

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



Estudio inmunoabsorbente ligado a enzimas de
Cryptosporidium parvum en vacas y vaquillas Holstein
aparentemente sanas, durante el parto.

Por

Tanya María Mora Salas

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

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



Estudio inmunoabsorbente ligado a enzimas de
Cryptosporidium parvum en vacas y vaquillas Holstein
aparentemente sanas, durante el parto.

Por

Tanya María Mora Salas

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

TESIS

ESTUDIO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMAS DE
CRYPTOSPORIDIUM PARVUM EN VACAS Y VAQUILLAS
HOLSTEIN APARENTEMENTE SANAS, DURANTE EL PARTO.

APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR DE REVISIÓN

PRESIDENTE DEL JURADO

MCV RAMÓN A. DELGADO GONZÁLEZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL
DE CIENCIA ANIMAL

MC. JOSE LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELIAS

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO DE 2007

ESTUDIO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMAS DE
CRYPTOSPORIDIUM PARVUM EN VACAS Y VAQUILLAS
HOLSTEIN APARENTEMENTE SANAS, DURANTE EL PARTO.

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

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESIDENTE:

MCV RAMÓN A. DELGADO GONZÁLEZ

VOCAL:

MVZ J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

VOCAL:

MC JOSÉ LUIS F. SANDOVAL ELÍAS

VOCAL SUPLENTE:

MC FRANCISCO J. CARRILLO MORALES

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO DE 2007

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo y agradezco cada uno de mis logros pasados y futuros a Dios, por dejarme vivir, por darme esta familia y amigos y ser el verdadero responsable de todo lo bueno que me ha pasado.

Agradezco también, con cariño, a mi Alma Mater, por permitirme lograr el sueño que me ha acompañado desde que tengo memoria: ser Médico Veterinario. Gracias a todos los que han participado en mi formación profesional de una u otra manera: profesores, compañeros e incluso a todos los animales cuyas vidas se sacrificaron para mi aprendizaje.

Doy muy especiales gracias al MCV Ramón Alfredo Delgado González por su paciencia, comprensión y ayuda para lograr las metas que nos propusimos. No puedo pensar en un mejor asesor, más comprometido y sobre todo preparado. Muchas gracias profe.

Hago este agradecimiento extensivo a los profesores que especialmente me ayudaron a lograr este trabajo, el MVZ José Guadalupe Rodríguez Martínez, el MC José Luis Francisco Sandoval Elías y el MC Francisco Javier Carrillo Morales, por sus atinadas correcciones y apoyo.

Así, también agradezco a los propietarios y encargados de los establos en que me permitieron realizar esta investigación. Y sobre todo a los trabajadores de cada uno, que sin su apoyo jamás hubiera logrado terminar este trabajo. Gracias a todos por su mente abierta a la investigación en la región, que nos beneficia tanto a todos.

Quiero dedicar este trabajo y mi carrera entera a mis padres, Amorita Ivonne Salas Westphal y Jorge Raúl Mora Cantellano, quienes me apoyaron siempre, confiaron en mi cada vez que salía a las 6 de la mañana a una práctica o

regresaba a las 10 de la noche (y aclaro: siempre fue verdad), que comprendieron las rarezas de la carrera al grado de solo suspirar y resignarse cuando llagaba con perros operados para cuidar, muestras raras para guardar en el refri o hasta la vez que herví una cabeza de caballo en la estufa y con la olla de la sopa. Muchas gracias por todo papá, sobre todo por tu ejemplo de paciencia y comprensión, por ser tan generoso y confiado. Y muchas gracias mamá, por tu ejemplo de esfuerzo, trabajo duro y honestidad; y admito que si influyó tu imagen en mi sueño de ser veterinaria. Los quiero mucho a los dos.

No puedo dejar aparte a mi más grande pilar: Fidel Rubio Moncayo, mi confidente y mayor sostén. Ya sabes más de Crypto (y veterinaria en general) que yo. Mi tesis, mi carrera y mi vida hubieran sido horribles sin ti. Eres tu quien aguantó todas mis quejas y desilusiones, mis ataques de nervios y mi neurosis. Gracias también por tu ejemplo de fortaleza, generosidad y por atreverte a darme un zape cuando lo necesitaba. Gracias por compartir mi pasión: juntos aprendimos a usar ELISA, nos fuimos a Misiones a vacunar cerdos, me ayudaste a descarnar cabezas, a estudiar temas que no te interesaban, en fin, vivimos esta aventura juntos. Te amo Pastel.

A mi hermana Amorita Ivonne Mora Salas porque cada día es un poco más paciente y también le tocó aguantar estoicamente las locuras que a veces pasaban en la casa, a veces siendo la única que lo veía con sentido del humor.

Agradezco también la infinita comprensión, apoyo y paciencia de mis compañeros María de Lourdes Balcázar Esparza, que me llevó a cada establo que conozco y juntas vivimos tantas aventuras en las carreteras de La Laguna; Dania Montserrat Pérez Soto que pacientemente escuchó cada uno de los mil comentarios sobre Crypto aunque no tuvieran nada que ver con ella; Abraham Neftalí Fuentes Parra, quien hizo mas de mi tesis que de la suya propia demostrando siempre gran entrega y generosidad y a Emilio Arturo Castrejón Barrios que siempre logró aligerar los momentos tensos aunque fuera cantando.

Gracias a todos ellos, pues son los que verdaderamente aguantaron mi histeria de titulación.

Y por último, pero no menos importante, no quiero dejar de agradecer a mi mejor amiga Liliana Díaz Burciaga, que casi vomitaba cada vez que me acompañaba a algo pero que nunca desistió, a Indhira Ávila, Elena Rangel, Ángel Luna y en general a todos mis amigos y amigas por su comprensión mientras yo no tenía tiempo de hacer nada y por no dejarme atrás a pesar del tiempo que llevamos sin vernos.

Gracias a todos los que siempre estuvieron ahí. Gracias a todos los que participaron de algún modo. Muchas gracias a todos.

RESUMEN

Se realizó un muestreo en 7 hatos lecheros de la Comarca Lagunera con prevalencia conocida de criptosporidiosis crónica en becerras, con la finalidad de identificar a las vacas y vaquillas positivas a la presencia de *Cryptosporidium parvum* como factores de riesgo para la infección en becerras lactantes. Se tomaron 93 muestras de heces de vacas y vaquillas con un máximo de 24 horas después del parto, todas ellas aparentemente sanas. Las muestras se analizaron con la prueba inmunoabsorbente ligada a enzimas con un paquete de diagnóstico comercial. No se observaron muestras positivas. Se discuten los resultados y se sugieren estudios con diferentes técnicas de diagnóstico para descartar que las vacas y vaquillas aparentemente sanas durante el parto puedan ser un vector de transmisión de *Cryptosporidium parvum*.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Dedicatorias y Agradecimientos	i
Resumen	iv
I Introducción	1
II Antecedentes	3
2.1 Etiología	4
2.1.1 Ciclo Biológico	5
2.1.2 Morfología	6
2.2 Epidemiología	8
2.2.1 Factores de Riesgo	8
2.2.2 Transmisión y Patogenia	9
2.3 Signos y Lesiones	11
2.4 Diagnóstico	12
2.5 Control	15
2.5.1 Prevención	16
2.5.2 Tratamiento	17
III Justificación	19
IV Objetivos	20
4.1 Objetivo General	20
4.2 Objetivos Específicos	20
V Material y Métodos	21
5.1 Marco de Referencia	21
5.2 Fase de Campo	21
5.3 Fase de Laboratorio	22
5.3.1 Depósito de las Muestras	22
5.3.2 Primer Lavado	23
5.3.3 Depósito del Conjugado	23
5.3.4 Segundo Lavado	23
5.3.5 Revelado	24
5.3.6 Lectura	24
5.3.7 Criterio de Evaluación	24
5.3.8 Interpretación	24
VI Resultados y Discusión	26
VII Conclusión	29
Anexos	30
VIII Bibliografía	33

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Cryptosporidium</i>	4
Cuadro 2. Especies nombradas de <i>Cryptosporidium</i>	5

I INTRODUCCIÓN

Cryptosporidium spp. es un parásito entérico obligado del *Phylum* Apicomplexa que infecta la región de las microvellosidades de las células epiteliales de los órganos digestivos, respiratorios y biliar, afectando a una amplia variedad de hospedadores vertebrados, incluyendo al humano, y es una importante causa de enfermedades diarreicas en el mundo (Hashim y col., 2006; Fayer y Ungar, 1986). Numerosos reportes de infecciones individuales, brotes en rebaños e inspecciones regionales de ganado indican que la criptosporidiosis bovina está distribuida en todo el mundo. Es encontrada en varias razas lecheras y de carne, es muy común en becerros jóvenes y está asociada a menudo con diarrea (Fayer y Ungar, 1986).

El modo de infección es por vía fecal-oral, en alimentos y agua, y es iniciada cuando los esporozoitos son liberados de los oocistos, éstos se fijan al tracto intestinal e invaden las células epiteliales de la mucosa (Hashim y col., 2006). Los becerros recién nacidos son particularmente susceptibles a la infección y pueden excretar millones de oocistos cuando desarrollan la criptosporidiosis. Estudios recientes indican que en animales adultos, el ganado asintomático también excreta oocistos, y el total del número excretado puede ser considerable debido a la cantidad de heces producidas (Kuczynska y col., 2005). Los individuos afectados han demostrado una gran variedad de manifestaciones clínicas, éstas comúnmente se presentan en individuos jóvenes de la población de los hospedadores (Fayer y Ungar, 1986).

En cuanto al diagnóstico de la criptosporidiosis, la prueba de *Western blot* es bastante sensible y es considerada como referencia o “prueba de oro”. Esta prueba es técnicamente difícil y muy laboriosa, y para una óptima separación de antígenos se requiere un gel de poliacrilamida. Son necesarias nuevas pruebas capaces de analizar gran número muestras y de cuantificación rápida para estudios de poblaciones infectadas con *C. parvum* (Priest y col., 1999).

