el ozono no deja residuos para matar microorganismos en el sistema de distribución, tal como lo hace el cloro. Los altos costos de nuevos filtros o plantas para tratamiento con ozono deben ser comparados con los beneficios de tratamientos adicionales (Avery *et al.*, 1996).

El ozono como desinfectante tiene mayor potencial de oxidación de todos los empleados para el agua, en medio acuoso produce unos radicales libres que alteran la permeabilidad de la pared del ooquiste y después a su ADN. También tiene inconvenientes: la cantidad de ozono necesario para matar los ooquistes es superior a la necesaria para eliminar los contaminantes bacterianos del agua y su efectividad depende de la temperatura, tiempo de contacto, pH. Además, en presencia de bromuros, el ozono forma bromatos que son cancerígenos. En aguas embotelladas la cantidad de ozono se limita a 0.4 mg/L de agua en el producto final, que no asegura la eliminación total de los ooquistes (Mac Kenzie *et al.*, 1994).

La desinfección con cloro ha sido una barrera importante en la prevención de enfermedades por agua contaminada, pero *C. parvum* es muy resistente al

cloro y otros desinfectantes usados en el tratamiento de agua para consumo. La preocupación sobre la eficacia de cloro contra algún patógeno resistente como *Cryptosporidium*, así como su seguridad, y la salud, potencialmente ha llevado a la consideración de desinfectantes alternativos y estrategias de la desinfección, como el tratamiento secuencial con dos o más desinfectantes (Venczel *et al.*, 1997).

Los ooquistes normalmente resisten al cloro en concentraciones usadas para tratamiento de agua para beber (las concentraciones residuales típicas van de 0.5 a 2 mg/L) (Rochelle *et al.*, 1997).

Los ooquistes del *Cryptosporidium* tienen paredes gruesas que pueden soportar ambientes hostiles que los hacen resistentes a los desinfectantes químicos tales como el cloro, que es usado en forma tradicional en los sistemas de agua potable municipal y en las piscinas (Avery *et al.*, 1996)

2.17 Zoonosis

Las infecciones en los animales domésticos y de compañía pueden constituir un reservorio para la infección de personas susceptibles. Esto ocurre especialmente en pacientes con SIDA. La infección se transmite por contacto directo, también se transmite por agua contaminada por heces de animales salvajes y domésticos (Radostits *et al.*, 1999).

Sugiere que la infección a través de la comida contaminada es un riesgo para los humanos. Se han identificado en el ganado tanto en productos y subproductos, tales como leche cruda y productos carnicos, como las fuentes potenciales de infección. El agua contaminada también es un riesgo a la industria de comida, desde que se usa para productos crudos incluso los productos limpios. (Laberge *et al.*, 1996).

Se transmite por la vía fecal-oral y es a menudo por agua contaminada, con tan sólo una dosis de *C. parvum* puede infectar a los humanos y representa una amenaza en salud pública y 4 de estos parásitos son zoonóticos y antropozoonóticos contribuye significativamente a la mortalidad de personas inmunodeficientes (Graczyk *et al.*, 1999).

3. Justificación

Existen datos referentes a la criptosporidiosis bovina en la Comarca Lagunera y que causa grandes pérdidas económicas por las diarreas que produce, en el presente estudio se pretende observar la frecuencia de *C. spp* en animales neonatos, con diarrea.

4. Objetivo

4.1 Objetivo general

Identificar la frecuencia de la criptosporidiosis involucrada en las terneras lactantes, en la Comarca Lagunera, utilizando la tinción de Ziehl Nelsen, modificada.

5. Marco de referencia.

La región Lagunera, se localiza en la parte central de la porción norte de los Estados Unidos Mexicanos. Se encuentra ubicada entre meridianos 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 1, 139 metros. Cuenta con una extensión montañosa y una superficie plana donde se localizan las áreas agrícolas, así como áreas urbanas.

La topografía de la Región Lagunera en términos generales es plana y de pendientes suaves, que varían de 0.20 a 1.0 metros por kilómetro, generalmente hacia el norte y noroeste.

