

**EXCRECIÓN DE OOQUISTES DE *Cryptosporidium* sp. EN BECERROS
DE UNA FINCA DOBLE PROPÓSITO**
Hernández Salas, Olga Carolina



**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 FINCA DOBLE PROPÓSITO**

TUTOR ACADEMICO

PROF: ADELINA DÍAZ DE RAMÍREZ

BACHILLER:

OLGA C. HERNÁNDEZ SALAS

TRUJILLO; JUNIO 2003

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
NÚCLEO UNIVERSITARIO
"RAFAEL RANGEL"
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

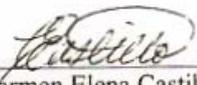
ACTA DE EVALUACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

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 Doble Propósito**", presentado por la Bachiller **Olga Carolina Hernández S.**, CI: 14.556.787, 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 diecinueve días del mes de junio del dos mil tres.


Prof. Isaac Rodriguez
JURADO




Prof. Carmen Elena Castillo
JURADO


Prof. Adelina Diaz de Ramirez
TUTOR
COORDINADOR DEL JURADO

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso y la Virgen, por voluntad que me ha dado para superar tantos obstáculos y por representar el pilar más importante en el logro de mi hermosa carrera.

A mi padre **DANIEL** que esta en el cielo motivo de esperanza para seguir adelante en mi vida nunca olvidare la bondad, humildad y honestidad que resembraste en mí, yo se que compartes conmigo este triunfo " Te Amo"

A mi madre, **Migdalia** por ser fundamental en mi vida, ejemplo de amor y sacrificio quien me brindo en todo momento su comprensión, cariño y entusiasmos " Que dios te llene de Bendiciones"

A mis hermanos Daniel y Damarys espero que les sirva de ejemplo y gracias por compartir conmigo este momento "los quiero mucho."

A mi tía Lucía por estar conmigo en los momentos más difíciles gracias por aparecer en mi camino. "Te quiero"

A todos mis tíos (as) que de una u otra forma me dieron sus consejos y me apoyaron... Gracias por creer en Mí.

A todos mis familiares por el apoyo que me dedicaron cuando yo los necesite.

A todos mis Compañeros de estudio Lorena, Daxcely, Jormaryury, Deliana, Maira, Douyels, Gustavo, José Luis, Carlos, Leonar, Alejandro, Rosalino, Arturo, muy especialmente a Noraima quién fuiste para mi más que una amiga mi hermana te quiero, que de una u otra forma depositaron en mí un símbolo de solidaridad permanente, les doy gracias.

A mis amigos (as): Migdalis, Antonio, Orellys, Lourde, Leonel, Juaquien, Maria, Maryori, Yackelin, Luz Marina, José Luis, José Gregorio, Mary, Alba, gracias por su apoyo, amistad y por estar a mi lado, por

compartir alegrías y tristezas de mi vida que este triunfo le sirva de orgullo y ejemplo.

A todas aquellas personas que con un granito de arena colaboraron para este éxito. Gracias.

OLGA

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mis mas sinceros agradecimiento a:

A la Ilustre Universidad de los Andes extensión Trujillo por capacitarme como profesional en la mención " Técnico Superior Pecuaria."

A la Profesora **Adelina Díaz de Ramírez**, por su valioso aporte como Tutora quien con su gran amor vocacional, me entregó sus conocimientos haciendo posible esta meta, mis mejores deseos de todo corazón.

Al Laboratorio de Investigación en Fisiología e Inmunología (**LIFI**) por su colaboración durante mis pasantía y por prestarme todos los servicios.

A los Técnicos **José Gregorio y Mary** quien durante el periodo de pasantías de manera incondicional me ayudaron y me orientaron a la aplicación de los instrumentos, mi gran admiración y respecto los recordare siempre.

A los profesores **Lilido Ramírez, Mario González y Rolando Rivas** quienes dieron su conocimiento sin ningún interés para poder lograr mi meta "les estaré siempre Agradecida"

Al señor **Fabio** por haber estado de acuerdo para recibirme en su finca para hacer mis respectivas pasantías, especialmente al **Dr. Antonio Velásquez** y a todos los de mas trabajadores por haberme ayudado en ese momento. "Gracias"

Al resto del personal del **NURR**, porque durante mi estadía se portaron como unos verdaderos amigos.

"Gracias"

OLGA

Olga Hernández, 2003; “EXCRECIÓN DE OOQUISTES DE *Cryptosporidium* sp. EN BECERROS DE UNA FINCA DOBLE PROPÓSITO” Universidad de los Andes – NURR. Trujillo - Estado, Trujillo. Tesis de grado para optar al Título de Técnico Superior Pecuaría.

RESUMEN

Se evaluó la presencia e intensidad de la infección de *Cryptosporidium* sp., así como su asociación con cuadros de diarrea en becerros de una finca ganadera de doble propósito ubicada en el Municipio San Miguel, estado Trujillo, Venezuela. Se colectaron muestras fecales de 76 becerros de ambos sexos, de 2 a 75 días de edad, las cuales fueron procesadas mediante la técnica de centrifugo-flotación con solución de NaCl y las preparaciones se colorearon con la técnica de carbol-fucsina. La excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* fue evaluada semicuantitativamente, determinándose los valores morfométricos a una magnificación de 1000X. Los resultados mostraron que 39,4% (30/76) de los becerros excretaron ooquistes de *Cryptosporidium* sp., cuyas dimensiones fueron la siguientes: Largo $x \pm DE = 4,34 \pm 0,48$ (Mínimo-Máximo = 4,0- 5,5); Ancho $x \pm DE = 4,11 \pm 0,31$ (Mínimo-Máximo = 3,5 - 5,0); Índice de la forma (Largo / Ancho) $x \pm DE = 1,06 \pm 0,10$ (Mínimo-Máximo = 0,89 - 1,38); Número de ooquistes medidos = 138. La presencia de ooquistes se apreció a partir de los 3 días de edad de los becerros y la mayor prevalencia correspondió al grupo etario $>15-\leq 30$ (70,5 %), observándose una asociación significativa ($P < 0,05$) entre la presencia de parásito y la edad. En cuanto al sexo no hubo diferencias significativas. El 35,5 % de las muestras fueron diarreicas, encontrándose una asociación significativa entre la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* sp. y diarrea ($P < 0,05$).

