



Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in dairy livestock from the laguna region, Mexico

Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en hatos lecheros de la región lagunera, México

López Torres, L. L.¹, López Cuevas, O.³, Vázquez Vázquez, C.², Alvarado Gómez, O. G.¹, Vázquez Alvarado, R. E.¹, Rodríguez Fuentes, H.¹, Chaidez Quiroz, C.³, Vidales Contreras, J. A.¹

¹Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León. Francisco Villa s/n. Col. Ex-hacienda "El Canadá". Escobedo, Nuevo León, México. C.P. 66050.

²Facultad de Agricultura y Zootecnia, Universidad Juárez del Estado de Durango. Carretera Gómez Palacio-Tlahualilo, Km. 35, Gómez Palacio, Durango, C.P. 35111, Gómez Palacio, Durango, México.

³Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIIA), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., coordinación Culiacán. Carretera a Eldorado, km. 5.5, Campo El Diez, Culiacán, Sinaloa, México. C.P. 80110.

Cite this paper/Como citar este artículo: 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. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e881>



ABSTRACT

Cryptosporidiosis is a parasitic disease caused by *Cryptosporidium* spp. This zoonotic protozoan causes gastrointestinal infections in vertebrate animals, including human. In milk production industry, *Cryptosporidium* spp. causes morbidity and mortality of adult cattle and calves, and therefore, economic losses. In Mexico, the largest group of milk producers is in the Lagunar Region (LR), where gastrointestinal infections in cattle are frequent; however, the etiology is rarely known. The objective of this investigation was to determine the prevalence of *Cryptosporidium* spp. in 39 dairy herds of the LR. 78 stool samples were taken from the rectum of adult cattle and pre-weaned

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: December 2nd 2019.

Accepted/Aceptado: February 25th 2020.

Available on line/Publicado: February 25th 2020.

RESUMEN

La cryptosporidiosis es una enfermedad parasitaria causada por *Cryptosporidium* spp. Este protozooario zoonótico causa infecciones gastrointestinales en animales vertebrados, incluyendo el hombre. En la industria de producción de leche, *Cryptosporidium* spp. causa morbilidad y mortalidad de bovinos adultos y terneros, y por lo tanto, pérdidas económicas. En México, el mayor grupo de productores de leche se encuentra en la Región Lagunar (LR), donde las infecciones gastrointestinales en los bovinos es frecuente; sin embargo, pocas veces se conoce la etiología. El objetivo de esta investigación fue determinar la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en 39 hatos lecheros de la LR. Se tomaron 78 muestras de heces del recto de bovinos adultos y terneros pre-destetados (39 muestras de cada grupo). *Cryptosporidium* spp. se recuperó por el método de sedimentación con éter de formalina y se identificaron por microscopía y por PCR, amplificando una región del gen *Hsp*

*Corresponding Author:

Juan Antonio Vidales Contreras. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León. Francisco Villa s/n. Col. Ex-hacienda "El Canadá". Escobedo, Nuevo León, México. C.P. 66050. Phone: +52(811) 340 4399. E-mail: juan.vidalescn@uanl.edu.mx

calves (39 samples from each group). *Cryptosporidium* spp. was recovered by sedimentation method with formalin ether and identified by microscopy and PCR, amplifying a region of *Hsp 70* gene, and PCR products were sequenced and analyzed. The prevalence of *Cryptosporidium* spp. was determined in 71.79 % of total samples, which corresponded to 56.41 % of adults analyzed (22/39) and 87.17 % of calves (34/39). Sequences analysis showed a 100 % phylogenetic homology with *Cryptosporidium parvum* in all the isolates analyzed based on the alignment of *Hsp70* gene. The prevalence of *Cryptosporidium parvum* in dairy herds of LR suggests that this is endemic and represents a risk for dairy industry and public health if manure is applied as a fertilizer in agricultural fields.

KEY WORDS

Cattle, dairy herds, *Cryptosporidium* spp., Prevalence, sequencing.

Introduction

Cryptosporidium spp. is one of the most common zoonotic parasites in humans. In livestock, mainly cattle, it is often associated with profuse watery diarrhea, significant weight loss and mortality in adults and calves, which significantly affects the productivity of the dairy industry (Delafosse *et al.*, 2015; Thompson *et al.*, 2016). Studies conducted in various regions of the world have shown that the prevalence of *Cryptosporidium* spp. in dairy herds considerably varies (Degerli *et al.*, 2005; Silverlas *et al.*, 2012; Garro *et al.*, 2016); however, its prevalence frequently exceeds 20 %, showing a ubiquitous and endemic distribution in dairy farms (Cai *et al.*, 2017; Feng & Xiao, 2017). Cattle infection in farms is caused by the ingestion of *Cryptosporidium* oocysts, commonly excreted by unhealthy cattle, in amounts that can reach up to 4.15×10^7 oocysts per gram of feces (Fayer *et al.*, 1998).