La infección de *C. parvum* en animales y humanos provoca el desarrollo de una respuesta de anticuerpos característica mediada por inmunoglobulinas G, M y A en contra de los antígenos parasitarios de baja masa molecular en el rango de 27- y 17-kDa (Moss y col., 1998; Peeters y col., 1992). Esto permite el desarrollo de una prueba de inmunoabsorbencia ligada a enzimas (ELISA) para la detección de estos antígenos o de los anticuerpos específicamente.

En becerras los factores de riesgo para la infección son el agua y alimentos, aunque también se menciona la eliminación de oocistos por los animales adultos (Díaz de Ramírez y col., 2002). En la Comarca Lagunera, estudios previos para la detección de oocistos en vacas y vaquillas antes del parto, con la técnica de Ziehl Neelsen modificada, no evidenciaron la presencia del parásito, por lo tanto en este estudio se pretende identificar antígeno del parásito utilizando la técnica de ELISA.

II ANTECEDENTES

Estos protozoarios intracelulares obligados de 2 a 6 μm , dependiendo de la etapa del ciclo de vida en que se encuentren, fueron durante mucho tiempo solo una curiosidad biomédica. Antes de 1980, las infecciones con especies de *Cryptosporidium* eran consideradas raras en animales, y en humanos se pensaba que eran el resultado de un patógeno oportunista poco conocido en individuos inmunodeficientes. A principios de 1982 el concepto sobre este parásito protozoario cambió, al considerarlo una importante causa de enfermedades diarreicas en humanos y algunos animales domésticos (Current y García, 1991).

Estudios sobre las características estructurales de los oocistos, realizados entre 1961 y 1986, resultaron en el nombramiento de aproximadamente 19 especies de *Cryptosporidium* de peces, reptiles, aves y mamíferos (Fayer y Ungar, 1986).

Cryptosporidium spp. es un patógeno específico, sin embargo llega a adaptarse, por ejemplo, el hospedador de *C. felis* es el gato, pero esta especie también puede ser aislada en vacas (Bornay-Llinares y col., 1999) y *C. parvum* puede causar enfermedad a personal de laboratorio, estudiantes de veterinaria y trabajadores de los establos, aunque se reconoce como una infección que se observa principalmente en los becerros jóvenes (Fayer y Ungar, 1986).

Se considera generalmente que los becerros de leche y de carne presentan el mayor riesgo por su número, distribución, incidencia de infecciones y niveles altos de excreción de oocistos. Los becerros neonatos son particularmente sensibles a la infección y pueden excretar hasta 30 mil millones de oocistos o más en un periodo de 1 a 2 semanas (Kuczynska y Shelton, 1999). Una granja de ganado vacuno está considerada como una gran fuente de oocistos de *Cryptosporidium parvum* ya que están ampliamente distribuidos en el ambiente de muchas explotaciones ganaderas, y son ingeridos por el ternero recién nacido

(Anusz y col., 1990). Además estudios recientes indican que becerros después del destete y ganado adulto asintomático también excretan oocistos (Kuczynska y col., 2005).

2.1 Etiología

Cada especie o genotipo de *Cryptosporidium* tiene una especificidad hospedatoria diferente. Actualmente, la identificación de *Cryptosporidium* spp. y sus genotipos es hecha en su mayoría por PCR-RFLP o análisis de secuencia de antígenos y genes estructurales (Lowery y col., 2000; Spano y col., 1997; Sturbaum y col., 2001).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Cryptosporidium* (Current y García, 1991).

Clasificación	Nombre	Características biológicas
Phylum	Apicomplexa	Las formas invasivas tienen complejo apical con anillos polares, roptrias, micronemas, conoides y microtúbulos subpeculiares.
Clase	Sporozoasida	La locomoción de las formas invasivas se da por flexión deslizante del cuerpo u ondulación.
Subclase	Coccidiasina	Ciclo sexual con merogonias, gametogonias y esporogonias.
Orden	Eucoccidiorida	Merogonias presentes, se encuentran en hospedadores vertebrados.
Suborden	Eimeriorina	Los gametos masculino y femenino se desarrollan independientemente.
Familia	Cryptosporidiidae	Monoxeno (ciclo de vida en un solo hospedador) con etapas de desarrollo solo debajo de la membrana de la célula hospedadora; oocistos con cuatro esporozoitos; microgametos sin flagelos.

Cuadro 2. Especies nombradas de *Cryptosporidium* (Fayer y Ungar, 1986).

Especie	Autor	Hospedador
<i>C. agni</i>	Barker y Carbonell, 1974	<i>Ovis aries</i> (oveja doméstica)
<i>C. ameivae</i>	Arcay de Peraza y Bastardo de San Jose, 1969	<i>Ameiva ameiva</i> (lagartija)
<i>C. anserinum</i>	Proctor y Kemp, 1974	<i>Anser anser</i> (ganso doméstico)
<i>C. baileyi</i>	Current, Upton y Haynes, 1986	<i>Gallus gallus</i> (pollo doméstico)
<i>C. bovis</i>	Barker y Carbonell, 1974	<i>Bos taurus</i> (bovino europeo)
<i>C. crotali</i>	Triffit, 1925	<i>Crotalus confluens</i> (víbora)
<i>C. ctenosauris</i>	Duszynski, 1969	Lagartija costarricense
<i>C. cuniculus</i>	Inman y Takeuchi, 1979	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (conejo doméstico)
<i>C. felis</i>	Iseki, 1979	<i>Felis catis</i> (gato doméstico)
<i>C. garnhami</i>	Bird, 1981	<i>Homo sapiens</i> (hombre)
<i>C. lampropeltis</i>	Anderson, Dusynski, Marquardt, 1968	<i>Lampropeltis calligaster</i> (lagartija)
<i>C. meleagridis</i>	Slavin, 1955	<i>Meleagris gallopavo</i> (pavo)
<i>C. muris</i>	Tyzzler, 1907	<i>Mus musculus</i> (ratón doméstico)
<i>C. natorum</i>	Hoover, Hoerr, Carlton, Hinsman y Ferguson, 1981	<i>Naso literatus</i> (pez)
<i>C. parvum</i>	Tyzzler, 1912	<i>Mus musculus</i> (ratón doméstico)
<i>C. rhesi</i>	Levine, 1981	<i>Macaca mulatta</i> (mono rhesus)
<i>C. serpentis</i>	Levine, 1981	Víboras colúbridas y crotálicas
<i>C. tyzzeri</i>	Levine, 1961	<i>Gallus gallus</i> (pollo doméstico)
<i>C. vulpis</i>	Wetzel, 1938	<i>Vulpes vulpes</i> (zorra común europea)

2.1.1 Ciclo Biológico

El ciclo biológico (Figura 1) comienza por la ingestión y la desenquistación de los oocistos en el tracto gastrointestinal del hospedador, liberándose de cada uno de ellos cuatro esporozoitos con una pared de doble capa; la pared de los oocistos de *Cryptosporidium* spp. es similar al de las otras coccidias, tienen una capa interna y otra externa que se abren y los esporozoitos salen del oocisto. Una vez liberados los esporozoitos (Figura 2) alcanzan el borde luminal de los enterocitos mediante movimientos de contracción, extensión y deslizamiento. Allí se invaginan siendo englobados por la membrana de la célula hospedadora, que encapsula al parásito en el interior de la vacuola parasitófora y se desarrolla a

estadio de trofozoito. Éste, pasa a merogonia, que es la fase donde ocurre la multiplicación asexual dentro de las células del hospedero (ectomerogonia), se forman 8 ó 4 merozoitos dependiendo de si es una esquizogonia de I o II generación. Se reconoce la existencia de dos tipos de esquizonte, el de tipo I es el primero en aparecer en el ciclo biológico y tiene 8 merozoitos, el tipo dos cuenta con 4 merozoitos. Los tipo I pueden generar nuevas merogonias de primera generación o formar merozoitos tipo II, de éstos se desarrollan los macro y los microgametos, la mayoría de los merozoitos tipo II que entran en las células hospedadoras forman macrogametos, y solo unos cuantos forman microgametos, que contienen 16 microgametocitos en su interior; se cree que la temperatura corporal de los mamíferos (+/- 37°C), las sales biliares y posiblemente la tripsina son los factores que más influyen en esta fase. Los microgametos no tienen flagelo y se unen a los macrogametos gracias al flujo intestinal. Esto lleva a que los microgametocitos fertilicen a los macrogametocitos. La unión de macro y microgametocitos produce la formación de la pared de los oocistos, que genera su resistencia al medio ambiente y así logran transmitirse de un hospedador a otro. En el oocisto se formarán esporozoitos infectivos dentro de su pared. Los oocistos son arrojados por las heces (Current y García, 1991).

2.1.2 Morfología

Los trofozoitos (Figura 3) son formas intracelulares ovales o redondas de núcleo grande, y éstos y todas las formas de desarrollo subsecuentes tienen una vacuola parasitófora rodeada de la membrana de la célula hospedadora. Los trofozoitos se caracterizan por un núcleo grande, 1.0 a 1.3 μm de diámetro, que contiene un nucleolo también grande, y por la ausencia de las estructuras del complejo apical, que caracteriza a esporozoitos y merozoitos. Mientras el núcleo se replica, el *Cryptosporidium* spp. pasa de la fase de trofozoito uninuclear a la de meronte (esquizonte) multinuclear. Dos tipos de merontes físicamente diferentes de 4 a 5 μm de diámetro parecen desarrollarse secuencialmente (Fayer y Ungar, 1986).

Los merontes I (Figura 4) se desarrollan como la primera generación asexual de trofozoitos o merozoitos que dejan un meronte tipo I e invaden nuevas células hospederas. Los merontes tipo I producen de 6 a 8 merozoitos que brotan de una región distintiva conocida como la “zona de unión” u “organelo de alimentación”, donde el meronte interactúa con la célula hospedadora (Fayer y Ungar, 1986).

