



**UNIVERSIDAD VERACRUZANA**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

**PREVALENCIA DE *Cryptosporidium spp.* E IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE RIESGO EN BECERRAS DE VERACRUZ Y LA COMARCA LAGUNERA, MÉXICO.**

**TESIS**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL**

PRESENTA:

**M.V.Z OSCAR EDUARDO GODOY SALINAS**

DIRECTORA:

**DRA. DORA ROMERO SALAS**

DIRECTOR EXTERNO:

**PhD. ZEFERINO GARCÍA VÁZQUEZ**

**H. VERACRUZ, VER. FEBRERO 2011**

<b>CONTENIDO</b>	<b>PAG.</b>
Dedicatoria.....	iii
Reconocimientos.....	iv
Agradecimientos.....	v
Fuente de financiamiento.....	vii
Lista de cuadros.....	xi
Lista de figuras.....	xii
Resumen.....	xiii
Abstract.....	xiv

## **DEDICATORIA**

### **A Dios**

Por darme la fuerza y confianza, en este camino largo y cansado. Las metas que logre en esta vida son gracias a la fe en Él, por que a pesar de los tropiezos ocurridos jamás me dejó rendirme y logré la culminación de ésta.

### **Mi Mamá**

Balbina Salinas Hernández que con sus consejos, ejemplos de fortaleza, dedicación y pasión por lo que se realiza. El apoyo y confianza incondicional que depositó en mí fueron y serán indispensables en mi vida diaria.

### **Mi Tía**

Que con el esfuerzo, comprensión y ayuda logré mi superación, por que sin la dedicación diaria de ella no hubiera tenido la fuerza necesaria para completar este proyecto.

### **Mi Hermana**

Por los momentos compartidos, por los ánimos que me diste todo el tiempo y tu alegría que no permitía que me rindiera.

### **Mi Novia**

Por su ánimo y sacrificio de su tiempo en una parte de la realización de este trabajo, gracias por todo tu apoyo, amor y cariño.

### **Amigos**

Los cuales siempre estuvieron para dar una palabra de aliento y su ayuda en los diferentes pasos que se dieron a lo largo de este posgrado, ya que sin esas personas las cuales no pertenecen a tu familia este camino hubiera sido lo más cansado y tedioso de la vida, gracias a aquellos que me dieron su amistad.

## RECONOCIMIENTOS

**UNIVERSIDAD VERACRUZANA.** Por haber sido el alma Mater de mi formación personal.

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.** Por haberme otorgado un espacio y lograr concluir mis estudios de Licenciatura y Maestría.

## AGRADECIMIENTOS

**Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.** Por la beca otorgada a lo largo de la realización de este trabajo.

**Dra. Dora Romero Salas.** Que me motivó y tuvo la confianza en mi para realizar este trabajo y todo el tiempo contar con su apoyo, a usted que me enseñó como debían ser las cosas en este tipo de trabajos, y que con mucha paciencia me ha ayudado a no desistir y seguir siempre adelante, a luchar en este proyecto, usted como mi maestra, mi amiga y una persona de la que estoy muy agradecido por haberme permitido desarrollar esta investigación.

**PhD. Zeferino S. García Vázquez.** A usted, le agradezco toda su paciencia, su valioso tiempo en la asesoría y en la revisión de esta investigación. Fue un gran honor trabajar con una persona como usted.

**Dr. Bernabé Chavarría.** Por todo el apoyo que se recibió, así como también por lo confianza otorgada en la capacidad de realización de este trabajo.

**Dr. Felipe Montiel Palacios.** Por toda la ayuda brindada en la búsqueda de ranchos y contactos para la obtención de las muestras, de verdad estoy muy agradecido por todo el apoyo y tiempo que usted me brindo.

**Al H. Jurado: Dra. Violeta T. Pardío Sedas, Dr. Apolo A. Carrasco García, Dra. María Isabel Jiménez García y MCAT. Nelly del Jesús Ibarra Priego.** Por la ayuda prestada en la lectura y corrección de este trabajo recepcional, por lo cual les quiero agradecer la atención prestada y la prontitud con la cual se realizó este proceso.

**A mis profesores de posgrado.** Por todo el tiempo invertido en las clases y por formar parte de formación profesional.

A los Doctores que me brindaron su ayuda en la recolección de muestras en la Zona de la Comarca Lagunera **Verónica, Adán Alarcón** y **Cesar Cancino**, así como también a las personas que trabajan en **IFAVET** las cuales me dieron la oportunidad de convivir con ellos y ayudarme en cualquier gestión, y por último pero no menos importantes a todos los dueños de los establos que se visitaron ya que sin su consentimiento no se hubiera podido realizar esta investigación.

A todos los **productores ganaderos** de los cuatro municipios de la zona centro del estado de Veracruz (Naolinco, Acatlán, Miahuatlán y Landero y Coss) que permitieron hacer posible este trabajo dando acceso a sus unidades de producción ganadera y manipular sus animales, ya que sin su apoyo este trabajo no se hubiese podido realizar. Un agradecimiento en muy especial al señor y ex presidente de Miahuatlán **Isacc Sánchez Cervantes** por haberme permitido alojarme en su casa con su apreciable familia y también así poder muestrear sus animales.

### **FUENTE DE FINANCIAMIENTO**

El presente trabajo fue financiado por el laboratorio Intervet Schering-Plough Animal Health.

**ÍNDICE**

<b>CONTENIDO</b>	<b>PAG.</b>
Introducción.....	1
1. Antecedentes.....	3
1.1 Generalidades.....	3
1.2 Situación mundial del <i>Cryptosporidium</i> spp. en bovinos.....	5
1.3 Prevalencias y formas de detección del parásito por medio de diferentes pruebas.....	10
1.4 Situación en América del <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	12
1.4.1 Situación en Centro y Sudamérica.....	17
1.5 Transmisión a los humanos.....	19
1.6 Situación nacional en bovinos de tipo lechero.....	20
Hipótesis.....	22
Objetivos.....	22
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos.....	22



2. Material y métodos.....	23
2.1 Sitio de estudio.....	23
2.1.1 Comarca Lagunera.....	23
2.1.2 Naolinco.....	24
2.1.3 Acatlán.....	25
2.1.4 Miahuatlán.....	26
2.1.5 Landero y Coss.....	27
2.2 Estimación del tamaño de muestra.....	28
2.3 Toma de muestra.....	28
2.4 Prueba de Ziehl-Neelsen ácido-rápido modificada.....	29
2.5 Prueba de Inmunocromatografía de flujo lateral.....	29
2.6 Comparación de pruebas.....	30
2.7 Aplicación de cuestionario.....	30
2.8 Análisis de datos.....	30
2.9 Factores de riesgo.....	31
3. Resultados y discusión.....	34
3.1 Prevalencia de criptosporidiosis en becerras de la Comarca Lagunera.....	34

3.1.1 Razón de Momios de la Comarca Lagunera.....	37
3.2 Prevalencia de criptosporidiosis en municipios del Estado de Veracruz.....	40
3.2.1 Razón de Momios de los municipios del Estado de Veracruz.....	44
3.3 Concordancia de las pruebas IFL y ZN en las dos zonas de estudio.....	46
4. Conclusiones.....	48
5. Recomendaciones.....	50
6. Bibliografía.....	51
7. Anexo A.....	59

<b>LISTA DE CUADROS</b>		<b>PAG.</b>
1	Variables de estudio para las explotaciones lecheras en la encuesta.....	32
2	Prevalencia de los municipios de la Comarca Lagunera por medio de dos pruebas diagnósticas.....	35
3	Prevalencia por edad de las becerras de la Comarca Lagunera por medio de dos pruebas diagnósticas.....	36
4	Razón de momios de los diferentes factores de riesgo de la Comarca Lagunera.....	38
5	Prevalencia por municipios de la zona centro del estado de Veracruz por medio de dos pruebas diagnósticas.....	40
6	Prevalencia por edad de las becerras de la zona centro de Veracruz por medio de dos pruebas diagnósticas.....	41
7	Consistencia de las heces recolectadas de la zona centro de Veracruz y su prevalencia en base a dos pruebas diagnósticas.....	42
8	Razón de Momios de los diferentes factores de riesgo para la zona central del Estado de Veracruz.....	44

	<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>PAG.</b>
1	Mapa de la Comarca Lagunera.....	23
2	Localización del municipio de Naolinco.....	24
3	Localización del municipio de Acatlán.....	25
4	Localización del municipio de Miahuatlán.....	26
5	Localización del municipio de Landero y Coss.....	27

Godoy Salinas Oscar Eduardo. 2011. **PREVALENCIA DE *Cryptosporidium* spp. E IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE RIESGO EN BECERRAS DE VERACRUZ Y EN LA COMARCA LAGUNERA, MÉXICO.** Tesis de Maestría en Ciencia Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, **Universidad Veracruzana**, Veracruz, México. Directores de tesis: Dra. Dora Romero Salas y PhD. Zeferino S. García Vázquez.

## RESUMEN

*Cryptosporidium* spp. es un parásito que habita en el borde de las vellosidades intestinales de los bovinos, ovinos y otras especies animales; este ocasiona en bovinos neonatos, deshidratación asociada con diarrea, cólico y complicaciones de diversas etiologías. El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia y factores de riesgo en becerras entre uno y 60 días de edad en la zona centro del estado de Veracruz y la Comarca Lagunera, México. El estudio fue de tipo transversal con muestreo de conveniencia con un periodo de muestreo de abril a julio de 2009 (Comarca Lagunera) y de enero a febrero 2010 (Veracruz). De las 460 becerras muestreadas en la Comarca Lagunera, se obtuvo una prevalencia por medio de la prueba de Inmuncromatografía de flujo lateral (IFL) de 19.35% y un 18.04% con la prueba de Ziehl-Neelsen (ZN); la prevalencia entre los municipios tuvo un rango de 9.80-35% con la prueba IFL y con ZN 7.84-35%. La prevalencia por rango de edad fue de 35.62% (1-15 días), 7.59% (16-30 días) y 0% (31-45 días y 46-60 días) con la prueba de IFL; la cual fue muy parecida con la prueba de ZN, con la excepción en el intervalo de 1-15 días (32.88%). Los factores de riesgo identificados fueron la edad con 6.73 (IC<sub>95%</sub> 3.43-13.22;  $P=0.0001$ ) y método de limpieza combinado con 0.54 (IC<sub>95%</sub> 0.33-0.88;  $P=0.01$ ) siendo un posible factor protector; otro factor de riesgo fue dar únicamente sustituto de leche 2.08 (IC<sub>95%</sub> 1.29-3.36;  $P=0.003$ ); presencia de diarrea FM= 4.49 (IC<sub>95%</sub> 2.63-7.68;  $P=0.0001$ ), la consistencia normal de las heces en el momento de la recolección 0.04 (IC<sub>95%</sub> 0.01-0.10;  $P=0.0001$ ) como posible factor protector. En Veracruz de los 120 animales lactantes muestreados, se reportó una prevalencia por IFL de 3.33% y un 12.50% por la prueba de ZN; la prevalencia por municipios el rango fue de cero a 9.10% en la prueba de IFL y con ZN fue de cero a 30.43%; la prevalencia por rango de edad fue 9.10% (1-15 días), 4% (16-30 días), 0% (31-45 días) y 1.61% (46-60 días) por la prueba de IFL y por medio de ZN fue de 18.18% (1-15 días), 12% (16-30 días), 0% (31-45 días) y 12.90% (46-60 días). Se encontró una mayor prevalencia en becerras con consistencia de las heces "líquida" con 14.30% y 57.10% por las dos pruebas de IFL y ZN, respectivamente. En becerras de Veracruz se encontró como factores de riesgo animales con presencia de diarrea (FM= 7.25, IC<sub>95%</sub> 2.29-22.91 y  $P=0.0008$ ), otros factores se presentaron como posibles factores de protección, como animales alojados en corraleta individual (FM= 0.27, IC<sub>95%</sub> 0.08-0.85 y  $P=0.04$ ), recibir calostro durante el periodo de 30-60 min después de nacidos FM=0.22 (IC<sub>95%</sub> 0.05-0.87 y  $P=0.04$ ) y becerras con heces normales FM= 0.07 (IC<sub>95%</sub> 0.01-0.39 y  $P=0.004$ ). La concordancia entre las dos pruebas en la Comarca Lagunera fue de 95% y en Veracruz de 39%.

**Palabras clave:** *Cryptosporidium* spp., prevalencia, ganadería.

**Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and identification of risk factors in calves from the central region Veracruz and Comarca Lagunera, México.**  
 Oscar Eduardo Godoy Salinas. 2011. BS thesis in Master of Animal Science, **Universidad Veracruzana, Veracruz**, México. Directed by Dr. Dora Romero Salas and PhD. Zeferino S. García Vázquez.

### ABSTRACT

The *Cryptosporidium* spp. it is a parasite that lives in the edge of the intestinal cells of cattle, sheep and other animals; it causes in newborn calves, dehydration associated with diarrhea, cramps and diverse complications of etiology. The objective of this study was to determine the prevalence and risk factors in calves between one and 60 days of age in the central zone of the state of Veracruz and the Comarca Lagunera, México. Of the 460 calves sampled in the Laguna Region, the prevalence by the lateral flow immunochromatography test (LFI) was 19.35% and 18.04% with of Ziehl-Neelsen test (ZN), the prevalence among municipalities ranged from 9.80-35% in the IFL test and ZN 7.84-35%. The age-prevalence by the LFI test was 35.62% (1-15 days) 7.59% (16-30 days) and 0% (31-45 days and 46-60 days); which was very similar to the ZN test, except in the range of 1-15 days (32.88%). Risk factors identified were age 6.73 (CI<sub>95%</sub> 3.43-13.22,  $P=0.0001$ ) and management factors were found to combined cleaning method with 0.54 (CI<sub>95%</sub> 0.33-0.88,  $P=0.01$ ) to be a possible protector factor; other risk factors was given only milk replacer 2.08 (CI<sub>95%</sub> 1.29-3.36,  $P=0.003$ ), presence of diarrhea was a risk factor identified 4.49 (CI<sub>95%</sub> 2.63-7.68,  $P=0.0001$ ), normal consistency of stools at the time of collection, normal feces with 0.04 (CI<sub>95%</sub> 0.01-0.10,  $P=0.0001$ ) as a protective factor. In Veracruz of 120 calves sampled, the prevalence by LFI was 3.33% and 12.50% by ZN test; the prevalence by municipalities ranged zero to 9.10% in the IFL test and by ZN test zero to 30.43%, the age-prevalence was 9.10% (1-15 days), 4% (16-30 days), 0% (31-45 days) and 1.61% (46-60 days) for the test IFL and by ZN test was 18.18% (1-15 days), 12% (16-30 days), 0% (31-45 days) and 12.90% (46-60 days), it was found a higher prevalence in stool consistency "liquid" with 14.30% and 57.10% for the IFL and ZN tests, respectively. In Veracruz was found to be risk factor calves with diarrhea at the time of sampling (FM= 7.25, CI<sub>95%</sub> 2.29-22.91,  $P=0.0008$ ); other factors were presented as possible protection, such as the calves in individual pens (FM= 0.27, CI<sub>95%</sub> 0.08-0.85 and  $P=0.04$ ), to receive colostrum as soon as possible (30-60 min.) FM= 0.22, CI<sub>95%</sub> 0.05-0.87 and  $P=0.04$  and animals with normal feces FM= 0.07, CI<sub>95%</sub> 0.01-0.39 and  $P=0.004$ . Agreement between the two tests in the Laguna Region was 95% and 39% in Veracruz.

**Key words:** *Cryptosporidium* spp., prevalence, farms.

## INTRODUCCIÓN

*Cryptosporidium parvum* es un protozooario que habita en el borde de las vellosidades intestinales de los terneros, corderos y otras especies animales, el cual puede incluso convertirse en una zoonosis (Romero *et al.*, 2001). *Cryptosporidium* spp. ha sido reconocido como un enteropatógeno significativo en los humanos y ganado bovino. La infección causada por este parasito tiene un amplio espectro en la mayoría de los animales en el orden de artiodáctilos, primates y roedores (Fayer, 2004). Actualmente hay 14 especies aceptadas del género *Cryptosporidium* (Xiao *et al.*, 2004; Cacciò *et al.*, 2005; Fayer *et al.*, 2005), de los cuales seis se han encontrado infectando al ganado, las más comunes son el *Cryptosporidium parvum* y *C. bovis* en el intestino y *C. andersoni* en el abomaso (Xiao *et al.*, 2004). Este protozooario ocasiona en terneros neonatos deshidratación asociada a diarrea, cólico y complicaciones de diversas etiologías (Romero *et al.*, 2001).

Numerosos factores de manejo influyen el aspecto epidemiológico y clínico de la presentación de *C. parvum* en el ganado bovino; la enfermedad es altamente prevalente en becerros neonatos productores de leche y también en becerros productores de carne confinados; esta infección ocurre de raramente en becerros de potrero en potrero o en ganado adulto (O'Handley, 2007).