Once in the environment, *Cryptosporidium* spp. oocysts can contaminate water, food, fomites and surfaces; and they are able to survive in these environments for weeks or months, since hard outer shell of the oocysts protects them from adverse physical and chemical factors, which increases the likelihood of infection, compared to other

70, and the products of PCR were sequenced and analyzed. Se determinó una prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en el 71.79 % del total de las muestras, que correspondió al 56.41 % de los adultos analizados (22/39) y al 87.17 % de los terneros (34/39). El análisis de secuencias mostró una homología filogenética del 100 % con *Cryptosporidium parvum* en todos los aislados analizados con base en el alineamiento del gen *Hsp 70*. La prevalencia de *Cryptosporidium parvum* en hatos lecheros de la LR sugiere que es endémico y representa un riesgo para la industria lechera y de salud pública si el estiércol es aplicado como abono en campos agrícolas.

PALABRAS CLAVE

Bovinos, hatos lecheros, *Cryptosporidium* spp., prevalencia, secuenciación.

Introducción

Cryptosporidium spp. es uno de los parásitos zoonóticos más comunes en los humanos. En el ganado, principalmente bovinos, a menudo se asocia con diarrea acuosa profusa, pérdida significativa de peso y mortalidad de adultos y terneros, lo que afecta significativamente la productividad de la industria lechera (Delafosse *et al.*, 2015; Thompson *et al.*, 2016). Estudios realizados en diversas partes del mundo han demostrado que la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en los hatos lecheros varía considerablemente (Degerli *et al.*, 2005; Silverlas *et al.*, 2012; Garro *et al.*, 2016); sin embargo, su prevalencia frecuentemente supera el 20 %, mostrando una distribución ubicua y endémica en las granjas lecheras (Cai *et al.*, 2017; Feng & Xiao, 2017). La infección de los bovinos en las granjas se produce por la ingestión de ooquistes de *Cryptosporidium*, comúnmente excretados por ganado insalubre, en cantidades que pueden llegar hasta 4.15×10^7 ooquistes por gramo de heces (Fayer *et al.*, 1998).

Una vez que están en el medio ambiente, los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. pueden contaminar el agua, alimentos, fomites y superficies; y son capaces de sobrevivir en estos ambientes durante semanas o meses, ya que la cubierta exterior dura del ooquiste los protege de factores físicos y químicos adversos, lo que aumenta la probabilidad de infección, en comparación con otros microorganismos (Budu-Amoako *et al.*, 2012; Swaffer *et al.*, 2014; Sterk *et al.*, 2016).

microorganisms (Budu-Amoako *et al.*, 2012; Swaffer *et al.*, 2014; Sterk *et al.*, 2016).

Cryptosporidium spp. is routinely detected by microscopic methods in fresh feces of infected cattle; however, in the last 25 years, molecular techniques such as Polymerase Chain Reaction (PCR), fragment sequencing and analysis, have been increasingly used to identify species and genotypes of *Cryptosporidium*, because microscopic techniques are often unable to distinguish a microorganism among various species, since it shares morphological characteristics and size with other microorganisms, causing false positive results (Thompson *et al.*, 2016; Yap *et al.*, 2016); in addition, its molecular characterization has helped to understand the dynamics of infection in dairy cattle and the eventual transmission to humans (Swaffer *et al.*, 2014; Garro *et al.*, 2016; Thompson & Ash, 2016). For example, *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* and *C. andersoni* have been shown to commonly infect heifers and milking cows without clinical manifestations. *C. parvum* has also been recognized to be exclusively related to calves; while for cattle, *C. bovis*, *C. ryanae* are the dominant species; and *C. andersoni* commonly infects adult animals (Fayer *et al.*, 2007; Karanis *et al.*, 2010; Garro *et al.*, 2016). However, *C. parvum* is the most widely distributed species in cattle of dairy herds, mainly when dairy farming is intensive (Xiao & Feng, 2008).

