

**EXCRECIÓN DE OOQUISTES DE *Cryptosporidium* sp. EN
BECERROS DE UNA EXPLOTACIÓN DE GANADERÍA LECHERA**
Montilla, Noraima Josefina



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
NÚCLEO UNIVERSITARIO RAFAEL RANGEL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS AGRARIAS
TRUJILLO EDO TRUJILLO**

**EXCRECIÓN DE OOQUISTES DE *Cryptosporidium* sp. EN
BECERROS DE UNA EXPLOTACIÓN DE GANADERÍA LECHERA**

Br: MONTILLA NORAIMA J.

TUTOR ACADEMICO
Dra. ADELINA DÍAZ DE RAMIREZ

Trujillo; Junio 2003

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
NÚCLEO UNIVERSITARIO "RAFAEL RANGEL"
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS AGRARIAS
TRUJILLO ESTADO TRUJILLO

TRABAJO DE PREGRADO PRESENTADO AL CONSEJO DE DEPARTAMENTO
DE CIENCIAS AGRARIAS COMO REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO
DE TÉCNICO SUPERIOR PECUARIO

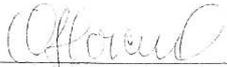
Trujillo; Junio 2003

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
NUCLEO UNIVERSITARIO "RAFAEL RANGEL"
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS AGRARIAS
TRUJILLO Edo. TRUJILLO

ACTA DE EVALUACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

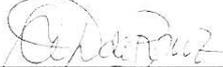
Los suscritos, miembros del Jurado designado por el Consejo de este Departamento en su sesión del día 11 de junio de 2003, para conocer y evaluar el trabajo titulado: "Excreción de Ooquistes de *Cryptosporidium* sp. en Becerros de Una Explotación de Ganadería Lechera", presentado por la Bachiller Noraima Josefina Montilla, CI: 14.780.296, como credencial necesaria para cumplir con el requisito de grado para optar al título de **TECNICO SUPERIOR PECUARIO**. Siguiendo las normas establecidas para la presentación escrita, exposición oral y evaluación de estos trabajos, este Jurado emite el veredicto de **APROBADO CON MENCIÓN PUBLICACIÓN**.

En Trujillo a los dieciocho días del mes de junio del dos mil tres.


Prof. Glenda Moreno
JURADO




Prof. Lildo Ramirez
JURADO


Prof. Adelina Díaz de Ramirez
TUTOR
COORDINADOR DEL JURADO

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso, quien nos da vida, salud e inteligencia y por iluminarme en la búsqueda de nuevos conocimientos, dándome la fuerza, voluntad y energía necesaria para seguir en mis propósitos y culminar la meta que me he trazado al concluir una fase de mi estudio.

A mi Madre Bernarda, quien ha estado siempre presente apoyándome y ayudándome a pesar de mis dificultades para poder culminar hoy una parte de mis estudios. Mi vida y lo que hoy en día soy, te lo debo a ti. Te quiero mucho mamá.

A mi Hija Noranyeli que la tuve al final de mi carrera es mi mayor estímulo para seguir adelante. Espero que algún día sea tu hija quien escriba estas líneas. "Te Amo"

A quien he querido siempre como a un padre Andres quiero agradecerte desde el fondo de mi corazón lo que has hecho para hacer posible este sueño. Te quiero mucho. A mis Sobrinos que son como mis segundos hijos los Adoro.

A mis Hermanos; Darwin, Alvaro, Andres, Jean Carlos, Yelitza, Rober, Franklin, Willians, Orangel y Hector. En especial a Franklin y a Yelitza, por su constante apoyo en los momentos más difíciles de mi vida, gracias por sus consejos. Los quiero mucho a todos este triunfo es de ustedes.

Ami abuela Salustriana: Por su constante permanencia a mi lado y por todos sus sacrificios para poder llegar a la culminación de mi carrera. "Te Amo abuelita".

A mis Tías(o): En especial a Emerita por haberme apoyado y ayudado cuando más la necesité. Te quiero muchas gracias.

A mis primos Ender, Carlos, Leonardo, Roselvi, Vanessa, Jogly, Gladys etc. Para que les sirva como ejemplo y más tarde sean ustedes quienes escriban estas líneas. Los quiero mucho.

A mis amigas(o): Belkis, Rosalino, Douyels, Adela, Maribel, Fany, Lourdes, Xiomara, Carmen, Liliana, Mirian, Suhaill, Floride, Yenny, Gustavo, Carlos, Leonar, Alejandro, Lorena, José G y Mary. Los quiero.

A mi comadre y amiga Olga quien ocupa un lugar muy especial en mi corazón y por que creo que sin tu ayuda y consejos no se me hubiese hecho fácil terminar mi carrera. Quiero que sepas que te quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

Al Núcleo Universitario Rafael Rangel por abrirme sus puertas, permitiéndome llegar a la cima de esta meta, en especial a mis profesores que me proporcionaron enormes conocimientos para especializarme en el ámbito pecuario.

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT - ULA), por su apoyo financiero a través del Proyectos NURR –C-322-02-03F

Al Laboratorio de Investigación en Fisiología e Inmunología (LIFI) por su apoyo. En especial a los técnicos Mary y José G, quienes estuvieron colaborándome y animándome en la realización de este trabajo.

A la profesora Adelina Díaz de Ramírez: Por sus valiosos aporte como tutora de esta investigación, sin lo cual no se pudiera haber llevado a cabo este trabajo. De todo corazón le agradezco haberme comprendido y por terminar siendo para mi, además de profesora una buena amiga.

Al Profesor Lílido Ramírez: por su grandiosa comprensión y colaboración.

A Todos mis compañeros de clase que me motivaron a pesar de las dificultades que se me presentaron en el camino para llegar a culminar esta meta. Se lo agradezco de todo corazón.

A la Finca La Orquídea y a Todo el Personal que en ella Labora: Por permitirme realizar mis pasantias haciendo uso de sus instalaciones y animales. Gracias por su colaboración.

RESUMEN

Noraima Montilla, 3-6-2003; “EXCRECIÓN DE OOQUISTES DE *Cryptosporidium* sp. EN BECERROS DE GANADERÍA LECHERA” Universidad de los Andes–Núcleo Universitario “Rafael Rangel”. Departamento de Ciencia Agrarias – Trujillo Estado, Trujillo. Tesis de Grado. Tecnología Superior Pecuaria. NURR – ULA.

Con la finalidad de determinar la prevalencia, la intensidad de la infección de *Cryptosporidium* sp y su asociación con cuadros de diarrea, así como, estudiar los valores morfométricos de los ooquistes de dicho parásito, se colectaron al azar, muestras fecales de 109 becerros de una finca lechera ubicada en el municipio Candelaria del estado Trujillo (Venezuela). Se incluyeron becerros de ambos sexos, de 4 a 120 días de edad, alojados en jaulas, las muestras se procesaron por el método de centrifugo-flotación con solución de NaCl asociado con la técnica de coloración de carbol–fucsina. Del total de muestras examinados, 48,6 % (53 /109) presentaron formas identificadas como ooquistes de *Cryptosporidium* sp., cuyas dimensiones fueron las siguientes: Largo $x \pm DE = 4,49 \pm 0,49$ (Mínimo-Máximo = 4,0–5,5); Ancho $x \pm DE = 4,08 \pm 0,31$ (Mínimo-Máximo = 3,0 – 5,0) ; Índice de la forma $x \pm DE = 1,10 \pm 0,12$ (Mínimo-Máximo = 0,80– 1,38). La mayor prevalencia (69,4 %) correspondió al grupo etario ≤ 30 días y dentro de estos, a los $>7-\leq 14$ días de edad (100 %), observándose una asociación significativa ($P < 0,05$) entre la presencia del parásito y la edad (en días) de los animales. En general, disminuye la prevalencia y la intensidad de la infección por *Cryptosporidium* sp., a medida que aumenta la edad de los animales. El 31,2 % de las muestras fueron diarreicas, existiendo una asociación altamente significativa ($P < 0,01$) entre la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* sp. y ésta.