Palabras clave: *Cryptosporidium*, En Becerros Ganadería Doble Propósito.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Dedicatoria.....	97
Agradecimiento.....	97
Resumen.....	98
Índice de contenidos.....	98
Índice de tablas.....	99
Índice de figuras.....	99
1.-Introducción.....	99
1.1-Planteamiento del problema.....	99
1.2.-Justificación.....	101
1.3.-Objetivos.....	102
2.- Materiales y métodos.....	102
2.1- Área estudiada y unidad de producción.....	102
2.2.-Animales.....	103
2.3.-Colecta de las muestras	103
2.4.-Diagnostico parasitológico.....	103
2.5.-Método de Centrifugo-flotación en Cloruro de Sodio.....	103
2.6.-Coloración de Carbol - Fucsina.....	104
2.7.-Análisis Estadístico.....	104
3.- Resultados.....	105
4.- Discusión	108
Conclusiones.....	110
Recomendaciones.....	110
Referencias Bibliográficas.....	111

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I. Prevalencia de la infección por *Cryptosporidium* en becerros distribuidos en grupos etarios, en una finca de doble propósito..... 105

TABLA II. Distribución porcentual de becerros según la edad y de acuerdo al recuento semi-cuantitativo de ooquistes de *Cryptosporidium* expresados en rangos..... 107

TABLA III. Relación entre diarrea e infección con *Cryptosporidium* según la edad de los becerros.....108

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Distribución porcentual de los becerros según la intensidad de la infección determinada semi-cuantitativamente y expresada en rangos..... 106

FIGURA 2. Relación entre infección por *Cryptosporidium* y diarrea en becerros de doble propósito..... 107

1. INTRODUCCIÓN

La Cryptosporidiosis es una infección ocasionada por parásitos protozoarios del género *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidae) que invaden las células epiteliales, en especial del tracto digestivo de un amplia gama de vertebrados (Fayer y col.,1997). Actualmente, se reconoce que los miembros de este género infectan a numerosas especies de mamíferos incluyendo humanos, animales domésticos y silvestres (Fayer y col., 1997).

A pesar que estos organismos fueron descubiertos a comienzos del siglo XX, su impacto en la salud animal sólo fue reconocido a partir de 1971, cuando se realiza el primer reporte de un caso de criptosporidiosis en un becerro de 8 meses de edad que padecía diarrea crónica (Panciera y col.,1971).

1.1-Planteamiento del problema

La mayoría de los datos sobre la incidencia de la infección en los animales domésticos, están referidos al ganado bovino. En estos animales, han sido reconocidas dos especies de *Cryptosporidium*: *Cryptosporidium parvum* Tyzer 1912 y *Cryptosporidium andersoni* n. sp., (sin. *Cryptosporidium. muris*, tipo bovino o *C. muris*-simil) (Lindsay y col.,2000).

Durante varios años, *C. andersoni* fue conocida como *C. muris*, por la semejanza morfológica que presentan los ooquistes de ambas especies. Sin embargo, estudios morfométricos, de transmisión experimental y análisis moleculares (Koudela y col., 1998; Morgan y col., 2000) mostraron que los ooquistes que infecta a los bovinos son biológica y genéticamente

diferentes a los de *C. muris* originalmente descrita en ratones de laboratorio. Sobre la base de estos datos y de investigaciones adicionales de transmisión cruzada, se ha planteado que los ooquistes semejantes a *C. muris* observados en los bovinos, sean considerados como una especie diferente, proponiendo para este organismo el nombre de *C. andersoni* n. sp. (Lindsay y col., 2000).

Dicha especie se desarrolla en las células epiteliales del abomaso, principalmente de bovinos adultos (Lindsay y col., 2000). Aunque se estima que no causa enfermedad clínica, demoraría la formación de ácidos, retardando la digestión de proteínas en el abomaso y trayendo como consecuencia, una reducción significativa de la producción láctea (Esteban y Anderson, 1995)

Cryptosporidium parvum, la otra especie que infecta a los bovinos, es la causa más común de criptosporidiosis aguda en los becerros. Este organismo ha emergido como un enteropatógeno prevalente, asociado con frecuencia con el síndrome de la diarrea neonatal de los becerros (de la Fuente y col., 1999; Moore y Zeman, 1991; Naciri y col., 1999; Reynolds y col., 1986; Uga y col., 2001). La infección en estos animales, ha sido detectada prácticamente en todos los países en los que se ha investigado y el gran número de trabajos publicados en los últimos años sobre infecciones en rebaños o estudios epidemiológicos (Atwill y col., 1999; de la Fuente y col., 1999; Garber y col., 1994; Lefay y col., 2000; Maldonado-Camargo y col., 1998; Moore y Zeman., 1991; Valera y col., 2001; Surumay y Alfaro., 1999; Uga y col., 2001; Wade y col., 2000) confirman el interés de la criptosporidiosis bovina.

C. parvum habita en el epitelio de la mucosa del intestino delgado en donde ocurre tanto la reproducción sexual como la asexual, cuyo resultado es la producción de ooquistes que son excretados con las heces (Current y Resse, 1986). La infección se establece después de la ingestión de estas formas y la ruta más común está en estrecho contacto con las heces de los becerros clínicamente afectados o de portadores inaparentes o asintomáticos.

