

Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:

Frecuencia de *Cryptosporidium* spp., en bovinos Holstein mediante la comparación de tres métodos diagnósticos

Frequency of *Cryptosporidium* spp., in Holstein cattle through three diagnostic methods

Authors/Autores: Huerta Magallanes, A.T., González Ruiz, S., Veyna Salazar, N.P., Cantó Alarcón, G.J. N., Bárcenas Reyes, I., Vera Ávila, H.R.

ID: e1643

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.11.e1643>

Received/Fecha de recepción: February 12th 2024

Accepted /Fecha de aceptación: August 07th 2024

Available online/Fecha de publicación: August 23th 2024

Please cite this article as/Como citar este artículo: Huerta Magallanes, A.T., González Ruiz, S., Veyna Salazar, N.P., Cantó Alarcón, G.J.N., Bárcenas Reyes, I., Vera Ávila, H.R. (2024). Frequency of *Cryptosporidium* spp., in Holstein cattle through three diagnostic methods. *Revista Bio Ciencias*, 11, e1643. <https://doi.org/10.15741/revbio.11.e1643>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Este archivo PDF es un manuscrito no editado que ha sido aceptado para publicación. Esto es parte de un servicio de Revista Bio Ciencias para proveer a los autores de una versión rápida del manuscrito. Sin embargo, el manuscrito ingresará a proceso de edición y corrección de estilo antes de publicar la versión final. Por favor note que la versión actual puede contener errores de forma.

Frecuencia de *Cryptosporidium* spp., en bovinos Holstein mediante la comparación de tres métodos diagnósticos

Frequency of *Cryptosporidium* spp., in Holstein cattle through three diagnostic methods

Cryptosporidium spp., en Holstein/

Cryptosporidium spp., in Holstein

Huerta Magallanes A.T. <https://orcid.org/0009-0001-9075-8119> , González Ruiz S. * <https://orcid.org/0000-0002-9463-1609> , Veyna Salazar N.P. <https://orcid.org/0009-0003-0968-1682> , Cantó Alarcón G.J. N. <https://orcid.org/0000-0001-7821-9916> , Bárcenas Reyes I. <https://orcid.org/0000-0001-8386-6560> , Vera Ávila H.R. <https://orcid.org/000-0002-2577-5836> 

Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. Av. De las Ciencias s/n; Juriquilla, Delegación Santa Rosa Jáuregui, C.P. 76230, Querétaro, Qro, México.

***Corresponding Author:**

[Sara González-Ruiz](mailto:sara.gonzalez@uaq.mx). Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. Av. de las Ciencias s/n; Juriquilla, Delegación Santa Rosa Jáuregui, C.P. 76230, Querétaro, Qro., México. Teléfono (442) 192 1200 ext. 5360. E-mail: sara.gonzalez@uaq.mx

RESUMEN

La criptosporidiosis es una enfermedad que afecta especialmente a los becerros, produciendo trastornos gastrointestinales agudos o crónicos, e incluso la muerte de los animales. Se considera una de las principales causas de diarrea en humanos debido a su carácter zoonótico. El diagnóstico de la enfermedad se realiza a través de la identificación de ooquistes por medio de métodos convencionales, sin embargo, existe una falta de información sobre el desempeño de estos en campo, por lo que el objetivo del presente estudio fue comparar distintos métodos diagnósticos convencionales para determinar el más sensible, práctico, económico y viable para los productores a fin de prevenir mayores tasas de morbilidad y mortalidad en los hatos, además de determinar la frecuencia de la enfermedad en ganado Holstein estableciendo un informe preliminar del parásito en el estado de Querétaro. Se compararon tres métodos diagnósticos: Tinción de Ziehl-Neelsen en frío, Tinción Safranina-Azul de Metileno y Flotación con Azúcar de Sheather. Los resultados indican que el mejor método de diagnóstico para la identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., en campo fue Ziehl-Neelsen en frío por su facilidad en desarrollo y a la sensibilidad mostrada. Se obtuvo una frecuencia total del 43.4 % indicando una alta prevalencia de la enfermedad, mientras que solo en los becerros fue del 63.4 %. Se determinó una asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre la presentación de diarrea y la detección de ooquistes, por lo que es importante establecer medidas de control y bioseguridad en las unidades de producción para disminuir la presencia de la enfermedad.

PALABRAS CLAVE:

Cryptosporidium spp., bovinos, diagnóstico, Ziehl-Neelsen, salud pública.

ABSTRACT

Cryptosporidiosis is a disease that affects calves, causing acute or chronic gastrointestinal disorders and death. It is also considered one of the main causes of diarrhea in humans. The diagnosis of this disease is made through the identification of oocysts by conventional methods; however, there is a lack of information about the performance of these methods in the field. Therefore, the objective of this study was to determine the most sensitive, practical, economical, and feasible conventional diagnostic method, as well as to determine the frequency of the disease in Holstein cattle, as a preliminary report of the parasite frequency in the State of Queretaro, Mexico. Three diagnostic methods were compared: Ziehl-Neelsen Cold Staining, Safranin-Methylene Blue Stain, and Sheather Sugar Flotation. The best diagnostic method for the identification of *Cryptosporidium* spp., oocysts in feces was the cold Ziehl-Neelsen stain method. A frequency of 43.4 % was obtained, indicating a high prevalence of the disease in cattle. In calves, the frequency was 63.4 %. There was a significant association ($p < 0.05$) between the presence of diarrhea in calves and the presence of oocysts in feces. Our results show the importance of establishing control measures to reduce the impact of this disease on dairy cattle premises.

KEY WORDS:

Cryptosporidium spp., cattle, diagnosis, Ziehl-Neelsen, public health.