Palabras clave: Becerros, *Cryptosporidium*, Ganadería Lechera.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Dedicatoria..... 17

Agradecimiento..... 17

Resumen..... 18

Índice de contenido..... 18

Índice de tablas..... 19

Índice de figuras..... 19

1.- Introducción..... 19

1.1.- *Cryptosporidium* spp. en el ganado bovino..... 19

1.2.- Ciclo biológico..... 20

1.3.- Importancia de la criptosporidiosis bovina.... 21

1.4.- Prevalencia en ganado lechero. 22

1.5.- Objetivos. 23

2.- Materiales y métodos..... 23

2.1.- Unidad de producción. 23

2.2.- Animales. 23

2.3.- Colecta de las muestras. 24

2.4.-Diagnostico parasitológico. 24

2.5.-Método de centrifugo-flotación en Cloruro de Sodio..... 24

2.6.- Coloración de Carbol- Fucsina. 25

2.7.- Análisis Estadístico. 25

3.- Resultados..... 25

4.- Discusión..... 30

Conclusiones..... 32

Recomendaciones..... 32

Referencias Bibliográficas..... 33

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I. Prevalencia de la infección por *Cryptosporidium* en becerros distribuidos por grupos etarios, de una explotación lechera.....26

TABLA II. Prevalencia de la infección por *Cryptosporidium* en becerros ≤ 30 de edad, distribuidos por grupos etarios.27

TABLA III. Intensidad de la infección de acuerdo al recuento semicuantitativo de ooquistes de *Cryptosporidium* en becerros.....27

TABLA IV. Relación entre infección por *Cryptosporidium* y diarrea en becerros, distribuidos por grupos etarios.....29

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Relación entre infección por *Cryptosporidium* y diarrea en becerros de una explotación lechera.....27

FIGURA 2. Distribución de los becerros según los rangos de excreción de ooquistes de *Cryptosporidium*. y la presencia de diarrea.....29

1.- INTRODUCCIÓN

Los miembros del género *Cryptosporidium* son protozoarios parásitos (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) que colonizan las células epiteliales, especialmente las que se encuentran a lo largo del tracto digestivo de un amplio espectro de vertebrados, incluyendo mamíferos, aves, peces y reptiles (Fayer y col., 1.997). A pesar que estos organismos fueron descubiertos a comienzos del siglo XX, es recién en la década de los setenta cuando se reconoce su acción patógena en los animales y en los seres humanos. (Nime y col., 1.976; Meisel y col., 1.976).

El gran número de trabajos publicados en los últimos años sobre criptosporidiosis en el ganado bovino y la detección del parásito en prácticamente todos los países en los cuales ha sido investigado, confirman el interés de esta entidad nosológica y ponen de manifiesto su amplia distribución geográfica (Atwil y col., 1.999; De la Fuente y col., 1.999; Fayer y col., 2.000; Maldonado-Camargo y col., 1.998; Mohammed y col., 1.999; Naciri y col., 1.999; Surumay y col., 1.999; Uga y col., 2.000; Valera y col., 2.001).

1.1.- *Cryptosporidium* spp. en el ganado bovino. Dos especies del género *Cryptosporidium* han sido reconocidas en los bovinos: *Cryptosporidium parvum* Tyzzer., 1.912 y *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (sin. *Cryptosporidium muris* tipo bovino o *C. muris*-simil) (Lindsay y col., 2.000). Esta última, fue denominada durante mucho tiempo *C. muris* por su semejanza con la especie descrita en los ratones de laboratorio (Anderson., 1.981; Esteban y Anderson, 1.995; Lindsay y col., 2.000; Koudela y col., 1.999). Sin embargo, estudios

morfométricos, de transmisión experimental y moleculares, mostraron que existen diferencias biológicas y genéticas entre las especies que infectan a los bovinos y a los ratones (Anderson, 1991; Koudela y col., 1.999). Por tal motivo, se ha propuesto que las mismas sean consideradas especies diferentes, asignándole el nombre de *C. andersoni* a la que se observa en los bovinos. (Lindsay y col., 2.000) Varios estudios mostraron que *C. andersoni* se desarrolla en los bordes de las microvellosidades de la células epiteliales del abomaso, se presenta más comúnmente en los animales adultos y por lo general, su prevalencia es baja (Lindsay y col., 2.002; Esteban y Anderson, 1.995; Fayer y col., 2.000). Aparentemente, no causa infección clínica, pero demora la producción de ácidos, retardando la digestión de proteínas en el abomaso y como consecuencia, se reduce significativamente la producción de leche en las vacas crónicamente afectadas (Esteban y Anderson, 1.995).

Por el contrario, *C. parvum* coloniza las células epiteliales del intestino delgado (Current y Resse, 1.986) aunque, en algunas ocasiones, se ha señalado localización extra-intestinal (Fayer y col., 1.997). Es más prevalente en animales menores de 30 días y numerosas publicaciones señalan a este organismo como uno de los principales agentes etiológicos del síndrome diarreico de los becerros (De la Fuente y col., 1.999; Moore y Zeman, 1991; Naciri y col 1.999; Uga y col., 2.000). Se considera que los bovinos constituyen una fuente importante de infección de *C. parvum* tanto para los animales como para el hombre, por esa razón, cuando se discute sobre criptosporidiosis en estos animales es necesario hacer distinción de las especies involucradas.

1.2.- Ciclo biológico. *Cryptosporidium* presenta un ciclo de vida monoxeno, donde todos los estados de desarrollo, sexual y asexual, ocurren en el mismo hospedador, no obstante, el parásito tiene especificidad para desarrollarse en una amplia variedad de mamíferos. El ciclo se inicia con la ingestión de ooquistes esporulados, estados exógenos presentes en el ambiente y excretados en las heces o secreciones respiratorias, siendo la transmisión fecal-oral la que comúnmente se acepta (Fayer y col., 1997).

Cada ooquiste contiene cuatro esporozoítos, estos son los estados infectivos, que al quedar en libertad (exquistación) por el efecto combinado de tripsina y sales biliares, invaden las células epiteliales y experimentan multiplicación asexual (merogonía o esquizogonía). Como resultado de esta fase del ciclo, se originan merontes tipo I que contienen a su vez seis u ocho merozoítos. Al liberarse dichos merozoítos pueden reiniciar nuevos ciclos como merontes tipo I o dar origen a merontes tipo II, los cuales poseen cuatro merozoítos. Estos últimos darán inicio a la fase sexual (gametogonía) en la cual se terminará produciendo los micros y macrogametos, que luego de la fecundación formarán el cigoto, único estado diploide del ciclo. Se forma luego la pared y ocurre esporulación de los ooquistes con producción de cuatro esporozoítos. Como los ooquistes esporulan dentro del hospedador, son eliminados en estado infeccioso, presentando además, gran resistencia para sobrevivir en el ambiente externo por un largo período de tiempo (Current y Resse, 1.986).

Se estima que en el 80 % de los ooquistes, se forma una doble pared y son eliminados con las heces, constituyendo así, las formas de resistencia capaces de infectar a otros hospedadores. Otro 20 %, está sólo

rodeado por una membrana y se los denomina ooquistes de paredes delgadas, teniendo los mismos capacidad de liberar los esporozoítos y originar un ciclo auto-infectivo (Current y Resse, 1.986).

