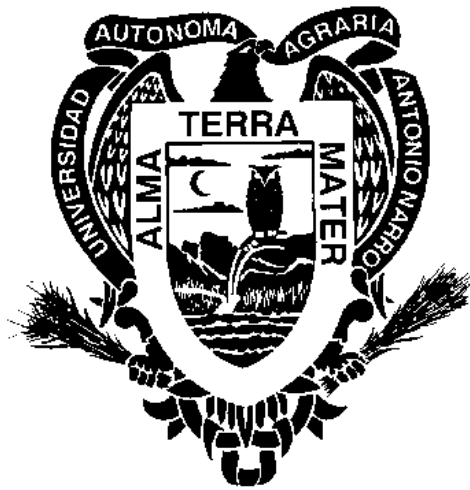


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA  
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**Identificación de *Cryptosporidium* en becerras Holstein de 1 día a 12 meses de edad**

**POR**

**ANA JANETH RODRÍGUEZ CABRERA**

**TESIS**

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

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**TORREÓN, COAHUILA**

**JUNIO DE 2016**

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

Identificación de *Cryptosporidium* en becerras Holstein de 1 día a 12 meses de edad

POR

**ANA JANETH RODRÍGUEZ CABRERA**

**TESIS**

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

APROBADA POR

PRESIDENTE:

  
M.C. Ramón Alfredo Delgado González

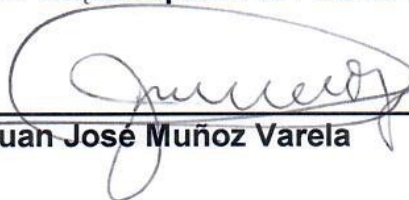
VOCAL:

  
M.V.Z. J. Guadalupe Rodríguez Martínez

VOCAL:

  
Dra. Ma. Guadalupe de la Fuente Salcido

VOCAL SUPLENTE:

  
M.C. Juan José Muñoz Varela

  
M.C. Ramón Alfredo Delgado González  
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA

JUNIO DE 2016

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

Identificación de *Cryptosporidium* en becerras Holstein de 1 día a 12 meses de edad

POR

**ANA JANETH RODRÍGUEZ CABRERA**

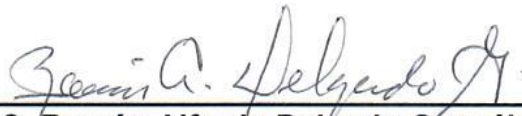
**TESIS**

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL COMITÉ DE ASESORÍA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

APROBADA POR

ASESOR PRINCIPAL:   
M.C. Ramón Alfredo Delgado González



M.C. Ramón Alfredo Delgado González

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL  División Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA

JUNIO DE 2016

## **AGRADECIMIENTOS**

Principalmente a **Dios**, por brindarme la fuerza y vida para salir adelante a pesar de los obstáculos presentados a lo largo de mi vida. Por permitirme haber alcanzado este logro que culmina con gran satisfacción.

**A mis padres:**Ana María Cabrera Solís y Francisco Rodríguez Iturriría. Por todo su amor, apoyo y comprensión a lo largo de todo este tiempo.

A mi **ALMA TERRA MATER** por darme la oportunidad de culminar mis estudios y formarme como profesionalista.

**A mis hermanos y mis sobrinos** por darme la fuerza y el impulso de seguir adelante.

**A mis amigos**, por no dejarme sola en los momentos difíciles, por brindarme sus consejos y por compartir momentos inolvidables en una de las mejores etapas de mi vida.

**A mi asesor de tesis**, Ramón Alfredo Delgado González, por darme la oportunidad de desempeñarme en uno de sus proyectos de investigación.

**A mis coasesores:** Gracias por su asesoramiento, consejos y por el tiempo dedicado para la realización de esta tesis.

**A todos mis maestros** a lo largo de mi carrera, por su conocimiento, consejos y disciplina con la cual me instruyeron a ser mejor estudiante y así lograr ser una buena profesionalista.

A todos ellos, Muchas Gracias.

## **DEDICATORIAS**

El presente trabajo es dedicado a todas las personas que me apoyaron a lo largo de mi vida y durante el tiempo transcurrido en mi **ALMA TERRA MATER**.

Dedicada especialmente **a mis padres:**

**Ana María Cabrera Solís**

**Francisco Rodríguez Iturriría**

Por haberme dado la vida, por apoyarme siempre, brindándome sus sabios consejos, guiándome con palabras de aliento, consejos y correcciones, apoyándome en cada una de mis decisiones y especialmente por estar siempre a mi lado brindándome su amor incondicional, orientándome y procurando hacer de mí, una persona digna y orgullosa de ellos.

**A mis hermanos:**

Francisco Israel Rodríguez Cabrera

Jorge Abraham Rodríguez Cabrera

**A mis sobrinos:**

Nataly Fernanda Rodríguez Martínez

Dylan Jousef Rodríguez Martínez

Christian Rodríguez Martínez

## RESUMEN

La criptosporidiosis es una infección entérica aguda de los animales y los seres humanos causada por varias especies de *Cryptosporidium* genotípica y fenotípicamente diversas. La especie de *Cryptosporidium* involucrada en los becerros neonatos es *C. parvum*, observándose con altas prevalencias en becerros jóvenes de un día a dos meses de edad. En bovinos jóvenes son más frecuentes *C. bovis* y *C. ryanae*, en adultos *C. andersoni*. La finalidad del presente estudio fue determinar la prevalencia de *Cryptosporidium spp* en ganado lechero Holstein en edades comprendidas de un día de nacidos a doce meses de edad, en un Establo lechero del municipio de Torreón, Coahuila. Se empleó la técnica de ZNm. Los resultados obtenidos mostraron prevalencias de 30, 25, 5, 10 y 5% en los grupos de animales de 1-60 d, 61-120 d, 121-180 d, 181-240 d y >240 d de edad, respectivamente. Resultados similares o diferentes pueden ser observados de acuerdo al estudio realizado en ganado lechero o de carne, o dependiendo de la región geográfica, a la epidemiología, a la cantidad de muestras analizadas y al método de diagnóstico.

**Palabras claves:** *Cryptosporidium*, criptosporidiosis, ooquistes, bovinos, prevalencia

## ABSTRACT

Cryptosporidiosis is an acute enteric infection of animals and humans caused by several species of *Cryptosporidium* genotypic and phenotypically different. The species of *Cryptosporidium* involved in newborn calves is *C. parvum*, with high prevalence in young calves from one day to two months of age. Young cattle are most frequent *C. bovis* and *C. ryanae*, adult *C. andersoni*. The purpose of this study was to determine the prevalence of *Cryptosporidium* spp. in Holstein dairy cattle in aged a day of newborns to twelve months of age, in a stable dairy of municipality of Torreón, Coahuila. ZNm technique was use. The results showed a prevalence of 30, 25, 5, 10, and 5% in groups of animals from 1-60 d, d 61-120, d 121-180, 181-240 d and > 240 d of age, respectively. Similar or different results can be observed according to the study conducted in dairy cattle or meat, or depending on the geographical region, epidemiology, the number of samples analysed and the diagnostic method.