Introducción

La Criptosporidiosis es una enfermedad ocasionada por el protozooario intracelular *Cryptosporidium* spp., que infecta a las células del intestino delgado de animales y de humanos, con relevancia en la salud pública debido a su carácter zoonótico e implicaciones importantes en los bovinos, especialmente en los becerros, ya que ocasiona trastornos gastrointestinales agudos o crónicos como diarrea ya sea con moco o sangre, bajas tasas de crecimiento, reducción en la ganancia diaria de peso (GDP) e inclusive la muerte (Brook *et al.*, 2008; Tarekegn *et al.*, 2021). Se han identificado más de 10 especies dentro del género *Cryptosporidium* spp., y la distribución de éstas está relacionada con la edad del hospedador, lo que hace evidente la idea errónea de que la especie zoonótica (*Cryptosporidium parvum*) está presente en todas las edades del animal (Fayer, 2010). La distribución de las especies puede atribuirse a diferentes factores como: el cambio en la microflora intestinal a medida que el animal madura o a los cambios de dieta que pueden afectar la capacidad del parásito para infectar el intestino (Thomson *et al.*, 2017). Por otro lado, se ha sugerido que los becerros recién nacidos son más susceptibles a las infecciones por *Cryptosporidium* spp., debido a la inmadurez de su sistema inmunitario y que la reducción de las tasas de prevalencia con la edad podría deberse al desarrollo de una respuesta inmunitaria protectora parcial tras múltiples infecciones por el parásito (Díaz *et al.*, 2021). Las especies más importantes en bovinos son: *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) que ocasiona la enfermedad clínica en los becerros y es zoonótico, *Cryptosporidium bovis* (*C. bovis*) por su potencial patogénico en bovinos adultos y *Cryptosporidium andersoni* (*C. andersoni*) que se asocia fuertemente con la

diseminación de ooquistes en el ambiente, contribuyendo a la infección de los animales (Chalmers & Davies, 2010; Hadfield *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2004; Ralston *et al.*, 2010; Silverlås *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 1999). La Criptosporidiosis se encuentra distribuida mundialmente, con prevalencias que van del 6% al 60% en diferentes países como Canadá, Estados Unidos de América, México y China (Maldonado-Camargo *et al.*, 1998; Nwosu *et al.*, 2019; Romero-Salas *et al.*, 2016; Ruest *et al.*, 1998; Trotz-Williams *et al.*, 2006). En México, la enfermedad ha sido reconocida desde 1983, cuando se documentó su presencia en bovinos lactantes, desde esa fecha se han realizado algunos estudios en diferentes estados del país (Maldonado-Camargo *et al.*, 1998), tales como Veracruz (73.6%) (Castelan-Hernández *et al.*, 2011), Región Lagunera (Durango y parte de Coahuila) (71.79%) (López-Torres *et al.*, 2020), Aguascalientes (40%) (García-Romo *et al.*, 2014), Nayarit (26-30%) (González *et al.*, 1997), Chihuahua (30%) (Castelan-Hernández *et al.*, 2011), Guanajuato (35%) (Castelan-Hernández *et al.*, 2011) y Guerrero (3.14%) (Fitz-Sánchez *et al.*, 2013). El diagnóstico de la enfermedad se realiza a través de la identificación de los ooquistes (4-6 μm) presentes en muestras fecales por métodos convencionales como Flotación con Azúcar de Sheather, Flotación con Sulfato de Zinc, Tinción de Ziehl-Neelsen, Tinción de Kinyoun, Sedimentación por formalina-acetato de etilo y algunos métodos de tinción negativos usando Nigrosina, Verde claro, Verde malaquita y Carbol fucsina (Rekha *et al.*, 2016); así como por métodos moleculares como aquellas basadas en PCR (PCR anidada, PCR-Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción, qPCR, ddPCR, PCR múltiple a tiempo real), Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y por técnicas serológicas tales como Ensayos Inmunofluorescentes y Ensayos Inmunoabsorbentes de captura de Antígenos (ELISA) (Aboelsoued & Abdel, 2022; Khan *et al.*, 2016). Además, existen kits comerciales para la detección de antígeno de *Cryptosporidium* spp., a través de Inmunoensayos enzimáticos, Ensayos inmunofluorescentes indirectos (IFA) y pruebas rápidas (Khan *et al.*, 2016). Los métodos microscópicos o convencionales son considerados los de elección en campo debido a su rapidez, simplicidad y bajo costo, a comparación de métodos moleculares que están mayormente limitados a investigación y a laboratorios especializados con una aplicabilidad limitada en los entornos de bajos recursos debido a sus costos, necesidades de infraestructuras y alta experiencia técnica involucrada (McCluskey *et al.*, 1995; Omoruyi *et al.*, 2014; Santín, 2020; Silverlås *et al.*, 2013) o de kits comerciales que son más costosos que los métodos moleculares y que pueden ser ineficientes en la detección de ooquistes en pacientes con bajos índices de infección (Hawash, 2014). Actualmente, y debido a que no se dispone de un tratamiento eficaz, es necesario el establecimiento de estrategias preventivas en contra de la enfermedad, por lo que detectarlo en los primeros días de vida de los becerros es importante, señalando la necesidad de métodos y/o técnicas rápidas y de fácil detección para los productores, por lo que en el presente estudio se comparan tres métodos diagnósticos convencionales para la identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., en ganado Holstein en diferentes etapas de desarrollo.

Material y Métodos

Lugar de estudio

Se realizó en un hato con bovinos de raza Holstein ubicado en el municipio de Pedro Escobedo, en el estado de Querétaro. Las condiciones del clima son semiseco

templado, con una temperatura promedio anual de 14-20 °C, precipitaciones de 500 a 800 mm² por año y un 66 % de humedad (INEGI, 2010; INEGI, 2020).