Aunque se observa una gran variedad de signos clínicos, el más común es la diarrea pudiendo ser moderada e intermitente en algunos casos, pero usualmente es profusa y acuosa, con presencia frecuente de mucus, a veces teñida de sangre y con una duración de 2 a 14 días. El cuadro de diarrea puede estar acompañado de anorexia, deshidratación, pérdida de peso, depresión y fiebre (Heine y col., 1984). Algunos animales mueren, pero otros pueden recuperarse espontáneamente.

Los becerros neonatos son particularmente susceptibles a la infección por *C. parvum*, y si bien, el parásito ha sido observado a partir de los días de nacidos.

(Moore y Zeman, 1991), diversos autores coinciden en señalar que la mayor prevalencia ocurre alrededor de las dos semanas de edad (de la Fuente y col., 1999; Garber y col., 1994; Maldonado-Camargo y col., 1998; Uga y col., 2000), período en el cual son más frecuentes las manifestaciones clínicas. Por el contrario, en becerros mayores de un mes, las tasas de excreción de ooquistes de *C. parvum* disminuye sensiblemente (Garber y col., 1994), y la infección generalmente cursa de forma subclínica. No obstante, dichos animales pueden ser fuentes potenciales del parásito.

Se reconoce a *C. parvum* como uno de los principales agentes etiológicos de la diarrea neonatal de los becerros, en tal sentido, estudios experimentales y de campo, revelan la importancia de este organismo como patógeno primario, causante de severos cuadros de diarrea en neonatos (de la Fuente y col.,1999; Heine y col.,1984; Moore y Zeman.,1991; Uga y col.,2000) o en asociación con rotavirus, coronavirus, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* y otros (Bellinzoni y col.,1990; de la Fuente y col.,1999; Moore y Zeman,1991; Naciri y col.,1999; Pérez y col.,1998; Reynolds y col.,1986).

Aunque hasta el momento no se conocen con exactitud las fuentes de infección, se presume que los animales de explotación pecuaria pueden ser importantes fuentes para la contaminación ambiental y si bien, diversas especies de importancia zootécnica son susceptibles a la infección por *C. parvum* y eliminan ooquistes esporulados, se considera que los bovinos presentan el mayor riesgo debido a su número, distribución, incidencia de la infección y altos niveles de excreción de ooquistes. En tal sentido, son numerosos los reportes que indican altas tasas de infección de *C. parvum* en los becerros neonatos (de la Fuente y col.,1999; Naciri y col., 1999; Uga y col.,2000; Ongert y Stibb.,1989; Valera y col., 2001) y estudios de infecciones naturales y experimentales señalan que los becerros con diarrea pueden excretar entre $10(5)$ a $10(7)$ ooquistes por gramo de heces.

Por otra parte, la excreción de ooquistes dura entre 1 a 13 días con una media de 7 días; considerando la cantidad media de ooquistes eliminados durante este período y el de heces producidas diariamente, se estima que un becerro puede eliminar alrededor de 6×10^{11} ooquistes durante su primer mes de vida (Uga y col.,

2000). De acuerdo a lo señalado, es indudable que estos animales desempeñan un papel importante en la diseminación del parásito hacia otros animales y el hombre.

1.2.-Justificación

La mayoría de los estudios sobre criptosporidiosis bovina han sido conducidos en ganado lechero (Bellinzoni y col.1990; de la Fuente y col., 1999; Garber y col.,1994; Lefay y col., 2000; Maldonado-Camargo y col., 1998; Naciri y col.,1999; Ongert y Stibb, 1989; Surumay y Alfaro, 1999;Uga y col.,2000; Valera y col.,2001),en comparación, son relativamente escasos los reportes en bovinos de carne (Bellinzoni y col., 1990; Pérez y col., 1998; Atwill y col., 1999; Bendali y col.,1999; Kaminyolo y col.,1993) y la investigación es aún incipiente, en los de doble propósito (Díaz de Ramírez y col., 2002; Valera y col., 2001).

En Venezuela, existe poca información publicada sobre criptosporidiosis bovina. En 1997, se señala por primera vez el aislamiento e identificación de *C. parvum* en becerros de explotaciones ganaderas del estado Falcón (Chirinos y col.,1997) y más recientemente se ha reportado la presencia del parásito en becerros de fincas lecheras del estado Monagas (Surumay y Alfaro, 1999) y de ganadería doble propósito del estado Zulia (Varela y col., 2001).

Un estudio 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 2002) y aunque en su mayoría los recuentos fueron bajos, no se desestima el potencial de riesgo que dichos animales representan para los becerros. Por otra parte, se sospecha que las infecciones

por *C. parvum* puedan estar ocasionando problemas entéricos a nivel de fincas, ya que las diarreas neonatales son observadas con relativa frecuencia en los becerros y las mismas son resistentes a los tratamiento convencionales con antibióticos o con coccidiostáticos.

Un mayor conocimiento de la frecuencia y del curso de la infección de la criptosporidiosis bovina 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, la contaminación ambiental y el riesgo para la salud animal y humana.

1.3.-Objetivos: Este estudio tiene como objetivos 1.- Determinar la prevalencia de criptosporidiosis en becerros de una explotación de ganadería doble propósito 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 los becerros.

2.-MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.-Área estudiada y unidad de producción: El trabajo se realizó en una finca comercial ubicada en Arapuey, municipio San Miguel del estado Trujillo, en una zona de vida de Bosque Seco Tropical, entre las coordenadas 9°17' de Latitud Norte y 70°55' de Latitud Oeste y a una altura de 1 a 100 msnm.

La finca desarrolla un sistema de explotación de ganadería de doble propósito. Las vacas, durante el último mes de gestación, son alojadas en el corral de maternidad donde se mantienen entre 10 a 15 días después del parto, junto con los becerros. Estos, al finalizar dicho período son trasladados a becerrerías



Excreción de ooquistes de Cryptosporidium sp. en becerros de una finca doble propósito

colectivas y el sistema de crianza de los becerros se caracteriza por recibir leche hasta los 7 meses, de uno o dos pezones durante el apoyo, después toman el residuo dejado en el ordeño y se les administra melaza con sal. Pastorean separados de las vacas; no se suplementan y todos los becerros hasta el destete comparten el potrero, practicándose la rotación de los mismos.