La presencia de *Cryptosporidium* spp. en heces de becerros ha sido estudiado en diferentes países, con prevalencias que van desde un 2.40% hasta un 100% (Quílez *et al.*, 1996; de la Fuente *et al.*, 1999; Wade *et al.*, 2000; Castro-Hermida *et al.*, 2002a,b).

Maldonado-Camargo *et al.* (1998) en la zona centro de México, determinaron la prevalencia y factores de riesgo para la excreción de *C. parvum* en becerros de la raza Holstein-Freisian, la prevalencia fue desde un 20 hasta un 29%; la edad de los animales fue fuertemente asociada a un riesgo, lo máximo que encontraron fue en la edad de 15 días.

Por otro lado Fayer *et al.* (2005) describieron una nueva especie, *C. bovis* basado en las diferencias del genoma y hospedador; hasta ahora el organismo solo ha sido identificado en ganado y no se ha reportado como zoonótico.

En la zona centro del estado de Veracruz, México Aguilar *et al.* (2007) realizaron un estudio en bovinos de carne, del cual los resultados que se obtuvieron fueron una prevalencia general de 78% en una población de 186 becerros, por municipio tuvo una variación desde un 12% hasta un 20%; por edad se separó en grupos de un día a cuatro meses, cinco meses y seis meses con prevalencias de 47%, 17% y 14% respectivamente.

Por lo anterior el objeto del presente estudio fue determinar la prevalencia y los factores de riesgo en ganado lechero especializado de una de las regiones de ganadería lechera más importante de México como la Comarca Lagunera y el estado de Veracruz ya que en ambos sitios no existen reportes sobre la prevalencia en becerras, de uno a 60 días de edad, debido a *C. parvum*, ni los factores de riesgo involucrados con la presencia de la enfermedad. Esta información es necesaria para establecer estrategias de control adecuadas para esta enfermedad y mejorar el estado de salud de las becerras.



## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Generalidades

El *Cryptosporidium* pertenece al Reino protista, *Phylum Apicomplexa*, Clase *conoidasida*, Sub-clase *coccidiasina*, Orden *eucoccidiorida*, Familia *cryptosporidiidae*, Género *Cryptosporidium* (Romero *et al.*, 2001). Muchas investigaciones se han realizado sobre *Cryptosporidium*, acerca de como este protozooario afecta a humanos y animales hace más de 30 años (Panciera *et al.*, 1971; Navin y Juranek, 1984), en ciertos estudios epidemiológicos *Cryptosporidium parvum* ha sido aislado de múltiples especies del tipo mamíferos, incluyendo el ganado, siendo así el que afecta exclusivamente al hombre el *Cryptosporidium hominis* (Hunter y Thompson, 2005). La forma más común de infestarse con este parásito es por la vía fecal-oral (Fayer *et al.*, 2000). *C. parvum* es responsable del 85% de infecciones gastrointestinales de becerros no destetados, pero solo el 1% en post-destetados. Los post-destetados y el ganado adulto son mayormente infestados por *C. bovis*, *C. andersoni* y el genotipo *C. deer-like* (Santín *et al.*, 2004).

Los hospedadores susceptibles se infectan a través de la ingestión de los ooquistes esporulados (Fayer *et al.*, 2000). En el ganado bovino *C. parvum* ha sido identificado como uno de los principales agentes etiológicos de la diarrea neonatal (Naciri *et al.*, 1999). Esto debido a que los ooquistes de *Cryptosporidium* son infectantes desde el momento en que son excretados por el hospedero ya que resisten al medio ambiente, por lo que pueden sobrevivir por largo tiempo en diferentes ambientes (Olson *et al.*, 2004).

Los becerros infectados pueden excretar un gran número de ooquistes, arriba de  $10^8$  por gramo de heces (Uga *et al.*, 2000); su ciclo incluye una primera fase que es asexual que prolifera en la superficie de la mucosa, y la segunda fase sexual es intracelular, tiene un desarrollo extra-citoplasmático, esta fase termina con la formación del ooquiste, fase infectiva del parásito, que es eliminada en grandes cantidades en las heces (Hunter y Thompson, 2005).

Una muestra positiva es la que llega a presentar uno o más ooquistes de *Cryptosporidium* por frotis; los cuales se observan como unos cuerpos redondos ligeramente elípticos de 5 micras de tamaño, teñidos de color fucsia con algunas granulaciones oscuras en su interior, contrastando con el azul del fondo del frotis (Romero *et al.*, 2001).

Los ooquistes de *Cryptosporidium* están totalmente espurulados y son infecciosos cuando son excretados; son parásitos monoxenos e intracelulares facultativos. Recientemente se han descrito diferencias en el ciclo de vida por una pequeña subunidad (SSU) rRNA entre *Cryptosporidium* y otras coccidias, la cual sugiere que este podría estar más cercanamente relacionado con los gregarines (Carreno *et al.*, 1999; Hijjawi *et al.*, 2002). Todo el ciclo de vida ocurre en los enterocitos en vacuolas parasitóforas situadas en el borde de la cerda entre la membrana del plasma y el citoplasma o en el lumen (Smith *et al.*, 2005).

El mecanismo por el cual los ooquistes llegan a la eclosión es poco entendido, tanto como el del hospedero como del parásito. *In vitro* los estudios de eclosión para *C. parvum* tratan de imitar las condiciones biológicas de un organismo tales como la temperatura de 37°C, fluctuaciones de pH, sales biliares, agentes reductores, proteasas y tiempo; pero aún así existe una incomprensión en la jerarquía o sinergismo de los mecanismos específicos por la falta de estandarización de los métodos (Robertson *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2005). Lo que sí es un hecho es que los rangos de eclosión disminuyen con una temperatura de 4°C con lo cual se da soporte a la hipótesis de que al incrementarla a 37°C se activa la eclosión, incluso en la ausencia de estímulo alguno por parte del hospedero (Fayer y Leek, 1984; Reduker y Speer, 1985).

Para que *C. parvum* pueda iniciar la infección la primera barrera que tiene que atravesar es el moco que protege al intestino por lo cual el ooquistes del parásito no puede entrar en contacto directo con las vellosidades intestinales. El mecanismo por el cual el parásito degrada es mediante la enzima proteínasa de cisteína segregada por el esporozoito la cual puede llegar a degradar la barrera y establecer contacto con los receptores del enterocito (Coombs *et al.*, 1997). En becerros que son destinados para la producción de carne, la prevalencia de *C. parvum* puede ser muy alta en los sistemas de manejo intensivo (Naciri *et al.*, 1999), pero esta prevalencia es aún baja comparada con la de becerros de ganadería lechera a pesar de que estos fueron criados bajo las mismas condiciones (Kvác *et al.*, 2006).

### **1.2 Situación mundial del *Cryptosporidium* spp. en bovinos**

Hamnes *et al.* (2006) en Noruega realizaron un estudio para determinar la prevalencia del *Cryptosporidium* en tres diferentes áreas, en el estudio los hatos con menos de cinco o más de 40 vacas fueron excluidas. El resto de los hatos en cada área fueron seleccionados al azar. Estos hatos fueron contactados por correo electrónico y por teléfono. El periodo de muestreo fue de junio del 2001 a marzo del 2003, todos los becerros muestreados se encontraban estabulados. La edad de los becerros fue de 3 a 183 días. Para su análisis se utilizó el método de microscopia por flotación descrita por Olson *et al.* (1997) y los resultados fueron: 53% de prevalencia (72 de 136) entre las granjas y un 12% (167 de 1,386) entre los becerros y el nivel de ooquistes de *Cryptosporidium* fue bajo en la mayoría de los becerros infectados. Olson *et al.* (2004) demostraron que *Cryptosporidium* tiene emergencia como un parásito importante en el ganado lechero por su alta patogenicidad y su significativo potencial en la salud pública por su transmisión zoonótica. Otros estudios como el de Robertson y Gjerde (2001) han demostrado que *Cryptosporidium* tiene mayor prevalencia en las fuentes de agua de Noruega.

Björkman *et al.* (2003) en Suecia determinaron, a través de un estudio en 75 hatos, la presencia y significancia de *C. parvum* en becerros de Suecia, por medio de la técnica de Ziehl-Neelsen modificada. Se muestrearon un total de 270 becerras de una edad de 1 día de nacidas hasta 90 días de edad, se identificó que el 11% (16/146) en heces diarreicas, *C. parvum* fue hallado en becerras con una edad que comprendía de 7-84 días de edad.

En Galicia, Nueva España Castro-Hermida *et al.* (2006) tomaron muestras de 734 animales seleccionados al azar de 60 hatos, estos animales se dividieron en 12 grupos de edades distribuidos en grupos del: <1 mes (53), 1-5 meses (30), 6-11 meses (31), 12-16 meses (72), 17-20 meses (64), 21-24 meses (96), 3 años (94), 4 años (74), 5 años (67), 6 años (67), 7-8 años (63) y 9-13 años (23) dando como resultado una prevalencia general de todos los animales del 14.20% (104/734), provenientes de 40 diferentes hatos (66.70%); la prevalencia de ganado infectado tuvo un intervalo entre 58.50% en becerros <1 mes y 7.90% en animales con una edad de entre 7-8 años, llegando a la conclusión de que el porcentaje de infección disminuyó significativamente con el incremento de la edad. Las infecciones más recurrentes se presentaron en los grupos de becerros de 1-5 meses (23.30%) y de 6-11 meses (25.80%).

En el área de Cheshire, Inglaterra, Brook *et al.* (2008) muestreó becerros no destetados con el propósito de llevar a cabo un estudio sobre la prevalencia y los factores de riesgo asociados con *Cryptosporidium* spp. Se recolectaron muestras del 50% de los becerros no destetados existentes en cada granja o un mínimo de cinco por cada una. Diversas variables fueron tomadas en cuenta, tales como tipo de alojamiento de los becerros (individual, grupal, por sexo o mezclados, m<sup>2</sup> por becerro, profundidad de la cama y limpieza de esta), si estaban identificados, registro de nacimientos, si estaban limpios de la cola, de los cuartos traseros y de los flancos, también se tomó en cuenta la consistencia de las heces (Hughes, 2001) y con esto el color de estas (crema/naranja, café/crema o café). Las muestras fueron primeramente examinadas por medio de la técnica de tinción de Ziehl-Neelsen, también con un kit comercial de inmunoensayo (ProSpect *Cryptosporidium* Microplate Assay; Remel, Lenexa, Kansas, USA), y si resultaban positivas a cualquiera de estas, se les examinaba posteriormente por medio de PCR de 18S rRna gene locus (Xiao *et al.*, 1999).

De un total de 215 muestras recolectadas de 41 hatos, el 28% fueron positivas confirmadas por PCR (60/215), por hatos hubo un 66% de prevalencia (27/41) lo que indica que en todos los hatos hubo al menos un animal positivo, la prevalencia en los hatos muestreados fue desde un 11 hasta un 67%, y la media fue del 36%, la mayoría de las muestras fueron clasificadas como *C. parvum* (50/54). En cuanto a los factores de riesgo analizados, el grosor de la cama, ya que con la profundidad de 11-15 cm (OR 0.12, IC<sub>95%</sub> 0.03-0.48,  $P= 0.01$ ) la infección en esos animales fue mucho menor que con la de 0-5 cm; la consistencia de la heces no fue concluyente con el grado de infección ya que la consistencia se puede alterar por la alimentación del becerro y con respecto a la edad se llegó a la conclusión de que los becerros con una edad entre los ocho y 21 días presentan más riesgo que los bovinos con edades mayores, el odds ratio que se obtuvo en animales con 8-14 días fue de 6.11 y con 15-21 días fue de 5.11 (IC<sub>95%</sub> 1.14-23.01,  $P>0.05$ ).

Watanabe *et al.* (2005) identificaron por primera vez el genotipo *C. parvum* en heces fecales de Taiwan, por medio de las técnicas de Ziehl-Neelsen modificada (ZNM), Ensayo de Inmunofluorescencia (IFA) y tipificando por medio de la técnica de PCR (gen 18S rRNA); para este estudio utilizaron muestras de ganado bovino y cabras de la región, los bovinos fueron catalogados en diferentes rangos de edad como menos de un mes, de uno a tres meses, de tres a seis meses, de 6-24 meses y ganado adulto con una edad mayor de los 24 meses; el total de muestras tomadas fueron 460 de 27 hatos, para las cabras se tomó una edad de cinco días a seis años, con lo cual reunieron un total de 123 animales de 10 hatos. La prevalencia reportada en esta investigación fue de 37.60% (173/460) para el ganado y en las cabras se obtuvo una prevalencia del 35.80% (44/123), en cuanto a la consistencia de las heces de bovino se obtuvo que en las heces diarreas hubo una frecuencia del 41.50% (59/142) y un 39.80% (107/269) en heces no diarreas. Las heces fecales que se encontraron positivas por medio de la prueba de IFA fueron posteriormente tipificadas por medio de PCR, confirmando que lo encontrado en esas heces era *Cryptosporidium parvum*, de manera similar ocurrió en tres cabras.

En la India Rajkhowa *et al.* (2006), realizaron un estudio mediante un kit de ELISA para conocer la prevalencia de *C. parvum* en "mithuns" (*Bos frontalis*) y se reportaron una prevalencia del 56%; la mayor prevalencia que se encontró fue en los "mithuns" de 1-6 meses de edad con 81% y la menor en los animales de más de dos años de edad con 42%. En cuanto a la consistencia de las heces se observó una prevalencia del 94% en las heces diarreicas y la menor fue en las no diarreicas con 51%. En la manera de vivir de los animales también hubo diferencia ya que se reportó que los "mithuns" bajo un sistema semi-intensivo tuvieron una mayor prevalencia (64%) en comparación con los de vida libre (40%). Posteriormente Paul *et al.* (2008) reportaron en tres diferentes regiones de la India por medio de la técnica de PCR de 18S SSU rRNA reportaron que el 30.20% de 457 muestras fecales obtenidas de bovinos neonatos estaban infectadas con *C. parvum*, la prevalencia más alta reportada fue en los meses de lluvia con 37.30%. En el 32.30% de los becerros muestreados se observó una diarrea aguda, los menores de 15 días de edad mostraron una prevalencia del 45.10%. En cuanto a la región en donde se tomaron las muestras, se identificó que en la parte norte hubo una mayor frecuencia (35.40%) en comparación con la este o sureste. Con esto concluyeron que *C. parvum* fue la única especie de *Cryptosporidium* que prevaleció en los becerros en las tres diferentes regiones muestreadas en la India.

Burenbaatar *et al.* (2008) en Mongolia reportaron por primera vez la prevalencia y genotipificación de *Cryptosporidium*, en total 439 muestras de ganado bovino, 16 de cabras jóvenes y 5 borregos; por medio de la técnica de Inmunofluorescencia (IFT), posteriormente se analizaron las muestras positivas por medio de PCR (gen 18 SSU rRNA). Los resultados de IFT indicaron que 116 muestras provenientes de ganado fueron positivas, con una prevalencia total del 26.40%, por otro lado también resultó que el 19.10% de los animales muestreados eran becerros de menos de un año de edad. Con respecto a la tipificación, de las 116 muestras positivas, 47 fueron analizadas por medio de PCR, de las cuales 11 fueron positivas mostrando que la especie de *Cryptosporidium* era *C. andersoni* en becerros de uno a tres meses de edad, una presentó *C. bovis* y no se encontraron ooquistes de *Cryptosporidium* en las muestras fecales provenientes de cabras o borregos.

En Tailandia, Nuchjangreed *et al.* (2008) por medio de las técnicas de tinción ácido-rápida y posteriormente por PCR determinaron la prevalencia y tipificación de *Cryptosporidium* para bovinos en esa zona. Los ooquistes de *Cryptosporidium* fueron encontrados en una frecuencia del 13% (26/200) y por medio de PCR se detectó un 9.63% (8/83) de prevalencia, con lo cual se obtuvo el resultado de que existe *C. parvum*.

Safavi *et al.* (2010) realizaron un estudio de caso-control matched 1:1 en becerros con una edad menor a la de un mes, las muestras fueron colectadas por un periodo superior a seis meses de un total de 112 animales con signos clínicos de diarrea. Las muestras fueron analizadas para poder encontrar la presencia de *Cryptosporidium* spp. por medio de la técnica de Ziehl-Neelson. Los ooquistes de este estuvieron presentes en 51.80% de los becerros con diarrea y en un 21.40% en los becerros control. Dentro de los becerros con diarrea la prevalencia más alta estuvo ubicada en la edad de 8-14 días (74.50%) y la más baja en los animales con una edad de 22-30 días (23.80%); y en cuanto a los factores de riesgo, obtuvieron que los animales con 1-7 días de edad alcanzaron una RM= 8 (IC<sub>95%</sub> 1.07-354.90; *P*= 0.04) y para los de 8-14 días una RM= 15 (IC<sub>95%</sub> 3.8-129.5; *P*= 0.0001).