Descripción del Sistema de Producción

La unidad estudiada cuenta con un sistema de producción intensivo con alrededor de 720 animales en línea. Todos los animales se encuentran separados por edad; al nacimiento, las becerras son separadas de la vaca y se alojan en casetas individuales, así como las becerras de 4 a 7 meses y las vacas adultas se encuentran en corrales colectivos separados entre sí.

Diseño y población de estudio

Se realizó un estudio transversal de junio a julio de 2023. El número de animales a muestrear se determinó en 288 de acuerdo con la siguiente fórmula y basado en una prevalencia general del 25 % observada por Maldonado-Camargo *et al.* (1998) en un estudio realizado en Hidalgo y Jalisco (Ecuación 1).

$$n = \frac{Z\alpha^2 * p * q}{d^2} = \frac{(1.962^2)(0.25)(0.75)}{(0.05^2)} = 288$$

Toma de muestras

Se recolectaron muestras de excremento en guantes de palpación directamente del recto de los animales aplicando un muestreo de conveniencia; debido a la susceptibilidad que presentan los animales más jóvenes a *Cryptosporidium* spp., la distribución de la toma de muestras se realizó de la siguiente manera: 145 menores a dos meses de edad, 70 de 4-7 meses y 73 adultos. Se registró la edad del animal, si presentaban o no diarrea y la consistencia de esta. Posteriormente, las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Parasitología ubicado en la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, donde fueron almacenadas a 4°C hasta su procesamiento.

Análisis de las muestras

Con la finalidad de establecer el mejor método diagnóstico para *Cryptosporidium* spp., se analizaron las primeras 100 muestras de acuerdo con un criterio de conveniencia con cada uno de los siguientes métodos: Tinción de Ziehl-Neelsen en frío (ZN), Tinción Safranina-Azul de Metileno (SMB) y Flotación con Azúcar de Sheather (SSF). Todas las muestras fueron procesadas en fresco debido a la urgencia de diagnóstico para la Unidad de Producción estudiada. La distribución de las 100 muestras analizadas fue: 69 muestras de becerras menores a dos meses de edad, 24 muestras de becerras de 4-7 meses y 7 muestras de adultos. Las muestras fueron analizadas por dos operarios distintos de manera simultánea.

Análisis estadístico

Para conocer el nivel de concordancia entre los tres métodos se realizó el Índice de Kappa, donde: valor de kappa (κ): $\kappa \geq 0.75$ = excelente concordancia, $\kappa 0.40-0.75$ = concordancia regular a buena y $\kappa < 0.40$ = mala concordancia. Se utilizó la prueba de Chi-cuadrada (X^2) para medir la asociación entre la presentación de diarrea y la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., en el total de las muestras, y, finalmente, el cálculo de la frecuencia se determinó como la proporción de muestras positivas a *Cryptosporidium* spp., mediante la presencia de ooquistes en frotis fecales a partir de los resultados observados por el método más sensible.

Resultados y Discusión

Para la elección del método más conveniente se tomaron en cuenta los valores de frecuencia de recuperación de ooquistes y del índice de kappa, junto a otros criterios de elección como la practicidad de las técnicas y la capacidad de visualización de los ooquistes.

De las 100 muestras que se utilizaron para determinar la mayor sensibilidad, se observó una frecuencia del 53 % para Ziehl-Neelsen en frío, 41 % para Safranina-Azul de Metileno y 9 % para Flotación con Azúcar de Sheather. El análisis de Kappa (κ) determinó una mayor concordancia entre los métodos de ZN y SMB ($\kappa = 0.88$), determinándose que 12 de los animales que fueron positivos a ZN fueron negativos mediante SMB. Se obtuvo una concordancia entre SMB-SSF de $\kappa = 0.34$ y ZN-SSF de $\kappa = 0.26$ (Tabla 1). La concordancia o similitud entre los métodos de ZN y SMB, fue observada anteriormente por Rubio-Guarín (2010), indicando así mismo, una mayor sensibilidad para la prueba de ZN sobre la de SMB lo que concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio. Los resultados negativos en SMB, pero positivos en ZN pueden explicarse a través de factores humanos tales como la confusión de los ooquistes con otros artefactos como esporas bacterianas o restos fecales; así como en el periodo crítico de calentamiento presente en SMB (Baxby *et al.*, 1984).

El método SSF fue el que obtuvo el menor porcentaje en recuperación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., y la de más requerimientos en tiempo y capacitación, lo que es contrario a lo descrito por Rekha *et al.* (2016) que informa que SSF es el método más sensible y específico para la detección de ooquistes; la baja tasa de detección de *Cryptosporidium* spp., por SSF en el presente estudio puede deberse a varios factores, enfatizando un posible número reducido de ooquistes. Fujino *et al.* (2006) indican que para que el método de SSF sea confiable las muestras deben presentar más de 103 ooquistes/ml, lo que podría resultar en un alto número de falsos negativos en animales con bajos índices de infección, lo que pudo ocurrir en el presente estudio, además, Current & Garcia (1991) mencionan que la detección de ooquistes a través de este método se considera de mayor dificultad que las comparadas debido a las características de las soluciones utilizadas que pueden hacer que los ooquistes colapsen o se deformen si son dejados más de 15 minutos en ellas, haciendo que el diagnóstico de las muestras procesadas sea menos certero; por otro lado, la preparación de las soluciones de azúcar utilizadas en SSF requiere de una gravedad específica muy precisa, pudiendo ser un factor determinante en la recuperación o no de los ooquistes (Rojekittikhun *et al.*, 2015).

Ninguna de las muestras negativas en ZN fue positivas en los métodos comparados, demostrando la capacidad de la misma para detectar ooquistes; además, la posibilidad que da este método para procesar múltiples muestras simultáneamente permite el ahorro de tiempo y provee mayor facilidad para los productores, por lo que, para el análisis del total de las muestras, se estableció el método de Ziehl-Neelsen en frío como el más sensible.