La Comarca está conformada por parte de los estados de Coahuila y Durango y debe su nombre a los cuerpos de agua que se formaban alimentados por dos

ríos: el Nazas y el Aguanaval, hasta antes de la construcción de las presas Lázaro Cárdenas y Francisco Zarco, que en la actualidad regulan su afluente. La Laguna, como comúnmente es conocida ésta próspera región, está integrada por 16 municipios, 11 del estado de Durango y 5 del estado de Coahuila. (SAGARPA, 1998).

Este proyecto se llevo acabo en establos ubicados en esta región comprendido Lerdo, Gómez Palacio, (municipios de Durango), Matamoros, Torreón, Fco. I. Madero, Viesca (Municipios de Coahuila).

6. Material y métodos

Fase de campo. El trabajo de campo se realizó en 20 establos lecheros de la Comarca Lagunera, los cuales en su momento contaban con una población de 1337 becerras. Se tomaron muestras de heces de 98 terneras lactantes de 1 a 40 días de edad, con signos clínicos de diarrea y se distribuyeron en ocho grupos de acuerdo con la siguiente escala de edades. 1 a 5, 6 a 10, 11 a 15, 16 a 20, 21 a 25, 26 a 30, 31 a 35 y 36 a 40 días. Se utilizaron hisopos estériles para la toma de muestras de heces diarreicas de la región anal del 100 % y se transportaron en refrigeración al lugar de trabajo.

Fase de laboratorio. La fase de laboratorio se realizó en el laboratorio de parasitología de la Unidad de Diagnóstico del Departamento de Ciencias Médico Veterinarias de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna.

Preparación de reactivos para la tinción de Ziehl Neelsen. Se preparó el carbol fucsina utilizando 10 g de Fucsina básica, (Hycel) que se diluyeron en 1 L de agua destilada, (Analytyca) 100 mL de alcohol absoluto (Analytica) y 50 mL de cristales de fenol (Merck). Para la solución madre de azul de metileno se utilizaron 1.4 g de de colorante azul de metileno (Goleen bell) y se diluyeron en 100 mL de alcohol de 96%. Para la solución de trabajo se diluyó la solución

madre en 90 mL de agua destilada. El alcohol ácido se preparó al 1 % en alcohol al 70 %.

Procedimiento de la tinción. Se realizaron frotis de heces diarreicas en portaobjetos, se secaron al aire y se tiñeron con la técnica de Ziehl Neelsen modificada. Se sumergieron en Carbol fucsina por 30 minutos, posteriormente se sumergieron en agua corriente de la llave por 5 a 10 minutos, luego en alcohol ácido hasta que se decolorara para obtener una tinción de color rosa, se continuó con agua corriente de la llave por 5 minutos para quitar los residuos del alcohol ácido, se utilizó azul de metileno por 2 minutos con la finalidad de hacer contraste en la tinción y agua corriente de la llave para eliminar los excesos del azul de metileno (Morgan, 1998). A esta técnica se le modificó sumergiendo en alcohol del 96° y alcohol absoluto, durante 5 minutos cada uno, con la finalidad de deshidratar la muestra para cubrirla con resina sintética, diluida con xilol y con cubreobjetos.

Interpretación. Se realizó una observación bajo el microscopio de luz fotónico con el objetivo 40X observando los ooquistes de color rojo brillante sobre un fondo azul como se observa en la figura 3, se contabilizaron en 25 campos ópticos y fueron observados como mínimo 50 campos antes de considerar un caso negativo. Se realizó una evaluación semi - cuantitativa de los ooquistes como se muestra en la figura 3.

Análisis estadístico. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó la prueba de ji cuadrada (X^2) para comparar la distribución de la enfermedad entre rangos de edades de los animales positivos y negativos a la presencia de *Cryptosporidium* spp. La prevalencia de criptosporidiosis fue calculada por la fórmula (OMS CEPIS, 2001)

$$P = \frac{\text{Número de casos}}{\text{Individuos totales}} \times 100$$

7. Resultados

Del examen de 1337 becerras en 20 hatos, se encontró que 98 (7.3%) de las mismas presentaron heces diarreicas. Se verificó (Cuadro 2) que becerras agrupadas en escala de edades de 6 a 15 días evidenciaron mayores frecuencias con criptosporidiosis.