The Lagunar Region (LR), also known as the "lagoon region", is a metropolitan area from northern Mexico that covers the cities of Torreón, Matamoros, Francisco I. Madero and San Pedro in the state of Coahuila and Gomez Palacio, Ciudad Lerdo, Mapimí and Tlahualilo in Durango (Figure 1). It is the main area of dairy cattle production in Mexico, consisting of more than 4×10^5 dairy cows and an annual milk production of 2,433 million liters, which each year contributes to about 21 % of the milk production throughout the country (Salazar-Sosa *et al.*, 2007; Fortis-Hernández *et al.*, 2009; SAGARPA, 2011). However, despite its economic importance, the evaluation of prevalence of *Cryptosporidium* spp. in this region remains a neglected task and little has been done to assess its prevalence in dairy cattle (Maldonado *et al.*, 1998; Vázquez-Flores, 2000; Castillo-García *et al.*, 2009). The present investigation presented an exploratory nature with a descriptive scope, and was aimed at determining the prevalence and distribution of *Cryptosporidium* spp. in adult cattle and freshly

Cryptosporidium spp. se detecta rutinariamente por métodos microscópicos en las heces frescas del ganado infectado; sin embargo, en los últimos 25 años, las técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la secuenciación y análisis de fragmentos, se han empleado cada vez más para identificar especies y genotipos de *Cryptosporidium*, esto debido a que las técnicas microscópicas frecuentemente son incapaces de distinguir el microorganismo, ya que comparte características morfológicas y tamaño con otros microorganismos, ocasionando falsos positivos (Thompson *et al.*, 2016; Yap *et al.*, 2016); además, su caracterización molecular ha ayudado a comprender la dinámica de la infección en el ganado lechero y la eventual transmisión a humanos (Swaffer *et al.*, 2014; Garro *et al.*, 2016; Thompson & Ash, 2016). Por ejemplo, se ha demostrado que *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* y *C. andersoni* infectan comúnmente a novillas y vacas de ordeña sin manifestaciones clínicas. También se reconoce que *C. parvum* está relacionado exclusivamente con los terneros; mientras que para el ganado mayor, *C. bovis*, *C. ryanae* son las especies dominantes; y *C. andersoni* comúnmente infecta animales adultos (Fayer *et al.*, 2007; Karanis *et al.*, 2010; Garro *et al.*, 2016). Sin embargo, *C. parvum* es la especie más ampliamente distribuida en bovinos de los hatos lecheros, principalmente cuando la ganadería lechera es intensiva (Xiao & Feng, 2008).

La Región Lagunar (LR), también conocida como "comarca lagunera", es un área metropolitana del norte de México que abarca las ciudades de Torreón, Matamoros, Francisco I. Madero y San Pedro en el estado de Coahuila y Gómez Palacio, Ciudad Lerdo, Mapimí y Tlahualilo en Durango (Figura 1). Es la principal zona de México productora de ganado lechero, compuesta por más de 4×10^5 vacas lecheras y una producción anual de leche de 2,433 millones de litros, que cada año aporta alrededor del 21 % de la producción de leche en todo el país (Salazar-Sosa *et al.*, 2007; Fortis-Hernández *et al.*, 2009; SAGARPA, 2011). Sin embargo, a pesar de su importancia económica, la evaluación de la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en esta región sigue siendo una tarea descuidada y poco se ha hecho para evaluar su prevalencia en el ganado lechero (Maldonado *et al.*, 1998; Vázquez-Flores, 2000; Castillo-García *et al.*, 2009). La presente investigación es de carácter exploratorio con alcance descriptivo, y tuvo por objetivos, determinar la prevalencia y distribución de *Cryptosporidium* spp. en bovinos adultos y terneros recién destetados de 39 hatos lecheros de la LR, así como

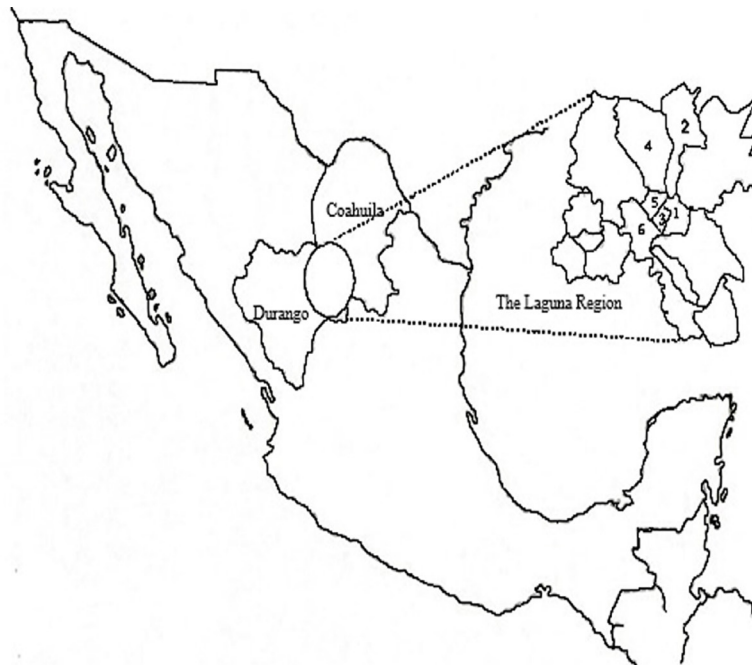


Figure 1. Geographic location of the Lagunar Region showing municipalities where the present study was conducted. Coahuila: Matamoros (1), Francisco I. Madero (2), and Torreon (3); Durango: Tlahualilo (4), Lerdo (5), and Gomez Palacio (6).