En las áreas frecuentadas por los becerros, la higiene incluye recolección semanal de las heces (corral de maternidad) y el lavado diario con agua de vaquera de ordeño, de los comederos y bebederos, los cuales son luego tratados con desinfectantes.

2.2-Animales: Se tomo al azar muestras de un lote de 76 becerros (machos y hembras), mestizos *Bos taurus*, de la raza Carora (n=37) y Pardo Suizo y *Bos indicus* de la raza Brahman (n=39) con edades comprendidas entre 2 y 75 días.

2.3.-Colecta de las muestras: Por cada becerro se colectó una muestra fecal mediante estimulación rectal, evitando el contacto de éstas con el suelo, utilizando para ello, guantes quirúrgicos y bolsas de polietileno rotuladas con el número del animal y fecha del muestreo. Se registró la consistencia de las heces de manera que fueron clasificadas en diarreicas las líquidas y semilíquida y en normal las heces formadas o pastosas.

Las muestras ya identificadas fueron transportadas en cavas con hielo al Laboratorio de Investigación en Fisiología e Inmunología del Núcleo Universitario Rafael Rangel, para su procesamiento dentro de cuatro horas después de la colecta.

2.4.-Diagnostico parasitológico: Para la detección y cuantificación de los ooquistes de *Cryptosporidium* se emplearon muestras de heces frescas las cuales fueron procesadas por un método de concentración asociado al de coloración con carbol-fucsina. El primero permite separar los ooquistes de los detritos fecales, incrementando de esta forma, la posibilidad de detección del organismo y es descrito a continuación.

2.5.-Método de Centrifugo-flotación en Cloruro de Sodio: Para su ejecución fueron homogenizadas mediante agitación con una varilla de vidrio 2 a 3 gramos de heces con 45 ml de agua destilada. La suspensión resultante fue filtrada a través de varios coladores de malla fina y trozos de gasa y fue centrifugada en tubos de polipropileno de 50 ml, aforados con agua destilada hasta 45 ml, luego se procedió a centrifugar a 500 x g por 10 minutos. Al terminar el paso señalado se descarta el sobrenadante y al sedimento se le adiciona agua destilada y se repite el proceso de centrifugación con la finalidad de reducir la cantidad de detritos. Una vez lavada las muestras, al sedimento resultante se le adicionaron 45 ml de la solución de flotación (cloruro de sodio: 360g/litros de agua destilada) procediéndose a su centrifugación a 500 x g durante 10 minutos.

Del sobrenadante de cada muestra se colecta 5 ml que fueron transferidos a tubos de 50 ml, los cuales se aforaron con 40 ml de agua destilada. La preparación fue nuevamente centrifugada a 500 x g durante 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 tubo Eppendorf de 1 ml a 1.500 x g por 3 minutos y

el sedimento final fue resuspendido en 100 µl 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 tamaño y el índice de la forma de los ooquistes de *Cryptosporidium* y las segundas para la determinación semicuantitativa de los mismos. Las preparaciones se colorearon con la técnica de tinción carbol- fucsina (Arrowood, 1997) descrito a continuación:

2.6.-Coloración de Carbol- Fucsina. Una vez realizadas las preparaciones, estas se secan a 60 ° C , se fijan con metanol durante 30 segundos, y se cubren con carbol fucsina por 1 minuto. Luego se lavan ligeramente con agua destilada, secadas y cubiertas con una solución de ácido sulfúrico al 10 % en etanol, durante 2 minutos. Transcurrido ese tiempo se procede a lavar con agua destilada y una vez secadas se cubren con verde de malaquita por 2 minutos. Por ultimo se lava con agua destilada, se secan y se examina bajo el microscopio óptico, usando inicialmente objetivo de menor aumento (400x) y luego el objetivo de inmersión en aceite (1.000x).

El nivel de ooquistes excretados fue determinado en forma senicuantitativa y de acuerdo al número medio ooquistes por campo, las preparaciones fueron clasificadas en algunos de los siguientes rangos: 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 considerará el numero medio de

ooquistes contados en 50 campos microscópicos, aleatoriamente seleccionados (1000x).

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. Fue considerada como variable dependiente 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 calcularon las dimensiones medias del largo, ancho e índice de la forma de los ooquistes aislados.

3.-RESULTADOS

Del total de muestras examinadas a través de la técnica de coloración de carbol-fucsina, el 39,4 % (30/76) presentaron formas identificadas como ooquistes de *Cryptosporidium* sp. En las preparaciones, los ooquistes fueron observados como estructuras esféricas o ligeramente ovoides, teñidos de color rojo o de rosado intenso sobre un fondo azul verdoso. En ocasiones, la coloración puede ser variable, observándose ooquistes poco o parcialmente teñidos y en algunos casos, se pueden apreciar esporozoitos dentro de los ooquistes, de tal forma que estos son excretados totalmente esporulados.

Las dimensiones de los ooquistes fueron las siguientes: Largo $\bar{x} \pm DE = 4,34 \pm 0,48$ (Mínimo-Máximo = 4,0- 5,5); Ancho $\bar{x} \pm DE = 4,11 \pm 0,31$ (Mínimo-Máximo = 3,5 - 5,0); Índice de la forma (Largo / Ancho) $\bar{x} \pm DE = 1,06 \pm 0,10$ (Mínimo-Máximo = 0,89 - 1,38); Número de ooquistes medidos = 138.