De acuerdo al número de becerras con diarrea, 25 (25.51%) resultaron positivas a *Cryptosporidium* spp y del total de becerras en los hatos fue de 1.86% (Cuadro 1).

La intensidad de la excreción de ooquistes en las heces fue muy manifiesta en el grado 1 (+) y el 5 (+++++). Los ooquistes de *Cryptosporidium* fueron encontrados en 11 (55 %) de 20 hatos examinados. La prevalencia de infección estuvo en rangos desde 22.2 hasta 100.

Cuadro 1. Prevalencia de *Cryptosporidium* spp en becerras Holstein con diarrea en la Comarca Lagunera.

Establo	N	n / %	+	% pm	% PPT
1	40	4 (10.0%)	4	100.0	10.0
2	30	7 (23.3)	4	57.1	13.3
3	1000	2 (0.2)	2	100.0	0.2
4	35	3 (8.6)	2	66.7	5.7
5	75	9 (12.0)	2	22.2	2.7
6	80	4 (5.0)	1	25.0	1.3
7	50	7 (14.0)	4	57.1	8.0
8	27	5 (18.5)	0	0.0	0.0
9	85	8 (9.4)	0	0.0	0.0
10	60	2 (3.3)	0	0.0	0.0
11	30	6 (20.0)	0	0.0	0.0
12	280	8 (2.8)	0	0.0	0.0
13	90	7 (7.7)	0	0.0	0.0
14	180	4 (2.2)	2	50.0	1.1
15	210	7 (3.3)	0	0.0	0.0
16	40	3 (7.5)	1	33.3	2.5
17	50	4 (8.0)	2	50.0	4.0
18	60	1 (1.6)	0	0.0	0.0
19	70	6 (8.5)	0	0.0	0.0
20	25	1 (4.0)	1	100.0	4.0
Total	1337	98 (7.3)	25	25.51	1.86

N = Número total de becerras en el hato.

n / % = Porcentaje de becerras muestreadas con diarrea.

+ = Positivo a *Cryptosporidium* spp.

% pm = Porcentaje de positivos en relación a las muestras.

% PPT = Porcentaje de positivos en relación a la población total.

Cuadro 2. Influencia de la edad en la ocurrencia de casos positivos a criptosporidiosis en becerras con diarrea, a partir de 20 establos en la Comarca Lagunera.

Becerras Positivas			Becerras negativas				Total Becerras + y -
Edad (días)	N°de Becerras (+)	%n	n= 98	N°de Becerras (-)	%n	n= 98	
0-5	2	66.6 ^a	2.0	1	33.3	1.0	3
6-10	10	58.8 ^b	10.2	7	41.1	7.1	17
11-15	9	42.8 ^a	9.1	12	57.1	12.2	21
16-20	3	15.7 ^c	3.0	16	84.2	16.3	19
36-40	1	14.2 ^a	1.0	6	85.7	6.1	7
Total	25	37.3	25.5	42	62.6	42.8	67

Literales diferentes indican diferencia estadística ($P < 0.05$).

$$\chi^2 = 8.1$$

No se registraron casos positivos en las edades 21-25 días, 26-30 y 31-35 días (n = 31).

Cuadro 3. Intensidad de excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

No. becerras con diarrea	Becerras con ooquistes	Intensidad de excreción				
		+	++	+++	++++	+++++
98	25 (25.51%)	10	0	2	2	11

+ de 1 a 10 Ooquistes

++ de 11 a 20 Ooquistes

+++ de 21 a 40 Ooquistes

++++ 41 a 80 Ooquistes

+++++ más de 80 Ooquistes

8. Discusión.

En el presente estudio se realizó la detección de *Cryptosporidium* spp utilizando la técnica de Ziehl Neelsen modificada (ZNm), 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. Pocos son los trabajos nacionales que describen la frecuencia de criptosporidiosis en animales y no se encontró sobre becerras recién nacidas.