Figura 1. Localización geográfica de la Región Lagunera, mostrando los municipios donde fue realizado el presente estudio. Coahuila: Matamoros (1), Francisco I. Madero (2) y Torreón (3). Durango: Tlahualilo (4), Lerdo (5) y Gómez Palacio (6).

weaned calves of 39 dairy herds from the LR, as well as determining *Cryptosporidium* species that were present in the farms analyzed.

determinar las especies de *Cryptosporidium* presentes en las granjas analizadas.

Material and Methods

Description of the study area

The LR is located in the Chihuahuan Desert at 1110-1200 m above sea level, at the limit of Coahuila and Durango between 25° 34' 18" and 26° 06' 31" north latitude and 102° 45' 08" and 104° 06' 53" west longitude. It includes 15 municipalities, 10 in Durango and 5 in Coahuila (Figure 1). The annual rainfall varies from 100 to 200 mm, a potential evapotranspiration of 2,396 mm and an average temperature of 22.1 °C.

Material y Métodos

Descripción del área de estudio

La LR está ubicada en el Desierto Chihuahuense a 1110-1200 m sobre el nivel del mar, en el límite de Coahuila y Durango entre 25° 34' 18" y 26° 06' 31" latitud norte y 102° 45' 08" y 104° 06' 53" longitud oeste. Incluye 15 municipios, 10 en Durango y 5 en Coahuila (Figura 1). La precipitación pluvial anual varía de 100 a 200 mm, una evapotranspiración potencial de 2,396 mm y una temperatura promedio de 22.1 °C. De marzo a junio tiene vientos estacionales de 6.5 km h⁻¹ en un promedio anual. De abril a mayo, pueden surgir tormentas de polvo con

From March to June, it has annual average seasonal winds of 6.5 km h⁻¹. From April to May, dust storms may occur with gusts of wind up to 78 km h⁻¹, the historical maximum reported for the area (Figuroa-Viramontes *et al.*, 2015). The LR have the highest production of dairy cattle in Mexico, with more than 4 x 10⁵ cattle heads, which in turn produces approximately 9.25 x 10⁵ ton of dry-based manure per year (Salazar-Sosa *et al.*, 2007; Fortis-Hernández *et al.*, 2009). The latter is able to fertilize agricultural fields of the dairy industry for forage production and it is a common practice in the LR (Figuroa-Viramontes *et al.*, 2015).

Samples collection

For the present study, 78 samples of cattle feces (39 from adult cattle and 39 from freshly weaned calves) were taken randomly in 39 dairy herds, where 33 of them have more than 600 cows in production. These samples were collected in the municipalities of Matamoros (3 herds), Francisco I. Madero (14 herds), Torreón (1 herd), Tlahualilo (2 herds), Lerdo (13 herds) and Gómez Palacio (6 herds) (Figure 1), between July 30th and August 2nd, 2012. The 39 dairy herds represented 10 % of the total of 380 herds established in the LR, according to data from SAGARPA (2011).

Approximately 40 g of feces were taken directly from animals' rectum by using sterile 50 mL tubes. Samples were properly labeled and placed in coolers at 5-10 °C and then transported to the Parasitology Laboratory of the Faculty of Agriculture and Zootechnics of the Juárez University from the State of Durango for analysis in the first 24 hours after collection.

Isolation of *Cryptosporidium* oocysts from cattle feces

Oocysts were isolated by a modification of the sedimentation method with formalin-ether (Levine *et al.*, 1988). Briefly, one gram of each stool sample was resuspended in 3.5 mL of sterile distilled water and filtered through a wet sterile gauze. Filtered sample was centrifuged at 1,100 xg for 5 minutes in triplicate and the supernatant was removed by decantation. Sediment was resuspended by adding 5 mL of 10 % formalin and after 5 minutes, 4 mL of ether was added to adjust the volume to 10 mL. The mixture was vortexed and centrifuged again at 1,100 xg for 5 minutes. The supernatant was decanted and samples were taken from the pellet to obtain two smears for microscopic

ráfagas de viento de hasta 78 km h⁻¹, el máximo histórico reportado para el área (Figuroa-Viramontes *et al.*, 2015). La LR es la de mayor producción de ganado lechero en México, con más de 4x10⁵ cabezas de ganado, que a su vez produce aproximadamente 9.25 x10⁵ t de estiércol de base seca por año (Salazar-Sosa *et al.*, 2007; Fortis-Hernández *et al.*, 2009). Este último tiene la capacidad de fertilizar los campos agrícolas de la industria láctea para la producción de forraje y es una práctica común en la LR (Figuroa-Viramontes *et al.*, 2015).