La comparación con métodos moleculares o serológicos más sensibles que la Tinción de ZN en frío no se realizó debido a los objetivos del estudio y a la necesidad de diagnóstico rápido para el tratamiento oportuno de los animales de la unidad de producción estudiada; además, algunos autores resaltan los altos costos de la utilización de estos métodos, así como la necesidad de conocimientos especializados por parte de los operarios (Omoruyi *et al.*, 2014; Santín, 2020; Silverlås *et al.*, 2013). En caso de requerir investigaciones acerca de las especies del parásito afectando el hato, los métodos moleculares sí son necesarios, puesto que los métodos microscópicos como la Tinción ZN no diferencian entre ellas a pesar de ser métodos baratos y asequibles (Rodríguez, 2016; Omoruyi *et al.*, 2014). Por otro lado, el uso de kits comerciales no fue considerado por el alto costo que involucraría el diagnóstico del total de animales; un estudio de comparación entre una técnica de tinción (Tinción de Kinyoun) y dos inmunoensayos enzimáticos determinó una mayor conveniencia en el uso de la primera debido al tiempo práctico requerido en los inmunoensayos junto a los altos costos de estos (Kehl *et al.*, 1995), dando esto un panorama general del beneficio de métodos convencionales.

Tabla 1. Análisis de Kappa para determinar la concordancia entre las técnicas Ziehl-Neelsen, Safranina-Azul de Metileno y Flotación con Azúcar de Sheather para la identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp.,

Ziehl-Neelsen en frío (ZN)	Safranina-Azul de Metileno (SMB)		Índice Kappa
	Positivas	Negativas	
Positivas	41	12	κ = 0.88
Negativas	0	47	
Ziehl-Neelsen en frío (ZN)	Flotación con Azúcar de Sheather (SSF)		Índice Kappa
	Positivas	Negativas	
Positivas	9	44	κ = 0.26
Negativas	0	47	
Safranina-Azul de Metileno (SMB)	Flotación con Azúcar de Sheather (SSF)		Índice Kappa
	Positivas	Negativas	
Positivas	8	33	κ = 0.34
Negativas	1	58	

Fuente: Elaboración propia.

La frecuencia general de *Cryptosporidium* spp., en el presente estudio fue del 43.4 % (Tabla 2.), mayor a lo que refiere Fitz-Sánchez *et al.* (2013) (3.14 %) en el estado de Guerrero, similar a un estudio realizado en el estado de Aguascalientes por García-Romo *et al.* (2014) (40 %), e inferior a lo observado por Castelán-Hernández *et al.* (2011) en Veracruz (76.6 %). La frecuencia encontrada en este estudio puede ser comparada en similitud con Aguascalientes, teniendo en cuenta las condiciones climáticas de ambos estados; sin embargo, algunos estudios nacionales e

internacionales han evaluado la relación estadística entre la Criptosporidiosis y el clima de cada región, determinando que, a pesar de existir un pico de infección durante algunos meses del año, no existe una relación estadísticamente significativa entre estas dos variables (García *et al.*, 2009; Starkey *et al.*, 2006), siendo así que la epidemiología de esta parasitosis muestra características particulares en cada unidad y sistema de producción sin tomar en cuenta el clima; según Fayer *et al.* (2000) y Thomson *et al.* (2017), la prevalencia de infección causada por este parásito varía fuertemente entre países y entre estudios debido a diversas causas, incluyendo el tipo de muestra examinada (diarreica/no diarreica), los métodos de diagnóstico utilizados, la edad de los animales muestreados junto a las condiciones higiénico-sanitarias de cada unidad de producción, siendo así que la gran diferencia de prevalencias observadas en el estado de Veracruz (76.6 %) y Guerrero (3.14 %) puede ser explicada en las técnicas diagnósticas seleccionadas, mientras que en Veracruz fue utilizado un método de concentración de ooquistes seguida de uno de tinción, en Guerrero fue utilizado únicamente el primero, pudiendo esto dificultar la observación de los ooquistes al diagnóstico y subestimando los casos positivos a la enfermedad en el estado de Guerrero (Castelán-Hernández *et al.*, 2011; Fitz-Sánchez *et al.*, 2013). Es así, que cada unidad cuenta con condiciones específicas donde la frecuencia puede verse afectada debido a factores de riesgo tales como la falta de limpieza en el área de maternidad y la falta de desinfección en utensilios de alimentación (mamas, sondas esofágicas, cubetas), pudiendo algunos de estos factores explicar la diferencia entre la frecuencia encontrada en este estudio para el estado de Querétaro en comparación con otros estados del país (Maldonado-Camargo *et al.*, 1998; Sischo *et al.*, 2000).

Tabla 2. Frecuencia por edades y total de ooquistes identificados en heces de bovinos Holstein.