Nosotros utilizamos la tinción de ZNm porque fue la forma más económica y rápida para la detección de los ooquistes de *C. spp*, de acuerdo a (Kehl *et al.*, 1995) y (Rodriguez-Hernandez *et al.*, 1994) el análisis microscópico de frotis fecales teñidos es el método más utilizado para el muestreo tamiz de heces para diagnóstico de *Cryptosporidium* en laboratorios de diagnóstico clínico. Además otras investigaciones han demostrado que los métodos de detección basados inmunologicamente, no son significativamente mas sensibles que la microscopía convencional.

Sin embargo, existen otros estudios que muestran pruebas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ya que estudios recientes demuestran una sensibilidad de 83.7 % y una especificidad de 98.9% para la microscopía

comparado con un 100% de sensibilidad y especificidad para la PCR (Morgan *et al.*, 1998).

La ocurrencia de diarrea causada por *Cryptosporidium* spp en la 1ª y 2ª semanas de edad lo encontramos en este rango en nuestro trabajo. Las criptosporidias casi siempre pueden ser encontradas en becerras con diarrea pero lo común es que se encuentren otros patógenos entéricos serios conocidos (Anderson, 1998).

La constatación, en este trabajo, de que las becerras de 8 a 15 días de edad presentaron diarrea asociadas a *Cryptosporidium* spp con frecuencia mayor que animales de otra escala de edades, se ajustan a las manifestaciones de otros autores (Reynolds *et al.*, 1986).

La alta prevalencia e intensidad de infecciones por *Cryptosporidium* spp en becerras de algunos hatos de la Comarca Lagunera indican que estos son parásitos comunes en esta región. Otros estudios muestran altas prevalencias que van desde 20 a 88 % (Bednarska *et al.*, 1998). La frecuencia de criptosporidiosis detectada fue relativamente baja en becerras diarreicas en la primera semana y después de la segunda semana hasta los 40 días de edad.

Por otra parte, hay varios criterios para categorizar los grupos para medir la intensidad de eliminación de *C. spp* en heces, (Bednarska *et al.*, 1998) los identifican en tres grupos como sigue: (+) < 5 ooquistes, (++) 5 to 10 ooquistes, (+++) > 10 ooquistes observados en 20 campos microscópicos a 400X aumentos. (Ortolani *et al.*, 2003) contabilizan 25 campos ópticos y evalúan la intensidad en la siguiente forma: (-) ausencia de ooquistes, (+) de 1 a 4, (++) de 5 a 20, +++ de 21 a 84 y ++++ arriba de 84, utilizando 400X aumentos y Emre y col. (1998) observan 20 campos a 1000X 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.

9. Conclusión

1. De 1337 becerras revisadas, se encontraron 98 (7.3%) con diarrea.
2. Se observaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp en un 1.86 % del total de las becerras revisadas
3. Se observaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp en un 25.5 % de becerras muestreadas.
4. La mayor frecuencia de diarreas asociadas a la criptosporidiosis se observó en becerras de 6 a 15 días de edad.
5. La intensidad de la excreción de ooquistes en las heces se manifestó en los grados 1 (+) y 5 (+++++).
6. Los ooquistes de *Cryptosporidium* fueron encontrados en 11 (55 %) de 20 hatos examinados.
7. La prevalencia de infección estuvo en rangos desde 22.2 hasta 100.