Los merontes tipo II (Figura 5) se desarrollan de los merozoitos tipo I: producen 4 merozoitos y de cualquier forma parecen similares al meronte tipo I. Los merozoitos tipo I y II aparentan ser morfológicamente idénticos. Tienen forma de media luna con las partes anterior y posterior redondeadas y miden alrededor de 5 a 1 μm . Contienen un único núcleo vesicular, retículo endoplásmico, y una variedad de gránulos no identificados. Como la mayoría de los merozoitos coccidianos, en la parte anterior hay organelos como conoides, un anillo polar, roptrías y micronemas, pero no tienen cuerpos retráctiles, mitocondrias, microporos, o gránulos polisacáridos (Fayer y Ungar, 1986).

Los microgamontes no son encontrados frecuentemente, aparentemente son etapas masculinas de vida corta. Observados ultraestructuralmente, en etapa temprana contienen partes condensadas de núcleos, ribosomas, retículo endoplásmico y vacuolas ligadas a la membrana. Los núcleos esféricos condensados o compactos son encontrados solo en la periferia de una masa citoplásmica granulosa, mas no en la zona de unión. En el desarrollo posterior los núcleos de los microgametos se mueven hacia fuera del citoplasma del microgametocito hacia la vacuola parasitófora (Fayer y Ungar, 1986).

De 14 a 16 microgametos se desarrollan de un microgametocito, que puede alcanzar de 4 a 5 μm de diámetro. Los microgametocitos maduros de *Cryptosporidium* spp. tienen forma de cuña con el polo apical aumentado y cubierto por una membrana externa de doble pared que cubre una membrana interna del polo apical. El polo apical es también un anillo polar del cual los

microtúbulos se extienden posteriores en arreglo paralelo entre las membranas interna y externa. Un núcleo compacto abarca la mayor parte del cuerpo elongado, y a la mitad del cuerpo una mitocondria grande está a un lado del núcleo (Fayer y Ungar, 1986).

Las formas muy jóvenes del macrogamonte (Figura 6), la etapa femenina, son indistinguibles de los trofozoitos. Los macrogamontes son casi esféricos, contienen un único núcleo grande y retículo endoplásmico, y están rodeados por una doble membrana. Debajo del citoplasma del microgamonte hay un organelo de alimentación. Los macrogamontes más maduros, de 3.2 a 5µm de diámetro, se distinguen por una variedad de gránulos (Fayer y Ungar, 1986).

2.2 Epidemiología

2.2.1 Factores de Riesgo

- a) Tamaño del hato. Existe una relación directa entre el número de animales del hato y el riesgo de infección (Garber y col., 1994). El riesgo es latente en aquellas explotaciones con alta carga animal, donde el hacinamiento favorece la transmisión del parásito. La alta carga animal contribuye a que los becerros permanezcan por más tiempo, favoreciendo la acumulación de oocistos y contribuyendo a la contaminación del ambiente. Lo anterior justifica que la presentación clínica de la enfermedad esté asociada con la época del parto, observándose un marcado incremento en la incidencia de nuevos casos al final de la misma como consecuencia de la contaminación progresiva de la explotación a lo largo de la época de partos (De Graaf, 1999).
- b) Edad de los animales. Los becerros neonatos son en particular susceptibles a la infección por *Cryptosporidium parvum*, se ha observado el parásito en becerros de dos días de nacidos (Moore, 1991), pero la mayor prevalencia ocurre a las dos semanas de edad (Anderson, 1981). En animales mayores de un mes la excreción de oocistos disminuye sensiblemente (Xiao, 1994). También ha sido descrita la presencia del parásito en animales adultos, estos

casos generalmente cursan en forma subclínica y con bajos niveles de infección. Sin embargo, se han reportado altas prevalencias (Scott, 1995), y excreción de hasta 1.8×10^4 oocistos por gramo de heces en vacas aparentemente sanas (Scott, 1994), por lo que las vacas adultas juegan un papel esencial como reservorios de éste parásito (Fayer, 2000).

- c) Condiciones higiénicas, sanitarias y sistemas de manejo. El periodo neonatal resulta el mas importante para la exposición de la enfermedad, por ello las condiciones higiénico-sanitarias están en relación directa con el riesgo de la infección (Garber y col., 1994). En los sistemas de manejo donde los becerros están en contacto con otros el riesgo de transmitir la enfermedad es mayor, ya que se incrementa la probabilidad de transmisión del parásito entre animales infectados y susceptibles. Esta probabilidad aumenta en explotaciones donde el becerro es alimentado por la madre (Mohammed, 1999). Se sugiere que la exposición inicial ocurre en los parideros, como consecuencia de la eliminación fecal de los oocistos por vacas periparturientas (Faubert, 2000). Debido a lo anterior las vacas adultas asintomáticas pueden desempeñar un papel importante en la epidemiología de la criptosporidiosis en becerros (Scott, 1995).

2.2.2 Transmisión y Patogenia

Después de la ingestión del oocisto por el ternero recién nacido sigue un periodo de incubación de 72 a 96 horas, después del cual se observa la diarrea durante dos a diez días y durante este tiempo son observados los oocistos en las heces (Anusz y col., 1990). Por esto un gran número de oocistos pueden entrar al sistema de aguas después de una lluvia fuerte en pastizales o establos con animales infectados. Varios estudios demuestran que *C. parvum* es inocuo en el ambiente y que tiende a estar presente como un patógeno flotante en el agua, especialmente en donde los estándares de sanidad y la tecnología de tratamiento de agua son bajos (Current y García, 1991). Algunos oocistos de *C. parvum* agregados a muestras de agua pueden ser recuperados por filtros de alto volumen

diseñados para atrapar quistes del protozooario entérico *Giardia lamblia*. El uso y posterior acondicionamiento de técnicas de recuperación similares, en conjunto con métodos de detección inmunofluorescente, han resultado en la demostración de la existencia de oocistos de *Cryptosporidium* en la superficie del agua potable y en muestras de drenajes corrientes obtenidas de muchas regiones geográficas de los Estados Unidos y de otros países (Musial y col., 1987).

Los oocistos también se fijan a la tierra y al estiércol, por esto afectan frecuentemente a los bovinos en un modo complejo y teniendo implicaciones en el transporte de estos oocistos a través de las heces (Kuczynska y col., 2005).

A diferencia de otros oocistos coccidianos, los de *C. parvum* están completamente esporulados y listos para iniciar la infección inmediatamente después de la excreción (Current y García, 1991).

La infección por *C. parvum* se observa principalmente en los becerros jóvenes desde el nacimiento hasta los 30 días de edad (Fayer y Ungar, 1986), se le considera una de las mayores causas de diarrea neonatal en los terneros y se le atribuyen pérdidas económicas significativas en la industria ganadera de carne y de leche (Anusz y col., 1990).

Lippi y Castro (2003) examinaron 930 becerros en 43 rebaños en el estado de São Paulo, Brasil, constatando que 21,5% de los mismos presentaban heces diarreicas. Se observó que becerros agrupados en escala de edades de 8 a 15 días evidenciaron mayores frecuencias de diarrea. Con relación a la influencia de la edad en la presencia de diarrea en becerros con *Cryptosporidium*, las frecuencias mayores se observaron en las primeras tres semanas. Con relación a los portadores asintomáticos, no se encontraron positivos en la primera semana de vida y una gran parte de ellos se encontraron de la segunda a la cuarta semana de observación.

2.3 Signos y Lesiones

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

La enfermedad es caracterizada clínicamente por diarrea profusa y acuosa, a veces con secreciones mucoides teñidas con sangre, deshidratación, emaciación, anorexia, debilidad, letargia o tenesmo. La enfermedad es más severa y letal cuando se complica con otros enteropatógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., Rotavirus o Coronavirus en hospedadores inmunodeprimidos (Arslan y col., 2001). *Cryptosporidium* ha sido identificado como el segundo agente infeccioso más común de diarrea en becerros (Fayer y Ungar, 1986).

La mala absorción y la digestión deteriorada pueden resultar en un sobrecrecimiento de la microflora intestinal, un cambio en la presión osmótica a través de la pared del intestino y en el flujo de fluido dentro del lumen del intestino. La mala absorción y la digestión deteriorada también han sido reportadas en humanos infectados con *C. parvum*. La diarrea secretora común a la mayoría de los pacientes inmunodeficientes con criptosporidiosis sugiere una hipersecreción mediada por una toxina dentro del intestino (Current y García, 1991). Aunque el parásito normalmente se enquista en el intestino después de una o dos semanas la infección persiste en pacientes inmunodeficientes, con riesgo de muerte (Bankier y col., 2003).

La infección en el epitelio intestinal puede producir vellosidades romas, hiperplasia de la cripta, destrucción del citoesqueleto y disminución de la absorción de sodio (McCole y col., 2000). Con frecuencia el abomaso contiene leche coagulada sin digerir, el intestino delgado presenta enteritis congestiva con mucosa hiperémica mas no hemorrágica. El contenido intestinal en ocasiones es

amarillento y acuoso y puede haber acúmulo de gas en ciego y colon (Ortega y col., 1999).

2.4 Diagnóstico

El diagnóstico clínico de las infecciones por *Cryptosporidium* se ha basado primeramente en la detección de oocistos en heces. Gran variedad de métodos de concentraciones y tinciones químicas han sido reportados (Bronsdon, 1984; García y col., 1983; McNabb y col., 1985; Zierdt, 1984).

Una forma de diagnóstico de criptosporidiosis se realiza con la identificación de oocistos esféricos, de 4 a 5µm o los estadios intracelulares obtenidos por medio de una biopsia de la mucosa gastrointestinal. La tinción hematoxilina-eosina debería ser suficiente para identificar la morfología de los estadios del parásito intracelular y su localización dentro de las células del epitelio intestinal (Parisi y Tierno, 1995).

Las técnicas que se han desarrollado y optimizado tradicionalmente para el conteo de oocistos de *Cryptosporidium* en agua generalmente no son útiles para la enumeración de oocistos en heces de animales. Esto es por la gran cantidad de partículas y material fibrinoso presente en las heces (Anusz y col., 1990). Las dificultades en la detección y enumeración de oocistos en muestras fecales están compuestas por variaciones en la consistencia entre las muestras individuales, la cantidad de muestra utilizada y la cantidad de oocistos perdidos durante los procesos de recolección (Parisi y Tierno, 1995).