1.3.- Importancia de la criptosporidiosis bovina. *C. parvum* no sólo constituye un agente etiológico importante en la diarrea neonatal de los becerros, si no que presenta gran interés en Salud Pública, debido a su potencial zoonótico. Se ha demostrado la existencia de al menos dos genotipos distintos, uno de origen bovino que está presente en un amplio rango de hospedadores, según se puede determinar por los aislados obtenidos en diferentes especies de mamíferos, incluyendo humanos. Mientras que el otro genotipo, circularía solamente entre los humanos. Se estima que el mismo, sería responsable del 70 % de los casos de criptosporidiosis en la población humana y al genotipo bovino le correspondería al menos el 30 %, con el agravante que este último infecta a una amplia gama de hospedadores y tiene importancia zoonótica..

Aún cuando aún no se ha establecido cuales son las principales fuentes de infección, se considera que estas pueden ser muy diversas, teniendo en cuenta que el parásito es capaz de desarrollarse en numerosas especies de mamíferos, las cuales eliminan ooquistes con capacidad infectiva para todas ellas. Los animales de explotación pecuaria pueden ser importantes fuentes para la contaminación ambiental. Ovinos, caprinos, equinos y otras especies de importancia zootécnica, son susceptibles a la infección por *C. parvum* y eliminan ooquistes esporulados, sin embargo, a los bovinos se les atribuye el mayor riesgo, debido a su número, amplia distribución, alta incidencia y niveles

de infección. En tal sentido, se ha calculado, que un becerro infectado puede eliminar alrededor de 6×10^{11} ooquistes durante su primer mes de vida (Uga y col., 2.000).

Estos valores pueden ser superados en becerros con diarrea, siendo indudable, que los animales diarreicos desempeñan un papel importante en la diseminación del parásito y en la transmisión directa de becerro a becerro.

En la actualidad, se reconoce a *C. parvum*, como un enteropatógeno causante de cuadros de diarrea, tanto en hospedadores inmunocomprometidos como en inmucompetentes (Gorman y col.,1.989; O' Donoghue, 1.995). En estos últimos, por lo general, la infección es asintomática o tiene un curso benigno autolimitado. En ocasiones, sin embargo, la evolución del proceso puede agravarse conduciendo a cuadros agudos con diarrea severa y mortalidad (Moore y Zeman, 1.991), señalándose con relativa frecuencia, que los becerros infectados con *C. parvum*, tienen un riesgo mayor de manifestar diarrea que aquellos que no lo están (De la Fuente y col.,1.999; Moore y Zeman, 1991; Naciri y col.,1.999; Reinods y col., 1.986; Uga y col., 2.000).

En los casos de criptosporidiosis con alta mortalidad de becerros, se ha afirmado que estarían involucradas otros agentes etiológicos y que *C. parvum* actuaría como patógeno secundario. Sin embargo, pueden ocurrir manifestaciones clínicas de criptosporidiosis en ausencia de otros patógenos, considerándose a *C. parvum* como uno de los principales agentes etiológicos de la diarrea neonatal de los becerros. Estudios experimentales y de campo revelan la importancia de este organismo como patógeno primario, responsable de severos cuadros de diarrea en

neonatos (De la Fuente y col., 1.999; Moore y Zeman, 1.991; Uga y col 2.000) o en asociación con otros agentes infecciosos (De la Fuente y col.,1999; Moore y Zeman, 1991; Reinolds y col., 1986). .

Los becerros neonatos, son en particular susceptibles a la infección por *C. parvum*, y si bien, el parásito ha sido observado a partir de los dos días de nacidos (Moore y Zeman, 1.991), diversos autores coinciden en señalar que la mayor prevalencia ocurre alrededor de las dos semanas de edad (Anderson, 1.981; De la Fuente y col.,1999; Garber y col.,1.994; Uga y col., 2.000), período en el cual son más frecuentes las manifestaciones clínicas. Las tasas de excreción de ooquistes disminuyen sensiblemente en animales mayores de un mes (Garber y col., 1.994; Xiao y Herd, 1.994), no obstante, *C. parvum* también ha sido descrito en becerros de mayor edad e incluso en bovinos adultos, en los que por lo general, cursa de forma subclínica y con bajos niveles de infección.

1.4.- Prevalencia en ganado lechero. La excreción de *C. parvum* ocurre con relativa frecuencia en becerros de rebaños lecheros, en los cuales, la alta concentración de animales generaría condiciones favorables para su transmisión. No obstante, los datos sobre prevalencia muestran variaciones (Atwil y col., 1.999; Garber y col., 1.994; Maldonado-Camargo y col 1.998; Surumay y Alfaro 1.999; Uga y col., 2.000; Valera y col., 2001; Xiao y Herd, 1994), las cuales podrían estar relacionadas con la zona geográfica estudiada, las condiciones epidemiológicas, la historia clínica del rebaño, el sistema de explotación, las prácticas de higiene, el manejo y la edad de los animales al momento del muestreo.

En estudios conducidos en becerros de explotaciones lecheras de diferentes regiones de Estados Unidos, se han reportado prevalencias de 22,4%, 40,7% y 57,5% (Garber y col., 1.994; Ongerth y Stibbs, 1.989; Surumay y pote, 1999). En contraste con estos resultados, sólo 5,6% de los becerros evaluados en el sur de California y el 13% de los procedentes de sureste de Nueva York tenían ooquistes de *C. parvum* en sus heces (Sobieh, 1.987). En Manitoba, Canadá , por el contrario, el 63% estaba infectado con *C. parvum*.

Prevalencias del 25%, 26,9% y 27,8% fueron observadas en becerros de explotaciones lecheras de México, Argentina y Brasil respectivamente (Maldonado- Camargo y col., 1.998; Bellinzoni y col., 1.990).

Numerosas investigaciones coinciden en señalar que los becerros infectados con *C. parvum*, tienen mayor probabilidad de presentar diarrea. Un trabajo llevado a cabo en el Sur de Gran Bretaña, en becerros con diarrea, muestra que 74% de los animales estaban infectados en comparación al 49% que no lo estaba (Reinolds y col., 1986). En California se observó que el 21% de los animales que manifestaron signos de diarrea, excretaron ooquistes de *C. parvum*, mientras que sólo el 2% de los no infectados, presentaron diarrea (Sobieh y col., 1.987). Resultados similares fueron obtenidos en Francia y Japón (Naciri y col., 1.999; Uga y col., 2.000).

En Venezuela, el estudio sobre *Cryptosporidium* spp. en el ganado vacuno, es incipiente, sin embargo, este organismo ya ha sido reportado en becerros de explotaciones ganaderas de los estados Monagas y Zulia (Surumay y Alfaro, 1.999; Valera y col., 2.001). Un trabajo reciente en el estado Trujillo, muestra que el

57% de las vacas excretan ooquistes de *Cryptosporidium* spp. durante el posparto (Díaz de Ramírez y col., 2.002) y aunque en su mayoría los recuentos fueron bajos, no se desestima el potencial de riesgo que estos animales representan para el resto del rebaño y en particular para los becerros.

Un mayor conocimiento de la frecuencia de la infección por criptosporidios en los becerros, permitiría una mejor conducción del control y del tratamiento de la diarrea neonatal, contribuiría a reducir los problemas de resistencia a los antibióticos, ligado al intenso y a veces abusivo uso de los mismos y permitiría reducir las pérdidas económicas en las explotaciones ganaderas, así como, la contaminación ambiental y el riesgo para la salud animal y humana.