La TABLA I muestra la prevalencia de la infección por *Cryptosporidium* sp. según la edad de los animales, apreciándose que el 31 % de los becerros ≤ 15 días, excretaron ooquistes de dicho parásito. La mayor proporción de animales positivos ocurre en el grupo etario $>15-\leq 30$ días con 70,5 %, mientras que la prevalencia se reduce considerablemente en los animales mayores de 30 días, en los cuales el porcentaje de infección fue de 37,5 y 21,4 % para los grupos etarios $>30-\leq 45$ y >45 días, respectivamente (TABLA I). 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.

De las 76 muestras evaluadas 42 (55,2%) fueron obtenidas de hembras. De estas, el 38.1% (16/42) resultaron positivas, mientras que de las 34 muestras obtenidas de machos el 38,2% (13/34) presentaron ooquistes de *Cryptosporidium* sp. No se observó asociación significativa entre el sexo de los animales y la infección por dicho parásito.

Tabla I.- PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR *Cryptosporidium* EN BECERROS DISTRIBUIDOS EN GRUPOS ETARIOS, EN UNA FINCA DE DOBLE PROPÓSITO.

Edad en Días	N° de becerros examinados	Positivos a <i>Cryptosporidium</i>	
		N°	%
≤ 15	29	9	31,0
$>15-\leq 30$	17	12	70,5
$>30-\leq 45$	16	6	37,5
>45	14	3	21,4
TOTAL	76	30	39,4

En la FIGURA 1 se observa que en la mayoría de los becerros cuyas muestras resultaron positivas, la intensidad de la infección fue baja. Esta representa una estimación del número de ooquistes excretados, lo cual fue evaluado semi-cuantitativamente y expresado en rangos según el número de ooquistes por campo. De esta manera, el 83,3% (25/30) de las muestras positivas fueron clasificadas dentro del rango 1, es decir, presentaron <1 ooquiste por campo microscópico. Solamente el 16,6% (5/30) de las muestras positivas se encontraron clasificadas dentro de los rangos 2, 3 y 4 ya que contenían de 1 a 5, 6 a 20 o más de 20 ooquistes por campo microscópico, respectivamente.

En la TABLA II se aprecia que el 33% de los becerros <15 días presentaron recuentos clasificados en los rangos >1, mientras que el 9.4% y el 16.7% de los animales de los grupos etarios 15-≤30 y >30-≤45 respectivamente entraron en dicha clasificación. Además, en todos los becerros > 45 días, la intensidad de la infección fue baja (rango=1).

El 35,5 % (27/76) de los becerros presentaron muestras diarreicas (liquidadas o semi- liquidadas) de estas, el 59,3 % (16/27) resultaron positivas a *Cryptosporidium* sp.

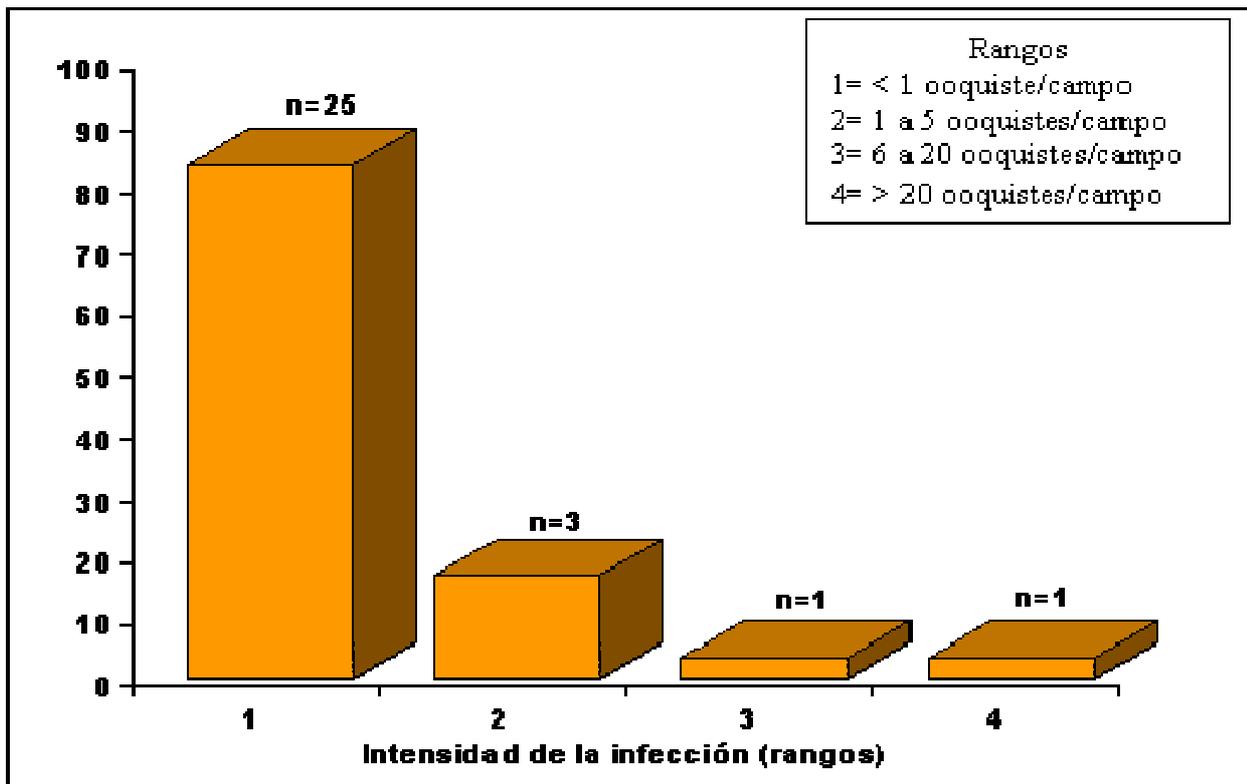


FIGURA 1. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LOS BECERROS SEGÚN LA INTENSIDAD DE LA INFECCIÓN DETERMINADA SEMI-CUANTITATIVAMENTE Y EXPRESADA EN RANGOS

Tabla II.- DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE BECERROS SEGÚN LA EDAD Y DE ACUERDO AL RECUENTO SEMI-CUANTITATIVO DE OOQUISTES DE *Cryptosporidium* EXPRESADOS EN RANGOS

Edad en días	N° de becerros (%)	
	Rango 1	Rango >1
≤15	6 (67,0)	3 (33,0)
>15-≤30	11 (91,6)	1 (9,4)
>30-≤45	5 (83,3)	1 (16,7)
>45	3 (100,0)	0 (0,0)

Cuando se analiza la relación entre excreción de ooquistes y presencia de diarrea, los resultados indican que existe una mayor probabilidad de manifestar cuadros de diarrea en los becerros infectados que en aquellos que no lo están.