Los frotis de las heces teñidos con auramina-rodamina o la tinción de Zielh-Neelsen, que son muy sensibles y específicas (Rochelle y col., 1999), además de la tinción de Giemsa y Kinyoun modificada alcohol-ácido resistente (García y col., 1983) son aprovechados como herramientas para la identificación de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Aunque una técnica muy precisa es la coloración por el

método Zielh-Neelsen modificado para la detección de oocistos de *Cryptosporidium* en heces ya que sin el calentamiento del frotis se observan los oocistos, ácido resistentes, de color rojo brillante sobre un fondo azul (Parisi y Tierno, 1995). La tinción de Zeihl-Neelsen modificada alcohol-ácido resistente (MAFS) es recomendada para muestras de heces concentradas. Esta prueba es rápida, sensible y poco costosa. Particularmente cuando está presente un número bajo de oocistos (García y col., 1983).

Otras técnicas en heces incluyen la de flotación de Sheather en solución de glucosa en sulfato de zinc (36% saturado) o sedimentación con etilacetato de formalina. Esta solución permite un inmediato reconocimiento de los oocistos teñidos de color rosa usando un alto poder de magnificación, pero los oocistos empiezan a alterarse y a perder sus características esféricas. Otra técnica es por medio de la tinción fluorescente, que incluyen naranja de acridina, que causa fluorescencia en oocistos y levaduras; auramina-rodamina, que solo tiñe oocistos pero no siempre uniformemente; y auramina carbol fuscina, con la que también se distingue entre levaduras y *Cryptosporidium* spp. y es significativamente mejor que la tinción ácido resistente, pero no permite la visualización detallada (Fayer y Ungar, 1986).

Los métodos de inmunofluorescencia (García y col., 1983; Rosenblatt y Sloan, 1993) han aumentado la sensibilidad y especificidad sobre la de los métodos de tinción convencionales (Stibbs y Ongerth, 1986) especialmente cuando el número de oocistos en heces es bajo. Los estudios de prevalencia deben verse especialmente beneficiados con las pruebas de inmunofluorescencia, porque los individuos infectados asintómicamente pueden arrojar oocistos en pequeñas cantidades (Arrowood y Sterling, 1989). La técnica de detección de *Cryptosporidium* mediante inmunofluorescencia alcanza hasta un 100% de sensibilidad y de especificidad (Rochelle y col., 1999).

Los oocistos de *Cryptosporidium parvum* son detectados en tierra, agua y desechos animales usando inmunoglobulinas marcadas con fluorocromo, con microscopia fluorescente (Arrowood y Sterling, 1989).

En pacientes infectados con uno o más parásitos como *Giardia lamblia* y *C. parvum* se usan de rutina métodos de diagnóstico con tinción tricrómica y tinción ácido resistente modificada, aunque pueden ser insuficientes para demostrar la presencia de éstos organismos. El diagnóstico se puede comprobar con un paquete comercial inmunoenzimático que puede ser interpretado aproximadamente en 12 minutos, fijando en formalina con una sensibilidad de 98% y una especificidad de 100% (García y col., 2003).

La capacidad de separación inmunomagnética para los oocistos de *Cryptosporidium* sedimentados en muestras concentradas es mejor que la de flotación con Percoll-sucrosa. Se ha observado la recuperación de oocistos por flotación con Percoll-sucrosa de 10 a 96% usando varias matrices de sedimentos originarias de muestras de agua ambiental contaminada con oocistos (Bukhari y col., 1998).

Evaluaciones de microscopía inmunofluorescente directa (DFA) con muestras de heces de bovinos han mostrado que este procedimiento puede detectar concentraciones tan bajas como 1000 a 6000 oocistos por gramo de heces. Xiao y Herd (1993) usaron heces de becerros para determinar la sensibilidad de la prueba DFA. El material fecal de los becerros tiene un alto contenido de grasa, el uso de heces de becerro puede no ser representativo del desempeño de la DFA respecto al uso de heces de bovinos adultos. En humanos el alto contenido de grasa de las heces ha demostrado reducir la sensibilidad de la microscopía inmunofluorescente (Weber y col., 1992).

Una prueba de hemoaglutinación pasiva con sensibilidad comparable a la de detección de anticuerpos inmunofluorescentes (IFA) también ha sido descrita

(Anusz y col., 1990; Kehl y col., 1995; Parisi y Tierno, 1995; Rosenblatt, y Sloan, 1993; Rusnak y col., 1989; Xiao y Herd, 1993). De cualquier forma, la sensibilidad de la IFA puede ser influenciada por técnicas de concentración de oocistos y los extremos en la consistencia de o por la inclusión de procesos de lavado para la suspensión de las heces antes de la tinción (Xiao y Herd, 1993).

Para realizar estudios epidemiológicos para evaluar los riesgos de infección de *C. parvum* asociados al agua de bebida y otras fuentes potenciales de exposición son necesarias nuevas pruebas serológicas rápidas y sensibles. (Moss y col., 1998).

Las pruebas de ELISA han sido usadas también para diagnósticos coprológicos de criptosporidiosis (Anusz y col., 1990; Rosenblatt y Sloan, 1993).

Se ha reportado el desarrollo de dos pruebas de ELISA para la detección de anticuerpos para los antígenos 17- y 27-kDa. La prueba de ELISA para los anticuerpos del antígeno 27-kDa usa una forma recombinante del antígeno, mientras que la prueba para los anticuerpos del antígeno 17-kDa usa Triton X-114, un detergente extraído de los oocistos enriquecido con el antígeno 17-kDa nativo. Se ha visto que ambas pruebas son sensibles y específicas para la detección de anticuerpos específicos de antígenos comparadas con la “prueba de oro” Western blot (Parisi y Tierno, 1995; Priest y col., 1999).

2.5 Control

El control de esta enfermedad es difícil. Mientras que la mayoría de las especies de coccidias entéricas tienen una serie de etapas de desarrollo genéticamente programadas en su ciclo de vida y son incapaces de reciclarse en el huésped, *C. parvum* tiene dos etapas que inician la autoinfectación: merozoitos tipo I y esporozoitos derivados de oocistos de pared delgada. Se cree que ambas etapas infectantes del ciclo de vida de *C. parvum* son responsables del desarrollo

de infecciones severas en hospederos expuestos solamente a un numero reducido de oocistos de pared dura (Current y García, 1991).

2.5.1 Prevención

Para la prevención de la propagación de *Cryptosporidium* u otras coccidias se requiere la eliminación de los oocistos. Sin embargo, bajo condiciones favorables, los oocistos permanecen infectando durante largos periodos de tiempo. Los oocistos de *Cryptosporidium* spp. se almacenan en soluciones acuosas a 4°C, donde empiezan a perder su infectividad entre los 2 y 6 meses, pero pueden ser viables de 6 a 9 meses e infectivos en cultivos celulares hasta por 12 meses. Las temperaturas extremas afectan la viabilidad de los oocistos, a 65°C por 30 minutos pierden su capacidad de infectar. Con el calor húmedo se pierde su infectividad al calentarlo de 90 a 55°C entre 15 y 20 minutos. Esto podría usarse como guía de tratamiento para la comida o agua contaminada que no se conoce o que es sospechosa. Para la reducción potencial de los oocistos se debe limpiar el agua y comida de la contaminación con heces (Fayer y Ungar, 1986).

Los oocistos de *Cryptosporidium* son muy resistentes a los desinfectantes más comunes y pueden sobrevivir por meses en el frío y la humedad. Un estudio realizado para evaluar la eficiencia de desinfectantes comerciales demostró que la exposición al amonio (50% ó más) y formalina (10% ó más) por 30 minutos puede matar los oocistos de *Cryptosporidium*. Aunque solo el desarrollo de suficiente inmunidad por los animales puede detener el ciclo (Current y García, 1991).

En algunos estudios, el ozono (otro método muy usado para el tratamiento de agua) ha demostrado la eliminación de la infectividad de los oocistos de *Cryptosporidium*, cuando se mantuvo una concentración de 1 ppm por 10 minutos (Current y García, 1991).

2.5.2 Tratamiento

La criptosporidiosis entérica en hospederos inmunocompetentes es auto-limitante, y el estado inmunitario del hospedero parece ser lo que determina la severidad y duración de la infección (Current y García, 1991). Los terneros afectados necesitan cuidados intensivos y alojamiento en un ambiente seco y limpio, debe administrárseles antibiótico para prevenir infecciones secundarias y protectores de mucosa además de una terapia de fluidos para neutralizar y prevenir la deshidratación y la pérdida de electrolitos provocada por la diarrea (Moore y col., 2003).

Los probióticos son microorganismos viables no patógenos que cuando son ingeridos provocan efectos benéficos en la prevención y tratamiento de condiciones patológicas. Los mecanismos de acción que en general se han atribuido a los probióticos incluyen la competencia por los sitios de recepción en la superficie intestinal, estimulando el sistema inmunológico, la excreción de sustancias antimicrobianas y competencia con patógenos por los nutrientes intraluminales (Duggan y col., 2002). *Lactobacillus* y *Bifidobacteria* son las bacterias ácidas lácticas que normalmente se encuentran en los productos lácteos. Además, numerosos estudios *in vitro* en humanos y animales han ilustrado claramente el potencial preventivo y terapéutico que pueden presentar contra *C. parvum* (Foster y col., 2003).

Se ha tratado de desarrollar una vacuna pasiva contra criptosporidiosis en rumiantes, de tal forma que proteja a los neonatos a través del calostro (De Graaf y col., 2002).

Algunos autores mostraron que crías de ratones pueden ser protegidas contra la infección oral experimental con inmunoterapia pasiva oral con suero hiperinmune, calostro o con anticuerpos monoclonales específicos (Riggs y

Perryman, 1987; Tilley y col., 1991). También, becerros neonatos pueden ser parcialmente protegidos con calostro hiperinmune (Fayer y col., 1986).