En Zambia Geurden *et al.* (2006), estimaron la prevalencia de *Cryptosporidium* spp., en tres sistemas diferentes de manejo, las muestras fueron colectadas de becerros con una edad de tres meses. 250 muestras fueron colectadas de hatos lecheros, 238 de ganado de carne y 256 de hatos de ganado tradicional, todas las muestras fueron analizadas por medio de un kit comercial copro-antigen ELISA (Techlab® *Cryptosporidium* test). Las prevalencias en becerros lecheros, de carne y tradicionales fueron de 42.80%, 8.0% y 6.3% respectivamente, en cuanto a los hatos que mostraron al menos un animal infectado se distribuyo de la siguiente manera: 75.70% de los hatos lecheros, 44% de los hatos de carne y 15.20% de los hatos tradicionales. Tanto *C. parvum* como *C. bovis* fue identificado por medio de la amplificación genotípica y en un becerro de ganado de carne se identifico *C. suis*.

En la provincia de Heilongjiang, China Liu *et al.* (2009) realizaron un trabajo con 507 muestras fecales de seis hatos de la región, las cuales sometieron las pruebas de tinción ácido-rápido modificado para las muestras provenientes de becerros no destetados y para los post-destetados y ganado adulto se realizó la prueba de flotación de Sheather´s ambas tomadas de Mc Nabb *et al.* (1985). Obtuvieron que 5.33% (27/507) de las muestras resultaron positivas a *Cryptosporidium* por medio de la examinación al microscopio; posteriormente se procedió a la tipificación y encontraron que 26 de los especímenes fueron identificados como *C. andersoni*.

### **1.3 Prevalencias y formas de detección del parásito por medio de diferentes pruebas**

Trotz-Williams *et al.* (2005) utilizaron la prueba de Inmunocromatografía de Flujo Lateral (IFL) en muestras que fueron recolectadas directamente del recto de los animales los cuales tenían una edad <30 días en hatos del sur de Ontario, esto fue parte de un proyecto que estudio los factores de riesgo involucrados en la infección de *C. parvum* conducido por Ontario Veterinary College (OVC) el periodo de estudio fue de Junio 2003 a Septiembre 2004. Las pruebas que se utilizaron fueron tres, microscopia por flotación (amontonamiento húmedo de sucrosa), Inmunocromatografía de flujo lateral y PCR-RFLP con gel de electroforesis, esta ultima fue tomada como la prueba Oro Standard. En los resultados se analizaron la sensibilidad y especificidad entre pruebas. Las muestras se distribuyeron de la siguiente manera para la realización de las pruebas: un total de 199 muestras fueron tomadas, de las cuales 84 fueron positivas en cuanto a la técnica de microscopia por flotación, realizada en OVC. De las 199, 166 muestras (55 positivas y 111 negativas por microscopia) fueron analizadas usando el kit de IFL y 168 (83 positivas y 85 negativas por microscopia) fueron analizadas por medio de PCR-RFLP; solo 135 fueron analizadas por medio de los tres métodos diagnósticos.



Los resultados en cuanto a la concordancia de pruebas de microscopia por flotación contra COWP PCR-RLFP, de las 168 muestras que fueron muestreadas por los dos métodos, solo 15 tuvieron resultados que no concordaban ya que no hubo un bajo número de ooquistes (seis ooquistes y un ooquistes por portaobjetos) fueron detectados en dos de cinco muestras denominadas "falsos positivos", mientras que en los otros tres "falsos positivos" se encontró un rango por campo de ooquistes de 0.1-12. Asumiendo que la prueba de oro estándar, fue la de COWP PCR-RFLP, tuvo 100% sensibilidad y especificidad, la sensibilidad y especificidad de la prueba de microscopia por flotación realizada en el OVC fue de 88.6% (IC<sub>95%</sub>: 80.1-94.4%) y de 93.8% (IC<sub>95%</sub>: 86.0-97.9%) respectivamente; y la prueba de concordancia tuvo un valor de kappa de 0.82 (IC<sub>95%</sub>: 0.74-0.91) (Trotz-Williams *et al.*, 2005).

En microscopia por flotación contra IFL se analizaron 166 muestras por ambos métodos, 12 de las cuales tuvieron resultados no concordantes, cinco muestras fueron positivas a IFL. Para dos de las cinco muestras discordantes, estas fueron positivas por PCR-RFLP. La concordancia entre estas dos pruebas tuvo un valor de kappa de 0.84 (IC<sub>95%</sub>: 0.75-0.92) (Trotz-Williams *et al.*, 2005).

Por último se comparó la IFL contra COWP PCR-RFLP, con estas pruebas se analizaron un total de 135 muestras, en estas hubo 18 con resultados que no concordaron, 13 fueron "falsos negativos" y cinco "falsos positivos", ocho de las 13 considerados como "falsos negativos", también fueron negativos a microscopia por flotación. La sensibilidad y especificidad que se obtuvo fue de 78.3% (IC<sub>95%</sub>: 65.8-87.9%) y de 93.3% (IC<sub>95%</sub>: 85.1-97.8%) respectivamente. Para la concordancia se calculo un valor de kappa de 0.73 (IC<sub>95%</sub>: 0.61-0.84) (Trotz-Williams *et al.*, 2005).

Thompson *et al.* (2007) realizaron en hatos de bovinos del norte de Irlanda un estudio con becerros que sufrían de problemas diarreicos, estos con una edad de menos de 30 días, por un período de un año por medio de microscopia, genotipificación y subtipificación, para determinar la dinámica de transmisión.

De marzo del 2002 a febrero del 2003 se examinó la presencia de *Cryptosporidium* por medio de la técnica de tinción Ziehl-Neelsen modificada (ZNm) y para saber que tipo de *Cryptosporidium* era se uso la técnica de PCR. Con lo cual obtuvieron los siguientes resultados, se obtuvo una frecuencia del 37.40% (291/779) por medio de ZNm y la tipificación quedó distribuida de la siguiente manera, *C. parvum* fue identificado en 95.10% (213/224), *C. bovis* en 3.6% (8/224) y el genotipo *C. deer-like* en 1.3% (3/224).

Klein *et al.* (2008) utilizaron la inmunocromatografía para detectar *C. parvum* obteniendo una sensibilidad y especificidad de 100% y 94.6% respectivamente, en contraste con la técnica de oro estándar de sedimentación-flotación y tinción de Ziehl-Neelsen, así mismo se probaron con la técnica de PCR; las muestras fecales utilizadas fueron de 180 becerros con una edad entre 1-42 días, provenientes de 61 hatos seleccionados de manera aleatoria (98 becerros tenían diarrea). Todas las pruebas fueron siguiendo las especificaciones del kit (MegaCor Diagnostik GmbH) hecho por la compañía BCV (FASTest CRYPTO Strip); usando la técnica de sedimentación-flotación se obtuvo una prevalencia del 28.3%, siendo 51 muestras positivas, y todas estas fueron igualmente positivas con IFL (sensibilidad del 100%). Siete muestras positivas con IFL, fueron negativas con la técnica de sedimentación-flotación (especificidad del 94.6%) y seis de estas siete, fueron positivas con la tinción del Ziehl-Neelsen.

#### **1.4 Situación en América del *Cryptosporidium* spp.**

En un estudio realizado por Garber *et al.* (1994) con 7,369 becerros de 1,103 ganaderías lecheras en EE.UU. se detectó una prevalencia del 48% en becerros con una edad entre 7-21 días, con al menos un becerro positivo en 59% de los hatos.

Ruest *et al.* (1998) realizaron un estudio en Québec y la infestación detectada tuvo una prevalencia de 88%, de un total de 505 hatos lecheros. Se han asociado diferentes causas para los brotes de la diarrea en los becerros, tales como la fuente de agua para los animales, reportado en EE.UU., Inglaterra y Europa (Patel *et al.*, 1998; Ong *et al.*, 1999; Glaberman *et al.*, 2002) los cuales mencionan que hubo una epidemia surgida en Milwaukee en 1993; en ese año se especuló que los

responsables de la epidemia por ooquistes de *Cryptosporidium* fueron los cuerpos de agua, ya que hubo un fallo en la planta de tratamiento (Mc Kenzie *et al.*, 1994), en hatos ganaderos que estaban cerca de dos ríos. El autor comentó que la mano del hombre estuvo presente, ya sea por aguas residuales o mezclas con las lluvias de primavera y derretimiento de nieve; de manera posterior el trabajo molecular indicó que *C. hominis* fue responsable de la epidemia en Milwaukee (Sulaiman *et al.*, 2001), este descubrimiento fue esencial para no culpar al ganado, ya que se consideraba que éstos eran la fuente de la epidemia; sin embargo de estos no se aisló *C. hominis* (Morgan-Ryan *et al.*, 2002), además *C. parvum* se aisló de muy pocas fuentes de agua (Ong *et al.*, 1999; Glaberman *et al.*, 2002).

Sischo *et al.* (2000) encontraron el 15% de prevalencia en 198 becerros de tres semanas de edad, en 11 hatos del Noreste de los EE.UU., los cuales presentaban ooquistes de *Cryptosporidium* en 10 de los 11 hatos. En la cuenca del estado de Nueva York de un total de 453 muestras que fueron colectadas provenientes de 19 ranchos, de las cuales 184 tenían una edad de  $\leq 6$  meses (incluidos 81 animales de  $\leq 60$  días), 104 novillas mayores de seis meses y 165 animales adultos (vacas lactantes y horras); la prevalencia fue de 3.53%. Esto era mucho mayor a lo descubierto antes en otra cuenca próxima a ésta por Wade *et al.* (2000) que fue de 0.9%; así mismo examinaron el nivel de prevalencia entre hatos, la cual fue del 42% (en 8 de 19 hatos) y la prevalencia entre los animales muestreados fue de 3.1 a 21.4%

Starkey *et al.* (2006), llevaron a cabo un estudio en el río Susquehanna localizado en el condado de Delaware, New York el cual duró tres meses (junio a agosto). De 100 hatos solo 19 fueron seleccionados al azar. Se muestrearon animales con una edad menor a los seis meses, en cada hato sólo se muestreó un máximo de 15 animales, también se muestrearon a cinco novillas de seis meses de edad, cinco vacas lactantes y cinco vacas secas, esto en cada hato en estudio. En este estudio se colectaron detalles del manejo en el hato, para lo cual se aplicó un cuestionario para eliminar el error del observador; se preguntó acerca del manejo del calostro, tipo y frecuencia de cambios de cama, manejo, estado del hato y la existencia de roedores y problemas con aves silvestres.

En cuanto a las técnicas que se utilizaron, las muestras fueron procesadas inicialmente con una técnica estándar de cuantificación por flotación con centrifugación, por cada muestra se tomó 1 g de heces procesado con azúcar para recuperar los ooquistes de *C. parvum*-like; para su análisis se usó campo brillante con contraste; también se utilizó un ELISA comercial (ProSpecT *Cryptosporidium* Polyclonal Microplate Assay; Alexon-Trend, Inc., Lenexa, KS) pero sólo se utilizó en animales con <45 días de edad. Las muestras que se detectaron como positivas por una o ambas pruebas se procedió a analizarlas por medio de PCR. De un total de 453 muestras colectadas 184 eran animales con una edad de  $\leq 6$  meses (incluyendo 81 animales con una edad  $\leq 60$  días), 104 novillas mayores de seis meses y 165 animales adultos. Hubo un 92% de concordancia entre la técnica de flotación y ELISA. La prevalencia total de estudio fue del 3.53% (16/453) determinado por medio de la técnica de flotación; cuando se examinó la prevalencia en cuanto a los 19 hatos que estuvieron en estudio resultó que ocho de los 19 tuvieron al menos un animal positivo dando así una prevalencia del 42% y entre animales de cada hato muestreado esta fluctuó entre un 3.10 a 21.40%. El promedio de edad en la que los animales defecaban ooquistes fue de 16 días de edad. Cuando se examinaron los animales con una edad menor o igual a 60 días se obtuvo una prevalencia del 20% y la prevalencia más alta encontrada fue en los animales con 31 días o menos de edad con un 32%.

Starkey *et al.* (2006) estudiaron diferentes factores de riesgo, de los cuales fueron medidos la edad, tipo de agua que se les proporcionaba, tipos de establos para las vacas lecheras, como permanecían los becerros si atados o no atados, número total de becerros no destetados en contacto con los becerros destetados y vacas adultas. Los resultados de estas asociaciones fueron que la probabilidad de que los becerros arrojaran ooquistes decreció con el cambio de fuente de agua con un RM = 0.02 (IC<sub>95%</sub> 0.001-0.285;  $P= 0.133$ , de un criterio de  $P \leq 0.2$ ) y con la edad del animal este se incrementa OR= 0.9, los becerros amarrados tuvieron un mayor riesgo de arrojar los protozoarios que en otros tipos de confinamiento (Wade *et al.*, 2000) y la probabilidad de que los becerros arrojaran ooquistes de tipo *C. parvum* aumento con el número becerros no destetados en el hato.

En la costa este de los EE.UU. Fayer *et al.* (2006) determinaron la prevalencia de las diferentes especies de *Cryptosporidium* en 571 novillas, con una edad de uno a dos años provenientes de 14 hatos lecheros en siete estados. Cada muestra fue obtenida directamente de cada novillona y examinada posteriormente por medio de PCR. En este estudio se reportó una prevalencia del 11.90% de *Cryptosporidium* spp. y sólo el 0.70% fue *C. parvum*. De las otras especies se identificaron 68 por medio de PCR, siendo 1, 4, 10, 24 y 29 de los cuales fueron *C. suis*, *C. parvum*, genotipo de *C. deer-like*, *C. bovis* y *C. andersoni*, respectivamente. Estos descubrimientos demostraron una baja prevalencia de infección en ganado lechero de uno a dos años de edad, a diferencia del ganado con menor edad, así como también del cambio de diversidad en las especies de *Cryptosporidium* spp. presentes.

Posteriormente Santín *et al.* (2008) llevaron a cabo un estudio longitudinal de 30 animales con una edad que iba desde el nacimiento hasta los 24 meses de edad. De estos se obtuvieron un total de 33 muestras por animal, de la granja de Maryland, todas hembras de raza Holstein. Estas se fueron separando en cuanto avanzaban de edad con el siguiente criterio becerras son desde que nacieron hasta ocho semanas de edad, con una edad de tres a 12 meses son destetados y novillas fueron consideradas de los 13 a los 24 meses. Las muestras se recolectaban en los siguientes intervalos de tiempo: cada semana en animales de uno a ocho semanas (ocho muestras por animal), cada dos semanas de animales con una edad de 10-12 semanas (seis muestras por animal) y cada mes a animales con una edad de 6-24 meses (19 muestras por animal). Estas se analizaron por medio de dos métodos que fueron Inmunofluorescencia y PCR. En este estudio se obtuvo una prevalencia del 19.20% y del 12.90% por medio de las pruebas de PCR e Inmunofluorescencia respectivamente, la mayor prevalencia se obtuvo en los animales con una edad que iba desde el nacimiento hasta los tres meses, la cual decreció conforme a la edad de los animales iba aumentando, lo cual se pudo observar en ambos métodos de diagnóstico ( $P < 0.0001$ ).

De los 30 animales, 29 fueron positivos (96.60% de prevalencia), un segundo pico fue observado en los animales con 18 semanas de edad en la cual 14 de los 30 becerros estaban infectados (46.70% de prevalencia). Los datos de secuencia para 190 PCR identificados como especímenes positivos fueron *C. parvum*, *C. bovis*, genotipo de *C. deer-like* y *C. andersoni* con prevalencias acumulativas de 100, 80, 60 y 3.3% respectivamente. *C. parvum* constituye el 97% de la infección en los no destetados y solo un 4% y 0% en post-destetados y novillas respectivamente.

Coklin *et al.* (2008) en la isla de Prince Edward, Canadá, recolectaron 183 muestras de animales con una edad menos de seis meses provenientes de 11 hatos, muestreo hatos por conveniencia, los cuales se localizaban cerca del Colegio Veterinario del Atlántico; el número de becerros muestreados por explotación tuvo un rango de 7-27 y la raza que predominó fue la Holstein-Friesian. Estas fueron colectadas directamente del recto con guante y se transfirió la muestra a un envase de plástico, siendo refrigerada la muestra a 4° C para su posterior proceso 24 horas después. Se utilizaron las técnicas de Inmunofluorescencia microscópica (Uehlinger *et al.*, 2006), se hizo extracción de DNA de 38 muestras con las instrucciones del fabricante y se amplificó el gen HSP-70 de *Cryptosporidium* spp. por medio de PCR y con esto se obtuvo una prevalencia del 6.2% (10 becerros), esto fue en cuatro de los 11 (prevalencia de 36.4%) hatos que se muestreó. Se resalta el hecho de lo observado por Fayer *et al.* (2006) de que en los becerros no destetados se reporta la infestación predominante de *C. parvum*, el cual es completamente reemplazado en becerros post-destetados y animales de mayor edad con *C. andersoni*, *C. bovis* y genotipo *deer-like*.