**Key words:** *Cryptosporidium*, cryptosporidiosis, oocysts, cattle, prevalence

## INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	I
DEDICATORIAS.....	II
RESUMEN .....	III
ABSTRACT .....	IV
INDICE DE CONTENIDO .....	V
INDICE DE CUADROS .....	VI
INDICE DE FIGURAS.....	VII
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. HIPÓTESIS.....</b>	<b>3</b>
2.1. LA PREVALENCIA DE <i>CRYPTOSPORIDIUM SPP.</i> ES MAYOR EN LAS BECERRAS MENORES DE 120 DÍAS QUE EN LAS BECERRAS DE 121 A 300 DÍAS DE EDAD.....	3
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	3
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
<b>IV. REVISIÓN DE LA LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
4.1. GENERALIDADES DE CRIPTOSPORIDIOSIS .....	4
4.2. CRIPTOSPORIDIOSIS EN BOVINOS .....	5
4.3. TRANSMISIÓN DE <i>CRYPTOSPORIDIUM SPP.</i> .....	7
4.4. SIGNOS CLÍNICOS Y LESIONES DE CRIPTOSPORIDIOSIS .....	8
4.5. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE CRIPTOSPORIDIOSIS.....	10
<b>V. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>13</b>
5.1. LOCALIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO .....	13
5.2. TRABAJO DE CAMPO.....	13
5.3. ESTUDIO DE LABORATORIO .....	15
5.3.1. TÉCNICA DE ZIEHLNEELSEN MODIFICADA .....	16
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>16</b>
<b>VII. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>VIII. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>21</b>



## INDICE DE CUADROS

CUADRO 1. TOMA DE MUESTRAS DE HECES CON Y SIN DIARREA DE ACUERDO AL GRUPO.....	15
CUADRO 2. ALOJAMIENTO DE LOS ANIMALES DE ACUERDO AL GRUPO.....	15

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> ANIMALES POSITIVOS Y NEGATIVOS A <i>CRYPTOSPORIDIUM SPP</i> , DE ACUERDO A LA EDAD Y A LA PRESENTACIÓN DE LAS HECES.....	16
<b>FIGURA 2.</b> PREVALENCIA DE <i>CRYPTOSPORIDIUM SPP</i> , DE ACUERDO A LA EDAD .....	17
<b>FIGURA 3.</b> INTENSIDAD DE EXCRECIÓN DE <i>CRYPTOSPORIDIUM SPP</i> , DE ACUERDO A LA EDAD .....	17

## I. INTRODUCCIÓN

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria de distribución mundial ocasionada por el parásito protozoario *Cryptosporidium spp.*, principalmente por la contaminación del agua y los alimentos. La transmisión de los ooquistes es oro-fecal, en el intestino invaden las células epiteliales de las vellosidades de los huéspedes animales, ocasionando una enteritis y criptitis (Hussein, 2011; Lee *et al.*, 2011). El género *Cryptosporidium* pertenece al Phylum Apicomplexa, las especies infectan una amplia variedad de huéspedes vertebrados (Hashim *et al.*, 2006), incluyendo a los mamíferos, manifestándose con diarrea aguda y profusa (Xiao *et al.*, 2004). Si la diarrea se vuelve persistente, puede causar la muerte del huésped (Fayer *et al.*, 2009). Se conocen alrededor de 26 especies de *Cryptosporidium* y se han descrito más de 60 genotipos, la mayoría con algún huésped específico (Ryan *et al.*, 2014)

La criptosporidiosis bovina es causada principalmente por cuatro diferentes especies de *Cryptosporidium*, *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* y *C. andersoni* (Couto *et al.*, 2014). La principal fuente de infección de la criptosporidiosis para el hombre es el ganado bovino (Del Coco *et al.*, 2009). Los efectos de la infección varían dependiendo de la especie de *Cryptosporidium* involucrada. Algunas especies infectan a grupos específicos como roedores o rumiantes, mientras que otras pueden infectar a muchas especies de huéspedes y todavía otras infectan una sola especie de huésped (Fayer y Xiao, 2007). El conocimiento de la procedencia de los parásitos que causan criptosporidiosis en las becerras es esencial para el control de la enfermedad, ya que ésta es una de las principales causas de la diarrea indiferenciada de las becerras y produce un significativo impacto económico debido a los costos de gastos médicos y a las pérdidas en la productividad (Xiao *et al.*, 2004).

En los últimos años el parásito *Cryptosporidium* ha sido descrito como un patógeno emergente por su importancia zoonótica y por su implicación como

agente oportunista en individuos inmunodeprimidos. Para la detección de la infección se han utilizado varias técnicas incluyendo la observación microscópica de ooquistes, detección de anticuerpos, antígeno y ADN, además de exámenes histológicos y ultraestructurales (AL-Megrin, 2015). Comúnmente la detección de la infección por *Cryptosporidium* requiere de la observación del estado infectivo de los ooquistes, los cuales miden de 4-6  $\mu\text{m}$  de diámetro (Connelly *et al.*, 2008).

El método que puede ser utilizado para la detección de rutina de criptosporidias en muestras de heces, en casos de diarreas, debe ser aceptable en términos de sensibilidad y especificidad, proporcionar resultados clínicamente relevantes y ser económico (Mittal *et al.*, 2014). En general los resultados con la técnica microscópica con tinción de Ziehl Neelsen muestran una baja sensibilidad comparado con pruebas de ELISA y técnicas moleculares (AL-Megrin, 2015). A pesar de que el valor diagnóstico de la técnica de Ziehl Neelsen modificada (ZNm) es limitado, la mayoría de las investigaciones de criptosporidiosis la utilizan para la detección microscópica de ooquistes en muestras de heces para diagnóstico o para utilizar las muestras positivas en posteriores estudios moleculares (Romero-Salas *et al.*, 2016; Henriksen y Pohlenz, 1981).

En la Comarca Lagunera se sabe que *Cryptosporidium* spp infecta al ganado lechero, principalmente a becerros lactantes (Delgado *et al.*, 2007), sin embargo hay pocos estudios sobre la infección en animales mayores, por lo cual en el presente estudio se pretende identificar la ocurrencia de criptosporidiosis y su relación con la edad en animales con y sin diarrea.

## **II. HIPÓTESIS**

- 2.1. La prevalencia de *Cryptosporidium spp.* es mayor en las becerras menores de 120 días que en las becerras de 121 a 300 días de edad.

## **III. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo general**

- 3.1.1. Determinar la prevalencia de *Cryptosporidium* en becerras de un día hasta 300 días de edad, en un establo lechero comercial del municipio de Torreón, Coah.

### **3.2. Objetivos Específicos**

- 3.2.1. Identificar ooquistes de *Cryptosporidium* en heces de becerras utilizando la técnica de Ziehl Neelsen modificada.
- 3.2.2. Relacionar la ocurrencia de criptosporidiosis con la edad de las becerras de acuerdo a los grupos de edad (días): 1) 1 a 60 d, 2) 61 a 120 d, 3) 121 a 180 d, 4) 181 a 240 d.

## IV. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 4.1. Generalidades de criptosporidiosis

Tyzzler (1907), fue el primero que reconoció un parásito encontrado en las glándulas gástricas de ratones comunes y describió sus etapas asexuales y sexuales. Cada parásito tenía un organelo semejante a las gregarinas, especializado para la fijación en las células del huésped. Al protozoo identificado se le denominó *Cryptosporidium muris* (*C. muris*) (Tyzzler, 1907; Tyzzler, 1910). Más tarde, Tyzzler (1912) describió otra nueva especie a la cual llamó *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) (Tyzzler, 1912). A partir de entonces se han descrito una gran variedad de especies de *Cryptosporidium* causantes de criptosporidiosis, las cuales causan enteritis aguda con diarrea severa en los individuos afectados (Ramirez *et al.*, 2004).

Desde que se descubrió el género *Cryptosporidium* hace más de un siglo, durante 70 años la criptosporidiosis no fue considerada como una infección importante, aun cuando se apreciaban infecciones en intestinos de los animales y causaba ligera o nula enfermedad. Sin embargo, la asociación de las criptosporidias con infección en humanos y animales fue reconocida desde los años 70s como oportunista en individuos inmunodeprimidos (Panciera *et al.*, 1971; Nime *et al.*, 1976; Powell *et al.*, 1976; Tzipori y Widmer, 2008).

El modo de infección de las criptosporidias es por vía fecal-oral, por contaminación de alimentos y agua (Hashim *et al.*, 2006). La infección se inicia cuando se ingieren ooquistes esporulados por un huésped, estos se someten a exquistación en la luz intestinal emergiendo cuatro esporozoitos, presentes en cada ooquiste, los cuales invaden las microvellosidades del borde de cepillo del epitelio de la mucosa y se desarrollan en trofozoitos. Estos trofozoitos sufren una división asexual (merogonia) para formar ocho merozoitos dentro de merontes tipo I, y liberando merozoitos invasivos que invaden las células adyacentes del huésped para formar

merontes tipo I adicionales o para formar merontes tipo II. Los merozoitos liberados de los merontes tipo II no se reciclan, pero invaden las células el huésped para iniciar la fase sexual. Los microgametocitos liberados de los microgamontes fertilizan a los macrogamontes para convertirse en cigotos. La mayoría de los cigotos se desarrollan en ooquistes con una pared gruesa de dos capas, pero solo una minoría tiene una unidad de membrana que rodea a los cuatro esporozoitos y facilita el ciclo autoinfectivo que mantiene la infección sin más la ingestión de ooquistes de pared gruesa. Esporulados, los ooquistes de pared gruesa que contienen cuatro esporozoitos se liberan en las heces y transmiten la infección entre los huéspedes (Chalmers y Katzer, 2013).