El Halocur (lactato de halofuginona) está probado como auxiliar en la prevención de la criptosporidiosis. Este producto debe administrarse cada 24 horas durante los primeros 7 días de vida en la dosis recomendada por el laboratorio. No repercute en la ingesta de comida ni en la conversión alimenticia, además de dar como resultado un retraso en la infestación de *Cryptosporidium* y la eliminación de oocistos se reduce (Trotz-Williams y col., 2005).

El tratamiento basado en decoquinato de sodio a razón de 2.5 mg/kgPV/día, es decir 50 g por kilogramo de leche, administrado a las becerras enfermas disminuye la diarrea en un lapso de tres días y los animales pueden recuperarse en una semana (Navetat y col., 2003).

También se ha sugerido el uso de paromomicina en dosis de 1.5 a 2 g/día por 4 días, con lo que se logra una mejoría en los signos y hasta erradicación total del parásito, aunque dosis exageradas del producto pueden provocar toxicidad. Los concentrados de inmunoglobulinas de calostro de bovino Azitromicina y Lactobin-R han tenido algún éxito experimental. Ningún agente terapéutico se ha identificado claramente como eficaz (Fayer y col., 2000).

III JUSTIFICACIÓN

Recientemente se han realizado estudios epidemiológicos de criptosporidiosis en becerros Holstein de la Comarca Lagunera, encontrándose que el 25.51% resultaron positivos. Además, para encontrar la fuente de infección de los becerros con *Cryptosporidium*, se han investigado heces de vacas y vaquillas antes del parto, durante el periodo de reto, no observando oocistos en estas muestras, utilizando la técnica de Ziehl Neelsen.

De acuerdo a estos antecedentes, la finalidad del presente trabajo es analizar una de las posibles fuentes de contaminación que pudiera estar involucrada en la infección, tomando como factor de riesgo la eliminación de oocistos de *Cryptosporidium parvum* por parte de vacas y vaquillas durante el parto, en hatos lecheros con antecedentes de infecciones crónicas de criptosporidiosis, utilizando la técnica de ELISA, ya que al ser *C. parvum* un parásito oportunista, el estrés del parto podría permitir su desarrollo y la consecuente excreción de oocistos.

IV OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar la frecuencia de *Cryptosporidium parvum* en heces de vacas y vaquillas aparentemente sanas dentro de 24 horas posteriores al parto, en establos de la Comarca Lagunera, utilizando la técnica de ELISA.

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Identificar antígeno de *Cryptosporidium parvum* en heces de vacas y vaquillas aparentemente sanas dentro de 24 horas posteriores al parto, en establos de la Comarca Lagunera, utilizando la técnica de ELISA.

4.2.2 Establecer la frecuencia de eliminación de *Cryptosporidium parvum* en heces de vacas y vaquillas aparentemente sanas dentro de 24 horas posteriores al parto, en establos de la Comarca Lagunera, utilizando la técnica de ELISA.

V MATERIAL Y METODOS

5.1. Marco de Referencia

La Comarca Lagunera está situada en la parte central de la porción norte de los Estados Unidos Mexicanos. Se encuentra ubicada entre los meridianos 102° 22' y 104° 47' 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 agropecuarias y 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 el noroeste.

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 sus afluentes.

La Laguna, como comúnmente es conocida la región, está integrada por 16 municipios, 11 del estado de Durango y 5 del estado de Coahuila (INEGI, 1994; INEGI, 1998).

Este proyecto se llevó a cabo en establos ubicados en esta Región Lagunera comprendiendo el municipio de Gómez Palacio, Durango y los municipios de Matamoros y Viesca, Coahuila.

5.2 Fase de Campo

Se analizaron 7 establos lecheros con prevalencia de criptosporidiosis crónica en becerras. Se tomaron 93 muestras de heces directamente del recto de

vacas y vaquillas recién paridas (máximo 24 horas después del parto). Se utilizaron bolsas de plástico para transportar las muestras en refrigeración, hasta su procesamiento en el laboratorio.

5.3 Fase de Laboratorio

El estudio 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.

Se utilizó un paquete de diagnóstico comercial (Institut Pourquier*) para el diagnóstico antigénico de *Cryptosporidium parvum* en heces de bovinos por el método inmunoabsorbente ligado a enzimas, siguiendo las especificaciones requeridas por el proveedor.

5.3.1 Depósito de las Muestras

A	N	6										P = Control positivo N = Control negativo	
B	P	7											
C	P	8										1 = Muestra 1 2 = Muestra 2...	
D	1	9											
E	2	10											
F	3	11									...		
G	4	12									92		
H	5	...									93		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

- a) Se depositaron 100 µl de control negativo en la celda A1, 100 µl de control positivo en las celdas B1 y C1 y en el resto de las celdas las muestras examinadas diluidas con 50 µl de solución amortiguadora en cada una de las

celdas siguientes a los controles y 50 μ l de muestra de heces en cada celda con la solución amortiguadora.

- d) Se cubrió la placa con papel aluminio.
- e) Se incubó la placa a 21°C (\pm 5°C) durante 30 minutos (\pm 3 minutos).

5.3.2 Primer Lavado

- a) Se diluyó la solución concentrada (20x) de lavado a 1/20 con agua destilada. Esta solución será llamada en adelante “solución de lavado”
- b) Se vació el contenido de la placa y se sacudió vigorosamente para eliminar residuos, pero evitando que se seque.
- c) Se llenaron todas las celdas con la solución de lavado; y se vació una vez más.
- d) Se repitió el paso anterior dos veces, para un total de tres lavadas, con especial cuidado en evitar la formación de burbujas.

5.3.3 Depósito del Conjugado

- a) Se diluyó el conjugado 1/10 en la solución amortiguadora de dilución No. 8
- b) Se depositaron 100 μ l de la solución del conjugado diluido en cada celda.
- c) Se incubó la placa a 21°C (\pm 5°C) durante 30 minutos (\pm 3 minutos) mientras se agitaba.

5.3.4 Segundo Lavado

- a) Se vació el contenido de la placa y se sacudió vigorosamente para eliminar residuos, pero evitando que se seque.
- b) Se llenaron todas las celdas con la solución de lavado; y se vació una vez más.
- c) Se repitió el paso anterior dos veces, para un total de tres lavadas, con especial cuidado en evitar la formación de burbujas.

5.3.5 Revelado

- a) Se depositaron 100 µl de solución reveladora No. 5 en cada celda.
- b) Se dejó incubar por 10 minutos a 21°C (± 5°C) lejos de la luz.
- c) Se depositaron 100 µl de “solución de paro” por celda.
- d) Se agitó gentilmente la placa hasta que el color de la solución fue homogéneo, y se limpió cuidadosamente la parte de debajo de la placa.

5.3.6 Lectura

- a) Se leyeron las densidades ópticas a 450 nm (DO 450). El fotómetro se blanqueó primero al aire.

5.3.7 Criterio de Evaluación

Los resultados fueron considerados confiables ya que el promedio de la Densidad Óptica a 450 nm (DO 450) del control positivo fue mayor o igual a 0.500, y la proporción entre el valor del promedio de la DO 450 del control positivo y el valor DO 450 del control negativo fue mayor o igual a 5.

5.3.8 Interpretación

Se calculó para cada muestra el porcentaje de la muestra sobre el control positivo (M/P)

$$M/P = 100 \times \frac{\text{valor DO 450 de la muestra} - \text{valor DO 450 del control negativo}}{\text{valor DO 450 del promedio del control (+)} - \text{valor DO 450 del control (-)}}$$

- Las muestras con porcentaje M/P menor o igual a 20 % fueron consideradas negativas a *Cryptosporidium parvum*.

- Las muestras con porcentaje M/P mayor a 20% fueron consideradas positivas a *Cryptosporidium parvum*.

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados indican que del 100% de las muestras analizadas de vacas y vaquillas aparentemente sanas durante las 24 horas siguientes al parto, ninguna mostró la presencia de *Cryptosporidium parvum*.

El ganado adulto es comúnmente considerado como una fuente potencial de contaminación del ambiente con *C. parvum*, pero hay desacuerdo sobre la relativa importancia del ganado adulto en la contaminación de los suministros de agua con cantidades significativas de oocistos de *C. parvum*. La prevalencia reportada de contaminación fecal con *C. parvum* por ganado adulto de leche y carne varía entre 0 al 10% (Villacorta y col., 1991; Atwill y col., 1998a, 1998b, 2003a; Fayer y col., 2000; Hoar y col., 2000; Sischo y col., 2000; Wade y col., 2000; Huetink y col., 2001; Atwill y Pereira, 2003) hasta 20 a 70% en grupos clínicamente sanos de ganado adulto (Lorenzo y col., 1993; Scott y col., 1995; Quilez y col., 1996).

Nuestros resultados coinciden con los de Atwill y Pereira (2003) que examinaron 43 muestras de vacas de no más de 12 horas de paridas en establos con criptosporidiosis confirmada en becerros, obteniendo todos negativos. Al igual que Atwill y col. (1998a) habían examinado años antes 154 vacas frescas de 1 a 21 días, encontrándolas igualmente todas negativas, aunque en becerros de 7 a 21 días encontraron una prevalencia del 92%. Vergara-Castiblanco y col. (2001), del mismo modo, muestrearon 135 vacas adultas asintomáticas no encontrando ninguna positiva.

Por el contrario, Lorenzo y col. (1993) encontraron un 71.75% de positividad en 131 muestras de ganado adulto asintomático, además de un 63.35% de seropositivos a anticuerpos IgG de *Cryptosporidium* por medio de la prueba de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta (IFAT) y 51.41% por ELISA. Igualmente Scott y col. (1995) encontraron 62.4% muestras positivas en 553 vacas

adultas aparentemente sanas. Mientras que Gow y Waldner (2006) encontraron 1.1% de muestras positivas en un muestreo a 560 vacas adultas productoras de carne, y Mantilla (1997) 0.15% de las muestras de heces de vacas positivas y 2.8% de las muestras en vaquillonas y terneras positivas.