Edad	Muestras analizadas (n)	Muestras positivas	Frecuencia (%)
Becerras (≤ 2 meses)	145	92	63.45
Vaquillas (4 - 7 meses)	70	8	11.43
Adultos (> 7 meses)	73	25	34.25
Total	288	125	43.40

Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a la frecuencia por edad, se observó una mayor frecuencia en becerros (63.4 %), seguida de adultos (34.2 %) y de vaquillas de 4 a 7 meses (11.4 %) (Tabla 2), la frecuencia observada en becerros concuerda con diversos estudios donde mencionan que la infección por *Cryptosporidium* spp., es más frecuente en animales lactantes (Castelán-Hernández *et al.*, 2011; Santín *et al.*, 2004; Santín *et al.*, 2008). Se ha sugerido que los becerros son más susceptibles a las infecciones por *Cryptosporidium* spp., debido a la inmadurez de su sistema inmune (Fayer *et al.*, 2006) y que la reducción de las tasas de prevalencia con la edad podría deberse al desarrollo de una inmunidad protectora parcial posterior a infecciones múltiples con el protozooario (Ares-Mazás *et al.*, 1999). En diversos estudios se ha determinado que la frecuencia de *Cryptosporidium* spp., disminuye con la edad (Díaz *et al.*, 2021; Santín *et al.*, 2008), como se observó en el presente estudio donde los animales de 4 a 7 meses de edad presentaron una frecuencia de solo el 11.4 %. Por otra parte, la mayoría de los estudios coinciden en que la infección por *Cryptosporidium* spp., es menos frecuente en animales adultos (Amer *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2021), sin embargo, en el presente estudio se encontró una frecuencia de 34.2 %, lo que puede

deberse a la presencia de *C. andersoni* que afecta principalmente en animales mayores de 2 años (Fayer *et al.*, 2006; Santín, 2020; Smith *et al.*, 2014). La identificación de *C. andersoni* se realizó según la micrometría descrita en la literatura (Elliot *et al.*, 1999; Rekha *et al.*, 2016) la cual indica el tamaño de los ooquistes de $7.2 \pm 0.835 \mu\text{m}$ de largo por $5.7 \pm 0.835 \mu\text{m}$ de ancho contra el tamaño de *C. parvum* que es de $5.2 \pm 0.422 \mu\text{m}$ de largo por $4.05 \pm 0.052 \mu\text{m}$ de ancho (Figura 1.). La alta frecuencia de *Cryptosporidium* spp., en animales adultos podría explicarse al manejo en el hato, contaminación del corral (limpieza y desinfección) y al estado inmunológico de los animales entre otros.

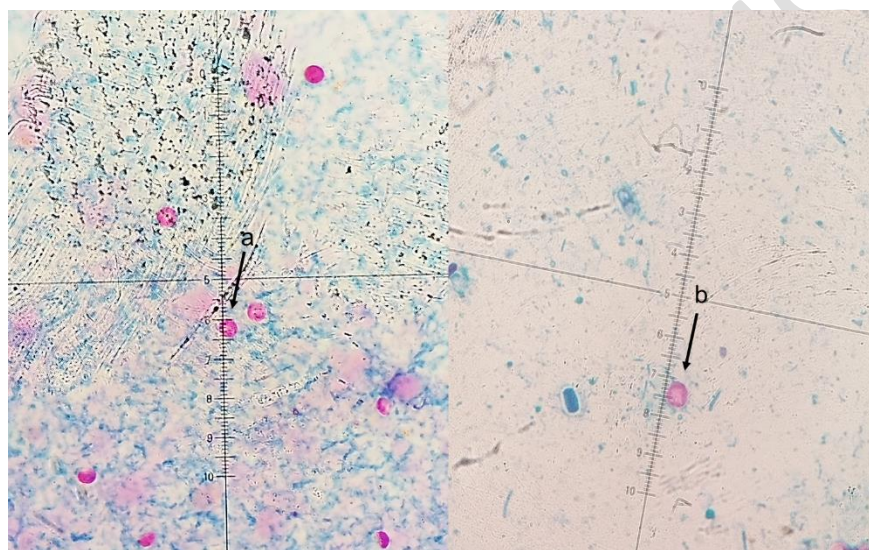


Figura 1. Comparación morfológica de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., y ooquistes de *C. parvum* (a) y *C. andersoni* (b). Fuente: Elaboración propia, tomada por Atzimba T. Huerta Magallanes.

Finalmente, para determinar la existencia de una relación estadísticamente significativa entre el signo de diarrea y la presencia del parásito *Cryptosporidium* spp., fue usada la prueba de Chi-cuadrada (X^2); considerando como variable dependiente la infección por *Cryptosporidium* spp., y como variable independiente la consistencia de las heces. El porcentaje de animales con diarrea fue de 24.30 % (39.31 % en becerras; 14.28 % en becerras de 4- 7 meses y 4.10 % en adultos), observando una disminución de este signo conforme la edad. Del total de animales con diarrea, 62.85 % (44/70) presentaban ooquistes de *Cryptosporidium* spp., al diagnóstico, únicamente 9 de estos animales presentaron diarrea con moco, observándose que 77.7 % de ellos tuvieron un diagnóstico positivo a la enfermedad (7/9). El valor de X^2 demostró una asociación significativa entre la diarrea y la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., en la población general ($p = 0.00027$) (Tabla 3); sin embargo, es importante mencionar que muchos de los animales sin el signo de diarrea también fueron positivos al parásito, por lo que la presencia de *Cryptosporidium* spp., es uno de los varios factores de importancia en la presentación de diarrea en ganado lechero que es multifactorial. Otros estudios han evaluado anteriormente la relación entre este

signo clínico y la infección por *Cryptosporidium* spp., concordando con los resultados reportados (Díaz de Ramírez *et al.*, 2007; Lombardelli *et al.*, 2019; Rajkhowa *et al.*, 2006; Rekha *et al.*, 2016; Romero-Salas *et al.*, 2016; Saha *et al.*, 2006); siendo así que Trotz- Williams *et al.* (2005) reportaron una asociación muy fuerte y significativa entre la infección por este parásito y la aparición de diarrea en becerros que excretan ooquistes, determinando que estos tienen al menos 3 veces más riesgo de sufrir diarrea que los becerros no infectados.

Tabla 3. Valores de p y X² de la asociación entre la presencia de diarrea y la presencia de *Cryptosporidium* spp., en heces de ganado Holstein.