Trotz-Williams *et al.* (2008), realizaron un estudio para identificar las prácticas de manejo que se asociaban con el incremento de prevalencia en los hatos del sur de Ontario por *C. parvum*, para lo cual tomó muestras de heces de 1089 becerros con una edad de 7-28 días; el análisis fue realizado por medio de dos técnicas, método de sucrosa y por PCR-RFLP, con lo cual se obtuvo una prevalencia del 30% (324/1089) por medio de microscopia, y la prevalencia entre hatos fue 77% (92/119).

En este trabajo también se evaluaron los factores de riesgo, con lo cual se encontró que cuando un hato tenía de 4-6 o >6 animales en un mismo corral o casa, la razón de momios fue de 2.1 (IC<sub>95%</sub> 1.4-3.1;  $P= 0.001$ ) y 2.3 (IC<sub>95%</sub> 1.5-3.5;  $P= 0.001$ ) respectivamente, y con una  $P = 0.001$  por todo el grupo; otro parámetro interesante que se consideró como un factor de riesgo fue el de separar a la cría de la madre tan pronto como este naciera con una razón de momios de 1.5 (IC<sub>95%</sub> 1.1-2.2) y con una  $P = 0.01$  y como factores protectores se consideraron tanto el piso de concreto donde descansaban los becerros y el de lavar los utensilios con jabón/detergente, con una razón de momios de 0.6 (IC<sub>95%</sub> 0.5-0.8)  $P = 0.002$  y 0.7 (IC<sub>95%</sub> 0.5-0.9)  $P = 0.015$  respectivamente.

#### **1.4.1 Situación en Centro y Sudamérica**

En Colombia, se determinó la más alta prevalencia de criptosporidiosis bovina (87%) (Vergara *et al.*, 1999), en contraste con México, Brasil y Perú que muestran prevalencias de 25%, 9.75% y 26%, respectivamente (Nevarez *et al.*, 1999; Oliveira, 2000; Rojas, 2002).

En Sao Paulo, Brasil, Lippi y Castro (2003) realizaron un estudio epidemiológico de la criptosporidiosis en becerros de hatos lecheros; de un total de 930 becerros provenientes de 43 rebaños lecheros se colectaron muestras de heces a 200 animales que presentaban diarrea y 200 sin diarrea, entre cero y 60 días de edad, los cuales fueron distribuidos aleatoriamente en cinco grupos de 40 animales, de acuerdo con la siguiente escala de edades en días: 0-7, 8-15, 16-22, 23-30 y 31-60. Se les analizó con el método de Ziehl-Neelsen, modificada en la concentración del ácido sulfúrico para promover la diferenciación del número de ooquistes contabilizados en 25 campos ópticos. Los resultados indicaron que de los 930 becerros 21.5% presentaban heces diarreicas, se verificó que becerros agrupados en escala de edades de ocho 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. En cuanto 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. Se obtuvo una prevalencia general del 38%.

En Venezuela Ramírez *et al.* (2004) realizaron un estudio con becerros de ambos sexos de dos fincas, una de ganadería lechera (GL) y otra de ganado de doble propósito (GDP), en la GL se contaba con crianza artificial de becerros (41 animales) estos mestizos *Bos taurus* de la raza Carora y Holstein, los cuales fueron destetados al quinto día de nacidos y alojados en jaulas de 1.50 m de ancho por 2.50 m de largo en los cuales se albergaban de uno a tres animales. En total, 52.5% de prevalencia (52/99) de los becerros examinadas excretaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp., apreciándose dichas formas a partir del tercer día de vida. En la finca de GDP, el porcentaje de infección fue 43.1%, alcanzando a 75% en el grupo de 15-21 días de edad, seguido del grupo de 22-30 días con 54.5%. En la finca de GL, la prevalencia se ubicó en 65.8% y los mayores porcentajes de infección correspondieron a los grupos 8-14 y 15-21 días de edad con 100 y 75%, respectivamente. En ambas explotaciones, se observó una asociación significativa entre la infección por *Cryptosporidium* spp. y la edad de los becerros.

Por otro lado Chirinos *et al.* (2004), realizaron de igual manera en Venezuela otro muestreo no probabilístico por consentimiento; en 10 hatos accedieron a prestar su ganado, se aplicó una encuesta. La muestra que se obtuvo fue de 152 animales de ambos sexos, sin signos aparentes de enfermedad, con una edad que iba de tres a 180 días. Se recolectó una muestra directa del recto en una bolsa de polietileno y se transportaron en cavas con hielo para su posterior procesamiento, el cual se realizó con la técnica de Zielh-Neelsen modificada (Olson *et al.*, 1997) y de flotación de solución de sacarosa de Sheather (Bernal *et al.*, 1998). El resultado de esta investigación resultó en un 80% de los hatos se diagnosticó *Cryptosporidium parvum*, este también fue encontrado en 31 becerros (20.4%), en cuanto a la edad de los animales se encontró que los más afectados fueron los que tenían una edad de tres a 60 días con un 24% y los que tenían de 90 a 150 días tuvieron un 18.2%, en estudio se pudo corroborar que los becerros examinados que permanecían con su madre durante 48 a 72 horas después del nacimiento, unido a la inmadurez del estado inmunológico del becerro y el corto periodo prepatente del ciclo de vida del parásito esto de acuerdo con otros autores como Bednarska *et al.*, 1998; Scout *et al.*, 1998; Mohamed *et al.*, 1999; Naciri *et al.*, 1999.



Del Coco *et al.* (2008) en Argentina, estudiaron en el área rural General Masilla, en el distrito de Magdalena localizado en a 96 km. de la ciudad de Buenos Aires; 280 becerros holando-argentina, con una edad  $\leq 30$  días, independientemente de su estado de salud. Los animales fueron separados en los siguientes grupos de edades: 1)  $\leq 7$  días, 2)  $\geq 8 \leq 14$  días, 3)  $\geq 15 \leq 21$  días y 4)  $\geq 22 \leq 30$  días de edad (de la Fuente *et al.*, 1999), las muestras fueron examinadas macroscópicamente para establecer la consistencia ya fuera diarreica o normal según McAllister *et al.* (2005) y también para detectar presencia de sangre y moco acorde con Castro-Hermida *et al.* (2002a). Para el procesamiento de estas muestras se utilizó la técnica de Ziehl-Neelsen (Casemore *et al.*, 1985). De los 280 becerros utilizados en el estudio 48 eliminaban ooquistes (prevalencia del 17%), de los cuales el 57.1% fueron becerros con diarrea, todos los becerros infectados fueron de una edad de  $\leq 14$  días. La correlación entre las heces normales y diarreicas con respecto a la presencia de *Cryptosporidium* spp., fue negativa; sin embargo, en las heces diarreicas sin sangre se encontró un 37.50% como positivas y el 83.30% de las positivas revelaron mucosidad. Esta investigación arrojó que la asociación entre la intensidad de infección y el grupo de edad para los animales de  $\leq 7$  días hubo una prevalencia del 66.70% con una concentración de  $>10$  ooquistes por campo en 20 de éstos y el grupo con la edad de  $\geq 8 \leq 14$  días tuvo una prevalencia del 33.40% con la misma intensidad de ooquistes que el grupo anterior.

### **1.5 Transmisión a los humanos**

La mayoría de las infecciones que ocurren en humanos son ocasionadas por *C. parvum* y *C. hominis*; sin embargo, esto puede variar de acuerdo a la localización geográfica; además que los humanos inmunocompetentes pueden presentar la enfermedad en cualquiera de sus fases (Cama *et al.*, 2008). Los síntomas en personas sanas se caracterizan con diarrea líquida que se puede acompañar por dolores abdominales, pérdida de apetito, ligero incremento en la temperatura, náuseas, vómito y pérdida de peso; pero también ocurren con frecuencia las infecciones asintomáticas (Huang y White, 2006).

En Tailandia Nuchjangreed *et al.* (2008) llevaron a cabo un estudio en 46 individuos los cuales padecían la enfermedad de VIH, a estas muestras se les examinó por medio el método de tinción de ácido-rápido, con una prevalencia del 28.70% (13/46), de los cuales 28.26% (13/46) presentaban diarrea y 71.74% (33/46) no. En cinco pacientes (38.46%) con diarrea y ocho (61.53%) sin diarrea, se encontraron positivos a *Cryptosporidium*. No se encontró asociación significativa entre ser positivo a *Cryptosporidium* y la edad o el sexo. Se le realizó de manera paralela a todas las muestras la prueba de PCR, lo cual reportó que el 4.35% (2/46) eran positivos a *C. parvum*.

### **1.6 Situación Nacional en bovinos de tipo lechero**

En tres estados de la zona central de México Maldonado-Camargo *et al.* (1998) determinaron la prevalencia y factores de riesgo para la excreción de *C. parvum* en becerros de la raza Holstein-Freisian. Las muestras fueron recolectadas solo una vez por cada becerro y la técnica que se utilizó fue Kinyoun para detección de *C. parvum*. La prevalencia se distribuyó así, de 31 hatos 29 tuvieron becerros infectados por *C. parvum*. La prevalencia total fue del 25% (128/512) y por cada estado fue de 28% (51/185), 29% (33/112) y 20% (44/215), para Hidalgo, Jalisco y México respectivamente; la edad de los animales estuvo fuertemente asociada a un riesgo, lo máximo que se encontró fue en la edad de 15 días. Se especuló que la asociación entre comenzar a alimentar con grano a los becerros con una mayor excreción de *C. parvum* da una mayor incidencia y el limpiar el área de maternidad con los mismos instrumentos sin desinfectarlos también incrementó el riesgo de excreción de *C. parvum*, debido a que el personal usó la misma escoba para limpiar el área de las becrreras con el área de maternidad, así fue como se infectaron lo becerros recién nacidos.

Posteriormente Cortés *et al.* (2006) realizaron otro estudio en el estado Tabasco en el municipio de Balancán en el cual se identificó dos de las 14 especies del *Cryptosporidium*, se colectaron muestras de heces de 100 becerros destetados y menores un año, mantenidos en pastoreo. Se utilizó la técnica de Ziehl-Neelsen modificada y el porcentaje de becerros positivos fue del 67%.

Fitz *et al.* (2006) desarrollaron otro estudio en México, Cuajinicuilapa, Guerrero, con 381 becerros recién nacidos hasta tres meses de edad. Se realizó un muestreo piloto para estimar el tamaño de muestra en una población finita, se aplicó encuestas a los ganaderos para saber acerca del manejo de los becerros. Se colectaron muestras de heces por vía rectal. La concentración de ooquistes se hizo con la técnica de Faust (Sulfato de Zinc), se realizó la técnica de Inmunofluorescencia directa. Se reportó lo siguiente: 12 muestras positivas a ooquistes de *C. parvum* (3.1%). En prevalencia por edad se encontró el mayor porcentaje (1.3%) en becerros de una semana de edad. En cuanto a los factores de riesgo se obtuvo una asociación estadística significativa con la variable zootécnica de alojamiento.

En la zona centro del estado de Veracruz, México Aguilar *et al.* (2007) realizaron un estudio en bovinos de carne, siendo un muestreo de tipo transversal en una población de becerros de un 1 día a 6 meses de edad; en cinco municipios (Medellín, Jamapa, Ignacio de la Llave, Tlalixcoyan y Veracruz). Estas se procesaron por microscopía directa, por medio de la técnica de flotación (Faust) con sulfato de zinc (44%); después por medio de la técnica de tinción de Kinyoun modificada. Los resultados mostraron una prevalencia general de 78%; por municipio fue para Medellín con 17%, Jamapa 12%, Ignacio de la Llave 15%, Tlalixcoyan 13% y Veracruz 20%; en cuanto a la edad se separó en grupos de un día a cuatro meses, cinco meses y seis meses con prevalencias de 47%, 17% y 14%, respectivamente.

Por otro lado Castillo *et al.* (2009) realizaron un estudio en Aguascalientes, México en el cual se muestreó 126 becerras lactantes (8 a 14 días), las muestras recolectadas de estas fueron procesadas mediante frotis fecal teñido con Kinyoun y por PCR anidada. La frecuencia de animales positivos a *Cryptosporidium* spp. por microscopía fue de 75% (95/126), con un rango entre establos de 25 a 100%, en tanto que por técnicas moleculares fue de 67% (85/126), con un rango entre establos de 20 a 100%. Todas las muestras secuenciadas tuvieron una homología del 100% con la región 18S rARN de *C. parvum*, lo cual confirma la importancia de este como principal agente de la criptosporidiosis en becerras lactantes y demostró su amplia distribución en la zona.

## **HIPÓTESIS**

La prevalencia de *Cryptosporidium parvum* es menos de un 50% en becerras menores de 60 días de edad en el estado de Veracruz y en la Comarca Lagunera, y sus principales factores de riesgo son: fuentes de agua, manejo de los animales neonatos y su tipo de alimentación.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar la prevalencia y los factores de riesgo en becerras entre uno y 60 días de edad en algunas unidades de producción de la zona centro del estado de Veracruz y de la Comarca Lagunera, México.

### **Objetivos Específicos**

Determinar la prevalencia de cryptosporidiosis en becerras de la Comarca Lagunera, y en cuatro municipios del Estado de Veracruz, México.

Determinar los factores de riesgo de cryptosporidiosis en becerras de la Comarca Lagunera, y en cuatro municipios del Estado de Veracruz, México.

Comparar la prueba de Inmunocromatografía de flujo lateral con la prueba de Ziehl-Neelsen modificada para el diagnóstico de cryptosporidiosis en becerras.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

**2.1 Sitio de estudio.** Se llevó a cabo en cuatro municipios de la zona del estado de Veracruz y en la región de La Comarca Lagunera, localizada en los estados de Coahuila y Durango donde existe una gran población de ganado lechero especializado. Para determinar la prevalencia, se realizó un estudio transversal (Kelsey *et al.*, 1986; Silva, 1993) en los hatos de ganado lechero de la región.

### 2.1.1 Comarca Lagunera

Es la novena área metropolitana de México ubicada en la región centro-norte de México, está conformada por zonas de los Estados de Coahuila y Durango, y debe su nombre a los cuerpos de agua anteriormente existentes trece lagunas en el área, entre las que estaba la Laguna de Mayrán, que se alimentaba por dos ríos, el Nazas y el Aguanaval. Esta tiene una localización con una Altitud 1,120 metros (3,674 pies), Latitud 24° 22' Norte y Longitud 102° 22' Oeste. La división territorial es dada por 16 municipios, 11 del estado de Durango y cinco del estado de Coahuila; Gómez Palacio, Lerdo, Tlahualilo, Mapimí, San Pedro del Gallo, San Luis del Cordero, Rodeo, Nazas, Cuencamé, General Simón Bolívar, San Juan de Guadalupe y otros cinco Torreón, Matamoros, San Pedro de las Colonias, Francisco I. Madero, Viesca respectivamente en cada estado. La principal fuente económica es la compañía lechera muy conocida como *Lala*, tiene aquí su origen y nombre (La Laguna), al igual que la cadena de supermercados, marcas reconocidas de quesos y una compañía cervecera ([www.explorandomexico.com.mx](http://www.explorandomexico.com.mx)).



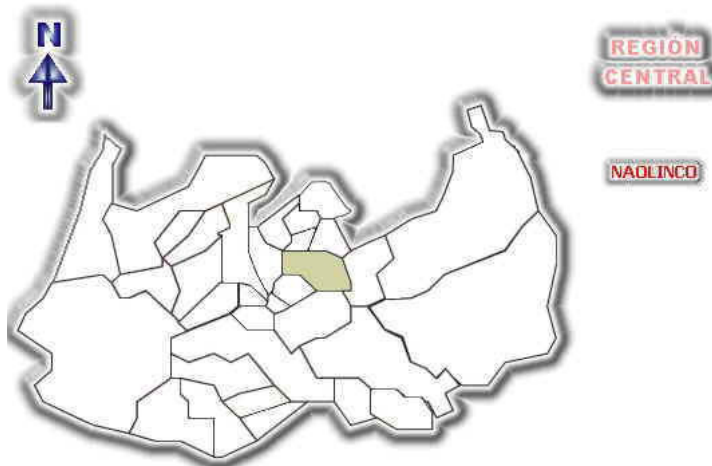
**Figura 1.** Mapa de la Comarca Lagunera por estado.