Algunas de las variaciones en la prevalencia observada en la contaminación fecal pueden ser explicadas por el uso de pruebas de diagnóstico de diferente sensibilidad y especificidad, pero muchas de las variaciones parecen ser resultado de las diferencias en las poblaciones de ganado estudiadas, incluyendo la diferencia entre los modos de operación entre explotaciones de leche y de carne, distribución de edades y prácticas de manejo (Atwill y col., 2003).

Con respecto a los tipos de ganado, de leche y de carne, el rango de carga parasitaria ambiental de *C. parvum* por unidad animal o por cantidad de materia fecal está condicionado a la distribución por edades del hato (Atwill y col., 1998a, 1998b, 2003; Kuczynska y Shelton, 1999; Fayer y col., 2000; Huetnink y col., 2001; Wade y col., 2000; Santin y col., 2004), la prevalencia de la infección está asociada con factores que incluyen el manejo de los terneros, la higiene del establo y la edad al destete (Maldonado-Camargo y col., 1998; Atwill y col., 1999; Mohammed y col., 1999; Hoar y col., 2000).

Actualmente se sabe poco sobre los rangos de carga parasitaria con *C. parvum* en hatos comerciales. Existe gran cantidad de hatos de bovinos, lo que indica también una gran acumulación de desechos fecales. Para poder analizar correctamente el riesgo de la contaminación del agua con *C. parvum* debido a lo anterior, el primer paso es obtener un valor estimado del número de oocistos presentes en el material fecal obtenido de los hatos. Esto ya sea desarrollando sistemas de manejo de las excretas o calculando una carga máxima diaria de *C. parvum* en el depósito de agua; es necesario conseguir valores estimados confiables de la cantidad de oocistos obtenidos de fuentes biológicas si se quieren implementar sistemas de manejo para disminuir la contaminación de las fuentes de agua (Mantilla, 1997).

Es importante identificar las fuentes más importantes de este parásito, siendo una de éstas el agua, por lo cual es primordial diseñar planes de manejo para reducir la ocurrencia de *C. parvum* en el suministro de agua potable (Atwill, 1996), seguido por la implementación de prácticas adecuadas de manejo para bajar la carga parasitaria (Rosen y col., 2000).

VII CONCLUSIÓN

93 muestras tomadas de vacas y vaquillas frescas de no más de 24 horas de paridas en la Comarca Lagunera resultaron negativas a *Cryptosporidium parvum*.

Los resultados obtenidos sugieren que en la Comarca Lagunera las vacas y vaquillas entre las 0 y 24 horas siguientes al parto podrían no expulsar oocistos de *C. parvum* y por lo tanto no ser fuente de transmisión a los becerros.

De acuerdo a lo expuesto y a las investigaciones revisadas se sugiere realizar mas estudios en ganado adulto, ya que no puede ser aún descartado como fuente de transmisión de criptosporidiosis a los becerros. Se recomienda el uso de diferentes métodos de diagnóstico como PCR o inmunofluorescencia.

Se propone además la examinación del agua de bebida, la cama y la madera de las jaulas de los becerros, el polvo e instalaciones en general para determinar si en la Comarca Lagunera pueden ser éstas algunas vías de contagio.

Es importante conocer el modo de transmisión de *C. parvum*, ya que al ser un patógeno secundario, agrava las enfermedades entéricas, que son una de las principales causas de pérdidas económicas en la ganadería de la región.

ANEXOS

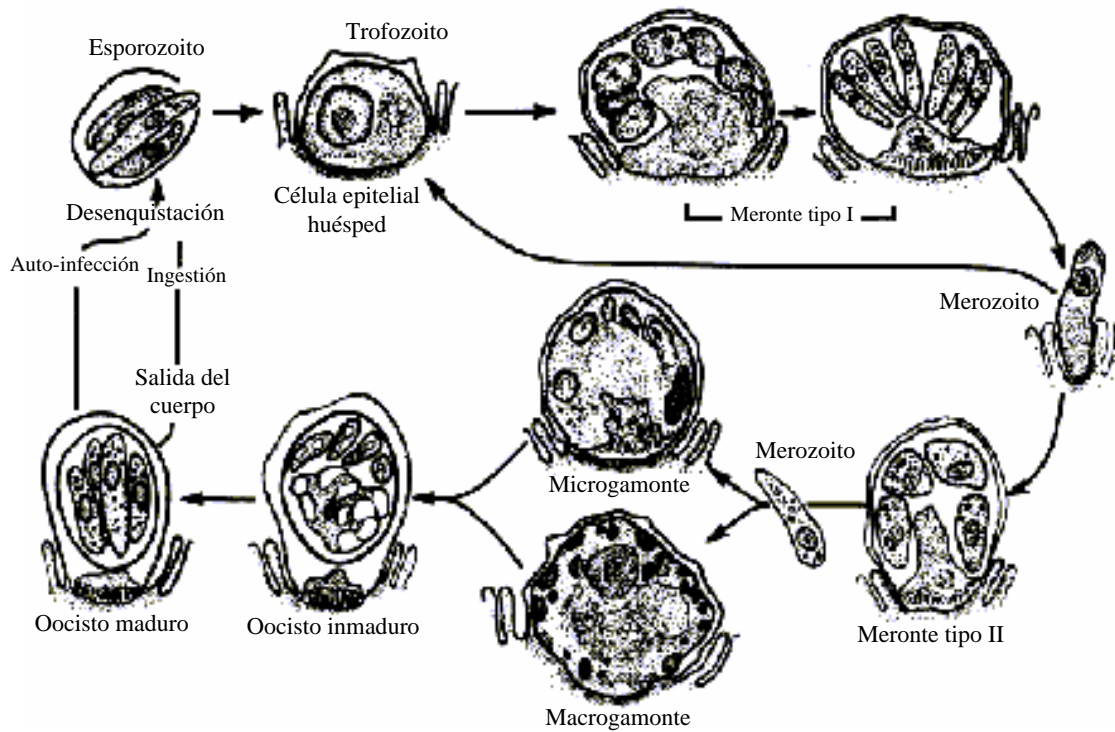


Figura 1. Diagrama representativo del ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. Los esporozoitos desenquistan de un oocisto y entra en las microvellosidades de una célula epitelial, donde se diferencian a trofozoitos. Los trofozoitos, bajo proliferación nuclear, forman merontes tipo I (esquizontes). Un merozoito tipo I deja el meronte para formar un meronte tipo I o II. Un merozoito tipo II deja el meronte para formar microgamontes o macrogamontes. El microgamonte fertiliza al macrogamonte, que se desarrolla en un oocisto. Los oocistos esporulan *in situ* y pueden liberar esporozoitos para autoinfección o salen del cuerpo en las heces (Fayer y Ungar, 1986).

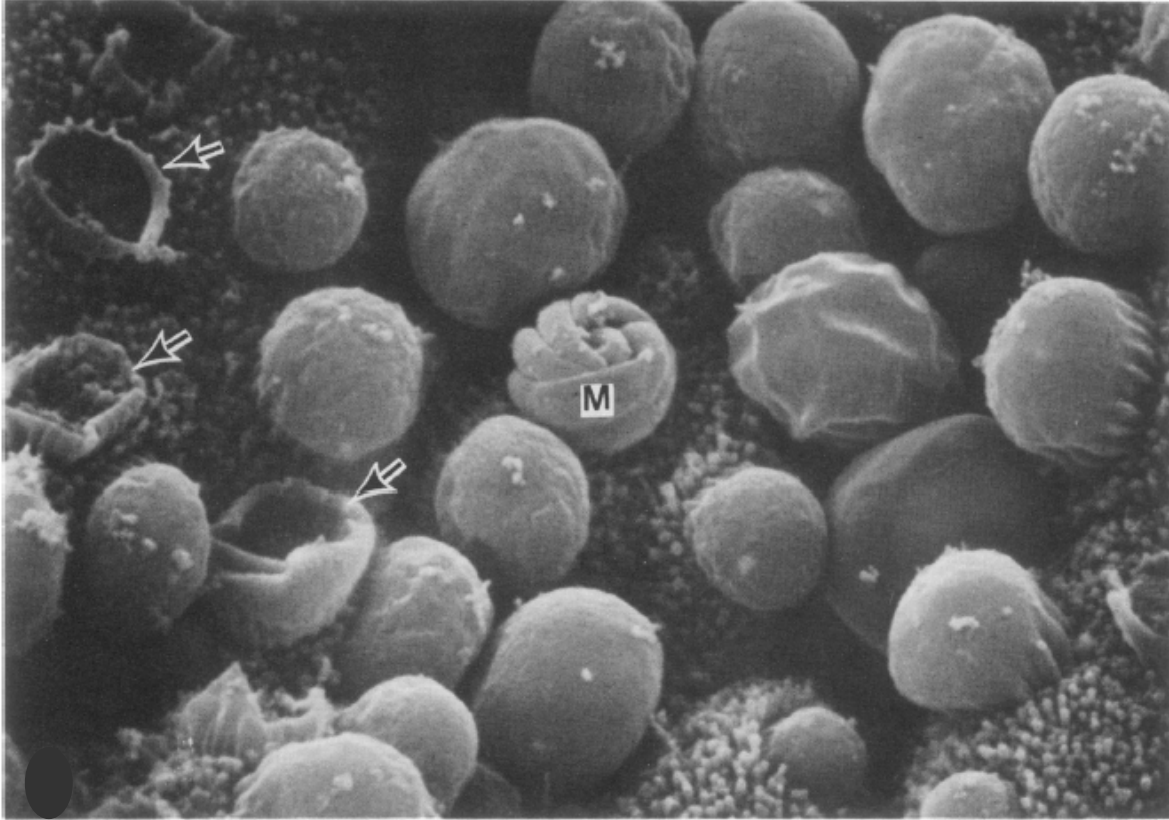


Figura 2. Microfotografía electrónica de barrido mostrando numerosas etapas del desarrollo de *Cryptosporidium* en la región de las microvellosidades de la mucosa intestinal. Cada parásito está contenido dentro de una vacuola parasitófora que resalta afuera de la región de las microvellosidades del enterocito. Algunos merozoitos de un meronte tipo I maduro (M) están expuestas como resultado de una división de la membrana de la vacuola parasitófora removida durante el proceso. Las flechas apuntan a cráteres en la superficie mucosa formada por vacuolas vacías que permanecen después de la liberación de los parásitos (Current y García, 1991).