1.5.- Objetivos. Este estudio tiene como objetivos 1.- Determinar la prevalencia de criptosporidiosis en becerros de una explotación de ganadería lechera. 2.- Cuantificar los niveles de excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* sp. 3.- Realizar estudios morfométricos de los ooquistes y 4.- Evaluar la asociación entre *Cryptosporidium* y cuadros de diarrea en becerros neonatos.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- Unidad de producción. El estudio fue realizado en una finca comercial localizada en el municipio Candelaria, Estado Trujillo, enmarcada dentro de un área ecológica de Bosque Seco Tropical, cuya ubicación geográfica está entre los 9°,7' de latitud norte y 70°,7' de longitud oeste. Esta zona se caracteriza por presentar una

altitud de 250 msnm, una temperatura media anual de 28°C, y a una precipitación de 1.315 mm.

La unidad de producción estudiada desarrolla un sistema de explotación de ganadería lechera, con cría en forma artificial de los becerros. Estos, después del nacimiento permanecen en el corral de maternidad, donde permanecen cuatro días junto a sus madres y consumen calostro. Al quinto día después del nacimiento, son destetados y alojados en jaulas, ubicadas en un corral a nivel del suelo, durante un período máximo de 120 días. Las jaulas con las siguientes dimensiones 1,50 m. de ancho por 2,50 m. de largo servían para alojar entre 1 a 3 becerros. Durante los tres primeros meses, los becerros son alimentados con 3 lts. de leche diarios y partir de los 30 días de edad son suplementados con 2 a 3 Kg diario de alimento concentrado y heno.

Entre las prácticas de higiene durante el período de lactancia, se incluyen el lavado diario de los utensilios empleados para la alimentación y el agua de bebida. En el área de maternidad la limpieza está limitada a la recolección de las heces sólo en época de lluvia o cuando se acumulan excesivamente. En el corral donde están las jaulas, las excretas son recogidas mensualmente y son desplazadas hacia otras áreas, limpias y secas cuando el piso está húmedo. En el corral de las becerrerías, cada dos meses, se hacen aplicaciones de cal al boleó.

2.2- Animales. La población estudiada estuvo representada por un lote de 109 becerros (machos y hembras) mestizos *Bos taurus*, de la raza Carora (n=81) y Holstein (n=28) bajo el mismo manejo y con edades comprendidas entre 4 y 120 días.

2.3.- Colecta de las muestras. Las muestras de heces fueron colectadas mediante estimulación rectal, utilizando para ello, guantes quirúrgicos y bolsas de polietileno rotuladas con el número del animal y la fecha del muestreo. Al momento de la toma de las muestras se registraron datos referentes al becerro tales como fecha de nacimiento, edad, sexo y raza. La consistencia de las heces fue registrada y clasificadas en diarreicas las líquidas y semilíquidas y en normales las pastosas o formadas, las dos primeras fueron registradas como heces diarreicas. Luego de su identificación, fueron colocadas en cavas refrigeradas y trasladadas, dentro de 4 horas de su colecta, al Laboratorio de Investigación en Fisiología e Inmunología del Núcleo Universitario Rafael Rangel donde fueron procesadas de inmediato.

2.4.-Diagnostico parasitológico. Para la detección y cuantificación de los ooquistes de *Cryptosporidium* se emplearon muestras de heces frescas, las cuales se procesaron por un método de concentración en asociación con la técnica de coloración de carbol-fucsina. El primero permite separar los ooquistes de los detritos fecales, incrementando de esta forma, la posibilidad de detección del organismo. Para ello se utilizó el método de centrifugo-flotación en cloruro de sodio (Kuczynka) el cual se describe a continuación.

2.5.- Método de Centrifugo-flotación en Cloruro de Sodio. Mediante agitación, se mezclaron 3 gramos de heces de cada muestra con 45 ml de agua destilada y la suspensión resultante fue filtrada a través de coladores de malla fina y varios trozos de gasa. Dicha suspensión



Excreción de ooquistes de Cryptosporidium sp. en becerros de una explotación de ganadería lechera

fue colocada en tubos de centrifuga de polipropileno de 50 ml, los cuales se aforaron con agua destilada hasta 45 ml, procediéndose luego a centrifugar a 500 x g por 10 minutos. De cada sobrenadante resultante, fue descartado, el sedimento, el cual se resuspende en 45 ml de una solución de cloruro de sodio (360 g./ litro; gravedad especifica, 1,21) y se procede a centrifugar a 500 x g durante 10 minutos. De la parte superior del sobrenadante, fueron transferidos 5ml a tubos de 50 ml y aforados con 40 ml de agua destilada. La preparación fue nuevamente centrifugada a 500 x g por 10 minutos y el sedimento se lava dos veces más, primero en 45 ml y luego en 15 ml de agua destilada. Posteriormente, el sedimento fue de nuevo centrifugado en un tubo Eppendorf de 1 ml a 1.500 x g por 3 minutos y el sedimento final fue resuspendido en 100µl de agua destilada. Luego, dos alícuotas de 50 y 10 µl de esta suspensión fueron depositadas en láminas portaobjetos sobre áreas de 1 cm y 5 mm de diámetro respectivamente. Las primeras fueron utilizadas para determinar el índice de la forma y el tamaño de los ooquistes de *Cryptosporidium* y las segundas para la determinación semi-cuantitativa de los ooquistes. Las preparaciones se colorearon con la técnica de tinción carbol-fucsina, (Arrowood, 1.997) descrito a continuación:

2.6.- Coloración de Carbol- Fucsina. Las preparaciones resultantes del procedimiento anterior, se secan a 60°C, se fijan con metanol durante 30 segundos, y se colorean con carbol fucsina por 1 minuto. Luego, fueron lavadas ligeramente con agua destilada, secadas y cubiertas con una solución de ácido sulfúrico al 10% en etanol, durante 2 minutos. Las láminas son nuevamente

lavadas con agua destilada y secadas, luego se tiñen con verde de malaquita por 2 minutos. Por último se lavan con agua destilada, se secan y se examinan bajo el microscopio óptico, usando inicialmente objetivo de menor aumento (400 x) y luego el objetivo de inmersión en aceite (1.000 x). Los ooquistes se evaluaron de forma semi-cuantitativa, para ello fueron contados en cada preparación positiva y clasificados en cuatro rangos de acuerdo a la siguiente escala: 1 = menos de 1 ooquiste por campo; 2 = 1 a 5 ooquistes por campo; 3 = 6 a 20 ooquistes por campo, 4 = más de 20 ooquistes por campo. Se consideró el número medio de ooquistes contados en 50 campos microscópicos.

2.7.- Análisis Estadístico. Los datos obtenidos en este estudio se analizaron utilizando el paquete estadístico computarizado Statiscal Analysis Sistem (S.A.S), realizando pruebas de ji-cuadrado y tablas de frecuencia. Fueron consideradas como variables dependientes la infección por *Cryptosporidium sp.*, mientras que la edad en días, niveles de excreción de ooquistes y consistencia de las heces de los becerros fueron las variables independientes. Se determinaron valores medios y rangos de largo, ancho e índice de la forma de los ooquistes.

3.- RESULTADOS

El examen individual de las muestras de heces correspondientes a 109 becerros mostró que el 48,6 % (53 /109) excretaron formas identificadas como ooquistes de *Cryptosporidium sp.* Los ooquistes fueron observados como estructuras esféricas o ligeramente

ovoides. La coloración puede ser variable, siendo que la mayoría de ellos aparecen total o parcialmente coloreadas de rojo o rosado intenso, sobre un fondo azul verdoso. En algunos casos se aprecian ooquistes tenuemente coloreados de rosado y en ocasiones se distinguen los esporozoitos dentro de los ooquistes, lo que demuestra que estos estadios son excretados totalmente esporulados.