[www.explorandomexico.com.mx](http://www.explorandomexico.com.mx)

**En cuanto al estado de Veracruz, los sitios de estudio se describen a continuación:**

### **2.1.2 Naolinco**

Se encuentra ubicado en la zona centro montañoso del Estado, en las estribaciones de la Sierra de Chiconquiaco, en las coordenadas  $19^{\circ} 39'$  latitud norte y  $96^{\circ} 52'$  longitud oeste, a una altura de 1,540 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con Miahuatlán, al noreste con Acatlán, al este con Tepetlán, al sureste con Alto Lucero, al sur con Actopan, Xalapa y Jilotepec, al oeste con Coacoatzintla, al noroeste con Tonayán. Tiene una superficie de  $123.38 \text{ km}^2$ , cifra que representa un 0.17% total del Estado. Se encuentra regado por el río Naolinco, tributario del río Actopan. Su clima es templado-húmedo-regular con una temperatura promedio de  $16^{\circ} \text{ C}$ ; su precipitación pluvial media anual es de 1,639.7 mm. Los ecosistemas que coexisten en el municipio son el de bosque caducifolia con árboles de encino, guácima, mora, joba y orejón, donde se desarrolla una fauna compuesta por poblaciones de tlacuaches, armadillos, zorrillos, conejos, mapaches y víboras. Su suelo es de tipo andosol, se caracteriza por haberse formado de ceniza volcánica, es susceptible a la erosión. Se distribuye el 28% para la agricultura, el 28% para vivienda, 27% para la ganadería, el 5% en bosques, 5% para el comercio, 3% para oficinas, 2% para espacios públicos y 2 % sin vegetación ([www.inafed.gob.mx](http://www.inafed.gob.mx)).

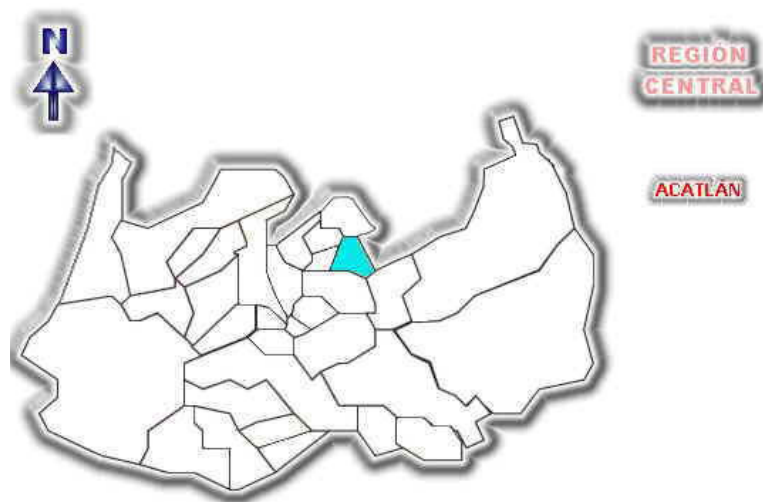


**Figura 2.** Mapa de Naolinco

[www.inafed.gob.mx](http://www.inafed.gob.mx)

### 2.1.3 Acatlán

Se localiza en la zona centro montañoso del Estado sobre las estribaciones de la Sierra de Chiconquiaco, en las coordenadas  $19^{\circ} 42'$  de latitud norte y  $96^{\circ} 50'$  longitud oeste, a una altura de 1,740 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con Chiconquiaco, al este con Tepetlán, al sudoeste con Naolinco, al oeste con Miahuatlán, al noroeste con Landero y Coss. Su distancia aproximada por carretera a la capital del Estado es de 35 km. nordeste. Tiene una superficie de  $20.56 \text{ km}^2$ , cifra que representa un 0.03% total del Estado. Se encuentra regado por los ríos Actopan y Pájaro Verde. Su clima es húmedo-regular con una temperatura promedio de  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ; su precipitación pluvial media anual es de un mil 570 mm. Los ecosistemas que coexisten en el municipio son el de bosque perennifolio conformado por poblaciones de ciprés, elite y palo blanco. La fauna se compone por poblaciones de conejo, armadillo, tuzas, aves y reptiles. Su riqueza está representada por su vegetación, sobresalen el ciprés y el encino por lo apreciado de su madera. Su suelo es de tipo andosol, se caracteriza por haberse formado a partir de cenizas volcánicas. Se utiliza en un gran porcentaje para la agricultura ([www.inafed.gob.mx](http://www.inafed.gob.mx)).



**Figura 3.** Mapa de Acatlán

[www.inafed.gob.mx](http://www.inafed.gob.mx)

### 2.1.4 Miahuatlán

Se encuentra ubicado en la zona centro montañoso del Estado en las estribaciones de la Sierra de Chiconquiaco, en las coordenadas  $19^{\circ} 42'$  y  $96^{\circ} 52'$  longitud oeste, a una altura de 1,800 sobre el nivel del mar. Limita al norte con Landero y Coss, al este con Acatlán, al sur con Naolinco, al oeste con Tonayán. Su distancia aproximada al nornoroeste de la cabecera municipal, por carretera es de 28 km. Tiene una superficie de  $20.56 \text{ km}^2$ , cifra que representa un 0.03% total del Estado. Se encuentra regado por tributarios del río Actopan. Su clima es templado-húmedo-extremoso, con una temperatura anual de  $14^{\circ}\text{C}$ ; su precipitación pluvial media anual e de 1,639.7 mm. Los ecosistemas que coexisten en el municipio son el de bosque perennifolio con encinos, donde se desarrolla una fauna compuesta por poblaciones de mamíferos, aves y reptiles. Entre su vegetación se encuentra la siguiente: ilete encino, pinos, cipres, palos blancos, huichin, se encuentran en la cabecera municipal; en las zonas serranas se cuenta con cedros, laurel, rosadillo y alamanacas. Su suelo es de tipo andosol, se caracteriza por haberse formado de cenizas volcánicas, es susceptible a la erosión. Se utiliza en el sector ganadero en 60%, 35% en la agricultura, 10% para uso habitacional y 5% para el comercio ([www.inafed.gob.mx](http://www.inafed.gob.mx)).



**Figura 4.** Mapa de Miahuatlán

[www.inafed.gob.mx](http://www.inafed.gob.mx)



### 2.1.5 Landero Y Coss

Se encuentra ubicado en la zona centro del Estado, en las coordenadas 19°44´ de latitud Norte y 96°51´ de longitud Oeste, a una altura de 2029 metros sobre el nivel del mar. Limita al Noreste con Misantla; al Este con Chiconquiaco; al Sureste con Acatlán; al Sur con Miahuatlán; al Oeste con Tonayán; al Noroeste con Tenochtitlán. Su distancia aproximada al Noreste de la capital del Estado, por carretera es de 33 kilómetros. Tiene una superficie de 21.39 km<sup>2</sup>, cifra que representa el 0.03% del total del Estado. Se encuentra regado por tributarios del río Actopan. Su clima es templado-húmedo-extremoso con una temperatura promedio de 16° C.; su precipitación pluvial media anual es de 2,120 milímetros. Los ecosistemas que coexisten en el municipio son el de bosque mediano perennifolio con especies de chancarro, encino, guanacastle, jonote y sangregado, donde se desarrolla una fauna compuesta por poblaciones de conejos, mapaches, aves y reptiles. En el municipio destacan los recursos forestales, estando representados por bosques de chancarro, jonote, guanacastle, sangreado y encino. Su suelo es de tipo andasol, se caracteriza por estar formado de cenizas volcánicas con tonalidades oscuras y rojizas, es susceptible a la erosión. El 75% del territorio municipal es destinado a la agricultura, un 20% a viviendas y un 5% a oficinas y espacios públicos ([www.inafed.gob.mx](http://www.inafed.gob.mx)).



**Figura 5.** Mapa de Landero y Coss

[www.inafed.gob.mx](http://www.inafed.gob.mx)

## 2.2 Estimación del tamaño de muestra

El paquete estadístico aplicado a epidemiología (Win Episcopo 2.0; Thrusfield *et al.* 2001) se utilizó para calcular el tamaño de muestra (modalidad estimar porcentajes), y las prevalencias. Para calcular el tamaño de muestra se utilizó una prevalencia del 50%, un margen de error del 10% y un nivel de confianza del 95% para los cuatro municipios del Estado de Veracruz y también para la Comarca Lagunera. El tamaño de muestra calculado fue de 97 animales para los cuatro municipios del Estado de Veracruz y 97 de la Comarca Lagunera.

Se hizo una invitación a los productores para participar en el estudio previa entrevista. En cada hato al menos 10 becerras de 1 a 60 días de edad fueron muestreados.

## 2.3 Toma de muestra

La toma de muestra se realizó de Abril a Julio del 2009 para la Comarca Lagunera y para Veracruz se realizó de Enero a Febrero del 2010, en las explotaciones que aceptaron participar. Se tomó una muestra de heces directa del recto con un guante de látex y se depositó en una bolsa, y se identificó con el número del animal, fecha de nacimiento, número y/o nombre de la madre. Una porción de la muestra fue utilizada para realizar la Prueba de Inmunocromatografía de Flujo Lateral (IFL) para la detección de antígenos de *C. parvum* en la explotación.

Las muestras de heces se enviaron por medio de paquetería comercial y transportadas en refrigeración (4<sup>0</sup> C) en una hielera al laboratorio de Parasitología de la Unidad de Diagnóstico la Posta Zootécnica "Torreón del Molino" de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana. En el laboratorio las muestras se trabajaron primero con el método de centrifugación de Faust modificada (Leventhal y Cheadle, 1992); posteriormente las muestras fueron teñidas y analizadas por la prueba de Ziehl-Neelsen modificada (Casemore *et al.*, 1985).

#### **2.4 Prueba de Ziehl-Neelsen ácido-rápido modificada**

Para la determinación de ooquiste de *C. parvum* las heces se procesaron con una concentración de agua éter (1:1). Estas fueron tamizadas para la determinación de ooquistes de *Cryptosporidium* utilizando el método modificado ácido de Ziehl-Neelsen; en esta tinción se utilizó una platina caliente; al porta objetos que tenía la impronta de la muestra se le puso encima un pedazo rectangular de papel filtro impregnado con fucsina, se calentó por cinco minutos aplicando en todo ese tiempo la fucsina, posteriormente se retiró de la fuente de calor y se lavó indirectamente con agua corriente, se le aplicó alcohol ácido y se volvió a lavar con agua corriente de manera indirecta; posteriormente se le aplicó la solución de azul de metileno dejando un minuto y se lavó; se secó y se observó al microscopio (Casemore *et al.*, 1985; Leventhal y Cheadle, 1992). Una muestra se consideró como positiva si un ooquiste de *Cryptosporidium* spp. fue detectado con su correcta morfología; que eran figuras con una forma un poco ovalada de color rosado.

#### **2.5 Prueba de Inmunocromatografía de Flujo Lateral**

La prueba de Inmunocromatografía de Flujo Lateral determina la presencia de antígenos de la superficie de *C. parvum* en las muestras fecales usando el paquete diagnóstico de Inmunocromatografía de Flujo Lateral para *Cryptosporidium parvum*, (BioX Diagnostics, Jemelle, Belgium). La prueba se realizó de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial. Aproximadamente 0.1 g de heces frescas se mezclaron dentro de un tubo ya provistos con reactivos, agitando las heces dentro del reactivo formando una suspensión homogénea; una tira de la prueba fue insertada en la suspensión y se observó a las 3 min y 10 min para determinar la presencia de las líneas reactivas de control y las líneas de la muestra. La presencia de ambas líneas de color rojo tenue indicaba un resultado positivo. Los resultados fueron registrados como positivos y negativos, esta prueba fue cualitativa.

## **2.6 Comparación de Pruebas**

El grado de concordancia entre las dos pruebas IFL y ZN se determinó calculando el valor de kappa (Thrushfiled, 1995), usando el valor estadístico de kappa con nivel de confianza del 95%.

## **2.7 Aplicación de cuestionario**

Para la determinación de los factores de riesgo se elaboró un cuestionario (Anexo A), que se aplicó previamente validado con 47 preguntas, aplicándolo en un tiempo estimado de 15 min. por explotación, en cada una de las explotaciones participantes. El cuestionario contenía las variables que se consideraron más importantes como posibles factores de riesgo y así mismo las variables de los animales en estudio, manejo del hato, maternidad y de las becerras antes del destete (Cuadro 1).

## **2.8 Análisis de datos**

Los datos fueron manejados en una hoja de cálculo de Excel para cada una de las variables y se realizó estadística descriptiva. La prevalencia se determinó como la proporción de muestras que fueron positivas a *C. parvum*, a la presencia de ooquiste o la presencia de antígeno de *C. parvum* entre el total de muestras por 100. La prevalencia por rancho se calculó considerando como un rancho positivo donde al menos se identificó un animal positivo, calculándose el número de ranchos positivos dividido entre el total de ranchos muestreados. Se determinó el promedio de prevalencias entre ranchos, se obtuvo sumando las prevalencias de los ranchos estudiados dividido por el número de ranchos estudiados.

Se determinó la prevalencia verdadera por medio de la siguiente fórmula (Ameni *et al.*, 2008).

$$PR = \frac{PA + Esp - 1}{Sen + Esp - 1}$$

Donde:

PR= Prevalencia real.

PA= prevalencia aparente.

Sen= sensibilidad de la prueba.

Esp= especificidad de la prueba.

La sensibilidad y especificidad fue tomada de lo reportado por Klein *et al.* (2008), para la prueba de Inmunocromatografía de flujo lateral; y para la determinación de la sensibilidad y especificidad de la prueba de Ziehl-Neelsen se tomo de lo reportado por Rigo y Franco (2002).

Para determinar las diferencias entre las prevalencias se utilizó la prueba de diferencia entre proporciones independientes o la prueba de Chi-cuadra exacta de Fisher.

## 2.9 Factores de riesgo

Los factores de riesgo fueron determinados por Razón de Momios (RM), se utilizó un método bivariados para el análisis de las variables. El análisis se llevó a cabo con el paquete estadístico Vassar Stats (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>). Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con un nivel de  $P < 0.05$ . Los factores discretos se analizaron con  $X^2$  para independencia o Prueba exacta de Fisher.

**Cuadro 1.** Variables de estudio para las explotaciones lecheras en la encuesta

<b>Variable (Factor de riesgo)</b>	<b>Descripción</b>
Manejo general del hato Fuente del agua	Categórica: pozo, potable, río, otras.
Tipo de becerreras	Categórica: aire libre, amarrados, cobertizos.
Corral de cuarentena	Categórica: Si, No.
Incremento del hato por 10% o más el año pasado	Categórica: Si, No.
Decremento del hato por 10% o más el año pasado	Categórica: Si, No.
Acceso de las vacas lecheras de acceso a pasturas de verano	Categórica: Si, No.
Casas de crianza de Novillonas (verano)	Categórica: Dentro, Aire libre, casa individual, casa grupal, amarrados.
Control de roedores	Categórica: Presente o ausente.
Manejo en la maternidad	
Área dedicada a becerros	Categórica: Si, No.
Acceso de becerros hacia las pasturas en verano	Categórica: Si, No.
Manejo de becerros al pre-destete	
Número total de becerros al pre-destete en el tiempo de estudio	Continuo.
¿Tienen los becerros permitido mamarle a la vaca?	Categórica: Si, No.
¿Cuándo eran los becerros separados de la vaca?	Categórica: inmediatamente, no inmediatamente.
¿Dónde van los becerros cuando se separan de la vaca?	Categórica: amarrado cerca de la vaca, al final de la casa de pre-destete, sacrificio.
Tipo de estancia al pre-destete	Categórica: Amarrados, casa grupal, becerreras rústicas, casas individuales.

---

¿Tienen cama?	Categoría: Si, No.
Frecuencia del cambio total o limpieza en casa de becerros no destetados	Categoría: Nunca, diario, días intercalados, semanalmente o menos frecuente.
Tipo de cama	Categoría: arena, aserrín, paja, otro.
Método principal para el cambio total o limpieza en casas de becerros no destetados	Categoría: No limpia, remoción de la parte sucia, toda la cama se remueve y se lava con agua, toda la cama se remueve y se lava con detergente
Alimento principal para becerros no destetados	Categoría: leche, sustituto de leche, concentrado, otros.
Uso de utensilios en el alimento de los becerros	Categoría: utensilios individuales, utensilios compartidos y no se limpian.
Higiene en los utensilios de alimentación entre comidas	Categoría: Lavados, no lavados, con agua, con desinfectantes.
Contactos del becerro después de la separación con la vaca	Categoría: Otros animales no destetados, animales destetados de seis meses de edad
Post-destete	
Número de becerras destetadas a los seis meses de edad	Continua.
Administración de agua a los becerros en verano	Categoría: Ninguna, periódicamente, continuamente.
Interacciones al post-destete	Categoría: Otros animales no destetados, animales destetados de seis meses de edad, animales de 6-18 meses, novillonas, ganado adulto o ningún contacto físico.
Frecuencia en la limpieza de casas de becerros destetados a los seis meses	Categoría: Nunca, diario, días intercalados, semanalmente o menos frecuente.