Recolección de muestras

Para el presente estudio se tomaron de manera aleatoria 78 muestras de heces de ganado bovino (39 de bovinos adultos y 39 de terneros recién destetados) en 39 hatos lecheros, donde 33 de ellos tienen más de 600 vacas en producción. Estas muestras fueron recolectadas en los municipios de Matamoros (3 hatos), Francisco I. Madero (14 hatos), Torreón (1 hato), Tlahualilo (2 hatos), Lerdo (13 hatos) y Gómez Palacio (6 hatos) (Figura 1), entre el 30 de julio y el 2 de agosto de 2012. Los 39 hatos lecheros representan el 10 % del total de 380 rebaños establecidos en la LR, según datos de SAGARPA (2011).

Se tomaron aproximadamente 40 g de heces directamente del recto de los animales utilizando tubos estériles de 50 mL. Las muestras fueron debidamente etiquetadas y colocadas en hieleras a 5-10 °C para luego ser transportadas al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Agricultura y Zootecnia de la Universidad Juárez del Estado de Durango para su análisis en las primeras 24 horas posterior a su recolección.

Aislamiento de ooquistes de *Cryptosporidium* de las heces de ganado

Los ooquistes se aislaron mediante una modificación del método de sedimentación con formol-éter (Levine *et al.*, 1988). Brevemente, un gramo de cada muestra fecal se resuspendió en 3.5 mL de agua destilada estéril y se filtró a través de una gasa estéril húmeda. La muestra filtrada se centrifugó a 1,100 xg durante 5 minutos por triplicado y el sobrenadante se eliminó por decantación. El sedimento se resuspendió añadiendo 5 mL de formol al 10 % y después de 5 minutos se le adicionaron 4 mL de éter para ajustar a un volumen a 10 mL. La mezcla se agitó con vórtice y se centrifugó nuevamente a 1,100 xg por 5 minutos. El sobrenadante se decantó y a partir del sedimento se tomaron muestras para obtener dos frotis para su observación al microscopio; el resto del sedimento

observation; the rest of the pellet was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for later molecular analysis. For microscopic oocysts detection, the collected smears were stained with the modified method of Ziehl-Neelsen (Henriksen & Pohlenz, 1981; Casemore *et al.*, 1985) and observed with a bright field microscope under a 100 X objective lens. The identification of red and egg-shaped oocysts of approximately 4 to 6 μm in diameter was recorded as positive samples (Henriksen & Pohlenz, 1981).

Identification of *Cryptosporidium spp.* by PCR and sequencing

Previously obtained frozen pellets were thawed and fractions of 1 mL were subjected to several centrifugation steps at 800 xg for 5 min, and the pellet of each sample was resuspended in a final volume of 5 mL. For DNA extraction, the phenol-chloroform method was used with 2 % cetyl trimethylammonium bromide adapted from Doyle & Doyle (1987) with some modifications. Briefly, samples were put in a boiling water bath for 5 min and allowed to cool at room temperature. 1 mL of each sample was taken and centrifuged at 10,000 xg for 5 min, this step was repeated three times. The pellet was resuspended in 400 μL TE 1X buffer pH 8 and 50 μL lysozyme (10 mg/mL, Sigma, USA) were added, it was mixed and incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 h. 75 μL of 10% SDS (Sigma, USA) and 5 μL of proteinase K (10 mg/mL, Sigma, USA) were added. The mixture was agitated and incubated at $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min in a dry bath. 100 μL of 5M NaCl were added. The mixture was agitated and 100 μL of a CTAB / NaCl; solution (2 % CTAB; 10Mm Tris-HCl pH 8; 20mM EDTA pH 8; 1.4M NaCl) preheated at $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ were added. The mixture was agitated and incubated at $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min in a dry bath. The mixture was heated in boiling water for 5 min and 750 μL of chloroform/isoamyl alcohol (24:1) was added. The mixture was agitated and centrifuged at 13,000 xg for 15 min. The supernatant was recovered in a 1.5 mL tube and 0.6 vol of isopropanol were added and incubated at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min. It was centrifuged at 13,000 xg for 15 min and supernatant was discarded, 1 mL of cold ethanol was added and centrifuged at 13,000 xg for 10 min, the supernatant was carefully discarded and the excess ethanol was evaporated at room temperature for 20 min. Finally, the DNA obtained was re-suspended in 30 μL of 1X TE buffer and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until its use. The integrity of the DNA obtained was analyzed by electrophoresis in a 8% agarose gel. PCR reactions were performed to amplify a 345 bp fragment of the Heat shock protein