Actualmente se conoce que *Cryptosporidium spp.*, es un parásito protozooarioentérico obligado del *Phylum Apicomplexa*, diseminado por todo el mundo, y es una de las causas más comunes de diarrea en humanos y animales. Se considera que *C. parvum* representa un grave problema de salud pública ya que es un patógeno zoonótico transmisible de una amplia variedad de animales al hombre (Mohammed *et al.*, 2013).

#### **4.2. Criptosporidiosis en bovinos**

Al ganado bovino se le ha identificado como una fuente importante de contaminación ambiental de *Cryptosporidium spp.* (Qi *et al.*, 2015). El parásito causa trastornos en rumiantes neonatos y es considerado como un agente etiológico importante en el síndrome de diarrea neonatal en becerros, corderos y cabritos, causando considerables pérdidas económicas directas e indirectamente debido a la mortalidad resultante, al retardo en el crecimiento de los animales, el costo de los medicamentos, a la asistencia veterinaria y el incremento de trabajo involucrado (De Graaf *et al.*, 1999). Además, las pérdidas económicas asociadas con esta enfermedad en bovinos incluyen morbilidad, mortalidad y costo directo del tratamiento, ya que la diarrea provocada por este parásito es una causa importante de enfermedad y muerte en becerros jóvenes (Schroeder *et al.*, 2012).

Durante la última década, la criptosporidiosis pasó de ser una rara infección, en gran medida asintomática a una enfermedad entérica aguda de los animales y los seres humanos (Ramirez *et al.*, 2004). Los becerros recién nacidos son particularmente susceptibles a la infección, pueden excretar millones de ooquistes cuando desarrollan la criptosporidiosis, y la enfermedad es considerada como un grave factor de morbimortalidad que conduce a grandes pérdidas económicas (Del Coco *et al.*, 2009). Los animales adultos, en ganado asintomático, también excretan ooquistes y el total del número de ooquistes excretados puede ser considerable debido a la cantidad de heces producidas (Kuczynska *et al.*, 2005).

En bovinos se han reportado las especies *C. parvum* (Anusz *et al.*, 1990), *C. bovis* (Fayer *et al.*, 2005), *C. andersoni* (Lindsay *et al.*, 2000), *C. ryanae* (Fayer *et al.*, 2008), *C. felis* (Bornay-Llinares *et al.*, 1999), *C. hominis* (Smith *et al.*, 2005), *C. suis*, *Cryptosporidium* genotipo ciervo (Fayer *et al.*, 2006), *Cryptosporidium* genotipo *suis* y *Cryptosporidium* porcino genotipo II (Langkjaer *et al.*, 2007). Las primeras cuatro especies (*C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* y *C. ryanae*), son las principales responsables de criptosporidiosis bovina (Maikai *et al.*, 2011; Šlapeta, 2011; Wang *et al.*, 2011).

*C. parvum* coloniza las células de las vellosidades intestinales siendo éste una etiología muy importante en el síndrome de la diarrea de los becerros recién nacidos, los signos muestran depresión, inapetencia, fiebre, deshidratación y baja condición corporal (Björkman *et al.*, 2003). En los bovinos adultos *C. parvum* puede cursar con una enfermedad subclínica y con bajos niveles de infección (Singh *et al.*, 2006). *C. andersoni* se observa más en bovino adulto, cursa sin signos aunque se ha observado que causa lesiones leves de abomasitis con una leve hiperplasia epitelial e infiltración de linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos en lámina propia (Masuno *et al.*, 2006), además se ha asociado a una baja producción de leche y baja ganancia de peso. Se ha encontrado en ovinos y caprinos, y se considera una especie zoonótica (Feng *et al.*, 2011). La especie *C.*



*bovis* más frecuente que *C. ryanaey* ambas infectan becerros destetados y de hasta un año de edad (Santin *et al.*, 2008), pero no se ha observado ningún signo clínico de enfermedad (Fayer *et al.*, 2008).

#### **4.3. Transmisión de *Cryptosporidium* spp.**

Se ha demostrado que la principal fuente de contaminación de los animales susceptibles a *Cryptosporidium* es el agua. Los ooquistes presentan mucha resistencia ya que son capaces de sobrevivir al aire libre en el agua, el suelo y puede parasitar diferentes huéspedes (Ramsay *et al.*, 2014). Algunos estudios mencionan que el 10% de las infecciones pueden ser transmitidas de individuo a individuo y la mayoría de las ocasiones es debido a la contaminación del agua potable (Eisenberg *et al.*, 2005). La criptosporidiosis zoonótica también es producida por el ganado bovino. Un de las principales causas de brotes de criptosporidiosis en humanos es debida al contacto con terneros infectados con *C. parvum* (Couto y Bomfim, 2012).

Los bovinos jóvenes y adultos pueden eliminar miles de ooquistes durante el período patente, esparciendo la forma infectante del protozooario en el ambiente jugando un papel importante en la cadena epidemiológica de la enfermedad (Couto y Bomfim, 2012; Anderson, 1998). Otro factor importante para la transmisión de la infección es el manejo posterior al parto. Los bovinos adultos como portadores asintomáticos del parásito, eliminan ooquistes al medio ambiente los cuales pueden infectar a los becerros recién nacidos (Garro *et al.*, 2014), surgiendo la posibilidad de infección inmediata al nacimiento. Otra situación de riesgo que favorece la transmisión es una inadecuada condición higiénica (Chirinos *et al.*, 2004).

En ocasiones, los bovinos infectados natural y experimentalmente eliminan grandes cantidades de ooquistes en sus excretas sin que haya una demostración

de signos clínicos y el periodo infeccioso es más frecuente entre el primero y segundo mes de edad (Iseki *et al.*, 1989, Atwill *et al.*, 1999).

Una variable zootécnica considerada como factor de riesgo para la criptosporidiosis, es la de no lavar la ubre antes de alimentar a los becerros, ya que las medidas de control basadas en las prácticas de manejo, minimizan el grado de exposición al parásito, y así se reduce significativamente su morbilidad (Fitz-Sánchez, 2013).

El tratamiento al agua de suministro, compostaje de excretas, equipo de ordeño y tanque de enfriamiento, así como la asistencia técnica permanente bajo criterio de un profesional son factores de protección contra este parásito (Hernández y Cortés, 2012).

#### **4.4. Signos clínicos y lesiones de criptosporidiosis**

El primer reporte de criptosporidiosis se describió en una becerro de 8 meses de edad. Los signos mostraron diarrea crónica y debilidad y las lesiones macroscópicas fueron leves pero histológicamente se observó en intestino delgado atrofia de vellosidades y presencia de diferentes formas de desarrollo de criptosporidias en el borde de las microvellosidades del epitelio (Pancieria *et al.*, 1971).

Las principales lesiones producidas por la infección debido a *Cryptosporidium* ocurren en el intestino delgado, se observa hiperemia, hemorragias leves, pérdida superficial del epitelio, atrofia y fusión de vellosidades, dilatación de las criptas, infiltración de la lámina propia con neutrófilos, presencia de ooquistes de criptosporidias en la superficie epitelial, y ocasionalmente lesiones similares en ciego y colon (Angus *et al.*, 1982).

En animales inmunodeprimidos se observan varios estadios de parásitos protozoarios, característicos de criptosporidias, como cuerpos esféricos de 1.5 a 4.0  $\mu\text{m}$  de diámetro en estómago, en el borde de las microvellosidades de la mucosa intestinal, duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon, principalmente sobre las puntas y a lo largo de los lados de las vellosidades intestinales, en las criptas de Lieberkühn, en las glándulas de Brunner, en los conductos biliares y pancreáticos y en la vesícula biliar. Las criptosporidias ocupan la superficie apical intracelular de los enterocitos (Knight y Wright, 1978; Snyder *et al.*, 1978).