<i>Consistencia heces</i>	<i>Muestras negativas</i>	<i>Muestras Positivas</i>	<i>Total</i>
Heces diarreicas	26	44	70
Heces sólidas	137	81	218
Total	163	125	288
X²			13.221
p			p = 0.0027

Fuente: Elaboración propia.

Conclusiones

Se determinó que el método de Ziehl-Neelsen en frío fue el más fácil de implementar, en el que se observaron los ooquistes en forma más clara y el que obtuvo mayor sensibilidad. Se determinó una frecuencia general del 43.4 % siendo los animales menores de 2 meses los que presentaron la mayor infección (63.4 %). Fue posible determinar la presencia de *C. andersoni* a través de micrometría en animales adultos. Además, se comprobó que la diarrea está asociada significativamente con la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., La alta frecuencia observada, indica la importancia de establecer medidas de bioseguridad en las unidades de producción para evitar el riesgo de infección en humanos.

Contribución de los autores

Conceptualización del trabajo, Huerta-Magallanes, González-Ruiz; desarrollo de la metodología: Huerta-Magallanes, González-Ruiz; manejo de software, Huerta-Magallanes, González-Ruiz, Cantó-Alarcón; validación experimental, Huerta-Magallanes, González-Ruiz, Cantó-Alarcón; análisis de resultados, Huerta-Magallanes, González-Ruiz, Veyna-Salazar, Cantó-Alarcón, Vera-Ávila, Barcenás-Reyes; manejo de datos, Huerta-Magallanes, González-Ruiz; escritura y preparación del manuscrito, Huerta-Magallanes, Veyna-Salazar, Cantó-Alarcón, Vera-Ávila, Barcenás-Reyes; redacción, revisión y edición: Huerta-Magallanes, González-Ruiz, Veyna-Salazar, Cantó-Alarcón, Barcenás-Reyes, Vera-Ávila; administrador de proyectos: Huerta-Magallanes, González-Ruiz, Cantó-Alarcón; adquisición de fondos: Huerta-Magallanes, González-Ruiz, Cantó-Alarcón.

Financiamiento

Esta investigación fue financiada con fondos propios.

Declaraciones éticas

Los autores declaran una previa autorización para la realización del proyecto por parte del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro con número de folio 079FCN2023.

Agradecimientos

Al M.C. José Eduardo Salazar Vázquez, por las facilidades brindadas en el presente estudio para la recolección de las muestras biológicas y a la Lic. en Microbiología Melisa Lachira por su apoyo en la toma y procesamiento de muestras biológicas.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias

- Aboelsoued, D., & Abdel, K.N. (2022). Diagnosis and control of Cryptosporidiosis in farm animals. *Journal of Parasitic Diseases*, 46(4), 1133–1146. <https://doi.org/10.1007/s12639-022-01513-2>
- Amer, S., Zidan, S., Adamu, H., Ye, J., Roellig, D., Xiao, L., & Feng, Y. (2013). Prevalence and characterization of *Cryptosporidium* spp., in dairy cattle in Nile River delta provinces, Egypt. *Experimental Parasitology*, 135(3), 518-23. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.09.002>
- Ares-Mazás, M.E., Fernández-da Ponte, B., Vergara-Castiblanco, C.A., Freire-Santos, F., Quílez-Cinca, J., Causapé-Valenzuela, A.C., & Sánchez-Acedo, C. (1999). Oocysts, IgG levels and immunoblot patterns determined for *Cryptosporidium parvum* in bovine examined during a visit to a farm (northeastern Spain). *Veterinary Parasitology*, 81(3), 185-93. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(98\)00245-3](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(98)00245-3)
- Baxby, D., Blundell, N., & Hart, C.A. (1984). The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. *The Journal of Hygiene*, 93(2), 317-23. <https://doi.org/10.1017/s0022172400064858>
- Brook, E., Hart, C.A., French, N., & Christley, R. (2008). Prevalence and risk factors for *Cryptosporidium* spp., infection in young calves. *Veterinary Parasitology*, 152(1-2), 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.003>
- Castelán-Hernández, O.O., Romero-Salas, D., García-Vázquez, Z., Cruz-Vázquez, C., Aguilar-Domínguez, M., Ibarra-Priego, N.D.J., & Muñoz-Melgarejo, S. (2011). Prevalencia de Criptosporidiosis bovina en tres regiones ecológicas de la zona centro de Veracruz, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13(3), 261-267. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93920942024>
- Chalmers, R.M., & Davies, A.P. (2010). Minireview: Clinical Cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology*, 124(1), 138-46. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.02.003>
- Current, W.L., & Garcia, L.S. (1991). Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(3), 325–358. <https://doi.org/10.1128/CMR.4.3.325>
- Díaz de Ramírez, A., Ramírez, I., Lilido, N., Morillo, L., José, G., Barreto, B., & Alejandro, J. (2007). Infección con *Cryptosporidium* spp., y su asociación con diarrea en becerros de ganadería de doble propósito. *Zootecnia Tropical*, 25(1), 29-36. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692007000100005&lng=es&tlng=es
- Díaz, P., Navarro, E., Remesar, S., García-Dios, D., Martínez-Calabuig, N., Prieto, A., López-Lorenzo, G., López, C.M., Panadero, R., Fernández, G., Díez-Baños, P., & Morondo, P. (2021). The Age-Related *Cryptosporidium* Species Distribution in Asymptomatic Cattle from North-Western SPAIN. *Animals*, 11(2), 256. <https://doi.org/10.3390/ani11020256>
- Elliot, A., Morgan, U.M., & Thompson, R.C. (1999). Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. *Journal of General and Applied Microbiology*, 45(3), 139-142. <https://doi.org/10.2323/jgam.45.139>
- Fayer, R. (2010). Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*, 124(1), 90-7. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.005>