En tal sentido en la FIGURA 2, se observa que la proporción de animales infectados con *Cryptosporidium* sp. y que padecían diarrea fue del 53,3% (16/30) mientras que de los animales no infectados sólo el 23,9% (11/46) presentaron heces diarreicas.

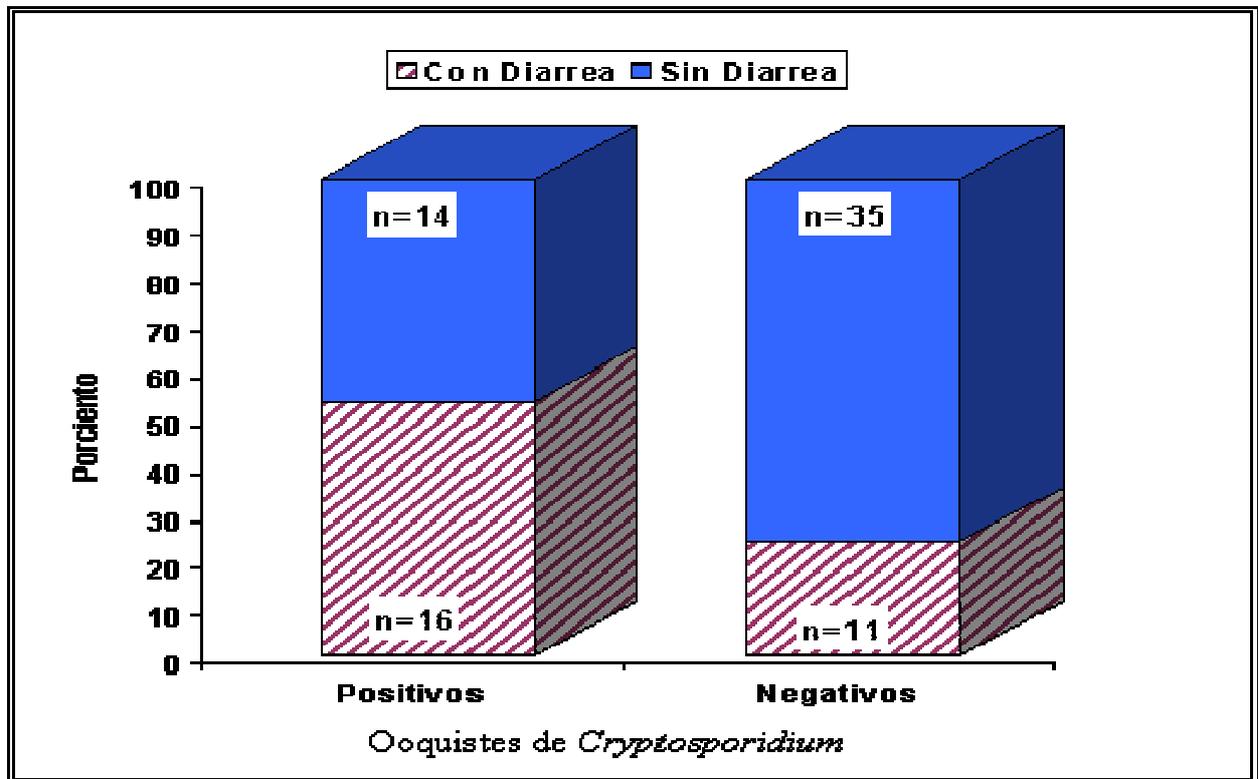


FIGURA 2 RELACIÓN ENTRE INFECCIÓN POR *Cryptosporidium* Y DIARREA EN BECERROS DE DOBLE PROPÓSITO

Tabla III.- RELACIÓN ENTRE DIARREA E INFECCIÓN CON *Cryptosporidium* SEGÙN LA EDAD DE LOS BECERROS

Edad en días	Becerras positivos	Positivos con diarrea N° (%)	Becerras de negativos	Negativos con diarrea N° (%)
≤15	9	8 (88,9)	20	4 (20,0)
>15-≤30	12	5 (41,7)	5	1 (20,0)
>30-≤45	6	2 (33,3)	10	5 (50,0)
> 45	3	1 (33,3)	11	1 (9,0)
TOTAL	30	16 (51,7)	46	11 (21,2)

Así, el riesgo de manifestar diarrea fue 2,2 [(16/30)/ (11/46)] veces mayor en los becerros que excretaron ooquistes que en los que no presentaron estas formas en las heces.

Cuando se analiza la relación entre diarrea e infección por *Cryptosporidium*, de acuerdo a la edad de los animales (TABLA III), los resultados indican que con excepción del grupo etario >30-≤45 días, la proporción de becerros con diarrea es mayor en los positivos que en los animales que no presentaron ooquistes en las heces. El mayor porcentaje de positivos con diarrea corresponde a los ≤ 15 días con 88,9 % seguido del grupo >15-≤30 días de edad con 41,7 % (TABLA III).

En el grupo etario ≤ 15 días se observó una asociación altamente significativa ($P<0.001$) entre la infección por *Cryptosporidium* sp. y la presencia de diarrea en los becerros.