En becerros infectados experimentalmente con *Cryptosporidium* spp, se observan criptosporidias libres en el lumen y adheridas al epitelio. Los ooquistes contienen cuatro esporozoitos y no presentan una membrana esporoquística. Los parásitos pueden encontrarse extracelularmente y adheridos adyacentes a las microvellosidades de las células epiteliales, los parásitos adheridos son detectados principalmente en las puntas de las vellosidades y pueden estar presentes todos los estadios en una sola vellosidad. El sitio de fijación se puede caracterizar por una ausencia de desintegración de las microvellosidades, desorganización y desarrollo de una zona especializada de adhesión. Hay un aumento del número de lisosomas e irregularidades en la membrana nuclear de la célula epitelial parasitada. Estos cambios en el tejido epitelial contribuyen con la diarrea (Pohlenz *et al.*, 1978a; Pohlenz *et al.*, 1978b).

También se ha descrito que en la diarrea infecciosa de los becerros participan varios patógenos asociados a *Cryptosporidium* spp como Coronavirus bovino, Rotavirus Bovino y *E. coli* K99, principalmente (Moon *et al.*, 1978; Schroeder *et al.*, 2012; İçen *et al.*, 2013). Los signos clínicos incluyen diarrea amarillenta, ocasionalmente con estrías de sangre y las lesiones macroscópicas, muestran intestinos distendidos. Histológicamente las lesiones se observan a la mitad del yeyuno e íleon, con vellosidades cortas desnudas o con células epiteliales columnares bajas o cúbicas e hiper celularidad en lámina propia. En el borde superficial de las microvellosidades de las células de absorción que recubren la

parte media superior de las vellosidades en el yeyuno medio posterior e íleon, se observan organismos con características morfológicas de *Cryptosporidium*. Los mismos organismos son observados con menor frecuencia en las criptas de Lieberkühn y están presentes lesiones con criptitis (Pohlenz *et al.*, 1978a). Cuando la lesión es mixta, Rotavirus + *Cryptosporidium*, las lesiones son más severas con vellosidades desnudas, pero similares a las descritas por la infección simple con *Cryptosporidium*. Cuando participa Coronavirus + *Cryptosporidium*, el Coronavirus también se detecta en células de absorción y de las criptas del colon, las lesiones histológicas se observan a partir de yeyuno anterior con vellosidades ligeramente más cortas de lo normal, cubiertas por células epiteliales cúbicas con un escaso desarrollo del borde de cepillo (microvellosidades). La punta de algunas vellosidades está desnuda. En el colon hay áreas focales de degeneración en las células de absorción y descamación con denudación y sustitución por células cuboidales (Morin *et al.*, 1976).

En el duodeno, los folículos linfoides de la lámina propia y la submucosa están reactivos y prominentes. Un número moderado de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos así como vasos sanguíneos congestionados se observan en la lámina propia. Un epitelio reactivo, evidenciado por excesiva eliminación epitelial en la zona de extrusión y un alto índice mitótico, es una característica sobresaliente (Kovatch y White, 1972). También por examen histológico se observa que las etapas de desarrollo de las criptosporidias se encuentran con frecuencia en la superficie del epitelio de las vellosidades en la parte distal del íleon. Las vellosidades se acortan y se expanden, y el tejido conectivo de la submucosa es infiltrado por células inflamatorias, principalmente de granulocitos eosinófilos (Fischer, 1982).

#### **4.5. Métodos de diagnóstico de criptosporidiosis**

Varios métodos han sido utilizados para detectar ooquistes de *Cryptosporidium* en heces, pero existen dificultades para discriminar entre los microorganismos no

criptosporidiales, de los microorganismos ácido resistentes parecidos a las criptosporidias y las criptosporidias (Casemore *et al.*, 1985). La técnica de flotación es un procedimiento práctico para detectar infección criptosporidial en becerros con diarrea (Anderson, 1981).

Los ooquistes del género *Cryptosporidium* se observaron por primera vez en las heces de becerros infectados de forma natural utilizando el método de flotación centrifugación con solución saturada de ZnSO<sub>4</sub> y solución de flotación de Breza. Los ooquistes recuperados de las heces fueron esporulados, esféricos o ligeramente elípticos, con una pared lisa, sin color y delgada. En la preparación fresca después de la técnica de flotación los ooquistes miden de 5.4 x 4.6 µm, mientras que en los frotis teñidos con Giemsa, su tamaño promedio es de 4.8 x 4.3 µm. Una característica típica de los ooquistes es un cuerpo residual que aparece como un punto oscuro en un polo del ooquiste cuando se observa con el microscopio óptico. El ooquiste contiene cuatro esporozoitos que forman un borde en forma de C alrededor del cuerpo residual, además, no se observan esporoquistes (Pavlassek, 1982).

Se ha descrito un método de tinción Köster modificado para coprodiagnóstico específico de criptosporidiosis en heces de humanos y animales y la eficacia de estas técnicas es comparada con otros métodos de tinción. Las técnicas de Köster modificada y Ziehl Neelsen son seguras y permiten una clara distinción entre ooquistes de criptosporidias y levaduras, aunque la primera técnica da una mejor diferenciación de la estructura interna de la criptosporidia (Kageruka *et al.*, 1984).

También las muestras de heces de becerros infectados experimentalmente con criptosporidios han sido examinados con la técnica de frotis fecal directo. Los ooquistes son detectados en las heces antes y durante un período que siguió a una exposición prolongada, sin embargo son más fácil de visualizar usando la técnica de flotación con solución de dicromato que en forma directa. Es importante considerar que las levaduras como *Candida albicans* pueden confundirse con

ooquistes cryptosporidiales en frotis fecales. Los ooquistes pueden ser fácilmente detectados en las muestras de heces desde los dos días de infección hasta 120 días en solución de dicromato, incluso en animales sin diarrea. La técnica de flotación con solución de dicromato es una técnica simple, rápida, barata y facilita la detección de criptosporidios por los laboratorios de diagnóstico y algunos médicos veterinarios (Willson y Acres, 1982).

Otra técnica utilizada es la histopatología, a partir de intestino delgado y grueso de becerros de 7 a 21 días de edad, que hayan tenido criptosporidiosis. Se utiliza la tinción de rutina de hematoxilina y eosina, hematoxilina y tartrazina, Giemsa modificado de Wolbach, o tinción con azul de toluidina y otras tinciones policromáticas. Además, por medio de microscopio electrónico de barrido las criptosporidias son claramente visibles, adheridas en las microvellosidades de los enterocitos de las vellosidades lesionadas por la inflamación que se producen incluso fuera del epitelio, y con frecuencia el material necrótico obstruye las salidas de las criptas de Lieberkuhn en el ciego de los terneros (Vitovec, 1982).

Aunque *Cryptosporidium* es encontrado en el tracto gastrointestinal, el tejido obtenido de biopsias puede ser insuficiente para recuperar el organismo, por lo cual, el estudio de muestras de materia fecal es un procedimiento no invasivo y proporciona mejores oportunidades totales para la recuperación del organismo. Las muestras de materia fecal pueden ser remitidas en formalina al 10%, dicromato de potasio al 5%, y polivinil alcohol y examinadas utilizando 15 diferentes métodos: Contraste de fase y microscopía de luz visible; Flotación de Sheather con azúcar; Técnica de concentración con formalina; Hidróxido de potasio al 10%; Giemsa, Tricrómica; Ácido Periodico de Shiff (PAS); PAS modificado; metamina de plata; Naranja de acridina; auramina-rodamina; Kinyoun ácido alcohol resistente; Ziehl-Neelsen carbolfuchsina; y un procedimiento modificado ácido alcohol resistente. Cada técnica o combinación de técnicas fueron evaluadas para la cuantificación de organismos, morfología de organismos, y facilidad de reconocimiento visual. Basado en éste estudio comparativo, la

tinción con Ziehl-Neelsen modificada, de muestras de heces conservadas con formalina al 10%, es recomendada para recuperar e identificar *Cryptosporidium* (García *et al.*, 1983).

Tanto la técnica de flotación con sacarosa de Sheater y la técnica de sedimentación de Ritchie con formalina y acetato de etilo más una tinción Kinyoun modificada (ácido alcohol resistente) identifican en porcentajes similares ooquistes de *Cryptosporidium* spp (McNabb *et al.*, 1985).