10. Literatura citada

- Anderson, B. C. (1998). "Cryptosporidiosis in bovine and human health." J Dairy Sci **81**(11): 3036-41.
- Arslan, M. Ö., Y. Gicikh, E. M. y B. Sari (2001). "Prevalence of Cryptosporidium spp. Oocysts in Diarrhoeic Calves in Kars Province Turkey." Turk J Vet Anim Sci: 161-165.
- Avery, B. K., A. Lemley y A. G. Hornsby Cryptosporidium: Un Patógeno Transmitido por el Agua (En línea) [1 de Septiembre de 2005] <<http://edis.ifas.ufl.edu>> [Consultado el 10 de Septiembre de 2005]
- Bankier, A. T., H. F. Spriggs, B. Fartmann, B. A. Konfortov, M. Madera, C. Vogel, S. A. Teichmann, A. Ivens y P. H. Dear (2003). "Integrated mapping, chromosomal sequencing and sequence analysis of Cryptosporidium parvum." Genome Res **13**(8): 1787-99.
- Bednarska, M., A. Bajer y E. Sinski (1998). "Calves as a potential reservoir of Cryptosporidium parvum and Giardia sp." Ann Agric Environ Med **5**(2): 135-8.
- Blood, D. C. (2000). Manual de Medicina Veterinaria, McGraw - Hill interamericana.
- Bowman, D. D., R. C. Lynn y M. L. Eberhard (2004). Parasitología para veterinarios. España, Elsevier.
- Bustamante, E. F. (1999). " Enfermedades emergentes o re- mergentes." Revista Costarricense de Ciencias Médicas **20**: 1-2.
- Current, W. L. y L. S. Garcia (1991). "Cryptosporidiosis." Clin Microbiol Rev **4**(3): 325-58.
- De Graaf, D. C., H. De Coninck, F. Petry, I. B. Eeckhout y J. E. Peeters (2002). "Specific bovine antibody response against a new recombinant Cryptosporidium parvum antigen containing 4 zinc-finger motifs." Korean J Parasitol **40**(1): 59-64.
- De Graaf, D. C., E. Vanopdenbosch, L. M. Ortega-Mora, H. Abbassi y J. E. Peeters (1999). "A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals." Int J Parasitol **29**(8): 1269-87.
- De Haro, A. I., S. P. M. Salazar y B. M. Cabrera (1995). Diagnóstico morfológico de las parasitosis. Mexico.
- Díaz, d. R. A., I. L. N. Ramírez, R. M. Godoy y R. Román (2002). "Excreción de ooquistes de Cryptosporidium spp. Durante el posparto, en vacas mestizas de doble propósito." Revista Científica **Vol. XII**:- 614 - 616.
- Dubey, J. P., C. A. Speer y R. Fayer (1990). "Cryptosporidiosis of man and animals." CRC Press: 199.
- Duggan, C., J. Gannon y W. A. Walker (2002). "Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract." Am J Clin Nutr **75**(5): 789-808.
- Elliott, D. A. y D. P. Clark (2000). "Cryptosporidium parvum induces host cell actin accumulation at the host-parasite interface." Infect Immun **68**(4): 2315-22.
- Emre, Z., B. M. Alabay, F. H., A. Duzgun y H. Cerci (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. of Veterinary and Animal Sciences: 453-457.