se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para un posterior análisis molecular. Para la detección microscópica de ooquistes, los frotis recolectados se tiñeron con el método modificado de Ziehl-Neelsen (Henriksen & Pohlenz, 1981; Casemore *et al.*, 1985) y se observaron con un microscopio de campo brillante bajo una lente de objetivo 100 X. La identificación de ooquistes de color rojo y en forma de huevo de aproximadamente 4 a 6 μm de tamaño se registraron como muestras positivas (Henriksen & Pohlenz, 1981).

Identificación de *Cryptosporidium spp.* por PCR y secuenciación

Los pellets congelados obtenidos previamente se descongelaron y fracciones de 1 mL fueron sometidas a varias etapas de centrifugación a 800 xg por 5 min, y el pellet de cada muestra fue resuspendido en un volumen final de 5 mL. Para la extracción de ADN, se usó el método de fenol-cloroformo con bromuro de cetil-trimetilamonio al 2 % adaptado de Doyle & Doyle (1987), con algunas modificaciones. Brevemente, las muestras se pusieron en baño de agua hirviendo durante 5 min y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se tomó 1 mL de cada muestra y se centrifugaron a 10,000 xg por 5 min, este paso se repitió tres veces. El pellet se resuspendió en 400 μL de buffer TE 1X pH 8 y se adicionaron 50 μL de lisozima (10 mg/mL, Sigma, USA), se mezcló y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. Se adicionaron 75 μL de SDS 10 % (Sigma, USA) y 5 μL de proteinasa K (10 mg/mL, Sigma, USA), se agitó y se incubó a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min en baño seco. Se agregaron 100 μL de NaCl 5 M, se agitó y se adicionaron 100 μL de una solución de CTAB/NaCl (2 % CTAB; 10Mm Tris-HCl pH 8; 20mM EDTA pH 8; 1.4M NaCl) precalentada a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, se agitó y se incubó a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min en baño seco. La mezcla se calentó en agua hirviendo por 5 min y se adicionaron 750 μL de cloroformo/alcohol isoamilico (24:1), se agitó y se centrifugó a 13,000 xg por 15 min. Se recuperó el sobrenadante en un tubo de 1.5 mL y se adicionó 0.6 vol de isopropanol y se incubó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. Se centrifugo a 13,000 xg por 15 min y se descartó el sobrenadante, se agregó 1 mL de etanol frío y se centrifugó a 13,000 xg por 10 min, se descartó cuidadosamente el sobrenadante y se dejó evaporar el exceso de etanol a temperatura ambiente por 20 min. Finalmente el ADN obtenido se re suspendió en 30 μL de buffer TE 1X y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Se analizó la integridad del DNA obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa al 8 %. Las reacciones de PCR se realizaron para amplificar un fragmento de 345 pb del gen de la proteína de choque térmico (*Hsp 70*) mediante

gene (*Hsp 70*) by using 25 to 50 pmol of each primer; sense 5'-TCCTCTGCCGTACAGGATCTCTTA-3' and antisense 5'-TGCTGCTCTTACCAGTACTCTTATCA-3' (Di Giovanni & Le Chevallier, 2005). 200 mM of a mixture of dNTPs (GIBCO-BRL), 2 mM MgCl₂, PCR buffer 1 X (200 mM Tris-HCl pH 8.0 and 500 mM KCl), 1 U Taq-DNA polymerase enzyme were used, plus 200 ng DNA and sterile milliQ water to reach a final volume of 25 µL. In an endpoint-PCR thermal cycler, a cycle of denaturation was programmed at 95 °C for 10 min, followed by 30 cycles of denaturation at 95 °C for 30 seconds, primers alignment at 60 °C for 1 minute, extension at 72 °C for 30 seconds, and a final extension cycle of 10 minutes at 72 °C. The reaction was stabilized at 4 °C for further analysis by electrophoresis. PCR products were separated by electrophoresis in 1 % agarose gels for 1 hour at 100 V and then stained with GelRed™ (NucleicAcid®) and visualized in a UV transilluminator. 25 out of the PCR products of the positive samples were sent to Macrogen Co, in Seoul, Republic of Korea, for sequencing in a 3730XL DNA sequence analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc). Finally, the nucleotide sequences of the *Hsp70* gene amplified fragment were compared in the database of the National Center for Biotechnological Information (NCBI); and finally, with the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), 4 sequences were analyzed, which showed differences in the previous analysis to determine alignments and differences in their sequences.