4.-DISCUSIÓN

En el presente trabajo se detectó la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* sp. en becerros de una finca ganadera de doble propósito y aunque los antecedentes sobre el hallazgo del parásito en este tipo de explotación son muy escasos, la criptosporidiosis parece ser común en dicha ganadería. Los resultados encontrados indican que el 39,4 % de los becerros entre 2 a 75 días estaban infectados con *Cryptosporidium* sp.; el porcentaje de infección fue similar al observado en el estado de Washington, USA, (40,7 %) por Ongeth y Stibbs (1989) en becerros menores de 2 meses de edad, a pesar que en ese caso correspondía a una ganadería lechera y la mayoría de los animales tenían menos de 30 días de edad, los cuales son más susceptibles a la infección por *Cryptosporidium* (de la Fuente y col., 1999; Mohammed y col., 1999).

Por el contrario, la prevalencia resultó baja en

relación a otras obtenidas en Venezuela; en tal sentido Valera y col. (2001) reportan la infección en 50,8 % de los becerros de una finca de ganadería de doble propósito del estado Zulia. En dicha explotación, el sistema de manejo de los becerros era diferente al del presente trabajo, ya que incluía destete precoz, alimentación en forma artificial y alojamiento en jaulas individuales. Además, se evaluaron animales de hasta cuatro semanas de edad, resultando por lo tanto más susceptibles a la infección. Por ello, si en el presente trabajo se consideran sólo a los animales menores de 30 días, los resultados de prevalencia, serían comparables con los de Valera y col (2001). Es importante recalcar que numerosos factores, pueden influir en los resultados de prevalencia tales como la edad de los animales, el sistema de explotación y manejo, las prácticas de higiene, historia clínica del rebaño y el número de muestras examinadas por animal.

El porcentaje de infección por *Cryptosporidium* estuvo también por debajo del reportado por Díaz de Ramírez (2002) en becerros de una finca de doble propósito ubicada en el estado Trujillo, en la cual la tasa acumulativa de excreción de ooquistes fue del 100%, luego que los animales fueron examinados a lo largo de un determinado período de tiempo. En este sentido, se acepta que el número de muestras evaluadas por animal, pueden influir en los resultados, ya que, los becerros excretan ooquistes durante un período relativamente corto que oscila entre 1 a 12 días (Fayer y col. 1997). En este sentido, cuando se adopta la prevalencia de período resultante de exámenes repetitivos de heces, los porcentajes de infección pueden superar el 90 % (Uga y col., 2000; McCluskey y col., 1995). Por el contrario, cuando se evalúa una sola

muestra por animal como ocurrió en el presente trabajo, los resultados reflejan una prevalencia de punto. Esta puede ser considerablemente más baja debido a que el patrón de excreción de ooquistes es intermitente y de corta duración, pudiendo estar expresándose resultados falsos negativos.

Como el riesgo de excretar ooquistes de *Cryptosporidium* está estrechamente asociada con la edad de los animales, los resultados de prevalencia se analizan en función de la edad. Así, se observa que los ooquistes fueron detectados a partir del tercer día de nacidos coincidiendo con las observaciones de Díaz de Ramírez (2002) y entre esta edad y los 15 días la prevalencia alcanzó el 31 %. Estos resultados indican que los becerros comienzan a adquirir la infección en los primeros días de vida, tal vez por la presencia de ooquistes en el área de maternidad. En este estudio los animales más susceptibles corresponden al grupo >15-≤30 días, en los cuales el 70,5% estaba infectado. Dicho porcentaje es alto con relación al de los otros grupos etarios, por lo tanto los resultados coinciden con los de diversos autores que señalan que la mayor prevalencia ocurre en becerros menores de 30 días (De la Fuente y col., 1985; Mohammed y col., 1999; Quilez y col., 1996).

Algunos autores señalan que las infecciones tempranas obedecen a la eliminación de ooquistes por parte de bovinos adultos y consideran a las madres como una potencial fuente de infección (Díaz de Ramírez y col., 2002 ; Faubert y col. 2000; Naciri y col., 1999; Quilez y col., 1996). En este caso, los becerros examinados permanecieron con sus madres cerca de 15 días después del nacimiento. Posteriormente, en el momento del ordeño los animales se aglomeraban,

permitiendo de esta manera, el contacto directo entre becerros de diferentes edades y con las vacas.

Numerosos estudios señalan que *Cryptosporidium parvum* desempeña un papel importante como agente etiológico de la diarrea neonatal de los becerros (de la Fuente y col, 1999; Heine y col, 1984; Moore y col, 1991; Naciri y col.,1999; Uga y col., 2000). En el presente estudio se observó que la proporción de becerros con diarrea es mucho mayor (53,3 %) en los animales infectados por *Cryptosporidium*, que en los no infectados (23,9 %); de manera tal, que el riesgo de tener diarrea fue 2,2 veces mayor para los becerros que excretaron ooquistes que para los que no presentaron el parásito. Estos resultados son similares a los obtenidos en Francia por Naciri y col,1999, en donde el riesgo de presentar diarrea fue 2,5 veces mayor para los animales infectados comparados con los que no presentaban ooquistes. Resultados comparables fueron obtenidos en Inglaterra por Reynolds y col.(1986).

Además, se apreció que el mayor porcentaje de infectados con diarrea correspondió al grupo etario <15 días con 88,9%. demostrando que existe una asociación altamente significativa ($P<0.001$) entre la infección por *Cryptosporidium* sp. y la presencia de diarrea.

Por otro lado, si bien la criptosporidiosis bovina puede ser ocasionada por *C. parvum* o por *C. andersoni*, este último no es responsable de la diarrea en los neonatos y es encontrado con mayor frecuencia en bovinos adultos. Aunque no se puede excluir la posibilidad de que *C. andersoni* circule entre los animales de la región estudiada (Díaz de Ramírez y col.,2002) las dimensiones obtenidas de los ooquistes

están dentro los rangos reportados para *C. parvum* (Upton, 1999) lo que sugiere que se está en presencia de dicha especie de *Cryptosporidium*. Actualmente, sin embargo, la identificación de especies de dicho género se apoyan en técnicas morfológicas, moleculares y de especificidad del hospedador.