Se ha descrito un examen simple en dos etapas, adecuado para uso rutinario, utilizando auramina fenol y carbol fuchsina para la detección y un método de tinción de Ziehl-Neelsen modificado para su confirmación. Un método adicional, utilizando tinción de Jenner y Giemsa, es de valor para la confirmación de los ooquistes, especialmente donde la microscopía de fluorescencia no está disponible (Casemore *et al.*, 1985).

## **V. MATERIAL Y METODOS**

### **5.1. Localización del área de estudio**

Las muestras examinadas fueron obtenidas de un establo lechero comercial ubicado en el km 6.5 de la carretera Torreón-Mieleras, en el municipio de Torreón, estado de Coahuila. El establo tenía una población de 2115 animales en el momento del muestreo, con 1116 en las áreas muestreadas.

### **5.2. Trabajo de campo**

Se realizó un estudio de campo para determinar la prevalencia de *Cryptosporidium* spp en los animales sujetos a investigación. Se obtuvieron muestras fecales de 100 becerras Holstein, divididas en 5 grupos; G-1) 1-60 d, G-2) 61-120 d, G-3) 121-180

d, G-4) 181-240 d, G-5) 241-360 d. Las muestras se tomaron en una sola ocasión durante el mes de marzo de 2014, directamente del recto, utilizando recipientes de polietileno (Cuadros 1 y 2).



Cuadro 1. Toma de muestras de heces con y sin diarrea de acuerdo al grupo.

Grupo	n	No. de animales	Presentación de las heces		
			Diarrea	Semilíquidas	Normales
1	20	196	8	1	11
2	20	208	9	0	11
3	20	205	7	2	11
4	20	157	4	0	16
5	20	350	2	1	17

Cuadro 2. Alojamiento de los animales de acuerdo al grupo.

Grupo	No. de animales	Alojamiento Jaula	No. animales por corral/jaula
1	196	Jaulas individuales	1
2	208	4 corrales	52
3	205	3 corrales	68
4	157	1 corral	157
5	350	6 corrales	68

### 5.3. Estudio de laboratorio

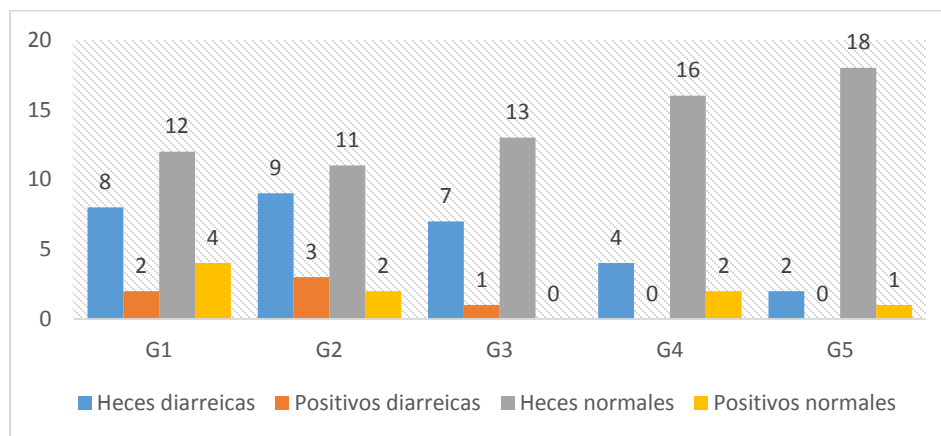
Las muestras fecales recolectadas fueron transportadas en refrigeración al laboratorio para su procesamiento. Cada muestra fue colocada en un recipiente, se depositaron 10 g de heces con 3 mL de Dicromato de Potasio, para conservar la muestra. Se realizaron extendidos en laminillas de vidrio, se secaron al aire y se tñieron con la técnica de ZNm. Se observaron 40 campos, con un microscopio de luz visible utilizando el objetivo de 40X, para dar el resultado positivo o negativo, de acuerdo a las características de tinción de los ooquistes. Los criterios para evaluar la intensidad de excreción fueron los siguientes: negativo (-), no se observaron ooquistes; incipiente (+), de 1 a 10 ooquistes; leve (++), de 11 a 20 ooquistes; moderado (+++), de 21 a 40 ooquistes; y severo (++++), más de 40 ooquistes.

### 5.3.1. Técnica de ZiehlNeelsen modificada

Los extendidos de heces se colocaron en Fucsina fenicada durante 30 minutos, enseguida se lavaron con agua corriente para eliminar el colorante y se decoloró con alcohol etílico al 96% con 1% de ácido clorhídrico. Se lavaron las laminillas para eliminar el exceso de la solución decolorante y se tiñeron durante 5 minutos con Azul de Metileno. Se secaron al aire y se montaron con resina sintética y cubreobjetos.

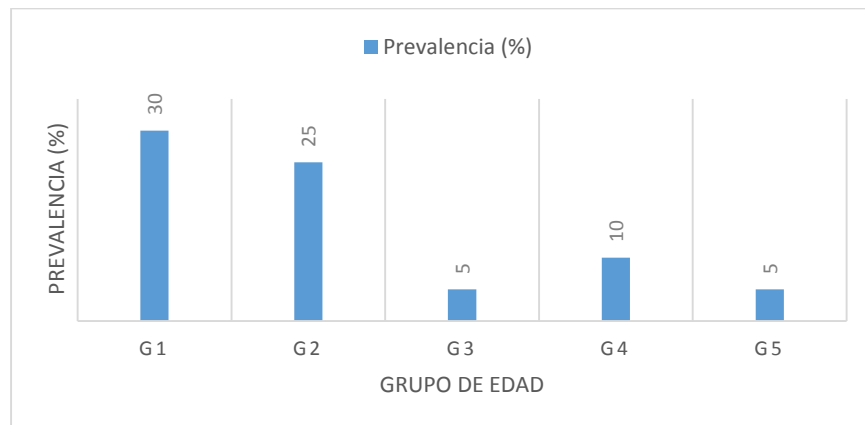
## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron una prevalencia de criptosporidiosis de 15%, 6 (40%) de animales con diarrea y 9 (60%) con heces normales (Figura 1). Estudios realizados en diversas partes del mundo han reportado prevalencias de la infección por *Cryptosporidium* spp en becerras y los resultados han sido muy variables. La prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en heces de bovinos se ha estudiado en países asiáticos, europeos, sudamericanos y norteamericanos, incluyendo a México, con prevalencias que se encuentran entre 1-85%, en animales de 1 día hasta mayores de 2 años de edad y en condiciones de explotaciones extensivas e intensivas (Xiao *et al.*, 2004; Delgado *et al.*, 2007).

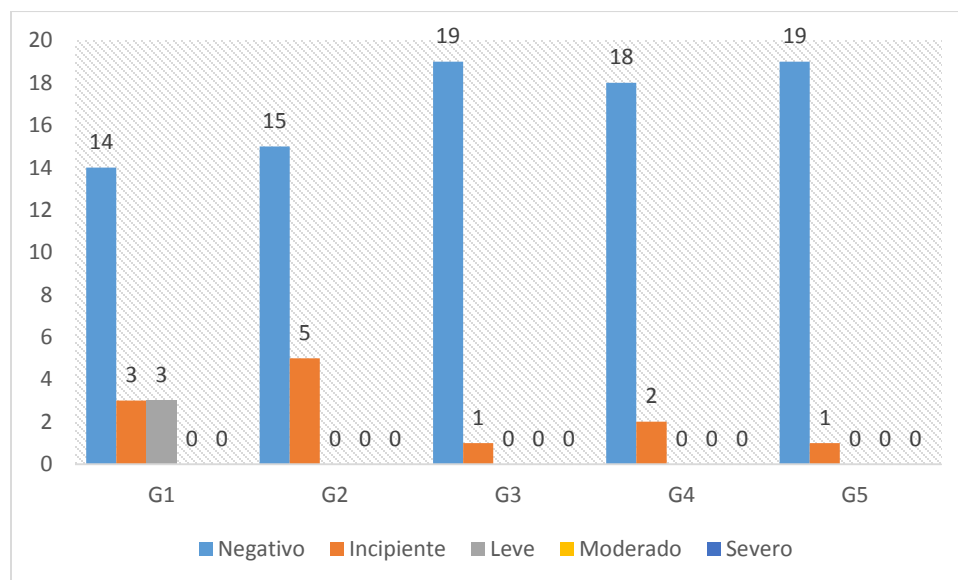


**Figura 1.** Animales positivos y negativos a *Cryptosporidium* spp, de acuerdo a la edad y a la presentación de las heces