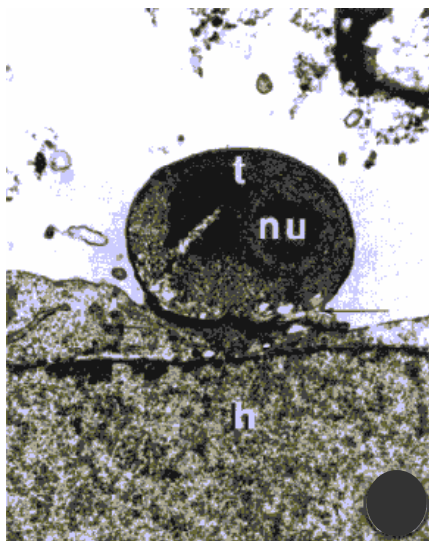


Figura 3. Fotografía electrónica de transmisión de un trofozoito (t) en una célula humana desarrollada *in vitro*. El núcleo tiene un nucleolo grande (nu). Un organelo alimentador (flecha) constituido por bandas citoplasmáticas paralelas se está desarrollando sobre la densa zona de unión con la célula hospedadora (h). Aumento x15,700 (Fayer y Ungar, 1986).

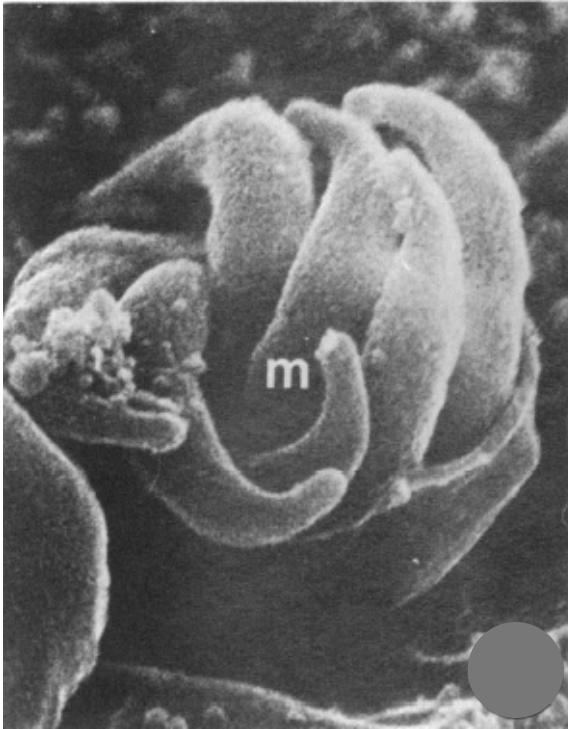


Figura 4. Microfotografía electrónica de barrido de un meronte tipo I con siete merozoitos (m) visibles. Aumento x12,000 (Fayer y Ungar, 1986).

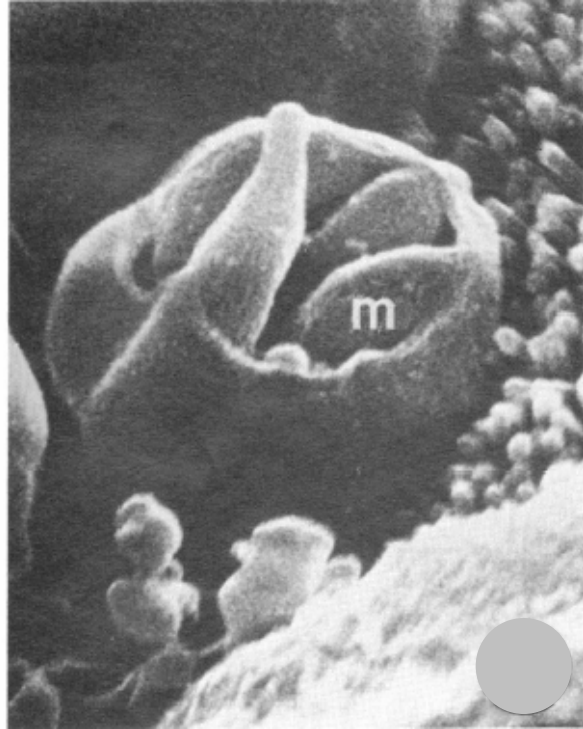


Figura 5. Microfotografía electrónica de barrido de un meronte tipo II con sus cuatro merozoitos (m) visibles. Aumento x12,000 (Fayer y Ungar, 1986).

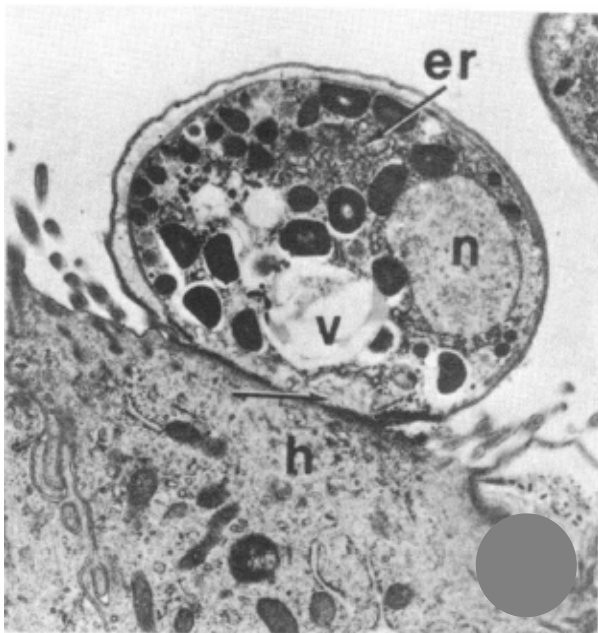


Figura 6. Microfotografía electrónica de transmisión de un macrogamete. Núcleo grande (n), retículo endoplásmico (er), una vacuola (v) y otros gránulos son prominentes. Un organelo alimentador (flecha) constituido por bandas citoplasmáticas paralelas se está desarrollando sobre la densa zona de unión con la célula hospedadora (h). Aumento x12,000 (Fayer y Ungar, 1986).

VIII BIBLIOGRAFIA

- Anderson, B. y M. Bulgin. 1981. Enteritis caused by *Cryptosporidium* in calves. *Vet. Med. Small Animal Clin.* 76:865-868.
- 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.
- Arrowood, M.J. y C.R. Sterling. 1989. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. *J. Clin. Microbiol.* 27:1490-1495.
- Arslan, M.O., Y. Gicikh, y E. Sari. 2001. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in diarrhoeic calves in Kars Province Turkey. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 36:161-165.
- Atwill, E.R., M. Das Gracas, C. Pereira, L. Herrera Alonso, C. Elmi, W.B. Epperson, R. Smith, W. Riggs, L.V. Carpenter, D.A. Dargatz y B. Hoar. 1996. Environmental load of *Cryptosporidium parvum* oocysts from cattle manure in feedlots from the Central and Western United States. Published online 3 January 2006. Technical Report. American Society of Agronomy.
- Atwill, E.R., J.A. Harp, T. Jones, P.W. Jardon, S. Checel y M. Zylstra. 1998. Evaluation of periparturient dairy cows and contact surfaces as a reservoir of *Cryptosporidium parvum* for calfhoo infection. *Am. J. Vet. Res.* 59:1116-1121.
- Atwill, E.R., B. Hoar, M. Das Gracas, Cabral Pereira, K.W. Tate, F. Rulofson, y G. Nader. 2003. Improved quantitative estimates of low environmental loading and sporadic periparturient shedding of *Cryptosporidium parvum* in adult beef cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4604-4610.
- Atwill, E. R., E. Johnson, M. Das Gracas y C. Pereira. 1999. Association of herd composition, stocking rate, and calving duration with fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in beef herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215:1833-1838.
- Atwill, E. R., E. Johnson, D. J. Klingborg, G. M. Vesperat, G. Markegard, W. A. Jensen, D. W. Pratt, R. E. Delma, H. A. George, L. C. Forero, R. L. Phillips, S. J. Barry, N. K. McDougald, R. R. Gildersleeve y W. E. Frost. 1998. 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. y M.G. Pereira. 2003. Lack of detectable shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts by periparturient dairy cattle. *J. Parasitol.* 89(6):1234-1236.
- Bankier, A.T., H.F. Spriggs, B. Fartmann, B.A. Konfortov, M. Madera, C. Vogel, S.A. Teichman, A. Ivens y P.H. Dear. 2003. Integrated mapping, chromosomal sequencing and sequence analysis of *Cryptosporidium parvum*. *Genome. Res.* 13(8):1787-1799.
- Bornay-Llinares, F.J., A.J. Da Silva, I.N. 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. Environ. Microbiol.* 65:1455–1458.
- Bronsdon, M.A. 1984. Rapid dimethyl sulfoxide-modified acidfast stain of *Cryptosporidium* oocysts in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 19:952-953.
- Bukhari, Z., R.M. McCuin, C.R. Fricker y J.L. Clancy. 1998. Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* from source water samples of various turbidities. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4495–4499.
- Current W. y L.S. García, 1991. Cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.* 4:325-358.
- 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 Graff, 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: 1269–1287.
- Díaz de Ramírez, A., L.N. Ramírez-Iglesia, R.M. Godoy de Plaza y R. Román. 2002. Excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* spp durante el postparto en vacas mestizas de doble propósito. *Revista Científica.* 12 (2): 614-616.
- 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.
- Faubert, G.M. y Y. Litvinsky. 2000. Natural transmission of *Cryptosporidium parvum* between dams and calves on a dairy farm. *J. Parasitol.* 86:495-500.
- 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):103-112.
- Fayer, R. y B.L.P. Ungar. 1986. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.* 50:458-483.