---

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1 Prevalencia de criptosporidiosis en becerras de la Comarca Lagunera**

Del total de 460 muestras de heces de becerras probadas en la Comarca Lagunera, por medio de la prueba de IFL se obtuvieron 89 muestras positivas con una prevalencia general de 19.35%; por la prueba de ZN se obtuvieron un total de 83 muestras positivas con una prevalencia general de 18.04%. En lo referente a la distribución de las prevalencias por municipio, se observó que con ambas pruebas IFL y ZN, el municipio que presentó mayor prevalencia fue el de Matamoros con 30.23% y 28.68% respectivamente, por la facilidad y accesibilidad que se proporcionó en las visitas; cabe mencionar que se esperaba encontrar una mayor frecuencia pero aun así el estudio reveló que el parásito está ampliamente difundido por diferentes partes de la Comarca Lagunera (Cuadro 2).



**Cuadro 2.** Prevalencia de los municipios de la Comarca Lagunera por medio de dos pruebas diagnósticas

Municipio	No. Muestras	Prevalencia % IFL (Positivos)	IC <sub>95%</sub> IFL	Prevalencia % ZN (Positivos)	IC <sub>95%</sub> ZN
*Francisco I. M.	102	9.80 (10)	0.05-0.17	7.84 (8)	0.04-0.15
Gómez Palacio	94	13.83 (13)	0.08-0.22	13.83 (13)	0.08-0.22
Jauja	20	35 (7)	0.18-0.57	35 (7)	0.18-0.57
Juárez	14	28.57 (4)	0.11-0.54	21.43 (3)	0.08-0.48
Lerdo	40	10 (4)	0.04-0.23	10 (4)	0.04-0.23
Matamoros	129	30.23 (39)	0.23-0.39	28.68 (37)	0.22-0.37
Torreón	61	19.67 (12)	0.12-0.31	18.03 (11)	0.10-0.29
<b>Total</b>	<b>460</b>	<b>19.35</b>	<b>0.16-0.23</b>	<b>18.04</b>	<b>0.15-0.22</b>

\*Francisco I. Madero.

Se utilizó la fórmula de Ameni *et al.* (2008) para determinar la Prevalencia Real (PR) tanto de la prueba de IFL como la de ZN y se obtuvo que la prevalencia real total de los municipios fue de 58.34% y 58.81% respectivamente, ya que la prevalencia real sólo se determina con la totalidad de la población; pero por medio de la fórmula antes mencionada se puede obtener ésta.

La prevalencia por rancho con la prueba de IFL fue de 75% (24/32), se consideró un rancho positivo cuando se encontró al menos un animal positivo; y con la prueba de ZN la prevalencia fue de 71.88% (23/32). El promedio de las prevalencias entre los ranchos fue de 17% con un rango de 0-60% por medio de la prueba de IFL, y por medio de ZN hubo una mínima variación con un rango que también va de 0-60% pero con un promedio de 15.57%.

La prevalencia que se obtuvo en la Comarca Lagunera en este estudio (19.35% IFL; 18.04% ZN) es menor que la publicada por Delgado (2007) de 29.7%, pero se debe aclarar que este autor solo tomó muestras de becerras con diarrea, ya que el objetivo de su estudio era determinar si la diarrea era causada por *Cryptosporidium* spp. Sin embargo, si coincide con el estudio de Aguascalientes, México hecho por Castillo *et al.* (2009) en el cual por medio de las pruebas de Kinyoun y por PCR anidada para amplificar la región 18S rARN del parásito (830 pb), obtuvieron una frecuencia de de 75% (95/126), con un rango entre establos de 25 a 100% por medio de Kinyoun, en tanto que por técnicas moleculares fue de 67% (85/126), con un rango entre establos de 20 a 100%.

En el cuadro 3 se puede apreciar que en los dos primeros estratos que comprenden una edad de 1-30 días en el cual se alcanzó una prevalencia promedio de 24.45% con la prueba de IFL y 22.80% con ZN; muy diferente al caso de los otros dos estratos, que fueron de una edad de 31-60 días, en los cuales no se encontraron animales positivos.

**Cuadro 3.** Prevalencia por edad de la Comarca Lagunera

<b>Edad (días)</b>	<b>No. Muestras</b>	<b>Prevalencia % ZN (Positivos)</b>	<b>IC<sub>95%</sub> ZN</b>	<b>Prevalencia % IFL (Positivos)</b>	<b>IC<sub>95%</sub> IFL</b>
1-15	219	32.88 (72)	0.27-0.39	35.62 (78)	0.30-0.42
16-30	145	7.59 (11)	0.04-0.13	7.59 (11)	0.04-0.13
31-45	64	0 (0)	0	0 (0)	0
46-60	32	0 (0)	0	0 (0)	0
<b>Total</b>	<b>460</b>	<b>18.04</b>	<b>0.15-0.22</b>	<b>19.35</b>	<b>0.16-0.23</b>

Estos resultados coinciden con los reportados por Del Cocco *et al.* (2008) quienes realizaron un estudio en 280 becerros ( $\leq 7-30$  días), con una prevalencia del 33.40% ( $\geq 8 \leq 14$  días), y en el cual se obtuvo una prevalencia similar de 32.88% para un rango de 1-15 días. Diversos autores que mencionan que los animales más afectados por esta enfermedad son los animales neonatos tal como mencionan Maldonado-Camargo *et al.* (1998), Ramírez *et al.* (2004), Fitz *et al.* (2006) y Castillo *et al.* (2009); incluso otros autores como Björkman *et al.* (2003) y Aguilar *et al.* (2007) notifican que no solo la infección se restringe para esos estratos, sino que puede llegar más allá de los 84 días hasta los 120 días de edad siendo afectados los becerros de ambos sexos.

### **3.1.1 Razón de Momios de la Comarca Lagunera**

En este cuadro se podrán encontrar factores de riesgo y de protección, estas variables pueden ir desde: la edad, el método de limpieza, tipo de alimentación, si presentó o no diarrea en sus primeros días de vida y la consistencia de las heces al momento de recolección, de igual manera se da la evaluación de esos puntos con su respectiva Razón de momios y se aprecia si es estadísticamente significativa, esta información fue tomada únicamente de los datos proporcionados por la prueba de IFL, ya que la información de ZN es muy similar para los tres datos Factor de Momios (FM), los Intervalos de Confianza al 95% y *P* (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Razón de momios de los diferentes factores de riesgo de la Comarca Lagunera

<b>Factor</b>	<b>n</b>	<b>Prevalencia (%)</b>	<b>IC<sub>95%</sub></b>	<b>FM</b>	<b>IC<sub>95%</sub></b>	<b>P</b>
<b>Edad</b>						
1-15	219	35.62	0.29-0.42	1		
16-30	145	7.58	0.04-0.13	6.73	3.43-13.22	0.0001
31-45	64	0	0	0	0	0
46-60	32	0	0	0	0	0
<b>Método de limpieza</b>						
Parte sucia	214	14.95	0.11-0.20	1		
Con agua	15	6.67	0.01-0.30	2.46	0.31-19.37	0.33
Combinado	231	24.24	0.19-0.30	0.54	0.33-0.88	0.01
<b>Alimento</b>						
Sustituto de leche	228	25	0.20-0.31	1		
Otro (leche y/o concentrado)	232	13.80	0.10-0.19	2.08	1.29-3.36	0.003
<b>Presentó o presenta diarrea</b>						
SI	211	31.75	0.26-0.38	1		
NO	248	8.87	0.03-0.13	4.49	2.63-7.68	0.0001
<b>Consistencia de las heces</b>						
Normales	210	3.81	0.02-0.07	1		
Pastosas	120	22.50	0.16-0.31	0.13	0.05-0.31	0.0001
Semi-líquidas	38	28.95	0.17-0.45	0.09	0.03-0.26	0.000008
Líquidas	92	46.74	0.37-0.57	0.04	0.01-0.10	0.0001

La edad con una razón de momios de 6.73 (IC<sub>95%</sub> 3.43-13.22;  $P= 0.0001$ ) y 6.36 (IC<sub>95%</sub> 3.24-12.50;  $P= 0.0001$ ) con las pruebas de IFL y ZN respectivamente, lo cual muestra que para un bovino la edad comprendida entre el primer y 15° día de vida es un factor predisponente para contraer *Cryptosporidium* spp., muy contrario a un individuo mayor y no presentar prevalencia alguna; en esto se coincide con Brook *et al.* (2008) y Safavi *et al.* (2010).

El método de limpieza es un factor que influye mucho en este tipo de enfermedad ya que este factor ayuda a controlar la problemática. En el cuadro 4 se puede observar que el método combinado (remoción de la parte sucia y lavar con agua) podría ser un factor protector (FM= 0.54; IC<sub>95%</sub> 0.33-0.88; P=0.01), ya que se remueve el excremento y el agua por arrastre se lleva la tierra contaminada; esto confiere protección, a diferencia de solo el uso del agua o remoción por separado. Hay otros dos factores que llaman la atención los cuales se podrían considerar como factores de riesgo, como son el tipo de alimentación y la presencia de diarrea; el primero es un factor de riesgo el dar sustituto de leche en vez de la leche de la madre y/o concentrado (FM= 2.08; IC<sub>95%</sub> 1.29-3.36; P= 0.003), ya que aunque el sustituto dice contener casi el mismo valor nutritivo para el becerro, la preparación podría ser inadecuada y no solo por la falta de higiene; sino en la cantidad de sustituto por litro de agua, ya que podría resultar muy ligera o muy concentrada provocando una incorrecta nutrición o que el animal sufra de problemas gastrointestinales como diarrea por lo concentrado de la suspensión; en este punto se difiere con lo reportado por Trotz-Williams *et al.* (2008) ya que reportaron que no dar sustituto de leche en la primera semana de vida puede ser un factor de riesgo (FM= 1.3; IC<sub>95%</sub> 1.0-1.8; P= 0.089), esto va relacionado con la el hecho de que no se da calostro a los becerros de las madres que son de primer o segundo parto, ya que el calostro de estas es muy pobre y por la escasez de calostro congelado se recurre al sustituto reforzado con otros componentes; el siguiente factor indica que un animal es 4.49 veces más susceptible de presentar criptosporidiosis si tiene diarrea (IC<sub>95%</sub> 2.63-7.68; P= 0.0001). Por último, se presenta como factor protector o como buen signo que el animal excrete de manera normal en vez de manera líquida ya que al análisis de la información se demostró que las heces Normales a comparación con pastosas, semi-líquida y líquida obtuvo los siguientes valores protectores FM= 0.13 (IC<sub>95%</sub> 0.05-0.31; P= 0.0001), 0.09 (IC<sub>95%</sub> 0.03-0.26; P= 0.000008) y 0.04 (IC<sub>95%</sub> 0.01-0.10; P= 0.0001) respectivamente. Ninguno de los factores de riesgo que se obtuvieron como estadísticamente significativos en esta investigación coinciden con lo reportado por Starkey *et al.* (2006) y Brook *et al.* (2008), ya que estos obtuvieron otro tipo de variables como significativas y en este trabajo no se evaluaron las mismas.

### 3.2 Prevalencia de criptosporidiosis en municipios del Estado de Veracruz

En la zona centro del estado de Veracruz se muestrearon un total de 120 animales lactantes, de los cuales se obtuvieron los resultados que se muestran en el cuadro 5, la prevalencia por municipio por las dos pruebas, el municipio con mayor prevalencia fue Acatlán (30.43%) con la prueba de Ziehl-Neelsen (ZN), pero menor (4.35%) con la prueba de Inmunocromatografía de Flujo Lateral,(IFL) y cabe resaltar que del municipio de Naolinco no tuvo animales positivos en cuanto a la prueba de IFL pero con ZN fue de un 9.10% y del municipio de Landero y Coss no se obtuvo ningún animal positivo en ambas pruebas (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Prevalencia por municipios de la zona centro del estado de Veracruz por medio de dos pruebas diagnósticas

Municipio	No. Muestras	Prevalencia %	IC <sub>95%</sub>	Prevalencia %	IC <sub>95%</sub>
		ZN (Positivos)	(ZN)	IFL (Positivos)	(IFL)
Acatlán	23	30.43 (7)	0.007-0.21	4.35 (1)	0.007-0.21
Landero y Coss	31	0 (0)	0	0 (0)	0
Miahuatlán	33	15.15 (5)	0.03-0.24	9.10 (3)	0.03-0.24
Naolinco	33	9.10 (3)	0-0.10	0 (0)	0
<b>Total</b>	<b>120</b>	<b>12.50</b>	<b>0.01-0.08</b>	<b>3.33</b>	<b>0.01-0.08</b>

La prevalencia real que se obtuvo por medio de la fórmula de Ameni *et al.* (2008) con la prueba de IFL fue de 50.06% y con la prueba de ZN fue de 56.03%, esto podría reflejar que el parásito como especie *Cryptosporidium* spp. está presente en los cuatro municipios muestreados de la zona centro del Estado de Veracruz, pero no así la especie ya que fue mucho mayor en cuanto a prevalencia aparente lo que se obtuvo por medio de la prueba de ZN (12.50%) que lo observado por medio de IFL (3.33%).

Estos resultados son similares a los reportados por Aguilar *et al.* (2007) los cuales observaron prevalencias que van desde un 12 a 20% por municipio. En el presente estudio se observó un rango de prevalencia de 0 a 30.43% (ZN) y de 0 a 9.10% (IFL); Fitz *et al.* (2006) reportó una prevalencia general de 3.10% para el estado de Guerrero en ganado de doble propósito lo cual es similar a lo observado en este estudio.

En la prevalencia por edades de los animales no presentó mucha variación, pero se observó que los animales más jóvenes presentaron mayor prevalencia con ambas pruebas, pero cabe destacar que en esta ocasión hubo mayor prevalencia por medio de la prueba de ZN lo cual indica que en esta zona hay mayor variabilidad del género de *Cryptosporidium* spp. (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Prevalencia por edad de las becerras de la zona centro de Veracruz por medio de dos pruebas diagnósticas

Edad (días)	No. Muestras	Prevalencia %		Prevalencia %	
		ZN (Positivos)	IC <sub>95%</sub> (ZN)	IFL (Positivos)	IC <sub>95%</sub> (IFL)
1-15	22	18.18 (4)	0.07-0.39	9.10 (2)	0.03-0.28
16-30	25	12 (3)	0.04-0.30	4 (1)	0.007-0.20
31-45	11	0 (0)	0-0.26	0 (0)	0-0.26
46-60	62	12.90 (8)	0.07-0.23	1.61 (1)	0.003-0.09
<b>Total</b>	<b>120</b>	<b>12.50</b>	<b>0.08-0.20</b>	<b>3.33</b>	<b>0.01-0.08</b>

Lo anterior coincide con lo reportado por Fayer *et al.* (2006), Santín *et al.* (2008) y Coklin *et al.* (2008) los cuales mencionan como se da ese cambio una vez que los animales se le deja de dar leche y comienzan a pastorear en convivencia con otros animales mayores que ellos, ya que en este estudio se observó que de 1 a 45 días los animales comienzan con una prevalencia (18.18%) la cual en animales de 16 a 30 días disminuye (12%) hasta no encontrarse y posteriormente en la edad de 46 a 60 días la prevalencia de nuevo surge (12.90%) probablemente debido al cambio de alimentación y lugar donde pastorean los animales conforme al paso de los días.

Uno de los factores que sirve para llegar al diagnóstico de la criptosporidiosis es la consistencia de las heces, ya que por medio de éstas se podría sospechar de la presencia de este protozooario; en el cuadro 7 se puntualizan las diferentes consistencias que se hallaron en los animales en este estudio, así como la prevalencia que se obtuvo en cada uno de esos grupos.

**Cuadro 7.** Consistencia de las heces recolectadas de la zona centro de Veracruz y su prevalencia en base a dos pruebas diagnósticas

Consistencia	No. Muestras	Prevalencia %	IC <sub>95%</sub>	Prevalencia %	IC <sub>95%</sub>
		ZN (Positivos)	(ZN)	IFL (Positivos)	(IFL)
Normal	79	8.90 (7)	0.04-0.17	1.30 (1)	0.002-0.07
Pastosa	25	12 (3)	0.04-0.30	8 (2)	0.02-0.25
Semi-líquida	9	11.10 (1)	0.02-0.43	0 (0)	0-0.30
Líquida	7	57.10 (4)	0.25-0.84	14.30 (1)	0.03-0.51
<b>Total</b>	<b>120</b>	<b>12.50</b>	<b>0.08-0.20</b>	<b>3.33</b>	<b>0.01-0.08</b>



Se puede observar como en las heces normales hay muy poca prevalencia tanto por ZN (8.90%) como por IFL (1.30%), de manera posterior se eleva en el siguiente grado de consistencia que es la pastosa 12% y 8% para ZN e IFL respectivamente; consistencia semi-líquida en la prueba de ZN fue 11.10% e IFL 0%, esto podría indicar que esa consistencia la podría estar causando *Cryptosporidium* spp. y no *C. parvum* como se trata de demostrar con la prueba de IFL. Por último se puede observar que en ambas pruebas la prevalencia aumentó significativamente en comparación con las otras consistencias, la consistencia líquida tuvo para ZN 57.10% y para IFL 14.30%; no se coincide con Hamnes *et al.* (2006) ya que muestra que no es significativo la ocurrencia de diarrea en los primeros 14 días de vida ( $P>0.05$ ) o la consistencia de las heces al momento de la recolección ( $P>0.05$ ), esto podría deberse a otros enteropatógenos o circunstancias en el medio que podrían desencadenar un cambio en la consistencia de las heces.