Statistical analysis

The results obtained were analyzed by binomial proportions based on the two groups: pre-weaned calves (aged 2 weeks to 4 months) and adult cattle. Statistical package IBM SPSS® Statistics Inc. Version 20.0.1 (Chicago, Illinois) was used, with a 95% confidence level.

Results and Discussion

Fifty of the 78 samples analyzed by the modified method of Ziehl-Neelsen gave positive results for *Cryptosporidium* spp. oocysts, with a prevalence of 64 % for all cattle sampled. However, molecular analysis detected 56 positive samples of the 78 analyzed (Table 1), showing a prevalence

el uso de 25 a 50 picomoles de cada primer; sentido 5'-TCCTCTGCCGTACAGGATCTCTTA-3' y antisentido 5'-TGCTGCTCTTACCAGTACTCTTATCA-3' (Di Giovanni & Le Chevallier, 2005). Se utilizaron 200 mM de una mezcla de dNTP's (GIBCO - BRL), 2 mM de MgCl₂, 1X de tampón para PCR (Tris - HCl 200 mM pH 8,0 y KCl 500 mM), 1 U de enzima Taq-DNA polimerasa, 200 ng de DNA y agua miliQ estéril para alcanzar un volumen final de 25 µL. En un termociclador para PCR-punto final, se programó un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 10 min, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineamiento de primers a 60 °C por 1 minuto, extensión a 72 °C por 30 segundos, y un ciclo de extensión final de 10 minutos a 72 °C. La reacción se estabilizó a 4 °C para su posterior análisis por electroforesis. Los productos de PCR obtenidos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % durante 1 hora a 100 V y teñidos con GelRed™ (NucleicAcid®) y visualizados en un transiluminador de luz UV. 25 de los productos de PCR de las muestras que resultaron positivas fueron enviadas a la empresa Macrogen Co, en Seoul, República de Korea, para su secuenciación en un analizador de secuencias de DNA 3730XL (Thermo Fisher Scientific Inc). Finalmente, las secuencias nucleotídicas del fragmento amplificado del gen *Hsp 70* se comparó en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI); y finalmente, con la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) se analizaron 4 secuencias que mostraron diferencias en el análisis anterior para determinar alineaciones y diferencias en sus secuencias.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron por proporciones binomiales con base en los dos grupos: terneros pre-destetados (edades de 2 semanas a 4 meses) y bovinos adultos. Se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS® Statistics Inc. Versión 20.0.1; Chicago Illinois, con un nivel de confianza del 95 %.

Resultados y Discusión

Cincuenta de las 78 muestras analizadas por el método modificado de Ziehl-Neelsen dieron positivas para ooquistes de *Cryptosporidium* spp., con una prevalencia del 64 % para todos los bovinos muestreados. Sin embargo, el análisis molecular detectó 56 muestras positivas de las

of 71.79 % (34/39 [87.17 %] in weaned calves, and 22/39 [56.41 %] in adults). It is important to mention that 100 % of the analyzed farms showed presence of *Cryptosporidium* spp., in addition, all the samples considered as positive by microscopic analyses were confirmed by PCR and only 5 of the analyzed calves showed no infection by *Cryptosporidium* spp. oocysts.

Identifying a prevalence of *Cryptosporidium* spp. in 71.79 % of cattle analyzed in the LR represents an alarming fact, since this rate is significantly higher than the one observed in previous studies conducted in Mexico, where it has been suggested that the prevalence of *Cryptosporidium* spp. in cattle can range from 22 % to 67 % (Maldonado *et al.*, 1998; Vazquez-Flores, 2000; Castillo-García *et al.*, 2009), with a higher infection level for calves, as presented in this study (Fayer *et al.*, 1997, Castillo-García *et al.*, 2009). It has been found that the prevalence of *Cryptosporidium* spp. in cattle is variable, and that this is closely linked to animals' age, sanitary management in production farms, as well as the access to the sanitary services and water quality (Fayer, 2004; Zanaro and Garbossa, 2008 ; Pulido-Medellín *et al.*, 2014). In other regions of the world, the prevalence of *Cryptosporidium* spp. in cattle has been reported from 30 % to more than 70 %; for example, a prevalence of 72.75 % has been reported in Spain (Lentze *et al.*, 1999; Cardona *et al.*, 2011; Silverlas *et al.*, 2012); in Turkey, 31.4 % (Degerli *et al.*, 2005); in Colombia, 53.3 % (Vergara & Quilez, 2004) and 48 % (Pulido-Medellín *et al.*, 2014); and in Venezuela a prevalence of 43 % to

78 analizadas (Tabla 1), mostrando una prevalencia de 71.79 % (34/39 [87.17 %] en los terneros destetados, y 22/39 [56.41 %] en los adultos). Es importante mencionar que el 100 % de los establecimientos analizados tuvieron presencia *Cryptosporidium* spp., además, todas las muestras consideradas positivas por análisis microscópico fueron confirmadas por PCR y solo 5 de los terneros analizados no mostraron infección por oquistes de *Cryptosporidium* spp.