Como resultado de las mediciones de 241 ooquistes aislados de 13 muestras, en preparaciones coloreadas se obtuvieron las siguientes dimensiones: Largo $x \pm DE$ $4,49 \pm 0,49 \mu m$ (Mínimo-Máximo 4,0 – 5,5); Ancho $x \pm DE$ $4,08 \pm 0,31 \mu m$ (Mínimo-Máximo 3,0 – 5,0); Índice de la forma (Largo / Ancho) $x \pm DE$ $1,10 \pm 0,12 \mu m$ (Mínimo-Máximo 0,80– 1,38). Dichas dimensiones están dentro de los rangos señalados para los ooquistes de *Cryptosporidium parvum*.

observó una asociación significativa entre el sexo de los animales y la infección.

La TABLA I muestra la proporción de animales positivos a *Cryptosporidium* sp. según la edad. Estos resultados indican que la prevalencia de excreción de ooquistes varía con la edad de los becerros, de esa manera, el grupo etario ≤ 30 días presentó el mayor porcentaje de positividad con 69,4 % mientras que en los animales $>30-\leq 60$ y > 60 días se registraron prevalencias muy similares con 39,5 y 36,7 % respectivamente. La prueba de ji cuadrado mostró que existe una asociación significativa ($P < 0,05$) entre la infección por *Cryptosporidium* y la edad de los animales.

Cuando se considera la excreción de ooquistes en los becerros de hasta 30 días de edad, los resultados indican un porcentaje de infección de 57,1 % para los ≤ 7 días.

Tabla I.- PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR *Cryptosporidium* EN BECERROS DISTRIBUIDOS POR GRUPOS ETARIOS, DE UNA EXPLOTACIÓN LECHERA

Edad en Días	N° de becerros examinados	Positivos a <i>Cryptosporidium</i>	
		N°	%
≤ 30	36	25	69,4
$>30-\leq 60$	43	17	39,5
>60	30	11	36,7
Total	109	53	48,6

Como consecuencia del tipo de producción de la finca estudiada, la mayoría de las muestras de heces 96 (88,07 %) fueron obtenidas de hembras. De estas, el 50 % (48 / 96) resultaron positivas, mientras que de las 13 muestras obtenidas de machos el 38,4 % (5 / 13) presentaron ooquistes de *Cryptosporidium* sp. No se

Este valor se elevó a 100 % en el grupo etario $>7-\leq 14$, mientras que en los grupos $>14-\leq 21$ y $>21-\leq 30$ días de edad la prevalencia fue de 87,5 y 46,7 % respectivamente, TABLA II. Se encontró una asociación significativa ($P < 0,05$) entre la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* y la edad de los animales.

Tabla II.- PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR *Cryptosporidium* EN BECERROS ≤ 30 DE EDAD, DISTRIBUIDOS POR GRUPOS ETARIOS

Edad en Días	N° de becerros examinados	Positivos a <i>Cryptosporidium</i>	
		N°	%
≤ 7	7	4	57,1
$>7-\leq 14$	8	8	100,0
$>14-\leq 21$	8	7	87,5
$>21-\leq 30$	13	6	46,2
Total	36	25	65,9

El recuento semi-cuatitativo de los ooquistes que fue expresado en rangos y que estima la intensidad de la infección indica que la mayoría de los becerros excretaron bajo número, ya que el 86,8 % (46 / 53) de las muestras positivas quedaron incluidas en el rango 1.

Al analizar la intensidad de la infección por grupo etario, esta fue mayor en los becerros ≤ 30 días con 24% de las muestras positivas distribuidas entre los rangos 2, 3 y 4, como se aprecia en la TABLA III. Las diferencias observadas en los niveles de infección entre los grupos etarios no fueron significativas ($P > 0,05$).

Se determinó la consistencia en todas las muestras de heces, observándose que el 31,2 % (34 / 109) fueron diarreicas (líquidas o semi-líquidas), de estas, el 91,2% (31 / 34) resultaron positivas para *Cryptosporidium*, mientras que el 29,3% (22 / 75) de las muestras de consistencia normal fueron positivas. Los resultados indican que existe una asociación significativa ($P < 0,05$) entre la excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* y los cuadros de diarrea.

Tabla III.- INTENSIDAD DE LA INFECCIÓN DE ACUERDO AL RECUENTO SEMICUANTITATIVO DE OOQUISTES DE *Cryptosporidium* EN BECERROS DISTRIBUIDOS POR GRUPOS ETARIOS

Rango *	Porcentaje de Becerros según la Edad			
	≤ 30	$>30-\leq 60$	> 60	Total
1	76,0	94,1	100,0	86,8
2	4,0	5,9	0,0	3,8
3	16,0	0,0	0,0	3,8
4	4,0	0,0	0,0	1,9

* determinado por el recuento semicuantitativo de los ooquistes

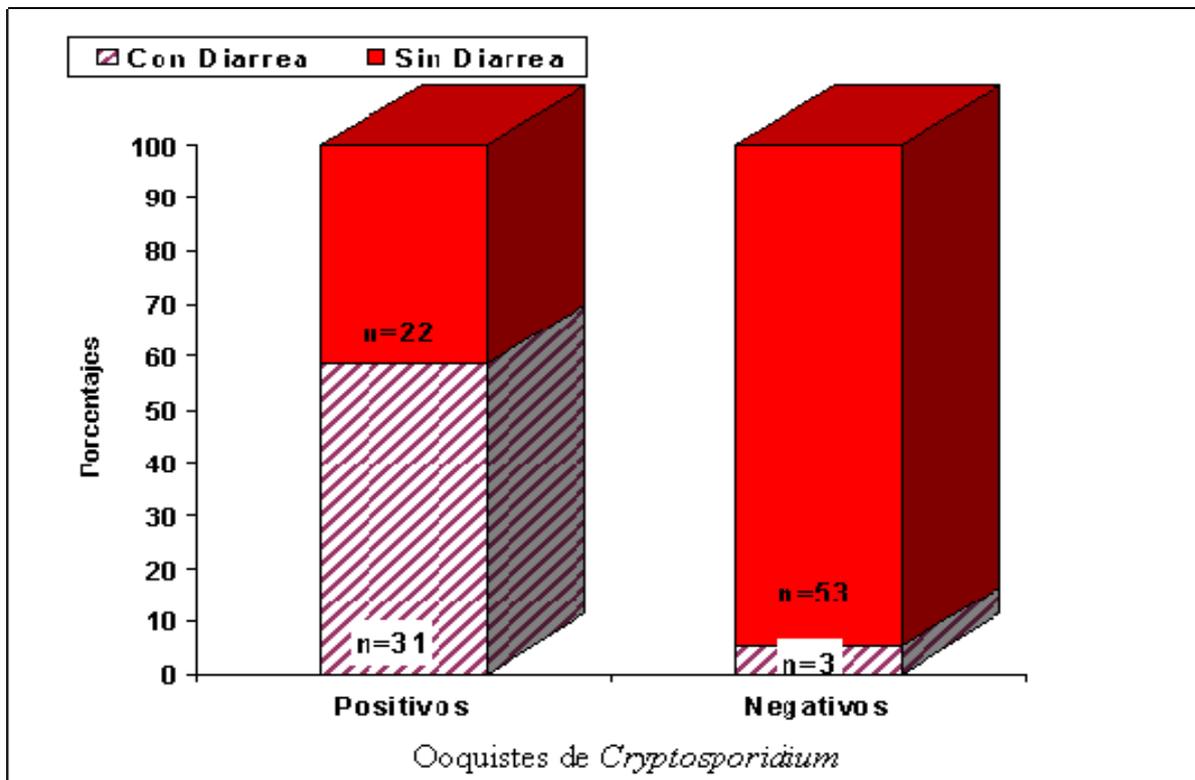


Figura 1. RELACIÓN ENTRE INFECCIÓN POR *Cryptosporidium* Y DIARREA EN BECERROS DE UNA EXPLOTACIÓN LECHERA

La FIGURA 1 muestra que el 58,5 % (31 / 53) de los animales que excretaron ooquistes de *Cryptosporidium* presentaron cuadros de diarrea, por el contrario dentro los becerros con muestras negativas sólo el 5.4 % (3 / 56) estaban con diarrea. De esta forma, el riesgo de manifestaron diarrea fue 11 [(31/53) / (3/56)] veces mayor para becerros que excretaban ooquistes de *Cryptosporidium* en comparación con los que no presentaron el parásito.