- Fayer, R. y R. G. Leek (1984). "The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on in vitro excystation of *Cryptosporidium*." J Protozool **31**(4): 567-9.
- Fayer, R., J. M. Trout, T. K. Graczyk y E. J. Lewis (2000). "Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on three Maryland farms." Vet Parasitol **93**(2): 103-12.
- Fayer, R. y B. L. Ungar (1986). "*Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis." Microbiol Rev **50**(4): 458-83.
- Foster, J. C., M. D. Glass, P. D. Courtney y L. A. Ward (2003). "Effect of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability." Food Microbiology **20**: 351-357.
- García, T. A. M., C. Fernández Gutierrez del Álamo, G. C. López, M. P. García y C. P. Marín (2004). "Brotos epidémicos de criptosporidiosis." 1-10.
- Gatei, W., J. Greensill, R. W. Ashford, L. E. Cuevas, C. M. Parry, N. A. Cunliffe, N. J. Beeching y C. A. Hart (2003). "Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam." J Clin Microbiol **41**(4): 1458-62.
- Gómez, B. M., M. L. M. Ortega, E. Tabares, R. V. Lopez y E. Costas (2000). "Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*)." Appl Environ Microbiol **66**(5): 1866-70.
- Graczyk, T. K., M. R. Cranfield y R. Fayer (1996). "Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (FA) test kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts of species other than *Cryptosporidium parvum*." Am J Trop Med Hyg **54**(3): 274-9.
- Graczyk, T. K., M. R. Cranfield, R. Fayer y H. Bixler (1999). "House flies (*Musca domestica*) as transport hosts of *Cryptosporidium parvum*." Am J Trop Med Hyg **61**(3): 500-4.
- Harp, J. y J. Goff "Protection of Calves with a Vaccine against *Cryptosporidium parvum*" [Diciembre 2004] <<http://www.extension.iastate.edu/Pages/dairy/report95/health/dsl-52.pdf>> [Consultado el 25 de Agosto 2005]
- Jiang, J., K. A. Alderisio, A. Singh y L. Xiao (2005). "Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors." Appl Environ Microbiol **71**(3): 1135-41.
- Juranek, D. D. (1995). "Cryptosporidiosis: sources of infection and guidelines for prevention." Clin Infect Dis **21 Suppl 1**: S57-61.
- Kehl, K. S., H. Cicirello y P. L. Havens (1995). "Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species." J Clin Microbiol **33**(2): 416-8.
- Khan, O. A., S. C. Bauserman, M. I. Rothman, E. F. Aldrich y H. S. Panitch (1997). "Concurrence of multiple sclerosis and brain tumor: clinical considerations." Neurology **48**(5): 1330-3.
- Laberge, I., A. Ibrahim, J. R. Barta y M. W. Griffiths (1996). "Detection of *Cryptosporidium parvum* in raw milk by PCR and oligonucleotide probe hybridization." Appl Environ Microbiol **62**(9): 3259-64.
- Levine, N. D. (1984). "Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (protozoa, apicomplexa)." J Protozool **31**(1): 94-8.

- Lindsay, D. S., S. J. Upton, D. S. Owens, U. M. Morgan, J. R. Mead y B. L. Blagburn (2000). "Cryptosporidium andersoni n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*." J Eukaryot Microbiol **47**(1): 91-5.
- Mac Kenzie, W. R., N. J. Hoxie, M. E. Proctor, M. S. Gradus, K. A. Blair, D. E. Peterson, J. J. Kazmierczak, D. G. Addiss, K. R. Fox, J. B. Rose y et al. (1994). "A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply." N Engl J Med **331**(3): 161-7.
- McCole, D. F., L. Eckmann, F. Laurent y M. F. Kagnoff (2000). "Intestinal epithelial cell apoptosis following *Cryptosporidium parvum* infection." Infect Immun **68**(3): 1710-3.
- Moore, D. A., E. R. Atwill, J. H. Kirk, D. Brahmabhatt, L. Herrera Alonso, L. Hou, M. D. Singer y T. D. Miller (2003). "Prophylactic use of decoquinatate for infections with *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves." J Am Vet Med Assoc **223**(6): 839-45.
- Morgan, U. M., L. Pallant, B. W. Dwyer, D. A. Forbes, G. Rich y R. C. Thompson (1998). "Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial." J Clin Microbiol **36**(4): 995-8.
- Navetat, B. H. y F. Cantaloube Decoquinatate to control cryptosporidiosis infestation in ruminants Information from Goat. (En línea) [8 de julio de 2005.] <<http://www.exopol.com/general/circulares/101circ.html>> [Consultado el 25 de agosto de 2005]
- Okhuysen, P. C., G. A. Rogers, A. Crisanti, F. Spano, D. B. Huang, C. L. Chappell y S. Tzipori (2004). "Antibody response of healthy adults to recombinant thrombospondin-related adhesive protein of cryptosporidium 1 after experimental exposure to cryptosporidium oocysts." Clin Diagn Lab Immunol **11**(2): 235-8.
- OMS CEPIS Curso de Autoinstrucción de Evaluación del Riesgo Asociado a Contaminantes del Aire. [5 de diciembre de 2004] <<http://www.cepis.ops-oms.org/bvsci/E/fulltext/riesgo/lecciones/leccion1.html>> [Consultado el 20 de octubre de 2005]
- Ortega, M. L. M., B. M. Gómez y V. F. A. Rojo (1999). Parasitología veterinaria. España, McGraw - Hill interamericana.
- Ortolani, E. L. y S. P. Castro (2003). "Aspectos epidemiológicos de la criptosporidiosis en becerros de rebaños lecheros." Parasitol. Latinoam **58**: 122-127.
- 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.
- Piper, M. B., A. T. Bankier y P. H. Dear (1998). "A HAPPY map of *Cryptosporidium parvum*." Genome Res **8**(12): 1299-307.
- 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.
- Radostits, M. O., C. C. Gay, D. C. Blood y K. W. Hinchcliff (1999). Tratado de enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino, McGraw - Hill. Interamericana.