Nuestro estudio muestra prevalencias de 30% (G-1), 25% (G-2), 5% (G-3), 10% (G-4), y 5% (G-5). El mayor número de animales positivos se encontró en los grupos G-1 y G-2 (Figura 2). Observándose únicamente infecciones de grado Incipiente y Leve (Figura 3). La prevalencia de criptosporidiosis en becerros lactantes de 1 a 30 días de edad, es generalmente elevada, con rangos de 26% a 65%, observándose la mayor frecuencia entre los 7 y 21 días de edad (Delgado, 2007; İçen *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Prevalencia de *Cryptosporidium spp.*, de acuerdo a la edad



**Figura 3.** Intensidad de excreción de *Cryptosporidium spp.*, de acuerdo a la edad

Algunos reportes en regiones de México, como un estudio realizado en el municipio de Cuajinicuilapa, en la región de Costa Chica del Estado de Guerrero, México, mostraron que la prevalencia más alta fue de 3.14%, en becerros con una edad de hasta 2 meses (Fitz-Sánchez, 2013). Otros estudios han demostrado una alta prevalencia de *Cryptosporidium spp.* en animales jóvenes, como el estudio realizado en tres regiones ecológicas del estado de Veracruz, México, utilizando la tinción con Kinyoun. Sin embargo, difieren los porcentajes ya que la prevalencia general de criptosporidiosis fue 73.6% y la prevalencia por edad fue 72.4% en becerros de hasta tres meses de edad y 74.4% en becerros de 6 a 12 meses (Castelán *et al.*, 2011). También altas prevalencias de *Cryptosporidium spp.* han sido demostradas en Aguascalientes, México, en donde se observó criptosporidiosis en un 75% (Castillo *et al.*, 2009).

En el Noreste de Argentina se encontró una prevalencia de 27% en becerras de 2 días a 2 años de edad, divididas en tres grupos; en lactantes de 20 días a 4 meses se observó 56%, en jóvenes de 4 meses a 1 año 24% y en adultas mayores de 1 año 16% (Araujo *et al.*, 2011). Resultados encontrados en Bogotá, Colombia fueron de 5% en becerros de 1 a 2 meses de edad (Hernández y Cortés, 2012).

Estudios realizados en Taiwán reportan un 32.6% de criptosporidiosis en ganado bovino. En becerros menores de 1 año se encontró un 33.8%, en vaquillas de 1 a 2 años 27.9% y en vacas mayores de 2 años 35.8% (Huang *et al.*, 2014). Nosotros solo muestreamos bovinos menores de 1 año de edad y se aprecia que los resultados difieren considerablemente. La causa pudiera ser debido a las diferentes condiciones ambientales y geográficas, así como a los sistemas de explotación, bioseguridad y número de muestras analizadas.

En la República Checa se ha reportado la criptosporidiosis en el 63% de becerras lactantes, principalmente a los 8 días de edad (Fischer, 1982).

En la costa este de los Estados Unidos (7 estados) se diagnosticaron en un 85% en becerras antes del destete y el 1% en el postdestete (Santín *et al.*, 2004). En Canadá se ha reportado la identificación de criptosporidias en 26% de becerros neonatos con diarrea acuosa y profusa, entre una y dos semanas de edad (Sanford y Josephson, 1982).

Para la observación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se utilizó la técnica de ZNm, éste método se utilizó porque es la forma más económica y rápida para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (Kehl *et al.*, 1995; Rodríguez-Hernández *et al.*, 1994), el análisis microscópico de los extendidos de heces teñidos con ZNm es la técnica más utilizada para el diagnóstico de *Cryptosporidium* en los laboratorios clínicos, ya que se sabe que los métodos de detección inmunológica no son significativamente más sensibles que la microscopía convencional (Quilez *et al.*, 1996). Sin embargo, los estudios con técnicas moleculares presentan una sensibilidad y especificidad de 100% comparado con un 83% de sensibilidad y un 98% de especificidad para la microscopía (Morgan *et al.*, 1998).

La ocurrencia de diarrea causada por *Cryptosporidium* spp en la primer y segunda semana de edad con eliminación de criptosporidios es frecuente y comúnmente se encuentran otros patógenos asociados a la infección (Anderson, 1998). Nuestro resultados mostraron que las becerras de 7 a 21 días de edad presentan diarrea asociadas a *Cryptosporidium* spp, con mayor frecuencia que en animales con otros rangos de edad, y similarmente es manifestado por otros investigadores (Reynolds y Morgan, 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 (Delgado *et al.*, 2007).

De acuerdo a los resultados observados, la susceptibilidad a *Cryptosporidium* spp. varía de acuerdo con la edad, y a otros factores de riesgo que pueden diseminar a infección, además otros enteropatógenos pueden estar presentes en asociación

con *Cryptosporidium* para la presentación de la diarrea en becerros (Emre *et al.*, 1998).

Con respecto a las becerros de 12 meses de edad, los resultados contrastan con lo encontrado por otros investigadores (Díaz de Ramírez, 2002), ya que obtuvieron una alta proporción de animales adultos que excretaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. En vacas aparentemente sanas se han encontrado miles de ooquistes por gramo de heces, y considerando una producción de 30 kg/día de heces por vaca, se pueden excretar millones de ooquistes por día. En otros estudios, en vacas y vaquillas, no hubo presencia de ooquistes (Atwill *et al.*, 1998).

Son varios criterios los utilizados para medir la intensidad de eliminación de *Cryptosporidium* spp. en heces. Se pueden agrupar en tres grados, el primero (+) con menos de 5 ooquistes, el segundo grado (++) al observar de 5 a 10 ooquistes, y el tercero (+++) con más de 10 ooquistes observados en 20 campos ópticos a 400 aumentos (Bednarska *et al.*, 1998). Otro criterio es observar 20 campos a 1000 aumentos y los gradúan en 1 (+) de 1 a 5 ooquistes, grado 2 (++) de 6 a 20 ooquistes y grado 3 (+++) más de 20 ooquistes (Emre *et al.*, 1998). Nuestro criterio sobre la evaluación de la intensidad de eliminación de ooquistes coincide con Ortolani y Castro (2003). Estos investigadores comentan que el grado 1 se presenta en animales asintomáticos o prepatentes, mientras que los grados 2 y 3 predominan en becerros con diarrea. Podemos entonces inferir que entre los grados de intensidad de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., se detectan los grados de infección en forma incipiente (+), leve (++) , moderada (+++) y severa (++++) , de acuerdo a los signos clínicos, aunque con muy poca variación en la interpretación con los otros autores.

## VII. CONCLUSIÓN

Se demostró una mayor prevalencia de *Cryptosporidium spp.* en los animales jóvenes de 1 a 60 días. Los demás grupos presentaron una bajaprevalencia.

La técnica de Ziehl Neelsen modificada es adecuada para un diagnóstico rápido y económico, en caso de requerir investigaciones para conocer las especies son necesarios métodos moleculares.

La intensidad de excreción en todas las edades la intensidad de excreción fue baja, por lo que se puede considerar que no exista un problema por criptosporidiosis

Los resultados obtenidos muestran la importancia de tener un adecuado control de excretas, así como una correcta higiene dentro de las instalaciones y desinfectar periódicamente los lugares donde existan riesgos de infección.

## VIII. LITERATURA CITADA

AL-Megrin, W.A.I. 2015. Comparison of ELISA and microscopy for detection of *Cryptosporidium* oocysts in animals. *Pak. J. Biol. Sci.* 18(7):341-345.

Anderson, B.C. 1981. Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 178(9):982-984.

Anderson, B.C. 1998. Cryptosporidiosis in bovine and human health. *J. Dairy Sci.* 81(11):3036-3041.

Angus, K.W., S. Tzipori y E.W. Gray. 1982. Intestinal lesions in specific-pathogen-free lambs associated with a *Cryptosporidium* from Calves with Diarrhea. *Vet. Pathol.* 19:67-78.

Anusz, K.Z., P.H. Mason, M.W. Riggs y L.E. Perryman. 1990. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in bovine feces by monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 28:2770-2774.