Cuando se analiza la relación entre infección por *Cryptosporidium* y diarrea en becerros según los grupos etarios (TABLA IV), los resultados indican que en todos ellos, el porcentaje de muestras positivas a *Cryptosporidium* y que

presentaron diarrea, fue muy superior al de los negativos que manifestaron cuadros de diarrea. De esta manera, existe una asociación significativa (P<0,05) entre la infección con *C. parvum* y la ocurrencia de diarrea según la edad de los becerros.

En la FIGURA 2 se aprecia que todas las muestras no diarreicas que resultaron positivas presentaron niveles de excreción de ooquistes clasificados en el rango <1, por el contrario, en las muestras diarreicas positivas el 77,4 % fueron clasificadas en dicho rango y el 22,6 % en rangos mayores o igual 2.

Tabla IV.- RELACIÓN ENTRE INFECCIÓN POR *Cryptosporidium* y DIARREA EN BECERROS, DISTRIBUIDOS POR GRUPOS ETARIOS

Edad en días	Becerras positivas	Positivos con diarrea (%)	N° de Negativos	Negativos con diarrea (%)
≤ 30	25	19 (76,00)	11	2 (18,2)
> 30- ≤ 60	17	8 (47,06)	26	1 (3,9)
> 60	11	4 (36,40)	19	0 (0,0)
Total	53	31 (58,50)	56	3 (5,3)

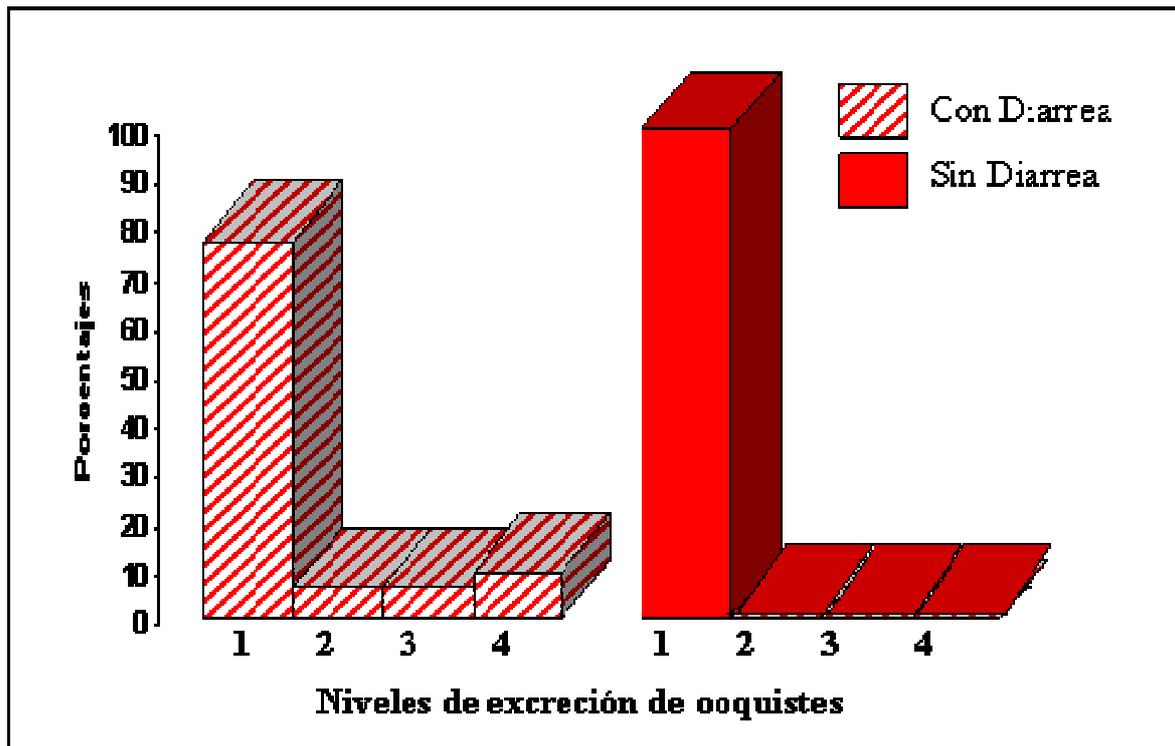


Figura 2. DISTRIBUCIÓN DE LOS BECERROS SEGÚN LOS RANGOS DE EXCRECIÓN DE OOQUISTES DE *Cryptosporidium*. Y LA PRESENCIA DE DIARREA

4.- DISCUSIÓN

En el presente trabajo se detectó la presencia de *Cryptosporidium* en becerros de una finca lechera del estado Trujillo. La infección por dicho parásito ocurre con relativa frecuencia en este tipo de explotaciones, ya que la alta concentración de animales generaría condiciones favorables para su transmisión.

El porcentaje total de infección con *Cryptosporidium* registrado en este estudio (48,6 %) en becerros de 4 a 120 días de edad, fue superior al observado (30,1 %) en otra región de Venezuela por Surumay y Alfaro (1.999). Dichos autores evaluaron becerros de 2 a 20 semanas de edad procedentes de fincas lecheras del estado Monagas. El porcentaje de becerros infectados (40,7 %) también es comparable al encontrado por Ongeth y Stibbs (1.989) en el estado de Washington, USA, aunque en este caso el 77 % de los animales examinados, tenían entre 7 a 21 días de edad.

La infección por *Cryptosporidium* ocurre con relativa frecuencia en el ganado bovino, no obstante, la mayoría de las veces resulta difícil establecer comparaciones entre los datos de prevalencia, ya que se observa que estos varían según la edad de los bovinos al momento del muestreo. Así mismo, otros factores tales como la historia clínica del rebaño, las prácticas de higiene, el manejo, el sistema de explotación, la zona geográfica estudiada, e incluso, el número de muestras analizadas por animal pueden influir sobre dichos resultados.

La edad de los becerros está estrechamente asociada con el riesgo de excretar ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, por lo tanto, los resultados de prevalencia fueron analizados según los grupos

etarios. Estos indican que los neonatos, son particularmente susceptibles a la infección por dicho parásito y coincide con diversos autores que señalan que la mayor prevalencia ocurre en becerros menores de 30 días (De la Fuente y col 1.985; Gorman y col 1.989; Mohamed y col 1.999; Quilez y col 1.996). Para dicho grupo etario, el porcentaje total de infección reportado en este estudio (69, %), es superior al observado (50,8 %) en becerros de una finca del estado Zulia (Valera y col 2.001) con sistema de explotación de doble propósito. Sin embargo, al igual que en la finca estudiada, el manejo de los becerros incluía un destete precoz, con cría en forma artificial y alojamiento en jaulas individuales. También es alto con relación a los valores detectados en Argentina (26,9 %) y en México (25 %) por (Bellinzoni y col 1.990; Maldonado-Camargo y col 1.998) pero es comparable al 70,5 % observado por Gorman y col (1.989) en Chile.