- Reynolds, D. J. y J. H. Morgan (1986). "Microbiology of calf diarrhea in Southern Britain." Vet Rec **119**: 34-39.
- Robinson, P., P. C. Okhuysen, C. L. Chappell, D. E. Lewis, I. Shahab, A. Janecki y A. C. White, Jr. (2001). "Expression of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in jejuna of volunteers after experimental challenge with *Cryptosporidium parvum* correlates with exposure but not with symptoms." Infect Immun **69**(2): 1172-4.
- Rochelle, P. A., D. M. Ferguson, T. J. Handojo, R. De Leon, M. H. Stewart y R. L. Wolfe (1997). "An assay combining cell culture with reverse transcriptase PCR to detect and determine the infectivity of waterborne *Cryptosporidium parvum*." Appl Environ Microbiol **63**(5): 2029-37.
- Rodriguez-Hernandez, J., A. Canut-Blasco, M. Ledesma-Garcia y A. M. Martin-Sanchez (1994). "Cryptosporidium oocysts in water for human consumption. Comparison of staining methods." Eur J Epidemiol **10**(2): 215-8.
- Ryan, U., L. Xiao, C. Read, L. Zhou, A. A. Lal y I. Pavlasek (2003). "Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic." Appl Environ Microbiol **69**(7): 4302-7.
- SAGARPA (1998). Anuario estadístico de la producción agropecuaria. Lerdo Durango, México.
- Sánchez, A. C., Q. J. Cinca, B. F. López y M. E. Del Cacho Control y prevención de las coccidiosis: medidas higiénico-sanitarias y desinfección. Parasitología y Enfermedades Parasitarias [Mayo de 2005] <<http://www.exopol.com/index>> [Consultado el 21 de agosto de 2005]
- Sturbaum, G. D., C. Reed, P. J. Hoover, B. H. Jost, M. M. Marshall y C. R. Sterling (2001). "Species-specific, nested PCR-restriction fragment length polymorphism detection of single *Cryptosporidium parvum* oocysts." Appl Environ Microbiol **67**(6): 2665-8.
- Tay, Z. J. (1995). Parasitología Médica. México.
- Tetley, L., S. M. Brown, V. McDonald y G. H. Coombs (1998). "Ultrastructural analysis of the sporozoite of *Cryptosporidium parvum*." Microbiology **144** (Pt 12): 3249-55.
- Trotz-Williams, L. A., B. D. Jarvie, S. W. Martin, K. E. Leslie y A. S. Peregrine (2005). "Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in southwestern Ontario and its association with diarrhea in neonatal dairy calves." Can Vet J **46**(4): 349-51.
- Tzipori, S. (1985). "The relative importance of enteric pathogens affecting neonates of domestic animals." Adv Vet Sci Comp Med **29**: 103-206.
- Venczel, L. V., M. Arrowood, M. Hurd y M. D. Sobsey (1997). "Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Clostridium perfringens* spores by a mixed-oxidant disinfectant and by free chlorine." Appl Environ Microbiol **63**(4): 1598-601.
- Xiao, L., R. P. Herd y G. L. Bowman (1994). "Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections on two Ohio pig farms with different management systems." Vet Parasitol **52**(3-4): 331-6.
- Yang, S., M. C. Healey, C. Du y J. Zhang (1996). "Complete development of *Cryptosporidium parvum* in bovine fallopian tube epithelial cells." Infect Immun **64**(1): 349-54.