- Fayer, R., Morgan, U., & Upton, S.J. (2000). Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection, and identification. *International Journal for Parasitology*, 30(12-13), 1305-22. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00135-1](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00135-1)
- Fayer, R., Santín, M., Trout, J.M., & Greiner, E. (2006). Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Veterinary Parasitology*, 135(2), 105-12. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.08.003>
- Fitz-Sánchez, E., Rosario Cruz, R., Hernández Ortiz, R., Hernández Castro, E., Rodríguez Batiz, E., & García Vázquez, Z. (2013). *Cryptosporidium parvum*: prevalencia y factores de riesgo en becerros del municipio de Cuajinicuilapa, Guerrero, México. *Revista Veterinaria Y Zootecnia*, 7(1), 49-61. <https://revistasoj.s.ucaldas.edu.co/index.php/vetzootec/article/view/4404>
- Fujino, T., Matsuo, T., Okada, M., & Matsui, T. (2006). Detection of a small number of *Cryptosporidium parvum* oocysts by sugar flotation and sugar centrifugation methods. *Journal of Veterinary Medical Science*, 68(11), 1191-3. <https://doi.org/10.1292/jvms.68.1191>
- García, A.M., Cruz, C., Quezada, T., Silva, E., Valdivia, A., Vazquez, S., & Ramos, M. (2009). Cryptosporidiosis in Dairy Calves from Aguascalientes, Mexico: Risk Infection in Relation with the Seadon and Months of Sampling. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 8(8), 1579-1583. <https://www.researchgate.net/publication/287032121>
- García-Romo, D., Cruz-Vázquez, C., Quezada-Tristán, T., Silva-Peña, E., Valdivia-Flores, A., Vázquez-Flores, S., & Ramos-Parra, M. (2014). Prevalence and risk factors associated with infection by *Cryptosporidium* spp. in suckling calves in Aguascalientes, Mexico. *Veterinaria México*, 1(1), <https://doi.org/10.21753/vmoa.1.1.332>
- González, M., Gómez, E.S., & Aluja, A.S. (1997). Criptosporidiosis en bovinos lactantes (histopatología, microscopía electrónica y de barrido). *Veterinaria México*, 14(1), 12-22. <https://biblat.unam.mx/es/revista/veterinaria-mexico/articulo/cryptosporidiosis-en-bovinos-lactantes-histopatologia-microscopia-electronica-de-transmision-y-de-barrido>
- Hadfield, S.J., Robinson, G., Elwin, K., & Chalmers, R.M. (2011). Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(3), 918-24. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3067739/>
- Hawash, Y. (2014) Evaluation of an immunoassay-based algorithm for screening and identification of Giardia and *Cryptosporidium* antigens in human faecal specimens from Saudi Arabia. *Journal of Parasitology Research*, 2014, 213745 <https://doi.org/10.1155/2014/213745>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. (2010). Compendio de Información geográfica municipal 2010. Pedro Escobedo, Querétaro. https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/22/22012.pdf
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. (2020). Panorama sociodemográfico de Querétaro: Censo de Población y Vivienda 2020. https://www.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/702825197957.pdf
- Kehl, K.S., Cicirello, H., & Havens, P.L. (1995). Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(2), 416-418. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.2.416-418.1995>
- Khan, S., Khan, A., Khan, I., & Muhammad, I. (2016). Differential techniques used for detection of *Cryptosporidium* oocysts in stool specimens. *Journal of Parasitic Diseases*, 1(1), 1-11. https://www.researchgate.net/publication/338823938_DIFFERENTIAL_TECHNIQUES_USED_FOR_DETECTIO_N_OF_CRYPTOSPORIDIUM_OOCYSTS_IN_STOOL_SPECIMENS
- Kumar, D., Sreekrishnan, R., & Das, S.S. (2004). Cryptosporidiosis in man and animals in Pondicherry. *Indian Journal of Animal Sciences*, 74(3), <https://epubs.icar.org.in/index.php/IJAnS/article/view/38362>
- Lombardelli, J.A., Tomazic, M.L., Schnittger, L., & Tiranti, K.I. (2019). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* in dairy calves and GP60 subtyping of diarrheic calves in central Argentina. *Parasitology Research*, 118(7), 2079-2086. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06366-y>
- López-Torres, L.L., López-Cuevas, O., Vázquez-Vázquez, C., Alvarado-Gómez, O.G., Vázquez-Alvarado, R.E., Rodríguez-Fuentes, H., Chaidez-Quiroz, C., & Vidales-Contreras, J.A. (2020). Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in dairy livestock from the Laguna Region, Mexico. *Revista Bio Ciencias* 7, e881. <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e881>
- Maldonado-Camargo, S., Atwill, E.R., Saltijeral-Oaxaca, J.A., & Herrera-Alonso, L.C. (1998). Prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in Holstein Freisian dairy calves in central México. *Preventive Veterinary Medicine*, 36(2), 95-107. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(98\)00084-1](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(98)00084-1)
- McCluskey, B.J., Greiner, E.C., & Donovan, G.A. (1995). Patterns of *Cryptosporidium* oocyst shedding in calves and a comparison of two diagnostic methods. *Veterinary Parasitology*, 60(3-4), 185-190. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(95\)00790-4](https://doi.org/10.1016/0304-4017(95)00790-4)