Si bien, la excreción de ooquistes de *Cryptosporidium*, ha sido detectada en becerros de 2 días de nacidos (Moore y col 1.991), diversos autores coinciden en señalar que esta es más frecuente alrededor de la segunda semana de vida (Anderson, 1.981; Atwill y col 1.999; De la Fuente y col 1.999; Garber 1.994; Maldonado-Camargo y col 1.998; Uga y col 2.000; Xiao y col 1.994), lo cual concuerda con los resultados de presente trabajo. En este, el 100 % de los becerros entre 8 y 14 días excretaron ooquistes del parásito y dicha proporción se mantuvo todavía alta (87,5 %) en los animales de 15 a 21 días de edad. Los referidos porcentajes fueron superiores a los reportados en el estado Zulia por Valera y col (2.001) quienes indican 57,1 y 76,9 % para becerros de 2 y 3 semanas respectivamente.

Los ooquistes fueron detectados en becerros de 4 días de nacidos y entre los 4 a 7 días de edad el porcentaje fue de 57,1 %, lo que indica que la infección por *Cryptosporidium* ocurre poco tiempo después del nacimiento. En becerros experimentalmente infectados, el período prepatente de *Cryptosporidium parvum*, tiene una duración de 3 a 6 días (Fayer y col 2.000) y se estima que en infecciones naturales, este período está en el rango de 3 a 12 días. Por lo tanto, se asume que una gran proporción de becerros adquirieron la infección durante los 4 primeros días, correspondiente a su permanencia en el área de maternidad junto a sus madres y a otras vacas postparto. Esta práctica de manejo, unida a condiciones higiénico sanitarias deficientes de las áreas frecuentadas por los animales recién nacidos, pueden afectar el riesgo de infección y probablemente contribuyeron con la alta prevalencia de criptosporidiosis registrada en este trabajo.

Algunos autores señalan que las infecciones tempranas ocurre como consecuencia de la eliminación fecal de ooquistes por parte de vacas periparturientas, especialmente durante el período de parto (Faubert y col 2.000). Igualmente en el estado Trujillo, Venezuela, Ramírez y col. (2.002) indican que una alta proporción de las vacas al postparto excretaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Por lo tanto madres pueden desempeñar un rol importante como potencial fuente de infección.

Otro aspecto importante en la transmisión de la infección por *Cryptosporidium* y que favorece la diseminación del parásito entre los becerros evaluados, es el referido a las prácticas de manejo establecidas en la finca, en la cual, los animales de 3 a 4 días de edad son trasladados a jaulas individuales, sin tomar medidas de

higiene a pesar de su ocupación previa por otros becerros.

Por otra parte, los becerros excretan ooquistes durante un período relativamente corto, el cual oscila entre 1 a 12 días (Fayer y col 1.997], por lo tanto, es también conveniente discutir los resultados de prevalencia, teniendo en cuenta el número de muestras examinadas por animal. En este orden de ideas, al adoptar la prevalencia de período obtenida luego de repetidos exámenes, se encuentran que el 100 % de los becerros <30 días estaban infectados con *Cryptosporidium parvum*. Resultados similares fueron reportados por Uga y col (2000) quienes señalan excreción de ooquistes en el 93 % de los animales. Por el contrario, en el presente estudio solo fue examinada una muestra de cada animal, reflejando de esta forma una prevalencia de punto. Como el patrón de excreción de ooquistes es intermitente y de corta duración, pueden resultar falsos negativos cuando los animales son muestreados solamente una vez.

Diversos estudios revelan la importancia de *C. parvum*, como patógeno responsable de severos cuadros de diarrea neonatal de los becerros (De la Fuente y col 1.999; Heine y col 1.984; Moore y col 1.991; Uga y col 2.000). En el presente estudio se observó que la probabilidad de presentar diarrea entre los animales infectados por *Cryptosporidium* fue de 58,5 %; en comparación, la probabilidad de tener diarrea entre los becerros que no excretaron ooquistes fue solo de 5.4%. Resultados comparables fueron obtenidos en Japón por Uga y col (2.000), quienes observaron que los becerros infectados tenían una tasa de diarrea significativamente mayor (33 %) que los becerros no infectados (8 %). Otro trabajo llevado a cabo en California mostró que el 21%

de los animales que manifestaron signos de diarrea, excretaron ooquistes de *C. parvum*, mientras que solo el 2% de los no infectados, presentaron diarrea (Sobieh y col 1.987).

El hallazgo de ooquistes de *Cryptosporidium* en los becerros estudiados, aporta nueva evidencia sobre la distribución ubicua de este parásito. La aplicación de medidas higiénico-sanitarias que aseguren en la finca un ambiente con reducida contaminación, especialmente en las áreas frecuentadas por los neonatos, ayudarían a controlar la infección tanto por este, como por otros entero-patógenos que pueden exacerbar la cryptosporidiosis clínica.

CONCLUSIONES

- Existe un alto porcentaje (48,6 %) de infección por *Cryptosporidium* sp. en la población de becerros estudiados, ella es mayor en los animales del grupo etario $>7-\leq 14$ días.
- Los valores morfométricos de los ooquistes de *Cryptosporidium*. aislados de los becerros, sugieren que se está en presencia de ooquistes de la especie *Cryptosporidium parvum*.
- La presencia de *C. parvum*, en este rebaño estuvo asociada a los cuadros de diarrea, la cual fue once veces mayor en los becerros que excretaban ooquistes de *C. parvum* en comparación con los que fueron diagnosticados negativos.
- Las practicas de manejo establecidas en la finca, pueden ser un factor que favorezca la diseminación del parásito y la infección temprana, antes de los 15 días, de los becerros.