### 3.2.1 Razón de Momios de los municipios del Estado de Veracruz

Para el cálculo de los factores de riesgo solo se usaron los datos de la prueba de Ziehl-Neelsen (ZN), pero también se mencionan los resultados con la prueba (IFL) ya que existe mucha variabilidad en cada una de las pruebas (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Razón de Momios de los diferentes factores de riesgo para la zona central del Estado de Veracruz

<b>Factor</b>	<b>n</b>	<b>Prevalencia (%)</b>	<b>IC<sub>95%</sub></b>	<b>FM</b>	<b>IC<sub>95%</sub></b>	<b>P</b>
<b>Edad</b>						
1-15	22	18.18	0.07-0.38	1		
16-30	25	12	0.04-0.30	1.62	0.32-8.24	0.42
31-45	11	0	0	0	0	0
46-60	62	12.90	0.07-0.23	1.5	0.40-5.57	0.38
<b>Presentó diarrea (ZN)</b>						
Si	27	33.33	0.002-0.08	1		
No	93	6.45	0.01-0.15	7.25	2.29-22.91	0.0008
<b>Lugar de los becerros (ZN)</b>						
Corraletas individuales	73	6.85	0.02-0.15	1		
Corraletas amarradas	47	21.27	0.11-0.34	0.27	0.08-0.85	0.04
<b>Recepción de calostro (ZN)</b>						
30-60 min.	108	10.19	0.05-0.17	1		
2-3 hrs.	12	33.33	0.03-0.13	0.22	0.05-0.87	0.04
<b>Consistencia de las heces (ZN)</b>						
Normales	79	8.86	0.04-0.17	1		
Pastosas	25	12	0.04-0.29	0.71	0.16-2.99	0.44
Semi-líquidas	9	11.11	0.01-0.43	0.77	0.08-7.15	0.59
Líquidas	7	57.14	0.25-0.84	0.07	0.01-0.39	0.004

El factor edad no fue estadísticamente significativo en ninguno de los estratos ni en ambas pruebas mostrando un FM 1.75 con un IC<sub>95%</sub> 0.50-6.14 y una  $P= 0.28$  esto con los resultados de la prueba de ZN y con IFL se obtuvo un FM 4.8 con IC<sub>95%</sub> 0.63-36.12 y una  $P= 0.15$ ; esto difiere con todo los estudios ya que la edad siempre ha constituido un factor predisponente a la infección.

La presencia de diarrea fue un factor estadísticamente significativo solo por la prueba de ZN (FM= 7.25, IC<sub>95%</sub> 2.29-22.91 y  $P= 0.0008$ ), esto va en relación con el hecho de que la prueba de IFL es específica para *C. parvum*, y la prueba de ZN es solo para detectar al parásito, así que de aquí se puede deducir que puede ser factor de riesgo el hecho de que el animal tenga diarrea al momento de la toma de muestra si se pretende diagnosticar *Cryptosporidium* spp. esto concuerda con lo reportado por Hamnes *et al.* (2006), de que la ocurrencia de diarrea no fue estadísticamente significativa en ese estudio  $P>0.05$ .

El manejo de los animales ya sea corraleta individual o amarrados, se obtuvo que al estar en una corraleta individual corresponde un factor protector (FM= 0.27; IC<sub>95%</sub> 0.08-0.85;  $P= 0.04$ ) por medio de la prueba de ZN, ya que si los animales están amarrados uno al lado de otro podría darse el hecho de una infestación directa, esto coincide con lo reportado por Starkey *et al.* (2006) ya que se reportó que podría ser un factor de riesgo tener a los animales uno cerca de otro (FM= 43.4; IC<sub>95%</sub> 3.66-515;  $P= 0.165$ ; esto con una significancia de  $P\leq 0.2$ ).

En cuanto a la recepción del calostro se obtuvo que es un factor protector el recibir el calostro lo más pronto posible, los primeros 30 o 60 minutos posterior al parto obtenido en la prueba de ZN (FM= 0.22; IC<sub>95%</sub> 0.05-0.87;  $P= 0.04$ ); esta variable no figura como significativa en los artículos de revisión como Hamnes *et al.* (2006), Starkey *et al.* (2006), Brook *et al.* (2008) o Trotz-Williams *et al.* (2008); sin embargo, este factor se encontró señalado en el estudio realizado por Maldonado-Camargo *et al.* (1998) quienes mencionan que no hubo ninguna relación entre la variable del calostro con la excreta de ooquiste de *C. parvum*; esto podría ser relevante ya que en este trabajo si hay una relación positiva entre proporcionar el calostro en un tiempo menor a diferencia de darlo posterior a una hora de que nació el becerro, esto podría ser por el hecho de que el calostro es rico en nutrientes esenciales para el neonato y confiere protección en el rumen aún no desarrollado, para así poder evitar una primera infestación del parásito ya sea por medio de excreta, pasto o fómite contaminado con *Cryptosporidium* spp.

El factor de riesgo consistencia de heces solo tuvo significancia estadística entre las heces normales y las de consistencia líquida por medio de la prueba de ZN  $FM = 0.07$ ,  $IC_{95\%} 0.01-0.39$  y  $P = 0.004$  esto no coincide con Hamnes *et al.* (2006) que al analizar esta variable por medio de la prueba de flotación en sucrosa no obtuvo significancia estadística  $P > 0.05$ . Pero si es relevante en el caso de la prueba de ZN por lo cual en este caso se difiere con lo dicho por esa investigación.

### **3.3 Concordancia de las pruebas IFL y ZN en las dos zonas de estudio**

Se obtuvo una  $k$  para ambas pruebas; en la Comarca Lagunera fue del 95% la cual es muy alta, lo que sugiere que en esa zona se puede utilizar cualquiera de las dos pruebas para obtener un resultado confiable. En la zona centro del estado de Veracruz se obtuvo una  $k$  del 39%, la cual es baja en comparación con lo obtenido en la otra zona de estudio, pero esto se puede explicar con el hecho de que en la zona de la Comarca Lagunera existe solo una especie dominante de *Cryptosporidium* por lo cual la concordancia resultó ser muy alta para esa zona y con lo que respecta a Veracruz no solo hay una especie dominante sino varias. Los resultados que se obtuvieron en la zona centro del Estado de Veracruz difieren con Trotz-Williams *et al.* (2005) ya que al comparar una prueba que es puramente de identificación contra una prueba altamente específica obtuvo una  $k$  del 82% que es considerado como un valor alto, otras pruebas que fueron comparadas fueron las de microscopia por flotación contra Inmunofluorescencia (IFL) las cuales también obtuvieron un valor alto de concordancia 84%, y por último comparo las pruebas de IFL contra COWP PCR-RFLP obteniendo un valor medio con una  $k$  del 73%. Pero esto se puede explicar con el hecho de que en la zona centro del Estado de Veracruz no solo hay una especie dominante de *Cryptosporidium* sino existe una mayor diversidad; pero con lo que respecta a la Comarca Lagunera se coincide ampliamente.

Haciendo una comparación entre ambas pruebas se podría evidenciar el por que de la variabilidad en una zona y otra; la prueba de Ziehl-Neelsen es puramente para detectar al parásito, es decir el ooquiste presente en heces, pero no se puede saber de que género es, además de que se necesita un procedimiento largo y equipo especializado para poder llegar a detectarlos además de estar entrenados para poder diferenciarlos de otras estructuras. La prueba de Inmunocromatografía de Flujo Lateral es un kit en el cual las tiras reactivas tienen un identificador de oro el cual detecta al antígeno directo en las heces por medio de un anticuerpo monoclonal, el cual va a detectar una sola especie que es *C. parvum* además de que la prueba se distingue por ser sencilla ya que la tira si es positiva tiñe dos bandas de color rojo y si es negativa solo tiñe una, lo cual permite que cualquiera pueda hacer un diagnóstico en campo, pero con la advertencia de que solo detectará una especie.

#### 4. CONCLUSIONES

Se observó que *Cryptosporidium* spp. y *C.parvum* están presentes en ambas ganaderías especializadas tanto de la Comarca Lagunera como en los cuatro municipios de la zona centro del estado de Veracruz, con prevalencias de 19.35% (0.16-0.23) con la prueba de IFL y con ZN 18.04% (0.15-0.22) para la Comarca Lagunera lo que denota que *C. parvum* es la especie que más está difundida en la zona. La prevalencia para Veracruz fue de 12.50% (0.01-0.08) con la prueba de ZN y un 3.33% (0.01-0.08) con la prueba de IFL lo cual indica que *C. parvum* no es la especie que predomina en la zona.

La variable edad (1-15 días) presentó la mayor prevalencia en la Comarca Lagunera 32.88% (0.27-0.39) con ZN y con IFL 35.62% (0.30-0.42) y para Veracruz 18.18% (0.07-0.39) con ZN y 9.10% (0.03-0.28) con IFL y es considerada como factor de riesgo como para la Comarca Lagunera con un OR 6.73 (IC<sub>95%</sub> 3.43-13.22; *P*= 0.0001) y OR 6.36 (IC<sub>95%</sub> 3.24-12.50; *P*= 0.0001) con las pruebas de IFL y ZN respectivamente. Para los cuatro municipios de la zona centro del Estado de Veracruz no es estadísticamente significativo que el becerro tenga la edad de 1-15 días lo cual se muestra con ambas pruebas un OR 1.75 con un IC<sub>95%</sub> 0.50-6.14 y una *P*= 0.28 esto con los resultados de la prueba de ZN y con IFL se obtuvo un OR 4.8 con IC<sub>95%</sub> 0.63-36.12 y una *P*= 0.15, lo cual quiere decir que la edad en esta zona no es un predisponente para que el animal contraiga la infección.

En la Comarca Lagunera se tomó en cuenta el método de limpieza de la becerra el cual es un factor que influye en este tipo de enfermedad, especialmente el método combinado (remoción de la parte sucia y lavar con agua). El hecho de categorizar los tipos de excretas de los animales permitiría detectar oportunamente una infección ocasionada por este parásito, ya que si al excretar cambia la consistencia podría tomarse como un indicador para sospechar de *C. parvum* en la Comarca Lagunera y *Cryptosporidium* spp. en la zona centro del estado de Veracruz.

La prueba de ZN es un método diagnóstico de amplio espectro, ya que detecta la presencia del protozooario sin importar la especie. En lugares donde ya se ha realizado la tipificación de las especies se podría utilizar el kit de IFL para saber de manera más rápida si la diarrea que presenta el animal es causada por *C. parvum* ya que esta prueba es específica.

## 5. RECOMENDACIONES

En la Comarca Lagunera se deberá implementar un mejor método de limpieza, utilizando fuentes de calor y remover de una manera más constante la capa de tierra en la que se encuentra la becerria durante los dos meses de estancia; asimismo, tener más atención al cambio de consistencia de excretas por parte de animales que entran en las becerrerías, ya que podría ser el indicativo del comienzo de la infestación. Para la zona centro del estado de Veracruz ordenar por estratos de edad a los animales y cambiarlos periódicamente de lugar de pastoreo, así como también limpiar el corral o implementar un programa de manejo del excremento, tener más cuidado en las interacciones que tienen los animales neonatos con los de mayor edad para evitar contagios, tener higiene con el becerro desde el nacimiento hasta el destete; por el manejo predominante en esa zona sería que los primeros 5 u 8 días que permanece el becerro al lado de la madre tener cuidado con el aseo de pezones ya que por el lugar donde los animales contaminarse. Los instrumentos para alimentación deben ser lavados con un detergente o de igual manera exponerlos a una fuente de calor para su descontaminación. En la zona centro del estado de Veracruz, se requiere continuar con el estudio, pero con la utilización de pruebas que permitan tipificar las diferentes especies de *Cryptosporidium* spp. que pudieran encontrarse en los diferentes municipios.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar B. G., Romero S. D., Martínez H. D. I. 2007. Prevalencia de *Cryptosporidium spp.*, en sistemas ganaderos de carne en el centro de Veracruz, México. XX Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria Veracruz, IX Simposio Internacional y IV Congreso Nacional de Agricultura Sostenible. Pp. 1-7.
2. Ameni G., Hewinson G., Aseffa A., Young D., Vordermeier M. 2008. Appraisal of interpretation criteria for the comparative intradermal tuberculin test for diagnosis of tuberculosis in cattle in central Ethiopia. *Clin. Vac. Inmunol* 15(8): 1272-1276.
3. Bednarska M., Bajer A., Sinski S. 1998. Calves as a potencial reservoir of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* sp. *Ann. Agric. Environ. Med.* 5: 135-138.
4. Bernal R., Hernández G., Ramírez E. 1998. Comparación de tres métodos de identificación. *Rev. Mex. Parasitol. Clin.* 45: 183-188.
5. Björkman C., Svevsson C., Christensson B., Verdier K. 2003. *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in calf diarrhoea in Sweden. *Acta Vet. Scand.* 44: (3-4) 145-152.
6. Brook E., Hart C. A., French N., Christley R. 2008. Prevalence and risk factors for *Cryptosporidium spp.* infection in young calves. *Vet. Parasitol.* 152: 46-52.
7. Burenbaatar B., Bakheit M. A., Plutzer J., Suzuki N., Igarashi I., Ongerth J., Karanis P. 2008. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* species from farm animals in Mongolia. *Vet. Parasitol.* 102: 901-905.
9. Cacciò S. M., Thompson R. C. A., Mc Lauchlin J., Smith H. V. 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* 21: 430-437.
10. Cama V. A., Bern C., Roberts J., Cabrera L., Sterling C. R., Ortega Y., Gilman R. H., Xiao L. 2008. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emer. Infect. Dis.* 14: 1567-1574.
11. Carreno R. A., Martin D. S., Barta J. R. 1999. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol. Res.* 85(11): 899-904.
12. Casemore D. P., Armstrong M., and Sands R. L. 1985. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *J. Clin. Pathol.* 38 (12): 1337-1341.
13. Castillo C. G., Cruz-Vázquez C., López R. R., Sánchez M. G., Rosario R. C., Vitela I. M., Medina L. E. 2009. Frecuencia e identificación molecular de *Cryptosporidium spp.* en becerros lactantes mantenidas en confinamiento en Aguascalientes, México. *Téc. Pecu. Méx.* 47 (4): 425-434.

14. Castro-Hermida J. A., González-Lozada Y. A., and Ares-Mazás E. 2002a. Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). *Vet. Parasitol.* 106 (1), 1-10.
15. Castro-Hermida J. A., González-Lozada Y. A., Mezo-Mendez M., and Ares-Mazás E. 2002b. A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. *Vet. Parasitol.* 106 (1), 11-17.
16. Castro-Hermida J. A., Carro-Corral C., González-Warleta M., and Mezo M. 2006. Prevalence and intensity of infection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia Duodenalis* in dairy cattle in Galicia (NW Spain). *J. Vet. Med. Series B.* 53 (5): 244-246.
17. Chirinos V. Y. Y., Rojas M., Salinas G., Bastidas P. G. A., and García F. G. 2004. Frecuencia de cryptosporidiosis en becerreros de diez fincas de la zona ganadera de tucacas, estado falcón, Venezuela. *Rev. Fac. Cs. Vets. UCV.* 45(1): 9-17.
18. Coklin T., Uehlinger F. D., Farber J. M., Barkema H. W., O'Handley R. M., and Dixon B. R. 2008. Prevalence molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. In dairy calves from 11 farms in Prince Edward Island, Canadá, *Vet. Parasitol* 10 (8): 1-15 pp.
19. Combs G. H., Denton H., Brown S. M. A., and Thong K. 1997. Biochemistry of the coccidia. *Adv. Parasitol.* 39: 142-202.
20. Cortés M. E., Figueroa C. J. A., Quiroz R. H. 2006. Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en becerros de Balancán, Tabasco. Memorias de la XLII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Veracruz. p. 47.
21. De la Fuente R., Luzon M., Ruíz-Santa-Quiteria J. A., García A., Cid D., Orden J. A., García S., Sanz R., Gomez-Bautista M. 1999. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30 day old diarrheic dairy calves in central Spain. *Vet. Parasitol.* 80 (3): 179-185.
22. Del Coco V. F., Córdoba A. M., Basualdo J. A. 2008. *Cryptosporidium* infection in calves from a rural area of Buenos Aires, Argentina. *Vet. Parasitol.* 158: 31-35.
23. Fayer R., and Leek R. G. 1984. The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature and time on *in vitro* excystation of *Cryptosporidium*. *J. Protozool.* 31: 567-569.
24. Fayer R., Morgan U., Upton S. J. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: Transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* 30: 1305-1322.
25. Fayer R. 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet. Parasitol.* 126: 37-56.
26. Fayer R., Santin M., Xiao L. 2005. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J. Parasitol.* 91: 624-629.