- Nwosu, A., Berke, O., Pearl, D.L., & Trotz-Williams, L.A. (2019). Exploring the geographical distribution of Cryptosporidiosis in the cattle population of Southern Ontario, Canada, 2011-2014. *Geospatial Health*, 14(2), <https://doi.org/10.4081/gh.2019.769>
- Omoruyi, B., Nwodo, U., Udem, C., & Okonkwo, F. (2014). Comparative Diagnostic Techniques for *Cryptosporidium Infection Molecules*, 19(2), 2674–2683. <https://doi.org/10.3390/molecules19022674>
- Rajkhowa, S., Rajkhowa, C., & Hazarika, G.C., (2006). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* in mithuns (*Bos frontalis*) from India. *Veterinary Parasitology*, 142(1–2), 146–149. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.06.026>
- Ralston, B., Thompson, R.C., Pethick, D., McAllister, T.A., & Olson, M.E. (2010). *Cryptosporidium andersoni* in Western Australian feedlot cattle. *Australian Veterinary Journal*, 88(11), 458-60. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20973292/>
- Rekha, K.M., Puttalakshamma, G.C., & D'Souza, P.E. (2016). Comparison of different diagnostic techniques for the detection of Cryptosporidiosis in bovines. *Veterinary World*, 9(2), 211-5. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.211-215>
- Rodríguez, A. (2016). Identificación de *Cryptosporidium* en becerras Holstein de 1 día a 12 meses de edad. [Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro]. <https://repositorio.uaaan.mx/xmlui/bitstream/handle/123456789/8264/ANA%20JANETH%20RODRIGUEZ%20CABRERA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rojekittikhun, W., Mahittikorn, A., Prummongkol, S., Puangsa-Art, S., Chaisiri, K., & Kusolsuk, T. (2015). Evaluation of sugar flotation and formalin-ether concentration techniques in the examination of GI parasites of refuge dogs and cats in Kanchanaburi province, Thailand. *Tropical Medicine & Parasitology*, 38, 17-24. https://ptat.org/uploads/pdf/journalPdf_38-1-2015-e3.pdf
- Romero-Salas, D., Alvarado-Esquivel, C., Cruz-Romero, A., Aguilar-Domínguez, M., Ibarra-Priego, N., Merino-Charez, J.O., Pérez de León, A.A., & Hernández-Tinoco, J. (2016). Prevalence of *Cryptosporidium* in small ruminants from Veracruz, Mexico. *BMC Veterinary Research*, 12, 14. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0638-3>
- Rubio-Guarín, D. (2010). Comparación de tres técnicas de tinción para la identificación de *Cryptosporidium* spp., a partir de muestras coprológicas obtenidas en una población infantil de Calarcá Quindío [Tesis de Licenciatura, Universidad del Quindío, Armenia] <https://bdigital.uniquindio.edu.co/server/api/core/bitstreams/18cbece2-2357-49f2-8497-0e41dbc093e4/content>
- Ruest, N., Faubert, G.M., & Couture, Y. (1998). Prevalence and geographical distribution of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in dairy farms in Québec. *The Canadian Veterinary Journal*, 39(11), 697-700. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1539484/>
- Saha, S., Sarkar, S., Batabyal, S., Pramanik, A.K., & Das, P. (2006). Observations on the epidemiology of bovine cryptosporidiosis in India. *Veterinary Parasitology*, 141(3–4), 330–333. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.06.017>
- Santín, M. (2020). *Cryptosporidium* and *Giardia* in Ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 36(1), 223-238. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.11.005>
- Santín, M., Trout, J.M., & Fayer, R. (2008). A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Veterinary Parasitology*, 155(1-2), 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.04.018>
- Santín, M., Trout, J.M., Xiao, L., Zhou, L., Greiner, E., & Fayer, R. (2004). Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Veterinary Parasitology*, 122(2), 103-17. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.03.020>
- Silverlås, C., Bosaeus-Reineck, H., Näslund, K., & Björkman, C. (2013). Is there a need for improved *Cryptosporidium* diagnostics in Swedish calves?. *International Journal for Parasitology*, 43(2), 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.009>
- Sischo, W.M., Atwill, E.R., Lanyon, L.E., & George, J. (2000). *Cryptosporidium* on dairy farms and the role these farms may have in contaminating surface water supplies in the northeastern United States. *Preventive Veterinary Medicine*, 43(4), 253–267. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(99\)00107-5](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(99)00107-5)
- Smith, R.P., Clifton-Hadley, F.A., Cheney, T., & Giles, M. (2014). Prevalence and molecular typing of *Cryptosporidium* in dairy cattle in England and Wales and examination of potential on-farm transmission routes. *Veterinary Parasitology*, 204(3-4), 111-9. <https://doi.org/10.1016%2Fj.vetpar.2014.05.022>
- Starkey, S.R., Kimber, K.R., Wade, S.E., Schaaf, S.L., White, M.E., & Mohammed, H.O. (2006). Risk Factors Associated with *Cryptosporidium* Infection on Dairy Farms in a New York State Watershed. *Journal of Dairy Science*, 89(11), 4229–4236. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72468-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72468-7)
- Tarekegn, Z.S., Tigabu, Y., & Dejene, H. (2021). *Cryptosporidium* infection in cattle and humans in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. *Parasite Epidemiology and Control*, 13,(14), e00219. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2021.e00219>

- Thomson, S., Hamilton, C.A., Hope, J.C., Katzer, F., Mabbott, N.A., Morrison, L.J., & Innes, E.A. (2017). Bovine Cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. *Veterinary Research*, 48(1), 42. <https://doi.org/10.1186%2Fs13567-017-0447-0>
- Trotz-Williams, L. A., Martin, D. S., Gatei, W., Cama, V., Peregrine, A. S., Martin, S. W., Nydam, D. V., Jamieson, F., & Xiao, L. (2006). Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. *Parasitology Research*, 99(4), 346–352. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0157-4>
- Trotz-Williams, L.A., Jarvie, B.D., Martin, S., Leslie, K.E., & Peregrine, A.S. (2005). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in southwestern Ontario and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Canadian Veterinary Journal*, 46(4), 349–351. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15943123/>
- Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R.C., Fayer, R., & Lal, A.A. (1999). Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3386-91. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91508/>

ARTÍCULO EN PRENSA