RECOMENDACIONES

- Desinfectar más frecuentemente y cambiar el sitio de las jaulas antes de introducir nuevos animales en la becarrera.
- Evitar la presencia de otros animales (perros, aves) en la zona de las becarreras. Limpieza y desinfección más frecuente del área de maternidad.
- Realizar diagnósticos rutinarios para detectar el parásito en el área de la becarrera y maternidad, para así tomar las medidas preventivas y de manejo más convenientes.
- Promover la divulgación y entrenamiento a los Médicos Veterinarios sobre este aspecto que permitan detectar este protozooario como patógeno involucrado en los problemas de diarreas en becerros neonatos.
- Realizar trabajos de investigaciones similares que permitan determinar la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en la población bovina del estado y del país y su implicación en la producción animal
- Llevar a cabo estudios moleculares para determinar las especies de *Cryptosporidium* spp. aisladas en el estado Trujillo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Anderson, B.C. 1981. Patterns o shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. 78:982-984.
- [2] Anderson, B.C. 1991. Prevalence of *Cryptosporidium muris*-like oocysts among cattle populations of the Unites States: preliminary report. J. Protozool. 38:4S-15S.
- [3] Arrowood, M.J. 1997. Diagnosis. 64 pp. In R. Fayer (ed) *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton.
- [4] Atwill, E.R., Johnson, E., Klingborg, D.J., Vesperat, G.M., Markegard, G., Jensen, W.A., Pratt, D. W., Delmas, R.E., George, H.A., Forero, L.C., Philips, R.L., Barry, S.J., McDougald, N.K., Gildersleeve, R.R., Frost, W.E. 1999. Age, geographic, and temporal distribution of fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cow- calf herds. Am. J. Vet. Res. 60: 420-425.
- [5] Bednarska M, Bajer A, sinski E. 1998. Calves as a potential reservoir of *Cryptosporidium paruum* and *Giardia* Sp. Ann Agric En viron Med 5: 135-138.
- [6] Bellinzoni RC, Blackhall J, Terzolo HR, Moreira AR, Auza N, Mattion N, Micheo GL, La Torre JL, Scodeller EA.1990. Microbiology of diarrhoea in young beef and dairy calves in Argentina. Rev Argent Microbiol 22: 130-6.
- [7] Castro- Hermida, J.A.,Gonzales - Losada YA, Mezo- Menendez M, Ares - Mazas E.2002. A Study of Cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. Vet parasitol 30; 106-11-7.
- [8] Current, W.L. 1985. Cryptosporidiosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 187:1334-1338.
- [9] Current, W.L., Resse, N.C. 1986. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. J. Protozool. 33:98-108.
- [10] Chirinos,Y., Castejón. O.C., Ruíz, H., Rojas, V., Salcedo,P. 1997. Primer aislado e identificación en Venezuela de *Cryptosporidium parvum* en becerros. Acta Científica Venezolana. 48 (Supl. 1):181.
- [11] De la Fuente, R., Luzón, M., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., García, A., Cid, D., Orden, J.A., García, S., Sanz, R., Gómez-Bautista, M. 1999. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enterophatogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. Vet. Parasitol. 80:179-185.
- [12] Díaz de Ramírez, A., Ramírez-Iglesia, L.N., Godoy de Plaza, R.M., Roman, R. Excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. durante el posparto, en vacas mestizas de doble propósito.2002. Revista Científica 12(Supl. 2):614-616.
- [13] Esteban, E., Arderson, B.C. 1995. *Cryptosporidium muris*: prevalence, persistency, and detrimental effect on milk

- production in a drylot dairy. J. Dairy Sci., 78:1068- 1072.
- [14] Faubert, G.M., Litvinsky, Y. 2000. Natural transmission of *Cryptosporidium parvum* between dams and calves on a dairy farm. J. Parasitol. 86:495-500.
- [15] Fayer, R., Trout, J.M., Graczyk, T.K., Lewis, E.J. 2000. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on three Maryland farms. Vet Parasitol. 93:103-112.
- [16] Fayer, R., Speer, C.A., Dubey, J.P. 1997. The general biology of *Cryptosporidium*. 41pp. In R. Fayer (ed) *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton.
- [17] Garber, L.P., Salman, M.D., Hurd, H.S., Keefe, T., Schlater, J.L. 1994. Potential risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. JAVMA 205:86-91.
- [18] Garcia, A.M., Lima, J.D. 1993. Frequência de *Cryptosporidium* en becerros lactantes de rebanho leiteiro de Minas Gerais. Arquivo Bras. Med. Vet. Zoot 45: 193-198.
- [19] Gorman, T., Alcaino, H., Santelices, J. 1989. *Cryptosporidium* y otras coccidias intestinales en terneros de lechería, Región Metropolitana. Chile. Arch. Med. Vet. 21:29-34.
- [20] Heine, J., Pohlenz, J.F., Moon, H.W., Woode, G.N. 1984. Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. J. Infect Dis. 150:768-775.
- [21] Kuczynska, E., Shelton, D.R. 1999. Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures and soils. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2820-2826.
- [22] Lefay, D Naciri, M Poirier P , Chermette R. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in calves in France. Vet. Parasitol. 89: 1- 9. 2000.
- [23] Lindsay, D.S., Upton, S.J., Owens, D.S., Morgan, U.M., Mead, J.R., Blagburn, B.L. 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. J. Eukaryot Microbiol. 47: 91-95.
- [24] 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 Mexico. Prev. Vet. Med. 36:95-107.
- [25] Mann, E.D., Sekla, L.H., Nayar, G.P.S., Koschik, C. 1986. Infection with *Cryptosporidium* spp. in humans and cattle in Manitoba. Can. J. Vet. Res. 50:174-178.

- [26] Meisel, J. L., D. R. Perera, C. Meligro C. E. Rubin. 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 70: 1156 - 1160.
- [27] Mohammed, H.O, Wade, S.E, Schaaf, S. 1999. Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in dairy cattle in southeastern New York State. *Vet. Parasitol.* 83:1-13.
- [28] Moore, D.A., Zeman, D.H. 1991. Cryptosporidiosis in neonatal calves: 277 cases (1986-1987). *JAVMA* 198: 1969-1971.
- [29] Naciri, M., Lefay M.P., Mancassola, R., Poirier, P., Chermette, R. 1999. Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France. *Vet. Parasitol.* 85: 245 - 257.
- [30] Nime, F.A., J.D. Burek, K.L. Page, M. A. Holscher J.H. Yardley. 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70: 592 - 598.
- [31] O'Donoghue, P. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. 1995. *Int. J. Parasitol.* 25:139-195
- [32] Ongerth JE, Stibbs HH. 1989. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in dairy calves in western Washington. *Am J Vet Res.* 50: 1069 - 1070.
- [33] Panciera, R.J., Thomassen, R.W., Garner, F.M. 1971. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.* 8: 479-484.
- [34] Pavlasek, I. 1995.. Cryptosporidia and other endoparasites in heifers imported in the Czech Republic. *Vet. Med (Praha).* 40: 333-336.
- [35] Reynolds, D.J., Morgan, J.H., Chanter, N., Jones, P.W., Bridger, J.C., Debney, T.G., Bunch, K.L. 1986. Microbiology of calf diarrhoea in southern Britain. *Vet. Rec.* 119: 34-39.
- [36] Sobieh, M., Tacal, J.V., Wickler, B.W., Lawrence, W., El-Ahraf, A. 1987. Investigation of cryptosporidial infection in calves in San Bernardino county, California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 191: 816-818.
- [37] Statistical Analysis System Institute. SAS/STAT User's Guide, Fourth Edition, Volume 2, Cary, NC (version 6) 1989.
- [38] Surumay V. , Q. y Pote, L. 1999. Infecciones Concurrentes de *Cryptosporidium* Y *Giardia* en fincas lecheras del Estado de Misissippi, USA. *Venezuela Revista Científica, FCV - LUZ.* 6 : 519 - 523
- [39] Surumay, Q., Alfaro, C. 1999. *Cryptosporidium* spp en bovinos jóvenes de fincas lecheras de la región oriental de Venezuela (Resumen). En IV Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. VII Congreso SOVVEC. Mayo 17-21. Maracaibo,

estado Zulia, Venezuela. 222 pp.

- [40] Tzipori, S. The aetiology and diagnosis of calf diarrhoea. 1981. Vet. Rec. 108:510-514.
- [41] Uga, S., Matsuo, J., Kono, E., Kimura, K., Inoue, M., Rai, S.K., Ono, K. 2000. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection and pattern of oocysts shedding in calves in Japan. Vet. Parasitol. 94: 27 - 32.
- [42] Valera, Z., Quintero, W., Villarroel, R., Hernández, H. 2001. *Cryptosporidium* Sp. en becerros neonatos de una finca del Municipio Rosario de Perijá, estado Zulia. Venezuela. Revista Científica, FCV-LUZ. 11: 213-218.
- [43] Wade S.E., Mohammed, H.O., Schaaf, S.L. 2000. Prevalence of *Giardia* sp., *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris* (*Cryptosporidium andersoni*) in 109 dairy herds in five counties of southeastern New York. Vet. Parasitol. 93:1-11.
- [44] Xiao, L., Herd, R.P. 1994. Infection patterns of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. Vet. Parasitol.55:257-262.