Araujo, AV., M.M.A. Gómez y A.M.F. Milano. 2011. Prevalencia de la infección por *Cryptosporidium spp.* en bovinos de dos establecimientos del Nordeste Argentino. REDVET: 2011, 12(10): ISSN 1695-7504.

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101011/101108.pdf>

Atwill, E.R., E. Johnson, D.J. Klingborg, G.M. Veserat, G. Markegard, W.A. Jensen, D.W. Pratt, R.E. Delmas, H.A. George, L.C. Forero, R.L. Philips, S.J. Barry, N.K. McDougald, R.R. Gildersleeve y W.E. Frost. 1999. Age, geographic, and temporal distribution of fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cow-calf herds. *Am. J. Vet. Res.* 60:420-425.

Atwill, E.R. J.A. Harp, T. Jones, *et al.* 1998. Evaluation of periparturient dairy cows and contact surfaces as a reservoir of *Cryptosporidium parvum* for calfhoo infection. *Ame. J. Vet. Res.* 59(9):1116-1121.

Bednarska, M., A. Bajer y E. Sinsky. 1998. Calves as a potential reservoir of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* sp. *Ann. Agric. Environ. Med.* 5 (2):135-138.

Björkman, C., C. Svensson, B. Christensson y K. de Verdier. 2003. *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in calf diarrhoea in Sweden. *Acta Vet. Scand.* 44(3-4):145-52.

Bornay-Llinares, F.J., A.J. da Silva, N.S. Moura, P. Myjak, H. Pietkiewicz, W. Kruminis-Lozowska, T.K. Graczyk y N.J. Pieniazek. 1999. Identification of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecular methods. *Appl. Envir. Microbiol.* 65:1455-1458.



Casemore, D.P., M. Armstrong, R.L. Sands. 1985. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *J. Clin. Pathol.* 38:1337-1341

Couto, M.C.M, M.F. Lima y T.C.B. Bomfim. 2014. New *Cryptosporidium* parvum subtypes of Ila subfamily in dairy calves from Brazil. *Acta Tropica.* 130:117-122

Couto, M.C.M y T.C.B. Bomfim. 2012. Espécies de *Cryptosporidium* que infectam bovinos: Características etiológicas e epidemiológicas. *Vet. Not. Uberlândia.* 18(2): 94-109. ISSN: 1983-0777.

Chalmers, R.M. y F. Katzer. 2013. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends Parasitol.* 29(5):237-251.

Chirinos, Y. M. Rojas, G, Salinas, G. Bastidas, F. García. 2004. Frecuencia de criptosporidiosis en becerreros de diez fincas de la zona ganadera de Tucacas, estado Falcón Venezuela. *Rev. Fac. Cienc. Vet.* 45(1):9-17.

Connelly, J.T., S.R. Nugen, W. Borejsza-Wysocki, R.A. Durst, R.A. Montagna y A.J. Baeumner. 2008. Human pathogenic *Cryptosporidium* species bioanalytical detection method with single oocyst detection capability. *Anal. Bioanalytical Chem.* 391:487-495.

De Graaf, D.C., E. Vanopdenboscha, L.M. Ortega-Mora, H. Abbassi, y J.E. Peeters. 1999. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int. J. Parasitol.* 30(29): 1269-1287.

Del Coco V.F., M.A. Córdoba y J.A. Basualdo. 2009. Criptosporidiosis: Una zoonosis emergente. *Rev. Argentina Microbiol.* 41(3):185-196.

Delgado, G.R., M.L. Mijangos, A.S. Avila, V.G. Martínez, y V.J. Espinoza. 2007. Criptosporidiosis en becerras Holstein con diarrea de la Comarca Lagunera, México. XVI Congreso Nacional de Patología Veterinaria. Mazatlán, Sin., México.

Díaz de Ramírez, A. 2002. Criptosporidiosis en el Ganado Bovino. Memorias XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. Valera 22 al 26 de Octubre. ULA-Trujillo.

Eisenberg, J.N., X. Lei, A.H. Hubbard, M.A. Brookhart y Jr.J.M. Colfors. 2005. The role of disease transmission and conferred immunity in outbreaks: Analysis of the 1993 *Cryptosporidium* outbreak in Milwaukee, Wisconsin. *Am. J. Epidemiol.* 161:62-72.

Emre, Z., B.M. Alabay, H. Fidanci, A. Duzguny 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. Vet. Anim. Sciences.* 22:453-457.

Fayer, R., M. Santin, J.M. Trout y E. Greiner. 2006. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Vet. Parasitol.* 135(2):105-112.

Fayer, R., M. Santin y J.M. Trout. 2008. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet. Parasitol.* 156(3-4):191-198.

Fayer, R., M. Santin y J.M. Trout. 2009. 2. *Cryptosporidium* in cattle: From observing to Understanding. En: Ortega-Pierres, M.G., S. Cacció, R. Fayer, T. Mank y H. Smith. *Giardia and Cryptosporidium: From molecules to disease*. CAB International 2009. Pp 12-24.

Fayer, R., M. Santin y L. Xiao. 2005. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J Parasitol.* 91(3):624-629.

Fayer R. y L. Xiao. 2007. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Second Edition. CRC Press. ISBN 9781420052268.

Feng, Y., W. Yang, U. Ryan, L. Zhang, M. Kvac, B. Koudela, D. Modry, N. Li, R. Fayer y L. Xiao. 2011. Development of a multilocus sequence tool for typing *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *J. Clin. Microbiol.* 49:34-41.

Fischer, O. 1982. Cryptosporidiosis in calves during the period of milk nutrition. *Vet. Med. (Praha).* 27(8):465-471.

Fitz-Sánchez E., R. Rosario-Cruz, R. Hernández-Ortiz, E. Hernández-Castro, E. Rodríguez-Bataz y Z. García-Vázquez. 2013. *Cryptosporidium parvum*: prevalencia y factores de riesgo en becerros del municipio de Cuajinicuilapa, Guerrero, México. *Vet. Zootec.* 7(1):ISSN 2011-5415.

García, L.S., D.A. Bruckner, T.C. Brewer y R.Y. Shimizu. 1983. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 18:185-190.

Garro, C.J., G. Morici, M.L. Tomazic y L. Schnittger, L. 2014. Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en terneros lactantes. *Rev. Argentina Prod. Anim.* 34(Supl. 1):45-75.

Hashim, A.G., B.B. Mulcahy y C. Marguerite. 2006. Interaction of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* with primary human and bovine intestinal cells. *Infect Immun.* 74(1):99-107.

Henriksen, S.A. y J.F. Pohlenz. 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet. Scand.* 22(3-4):594-596.

Hernández, G.N. y V.J.A. Cortés. 2012. Prevalencia y factores de riesgo de *Cryptosporidium*spp. y *Giardiaspp.* en terneros de ganado lechero de la zona noroccidental de la Sabana de Bogotá. *Rev. Salud Pública.* 14(1):169-181.

Huang, C.C., L.C. Wang, C.H. Pan, C.H. Yang, C.H. Lai. 2014. Investigation of gastrointestinal parasites of dairy cattle around Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 47:70-74.

Hussein, A.S. 2011. *Cryptosporidium parvum* causes gastroenteritis epidemics in the Nablus region of Palestine. *Tropical Med. Internal. Healt.* 16(1):12-17.

Içen H., N.B. Arserim, N. Işik, C. Özkan y A. Kaya. 2013. Prevalence of four enteropathogens with immunochromatographic rapid test in the feces of diarrheic calves in east and southeast of Turkey. *Pak. Vet. J.* 33(4):496-499.

Iseki, M., T. Maekawa, K. Moriya, S. Uni y S. Takada. 1989. Infectivity of *Cryptosporidium muris* (Strain RN66) In various laboratory animals. *Parasitol. Res.* 75:218-222.

Kageruka, P., J.R. Brandt, H. Taelman y C. Jonas. 1984. Modified Köster staining method for the diagnosis of cryptosporidiosis. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 64(2): 171-175.

Knight, R. y S.G. Wright. 1978. Progress report intestinal protozoa. *Gut.* 19:940-953.

Kovatch, R.M. y J.D. White. (1972). Cryptosporidiosis in two juvenile *Rhesusmonkeys*. *Vet. Pathol.* 9:426-440.