- Foster, J.C., M.D. Glass, P.D. Coyurtney y L.A. Ward. 2003. Effect of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Food Microbiology*. 20:351-357.
- Garber L.D., M.D. Salman, H.S. Hurd, T. Keefe y J.L. Schlater. 1994. Potential risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 205:86-91.
- 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.
- García, L. S., S. Shimizu, Novak, C. Marilyn y F. Chan. 2003. Comercial assay for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal sepecimens by rapid solid phase qualitaive immunochromatography. *J. Clin. Microbiol.* 41:209-212.
- Gow, S. y C. Waldner. 2006. An examination of the prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in cows and calves from western Canadian cow-calf herds. *Vet. Parasitol.* 137(1-2):50-61.
- Hashim, A., G. Mulcahy, B. Bourke y M. Clyne. 2006. Interaction of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* with primary human and bovine intestinal cells. *Infect. Immun.* 74:99-107.
- Hoar, B., E.R. Atwill y T.B. Farver. 2000. Estimating maximum possible environmental loading amounts of *Cryptosporidium parvum* attributable to adult beef cattle. *Quan. Microbiol.* 2:21–36.
- Huetink, R.E.C., J.W.B. Van Der Giessen, W.D. Noordhuizen y H.W. Ploeger. 2001. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Vet. Parasitol.* 102:53–67.
- INEGI. 1998. Anuario Estadístico del Estado de Coahuila. p. 3-4, 6,14-15.
- INEGI. 1994. Anuario Estadístico del Estado de Durango. p. 3-4, 13-14.
- Kehl, K.S.C., H. Cicirello y P.L. Havens. 1995. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *J. Clin. Microbiol.* 33:416–418.
- Kuczynska, E. y D.R. Shelton. 1999. Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures, and soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2820-2826.

- Kuczynska, E., D. Shelton y Y. Pachepsky. 2005. Effect of bovine manure on *Cryptosporidium parvum* oocyst attachment to soil. *Environ. Microbiol.* 71:6394-6397.
- Lippi, E. y P. Castro. 2003. Aspectos epidemiológicos de la criptosporidiosis en becerros de rebaños lecheros. *Parasitol. Latinoam.* 58:3-4.
- Lorenzo, M.J., E. Ares-Mazas e I. Villacorta. 1993. Detection of oocysts and IgG antibodies to *Cryptosporidium parvum* in asymptomatic adult cattle. *Vet. Parasitol.* 47:9–15.
- Lowery, C. J., J.E. Moore, B.C. Millar, D.P. Burke, K.A. McCorry, E. Crothers y J.S. Dooley. 2000. Detection and speciation of *Cryptosporidium* spp. in environmental water samples by immunomagnetic separation, PCR and endonuclease restriction. *J. Med. Microbiol.* 49:779–785.
- Maldonado-Camargo, S., E.R. Atwill, J.A. Saltijeral-Oaxaca y L.C. Herrera-Alonso. 1998. Prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in Holstein Freisian dairy calves in central México. *Prev. Vet. Med.* 36:95–107.
- Mantilla, L. 1997. Patógenos emergentes y resistencia el tracto gastrointestinal. *Am. Col. Gastro. 62nd Annual Meeting.*
- McCole, D.F., L. Eckmann, F. Laurent y M.F. Kagnoff. 2000. Intestinal epithelial cell apoptosis following *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* 68(3):1710-1713.
- 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* sp. oocysts in a large outbreak of human diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 22:587-589.
- Mohammed, HO, SE Wade y SL Schaaf. 1999. Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in dairy cattle in southeastern New York State. *Vet Parasitol* 83:1-13
- Moore, D.A., E.R. Atwill, J.H. Kirk, D. Brahmbhatt, L. Herrera Alonso, L.Hou, M.D. Singer y T.D. Miller. 2003. Prophylactic use of decoquinate for infections with *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. *J. Clin. Microbiol.* 36(4):995-998.
- Moore, D. A., D. H. Zeman. 1991. Cryptosporidiosis in neonatal calves: 277 cases (1986-1987). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198:1969-1971.

- Moss, D.M., S.I. Bennett, M.J. Arrowood, S.P. Wahlquist y P.J. Lammie. 1998. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis of a cryptosporidiosis outbreak on a United States Coast Guard cutter. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58:110–118.
- Musial, C.E., M.J. Arrowood, C.R. Sterling y C.P. Gerba. 1987. Detection of *Cryptosporidium* in water by using polypropylene cartridge filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:687-692.
- Navetat, B.H. y F. Cantaloube. Decoquinate to control Cryptosporidiosis infestation in ruminants. Information from goat. En línea. (8 de Julio de 2003). <<http://www.exopol.com/general/circulares/101circ.html>> (Consultado el 25 de julio de 2005).
- Okhuysen, P.C., G.A. Rogers, A. Crisanti, F. Spano, D.B. Huang, C.L. Chapell 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):235-238.
- Ortega, M.L.M., B.M. Gómez, y V.F.A. Rojo. 1999. Parasitología veterinaria. España, McGraw-Hill Interamericana.
- Parisi, M.T. y P.M. Tierno. 1995. Evaluation of new rapid comercial enzyme immunoassay for detection of *Cryptosporidium* oocysts in untreated stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 33:1963-1965.
- Peeters, J. E., I. Villacorta, E. Vanopdenbosch, D. Vandergheynst, M. Naciri, E. Ares-Mazas, y P. Yvone. 1992. *Cryptosporidium parvum* in calves: kinetics and immunoblot analysis of specific serum and local antibody responses (immunoglobulin A [IgA], IgG, and IgM) after natural and experimental infection. *Infect. Immun.* 60:2309–2316.
- Priest, J.W., J.P. Kwon, D.M. Moss, J.M. Roberts, M.J. Arrowood, M.S. Dworkin, D.D. Juranek y P.J. Lammie. 1999. Detection by enzyme immunoassay of serum immunoglobulin G antibodies that recognize specific *Cryptosporidium parvum* antigens. *J. Clin. Microbiol.* 37:1385–1392.
- Quilez, J., C. Sanchez-Acedo, E. del Cacho, A. Clavel y A.C. Causape. 1996. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragon (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* 66:139–146.
- Riggs, M.W. y L.E. Perryman. 1987. Infectivity and neutralization of *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infect. Immun.* 55:2081-2087.
- Rochelle, P.A., R. De Leon, A. Jonson, M.H. Stewart y R.L. Wolfe. 1999. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of infectious

Cryptosporidium parvum oocysts from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:841-845.

Rosen, B.H., R. Croft, E.R. Atwill, S. Wade y S. Stehman. 2000. Waterborne pathogens in agricultural watersheds. Watershed Science Inst., Univ. of Vermont, Natural Resource Conservation Service, USDA, Burlington, VT. Tech. Note 2:1-64.

Rosenblatt, J.E. y L.M. Sloan. 1993. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* spp. in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 31:1468-1471.

Rusnak, J., T.D. Hadfield, M.M. Rhodes y J.K. Gaines. 1989. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in human feces specimens by an indirect immunofluorescence assay with monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 27:1135-1136.

Santin, M., J.M. Trout, L. Xiao, L. Zhou, E. Greiner y R. Fayer. 2004. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet. Parasitol.* 122:103-117.

Scott, C.A., H.V. Smith y H.A. Gibbs. 1994. Excretion of *Cryptosporidium parvum* oocysts by a herd of beef suckler cows. *Vet. Rec.* 134:172.

Scott, C.A., H.V. Smith, M.M. Mtambo y H.A. Gibbs. 1995. An epidemiological study of *Cryptosporidium parvum* in two herds of adult beef cattle. *Vet. Parasitol.* 57(4):277-288.

Sischo, W.M., E.R. Atwill, J. George y L.E. Lanyon. 2000. Cryptosporidia on dairy farms and the role these farms may have in contaminating surface water supplies in the northeastern United States. *Prev. Vet. Med.* 43:253-267.

Spano, F., L. Putignani, J. McLauchlin, D. P. Casemore, y A. Crisanti. 1997. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 150:209-217.

Stibbs, H.H. y J.E. Ongerth. 1986. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. *J. Clin. Microbiol.* 24:517-521.

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.* 67:2665-2668.

Tilley, M., S.J. Upton, R. Fayer, J.R. Barta, C.E. Chrisp, P.S. Freed, B.L. Blagburn, B.C. Anderson y S.M. Barnard. 1991. Identification of a 15-kilodalton

- surface glycoprotein on sporozoites of *Cryptosporidium parvum*. *Infect. Immun.* 59:1002-1007.
- 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): 349-351.
- Vergara-Castiblanco, C.A., J. Quilez-Cinca, F. Freire-Santos, J.A. Castro-Hermida, M.E. Ares-Mazas. 2001. Serological response to *Cryptosporidium parvum* in adult cattle from the Andean region of Colombia. *Parasitol. Res.* 87(6):500-504.
- Villacorta, I., E. Ares-Mazas y M.J. Lorenzo. 1991. *Cryptosporidium parvum* in cattle, sheep, pigs, in Galicia (N.W. Spain). *Vet. Parasitol.* 38:249-252.
- Wade, S.E., H.O. Mohammed y S.L. Schaaf. 2000. Prevalence of *Giardia* sp., *Cryptosporidium parvum*, and *Cryptosporidium muris* (*C. andersoni*) in 109 dairy herds in five counties of southeastern New York. *Vet. Parasitol.* 93:1-11.
- Weber, R., R.T. Bryan y D.D. Juranek. 1992. Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 30:2869-2873.
- Xiao, L. y R.P. Herd. 1993. Quantitation of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples by direct immunofluorescence assay. *J. Clin. Microbiol.* 31:2944-2946.
- Xiao, L. y R.P. Herd. 1994. Infection patterns of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. *Vet. Parasitol.* 55:257-262.
- Zierdt, W.S. 1984. Concentration and identification of *Cryptosporidium* sp. by use of a parasite concentrator. *J. Clin. Microbiol.* 20:860-861.