27. Fayer R., Santín M., Trout J. M., Greiner E. 2006. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2 years old dairy cattle in the eastern United States. *Vet. Parasitol.* 135: 105-112.
28. Fitz S. E., Rosario C. R., Hernández C. E., Fernández R. M., Hernández O. R., García V. Z. 2006. Prevalencia y factores de riesgo de *Cryptosporidium spp.* En becerros del municipio de Cuajinicuilapa, Guerrero. Memorias de la XLII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Veracruz. p. 89.
29. Garber L. P., Salman M. D., Hurd H. S., Keefe T., Schlater J. L. 1994. Potential risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. *J. Am. Vet. Assoc.* 205: 86-91.
30. Geurden T., Goma F. Y., Siwila J., Phiri I. G. K., Mwanza A. M., Gabriel S., Claerebout E., Vercruyse J. 2006. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* in three cattle husbandry system in Zambia. *Vet. Parasitol.* Vol. 138 (3-4): 217-222.
31. Glaberman S., Moore J. E., Lowery C. J., Chalmers R. M., Sulaiman I., Elwin K., Rooney P. J., Millar B. C., Dooley J. S. G., Lal A. A., Xiao L. 2002. Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 631-633.
32. Hamnes I. S., Gjerde B., Robertson L. 2006. Prevalence Of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in three areas of Norway. *Vet. Parasitol.* 140: 204-216.
33. Hijjawi N. S., Meloni B. P., Ryan U. N., Olson M. E., Thompson R. C. A. 2002. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *Int. J. Parasitol.* 32(14): 1719-1726.
34. Hughes J. 2001. A system for assessing cow cleanliness. In practice 23: 517-524.
35. Huang D. B., White A. C. 2006. An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Gastro. Clin.of North America* 35: 291-314.
36. Hunter P. R., Thompson R. C. 2005. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int. J. Parasitol.* 35 (11-12): 1181-1190.
37. Kato S., Jenkins M. B., Ghiorse W. C., Bowman D. D. 2001. Chemical and physical factors affecting the excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J. Parasitol.* 87(3): 575-581.
38. Kelsey L. J., Thompson W. D., Evans A. S. 1986. Cross sectional and other types of studies. Methods in observational epidemiology. Oxford University Press. USA.

39. Klein D., Kern A., Lapan G., Benetka V., Môtstl K., Hassl A., Baumgartner W. 2008. Evaluation of rapid assays for the detection of bovine coronavirus, rotavirus A and *Cryptosporidium parvum* in faecal samples of calves. *Vet. J.* pp. 1-3.
40. Kvác M., Kouba M., Vítovec J. 2006. Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 137(3-4): 202-209.
41. Leventhal R., Cheadle R. 1992. *Parasitología Médica*. 3a. Edición, México: Ed. Interamericana, Mc Graw-Hill.
42. Liu A., Wang R., Li Y., Zhang L., Shu J., Zhang W., Feng Y., Xiao L., Ling H. 2009. Prevalence and distribution of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Heilongjiang province, China. *Vet. Parasitol.* 105: 797-802.
43. Lippi E. O., Castro P. S. 2003. Aspectos epidemiológicos de la criptosporidiosis en becerros de rebaños lecheros. *Parasitol. Latinoam.* 58: 122-127.
44. Mac Kenzie W. R., Hoxie N. J., Proctor M. E., Gradus M. S., Blair K. A., Poterson D. E., Kazmierczak J. J., Addiss D. G., Fox K. R., Rose J. B., and Davis J. P. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.* 331: 161-167.
45. Maldonado-Camargo S., Atwill E. R., Saltijeral-Oaxaca J. A., Herrera-Alonso L. C. 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.
46. McAllister T. A., Olson M. E., Fletch A., Wetzstein M., Entz T. 2005. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* en beef cows in southern Ontario and in beef calves in southern British Columbia. *Can. Vet. J.* 46 (1): 47-55.
47. McNabb S. J., Hensel D. M., Welch D. F., Heijbel H., McKee G. L., Istre G. R. 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.
48. Mohammed H. O., Wade S. E., Schaaf S. 1999. Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infections in dairy cattle in southeastern New York State. *Vet. Parasitol.* 83: 1-13.
49. Morgan-Ryan U. M., Fall A., Ward L. A., Hijjawi N., Sulaiman I, Fayer R., Thompson R. C., Olson M., Lal A., Xiao L. 2002. *Cryptosporidium hominis* n.sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J. Eukary. Micro.* 49: 433-440.
50. Naciri M., Lefay M. P., Mancassola R., Poirier P., Chermette R. 1999. Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhea complex in suckling and dairy calves in France. *Vet. Parasitol.* 85: 245-257.

51. Navin T. R., Juranek D. D. 1984. Cryptosporidiosis: Clinical, epidemiologic and parasitologic review. *Rev. Infect. Dis.* 6: 313-327.
52. Nevarez M., Ramírez R., Nino R., Rodríguez L. 1999. Identification of *Cryptosporidium* sp. In calf with diarrhea. *Clin. Microbiol.* 6: 37-42.
53. Nuchjangreed Ch., Boonrod K., Ongerth J., Karanis P. 2008. Prevalence and molecular characterization of human and bovine *Cryptosporidium* isolates in Thailand. *Vet. Parasitol.* 103: 1347-1353.
54. O'Handley R. M. 2007. *Cryptosporidium parvum* infection in cattle: are current perceptions accurate?. *Trends in Parasitol.* 23(10): 477-480.
55. Olson M.E., Guselle N.J., O'Handley R.M., Swift M.L., McAllister T.A., Jelinski M.D., Morck D.W. 1997a. Giardia and *Cryptosporidium* in dairy calves in British Columbia. *Can. Vet. J.* 38, 703-706.
56. Olson, M. E., O'Handley R. M., Ralston B. J., McAllister T. A., Thompson R. C. A. 2004. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends Parasitol.* 20: 185-191.
57. Oliveira C. 2000. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* in calf in the zone of Pereira, Municipality of Uberlandia-MG-Brasil. *Int. J. Parasitol.* 13: 590-593.
58. Ong C. S. L., Eisler D. L., Goh S. H., Tomblin J., Awad-El-Kariem F. M., Beard C. B., Xiao L., Sulaiman I., Lal A., Fyfe M., King A., Bowie W. R., and Isaac-Renton J. L. 1999. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis outbreaks and transmission in British Columbia, Canada. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61: 63-69.
59. Panciera R. J., Thomassen R. W., and Garner F. M. 1971. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.* 8: 479-484.
60. Patel S., Pedraza-Diaz S., McLaughlin J., and Casemore D. P. 1998. Molecular characterisation of *Cryptosporidium parvum* from two large suspected waterborne outbreaks. Outbreak Control Team South and West Devon 1995, Incident Management Team and Further Epidemiological and Microbiological Studies Subgroup North Thames 1997. *Commun. Dis. Public Health* 1: 231-233.
61. Paul S., Chandra D., Ray D. D., Tewari A. K., Rao J. R., Banerjee P. S., Baidya S., Raina O. K. 2008. Prevalence and molecular characterization of bovine *Cryptosporidium* isolates in India. *Vet. Parasitol.* 153(1-2): 143-146.
62. Quilez J, Sánchez-Acedo C, Clavel A, del Cacho E, López-Bernad F. 1996. Prevalence of *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragón (North-eastern Spain) *Vet. Parasitol.* 67: 83-88.
63. Rajkhowa S., Rajkhowa C., Hazarika G. C. 2006. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* in mithuns (*Bos frontalis*) from India. *Vet. Parasitol.* 142 (1-2): 146-149.

64. Ramírez A. D., Ramírez-Iglesia L. N, Salas O. H., Montilla N. 2004. *Cryptosporidium* sp. en becerros neonatos de ganadería lechera y de doble propósito del estado Trujillo, Venezuela. XII Congreso de Producción e Industria Animal. *Zootecnia Tropical* 22(2): 125-132.
65. Reduker D. W., and Speer C. A. 1985. Factors influencing excystation in *Cryptosporidium* oocysts from cattle. *J. Parasitol.* 71: 112-115.
66. Rigo C. R. and Franco R. M. B. 2002. Comparação entre os métodos Ziehl-Neelsen modificado e *Acid-Fast-Trichrome* para a pesquisa fecal de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 35(3): 209-214.
67. Robertson L. J., Campbell A. T., Smith H. V. 1993. *In vitro* excystation of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitol* 106: 13-19.
68. Robertson L., Gjerde B., 2001. Occurrence of *Cryptosporidium* oocyst and *Giardia* cyst in raw waters in Norway. *Scand. J. Public Health* 29: 200-207.
69. Romero M. R., Pedrozo R. H., Vera E. 2001. La Criptosporidiosis en los terneros recién nacidos. Su etiología, patogenía, síntomas, tratamiento y profilaxis. Revista de ciencia y Tecnología dirección de investigaciones -UNA. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. Vol. 1 Nº 3. 1-10.
70. Rojas M. 2002. Somera revisión de estudios de *Cryptosporidium parvum* en Perú. *Rev. Virt. Parasitol. Vet. Peru.* 1: 3-5.
71. Ruest N., Faubert G. M., Couture Y. 1998. Prevalence and geographical distribution of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in dairy farms in Québec. *Can Vet. J.* 39: 697-700.
72. Santín M., Trout J. M., Xiao L., Zhou L., Greiner E., Fayer R. 2004. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet. Parasitol.* 122: 103-117.
73. Santín M., Trout J. M., Fayer R. 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Vet. Parasitol.* 155: 15-23.
74. Safavi E. A., Mohammadi G. R., Naghibi A., Rad M. 2010. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. Infection in some dairy herds of Mashhad (Iran) and association with diarrhea in newborn calves. *Comp. Clin. Pathol* pp. 1-5.
75. Scout C., Smith H., Gibas H. 1998. Excretion of *Cryptosporidium parvum* oocysts by a herd of beef suckled cows. *Vet. Rec.* 134: 172.
76. Silva L. C. 1993. Muestreo para la investigación en ciencias de la salud. Madrid: Díaz de Santos.

77. Sischo W. M., Atwill E. R., Lanyon L. E., George J. 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.
78. Smith H. V., Nichols R. A. B., Grimason A. M. 2005. Cryptosporidium excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends. Parasitol.* 21(3): 133-142.
79. Starkey S. R., Kimber K. R., Wade S. E., Schaaf S. L., White M. E., Mohammed H. O. 2006. Risk factors associated with *Cryptosporidium* infection on dairy farms in a New York state watershed. *J. Dairy Sci.* 89: 4229-4236.
80. Sturdee A. P., Bodley-Tickell A. T., Archer A., Chalmers R. M. 2003. Long-term study of *Cryptosporidium* prevalence on a I.S. Hamnes et al. / *Veterinary Parasitology* 140 (2006) 204-216 215 lowland farm in the United Kingdom. *Vet. Parasitol* 116: 97-113.
81. Sulaiman I. M., Lal A., Xiao L. 2001. A population genetic study of the *Cryptosporidium parvum* human genotype parasites. *J. Eukaryot. Microbiol.* (Suppl.):24S-27S.
82. Thompson H. P., Dooley J. S. G., Kenny J., McCoy M., Lowery C. J., Moore J. E., Xiao L. 2007. Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. neonatal calves in Northern Ireland. *Vet. Parasitol.* 100: 619-624.
83. Thrusfield M., Ortega C., de Blas I., Noordhuizen J. P., Frankena K. 2001. Win Episcopo 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet Rec* 148: 567-572.
84. Trotz-Williams L. A., Jarvie B. D., Martin S. W., Leslie K. E., Peregrine A. S. 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.
85. Trotz-Williams L. A., Martin S. W., Martin D., Duffield T., Leslie K. E., Nydam D. V., Jamieson F., Peregrine A. S. 2005. Multiattribute evaluation of two simple tests for the detection of *Cryptosporidium parvum* in calf faeces. *Vet. Parasitol.* 134: 15-23.
86. Trotz-Williams L. A., Wayne S. M., Leslie K. E., Duffield T., Nydam D. V., Peregrine A. S. 2008. Association between management practices and within-herd prevalence of *Cryptosporidium parvum* shedding on dairy farms in southern Ontario. *Prev. Vet. Med.* 83: 11-23.
87. Uehlinger F. D., Barkema H. W., Dixon B. R., Coklin T., O'Handley R. M. 2006. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. In a Veterinary college bovine teaching herd. *Vet. Parasitol.* 142: 231-237.

88. Uga S., Matsuo J., Kono E., Kimura K., Inoue M., Rai S.K., Ono K. 2000. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection and pattern of oocyst shedding in calves in Japan. *Vet. Parasitol.* 94(1-2): 27-32.
89. Vergara C., Gómez M., Rojo F. 1999. Criptosporidiosis. *Vet. Parasitol.* 4: 132-136.
90. Wade S. E., Mohammed H. O., and Schaaf S. L. 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.
91. Watanabe Y., Yang C. H., Ooi H. K. 2005. Cryptosporidium infection in livestock and first identification of *Cryptosporidium parvum* genotype in cattle feces in Taiwan. *Vet. Parasitol.* 97: 238-241.
92. Xiao L., Escalante L., Yang C., Sulaiman I., Escalante A. A., Montali R. J., Fayer R., Lal A. A. 1999. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1578-1583.
93. Xiao L. H., Herd R. P. 1994. Infection patterns of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. *Vet. Parasitol.* 55: 257-262.
94. Xiao L., Fayer R., Ryan U., Upton S. J. 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 72-97.







**20.** ¿Tienen acceso las becerras a pasturas?

1 ( ) Si, que tipo: \_\_\_\_\_ 2 ( ) No

**21.** ¿Tienen permitido las becerras mamarle a las vacas?

1 ( ) Si 2 ( ) No

**22.** ¿Qué tiempo se tardan en separar la becerrita de la vaca después del ordeño?

1 ( ) Inmediatamente 2 ( ) Las dejan un poco más, ¿Qué tanto? \_\_\_\_\_ min.

**23.** Después de separadas las becerras de las vacas ¿A dónde van estas?

1 ( ) Amarrada cerca de la vaca 2 ( ) A la becerrera

**24.** ¿Tipo de estancia a la que van las becerras?

1 ( ) Amarradas 2 ( ) Casa grupal 3 ( ) Casa individual 4 ( ) Corral

**25.** ¿Limpien el lugar de estancia de las becerras?

1 ( ) Si 2 ( ) No

**26.** ¿Con qué frecuencia las limpia?

1 ( ) Nunca 2 ( ) Diario  
3 ( ) Días intercalados 4 ( ) Semanalmente o (-) frecuente

**27.** ¿Cuál es el método de limpieza del lugar donde habitan las becerras?

1 ( ) No limpia. 2 ( ) Limpieza de la parte sucia.  
3 ( ) Limpieza de todo con agua. 4 ( ) Limpieza de todo con detergente.

**28.** ¿Cuál es el alimento principal para los becerros no destetados?

1 ( ) Sustito de leche 2 ( ) otro: \_\_\_\_\_

**29.** ¿Cómo suministra el alimento a los becerros no destetados?

1 ( ) Con utensilios individuales 2 ( ) Utensilios compartidos y no los limpia

**30.** ¿Lava los utensilios entre comida y comida?

1 ( ) Si 2 ( ) No

**31.** ¿A que edad reciben el calostro las becerras? \_\_\_\_\_ Días.

**32.** ¿Cuánto tiempo lo reciben? \_\_\_\_\_ Días.

**33.** ¿Qué tipo de contacto tienen los becerros después de ser separados de la vaca?

1 ( ) Con otros animales no destetados    2 ( ) Con animales destetados también

**34.** ¿Cuántas becerras desteta a los seis meses de edad? \_\_\_\_\_

**35.** ¿Tipo de cama de los becerros post-destetados?

1 ( ) Paja o heno                      2 ( ) Aserrín                      3 ( ) Otros

**36.** Frecuencia de la limpieza.

1 ( ) Nunca                                      2 ( ) Diario  
3 ( ) Días intercalados                      4 ( ) Semanalmente o menos frecuente

**37.** ¿Qué tipo de contactos tienen los becerros post-destetados?

1 ( ) Otros animales no destetados.  
2 ( ) Animales destetados de seis meses de edad.  
3 ( ) Animales de 6-18 meses, novillonas, ganado adulto.  
4 ( ) Ningún contacto físico.



**9.** ¿Mejora el animal?

1 ( ) Si

2 ( ) No

**10.** ¿En qué tiempo?

1 ( ) 2 días

2 ( ) 5 días

3 ( ) > 10 días

**SR. GANADERO AGRADECEMOS SU COOPERACIÓN.**