Kuczynska, E., D. Shelton, y Y. Pachepsky. 2005. Bovine manure on *Cryptosporidium parvum* oocyst attachment to soil. *Appli. Environ. Microbiol.* 71(10):6394-6397.

Langkjaer, R.B., H. Vigre, H.L. Enemark, y C. Maddox-Hyttel. 2007. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology.*134(3): 339-350.

Lee, S.U., M. Joung, T. Nam, W.Y. Park., Y.H. Ji, y J.R. Yu. 2011. *Cryptosporidium parvum*: radiation-induced alteration of the oocyst proteome. *Exp. Parasitol.*127(1):25-30.

Lindsay, D.S., Upton, S.J., Owens, D.S., Morgan, U.M., Mead, J.R. y Blagburn, B.L. (2000). *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47(1):91-95

Maikai, B.V., J.U. Umoh, J.K. Kwaga, I.A. Lawal, V.A. Maikai, V. Cama y L. Xiao. 2011. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in native breeds of cattle in Kaduna State, Nigeria. *Vet. Parasitol.* 178(3-4): 241-245.

Masuno, K., T. Yanai, A. Hirata, K. Yonemaru, H. Sakai, M. Satoh, T. Masegi y. Nakai. 2006. Morphological and immunohistochemical features of *Cryptosporidium andersoni* in cattle. *Vet. Pathol.* 43(2):202–207.

McNabb, S.J.N., D.M. Hensel, D.F. Welch, H. Heijbel, G.L., Mckee y G.R. Istre. 1985. Comparison of sedimentation and flotation techniques for identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in a large outbreak of Human diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 22(4):587-589.

Mittal, S., M. Sharma, U. Chaudhary y A. Yadav. 2014. Comparison of ELISA and microscopy for detection of *Cryptosporidium* in stool. *J. Clin. Diagnostic Res.* 8(11):DC07-DC08. DOI: 10.7860/JCDR/2014/9713.5088

Moon, H.W., A.W. McClurkin, R.E., Isaacson, J., Pohlenz, S.M., Skartvedt, K.G. Gillette y A.L. Baetz. 1978. Pathogenic relationships of rotavirus, *Escherichiacoli*, and other agents in mixed infections in calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173(5Pt 2): 577-583.

Mohammed, A., R. Gholamreza, M. Gholamreza, y N. Abolghasen. 2013. Prevalence and molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned dairy calves in Mashhad Area, Khorasan Razavi Province, Iran. *Iranian J Parasitol.* 8(4):601-607.

Morin, M., S. Lariviere y R. Lallier. 1976. Pathological and microbiological observations made on spontaneous cases of acute neonatal calf diarrhea. *Can. J. Comp. Med.* 40(3):228-240.

Nime, F.A., J.D. Burek, D.L. Page, M.A. Holscher y J.H. Yardley. 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology.* 70(4): 592-598.

Ortolani, E.L. y S.P. Castro. 2003. Aspectos epidemiológicos de la criptosporidiosis en becerros de rebaños lecheros. *Parasitol. Latinoam.* 58: 122-127.

Pancier, R.J., R.W. Thomassen, y F.M. Garner. 1971. Cryptosporidial infection in a Calf. *Vet. Pathol.* 8:479-484.

Pavlasek, I. 1982. First detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in calf faeces by floatation method. *Folia Parasitol (Praha).* 29(2):115-118.

Pohlenz, J., H.W. Moon, N.F. Cheville y W.J. Bemrick. 1978a. Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhea of calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172(4): 452-457.

Pohlenz, J., W.J. Bemrick, H.W. Moon y N.F. Cheville. 1978b. Bovine cryptosporidiosis: A transmission and scanning electron microscopic study of some stages in the life cycle and of the host-parasite relationship. *Vet. Pathol.* 15:417-427.

Powell, H.S., M.A. Holscher, J.E. Heath y F.F. Beasley. 1976. Bovine cryptosporidiosis (a case report). *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 71(2): 205-207.

Qi, M.Z., Y.Q., Fang, X.T., Wang, L.X., Zhang, R.J., Wang, S.Z., Du, Y.X., Guo, Y.Q., Jia, Q.D., Liu, y G.H. Zhao, 2015. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned calves in Shaanxi Province, Northwestern China. *J. Med. Microbiol.* 64:111-116.

Ramirez N.E., L.A. Ward, y S. Sreevatsan. 2004. A review of the biology and epidemiology of criptosporidiosis in humans and animals. *Microbes Infect.* 6:773-785.

Ramsay, C.N., A.P. Wagner, C. Robertson, H.V. Smith y K.G.J. Pollock. (2014). Effects of drinking-water filtration on *Cryptosporidium* seroepidemiology, Scotland. *Emerg. Infect. Dis.* 20(1):70-76. [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid).

Romero-Salas, D., C. Alvarado-Esquivel, A. Cruz-Romero, M. Aguilar-Domínguez, N. Ibarra-Priego, J.O. Merino-Charrez, A.A. Pérez de León, y J. Hernández-Tinoco. 2016. Prevalence of *Cryptosporidium* in small ruminants from Veracruz, Mexico. *BMC Vet. Res.* 12:14 DOI: 10.1186/s12917-016-0638-3.

Ryan, U., R. Fayer y L. Xiao. 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitol.* 141(13):1667-1685. DOI: 10.1017/S0031182014001085.

Sanford, S.E. y G.K. Josephson. 1982. Bovine cryptosporidiosis: Clinical and pathological findings in forty-two scouring neonatal calves. *Can. Vet. J.* 23(12):343-347.

Santin, M., J.M. Trout, y R. Fayer. 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Vet. Parasitol.* 155(1-2):15-23.

Schroeder, M.E., M.A. Bounpheng, S. Rodgers, R.J. Baker, W. Black, H. Naikare, B. Velayudhan, L. Sneed, B. Szonyi, y A. Clavijo. 2012. Development and performance evaluation of calf diarrhea pathogen nucleic acid purification and detection workflow. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24(5):945-953.

DOI: 10.1177/1040638712456976

Singh, B.B., R. Sharma, H. Kumar, H.S. Banga, R.S., Aulakh, J.P. Gill y J.K. Sharma. 2006. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in Punjab (India) and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Vet. Parasitol.* 140(1-2):162-165.

Šlapeta, J. 2011. Naming of *Cryptosporidium pestis* is in accordance with the ICZN Code and the name is available for this taxon previously recognized as *C. parvum* 'bovine genotype'. *Vet. Parasitol.* 177(1-2):1-5.

Smith, H.V., R.A.B. Nichols, M. Mallon, A. Macleod, A. Tait, W.J. Reilly, L.M. Browning, D. Gray, S.W.J. Reid y J.M. Wastling. 2005. Natural *Cryptosporidium hominis* infections in Scottish cattle. *Vet. Rec.* 156:710-711.



Snyder, S.P., J.J. England y A.E. McChesney. 1978. Cryptosporidiosis in immunodeficient Arabian foals. *Vet. Pathol.* 15:12-17.

Tyzzar, E.E. 1907. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 5:12-13.

Tyzzar, E.E. 1910. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (Gen. et Sp. Nov.) of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Res.* 23:487.

Tyzzar, E.E. 1912. *Cryptosporidium parvum* (Sp. Nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. f. Protistenk.* 26:394.

Tzipori, S. y G. Widmer. 2008. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends Parasitol.* 24(4):184–189. DOI: 10.1016/j.pt.2008.01.002.

Vitovec, J. 1982. Morphological identification of cryptosporidia in the intestines of calves using light and scanning electron microscopy. *Vet. Med. (Praha)* 27(7):419-424.

Wang, R., X. Zhang, H. Zhu, L. Zhang, Y. Feng, F. Jian, C. Ning, M. Qi, Y. Zhou, K. Fu, Y. Wang, Y., Sun, Q. Wang y L. Xiao. 2011. Genetic characterizations of *Cryptosporidium* spp and *Giardia duodenalis* in humans in Henan, China. *Exp. Parasitol.* 127(1):42-45.

Willson, P.J. y S.D. Acres. 1982. A comparison of dichromate solution floatation and fecal smears for diagnosis of cryptosporidiosis in calves. *Can. Vet. J.* 23(8):240-246.

Xiao, L., R. Fayer, U. Ryan y S.J. Upton. 2004. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent advances and implications for Public Health. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(1):72-97.