CONCLUSIONES

- √ El 39,4 % de los becerros de la población estudiada excretaron ooquistes de *Cryptosporidium* sp. aunque en su mayoría los recuentos fueron bajos.
- √ El mayor porcentaje de animales positivos (70,5 %) ocurrió en el grupo etario >15-≤30, mientras que en los animales mayores de 30 días la prevalencia se reduce considerablemente.
- √ El riesgo de manifestar diarrea fue 2,2 veces mayor en los becerros que excretaron ooquistes que en los que no presentaron estas formas en las heces, siendo que la mayor proporción de positivos con diarrea corresponde a los becerros ≤30 días de edad.
- √ Los estudios morfológicos de los ooquistes sugieren que entre los animales estudiados circula la especie *Cryptosporidium parvum*.

RECOMENDACIONES

- √ Realizar estudios similares a fin de determinar la prevalencia de *Cryptosporidium* y sus implicaciones en la producción animal. Así mismo, conducir estudios que permitan aportar datos más precisos para la identificación de las especies que circulan en e la población bovina de la región estudiada.

- √ Considerando que la infección por *Cryptosporidium* incrementa el riesgo de manifestar diarrea, se recomienda promover la divulgación y entrenamiento a los Médicos Veterinarios sobre aspectos que permitan detectar este protozooario como patógeno involucrado en la diarrea neonatal de los becerros.
- √ Realizar diagnóstico rutinario para identificar el parásito en las áreas frecuentadas por los becerros con el fin de implementar medidas de control y de manejo más convenientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Arrowood, M.J. 1997. Diagnosis. 64 pp. In R. Fayer (ed) *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. CRC Press, Boca Raton.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Bendali F, Bichet H, Schelcher F, Sanaa M. 1999. Pattern of diarrhoea in newborn beef calves in south - West france. Vet Res 30: 61-74.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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 enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. Vet. Parasitol. 80:179-185.
- 8) Díaz de Ramírez, A., Ramírez-Iglesia, L.N., Godoy de Plaza, R.M., Roman, R. 2002. Excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. durante el posparto, en vacas mestizas de doble propósito. Revista Científica 12(Supl. 2):614-616.
- 9) Díaz de Ramírez, Adelina.2002.*Cryptosporidiosis* en ganado bovino. En: Avances en la Ganadería de Doble Propósito. Carlos Gonzáles-Stagnaro, Eleazar Soto Belloso, Lílido Ramírez Iglesia (eds).Fundación GIRARZ. Ediciones Astro Data. S.A Maracaibo-Venezuela Cap. XII:179-190.
- 10) 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.
- 11) Faubert, G. M., Litvinsky, y. 2000. Natural transmission of *Cryptosporidium parvum* between dams and calves on a dairy farm. J. Parasitol. 86:495-500.

- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) Kaminyolo JS, Adesiyun AA, Loregnard R, Kitson - Piggottw. 1993. Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts in livestock in trinidad and tobago. Vet parasitol 45: 209- 13.
- 16) Koudela, B., Modry, D., Vitovec, J. 1998. Infectivity of *Cryptosporidium* muris isolated from cattle. Vet. Parasitol. 76: 181-188.
- 17) 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.
- 18) Lefay, D.; Naciri, M., Poirier, P., Chermette, R. 2000. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in calves in France. Vet. Parasitol. 89:1-9.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) McCluskey, B., J., Greiner, E., C., Donovan, G. A., 1995. Patterns of *Cryptosporidium* oocyst shedding in calves and a comparison of two diagnostic methods, Vet. Parasitol. 60,185-190.
- 22) 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.
- 23) Moore, D.A., Zeman, D.H. 1991. Cryptosporidiosis in neonatal calves: 277 cases (1986-1987). JAVMA 198: 1969-1971.
- 24) Morgan, U. M., Xiao, L., Monis, P., Sulaiman, I., Pavlasek, I., Blagburn, B.L., Olsen, M., Upton, S.J., Khramtsov, N.V., Lal, A., Elliot, A., Thompson, R. C. 2000. Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium muris* from various hosts. Parasitology 120:457-464.
- 25) 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.
- 26) Ongerth JE, Stibbs HH. 1989. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in dairy calves in western Washington. Am J Vet Res. 50: 1069 - 1070.
- 27) Panciera, R.J., Thomassen, R.W., Garner, F.M. 1971. *Cryptosporidial* infection in a calf. Vet. Pathol. 8: 479-484.
- 28) Pérez, E, Kummeling A, Janssen MM, Jimenez C, Alvarado R, Caballero M, Donado P, Dwinger RH. 1998. Infectious agents associated with diarrhoea of calves in the canton of tilaran, costa Rica. Prev. Vet.

- Med 33: 195 - 205.
- 29) Quilez, J., Sanchez – Aceto, C., del Cacho, E., Clavel, A., Causape, A.C., 1996. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragon (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* 66:139-146.
- 30) 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.
- 31) Statistical Analysis System Institute. SAS/STAT User's Guide, Fourth Edition, Volume 2, Cary, NC (version 6) 1989.
- 32) Steve J. Upton., 08 April 1999. Parasitology Laboratory, *Cryptosporidium* oocyst measurements, <http://www.ksu.edu/parasitology/measurements>, Consultado el 13-07-2001.
- 33) 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.
- 34) Tyzzer, E. E. 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv Protistenkd.*, 26: 394 - 418.
- 35) 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.
- 36) Upton, S. J., Current, W. L. 1985. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) infecting mammals. *J. Parasitol.* 71:625-629.
- 37) 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.
- 38) 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.