Identificar una prevalencia de *Cryptosporidium* spp. del 71.79 % de los bovinos analizados en la LR, representa un dato alarmante, ya que esta tasa es sensiblemente superior a la observada en estudios previos realizados en México, donde se ha sugerido que la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en bovinos puede oscilar del 22 % hasta el 67 % (Maldonado *et al.*, 1998; Vázquez-Flores, 2000; Castillo-García *et al.*, 2009), con un nivel de infección más alto para terneros, tal como se presentó en el presente estudio (Fayer *et al.*, 1997, Castillo-García *et al.*, 2009). Se ha encontrado que la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en bovinos es variable, y que esto está íntimamente ligado a la edad de los animales, el manejo sanitario en las granjas de producción, así como el acceso a los servicios sanitarios y la calidad del agua (Fayer, 2004; Zanaro & Garbossa, 2008; Pulido-Medellín *et al.*, 2014). En otras regiones del mundo, la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en bovinos ha sido reportada desde un 30 % a más del 70 %; por ejemplo, en España se ha reportado una prevalencia del 72.75 % (Lentze *et al.*, 1999; Cardona *et al.*, 2011; Silverlas *et al.*, 2012); en Turquía en un 31.4 % (Degerli *et al.*, 2005); en Colombia

Table 1.
Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in the analyzed samples for both groups of sampled bovines by Ziehl-Neelsen and PCR.

Tabla 1.
Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en las muestras analizadas para ambos grupos de bovinos muestreados por Ziehl-Neelsen y PCR.

Sampled groups	Analyzed samples	Positive results <i>Cryptosporidium</i> spp. by Ziehl-Neelsen	Positive results <i>Cryptosporidium</i> spp. by PCR	Prevalence of <i>Cryptosporidium</i> spp. (PCR) (%)
Calves	39	20	22 ^a	87.17
Milked Cows	39	30	34 ^a	56.41
Total	78	50	56	71.79

^aThere was no statistical significance in prevalence between milked cows and calves ($p > 0.05$).

^aNo hubo significancia estadística en la prevalencia entre adultos y terneros ($p > 0.05$).

75 % has been reported (Valera *et al.*, 2001). In other Latin American countries such as Brazil, the prevalence of *Cryptosporidium* spp. is low compared to Mexico. For example, Meireles *et al.* (2011), found that 10.7 % of cattle in cowsheds from São Paulo, Brazil contained the presence of *Cryptosporidium* spp. Paz e Silva *et al.* (2013), determined a prevalence of 14 % in cattle also in São Paulo, Brazil, in which calves showed a prevalence of 26 % and adults only in 2 %. Lombardelli *et al.* (2019), found a prevalence of 25.5 % of *Cryptosporidium parvum* in the central region of Argentina, determining a positive correlation among animals with diarrhea compared to those that did not present the symptom. For its part, Palacios-Ordóñez (2017), identified the prevalence of *Cryptosporidium* spp. in calves from 0 to 4 months and its relationship with the contamination of water bodies in San Fernando canton region, Azua province, Ecuador. In this investigation, it was determined that 93.3 % of the calves contained the presence of *Cryptosporidium* and in 92.2 % of the water samples the presence of the parasite was also found, in concentrations of 5 oocysts/100 mL. This research suggests that fattening animals can be considered responsible for the presence of the parasite in water bodies and for the incidence in children in the study area, who presented an incidence of 14.3 %.

In adult cattle, 17 of the 39 samples tested were negative. Studies conducted by Castro-Hermida *et al.* (2002); Fayer *et al.* (2007) and Castillo-García *et al.* (2009), suggest that age is not a risk factor for *Cryptosporidium* spp. infection, which was confirmed in the present study, where the statistical analysis did not show any significant differences ($p > 0.05$) between age groups (Table 1). It is important to mention that the majority of negative results in the analyzed calves came from dairy farms with 2 to 10 cattle, where calves were raised with their mothers. Cacciò & Widmer (2014), suggested that the number of animals in the farm determines the incidence of *Cryptosporidium* infection, with a higher frequency in unhealthy animals present in large flocks, due to a high load of fecal pathogens. In the present study, most of the samples came from intensive dairy production systems, where frequently the number of animals exceeds 600, and in which it is common practice to separate the animals from their mothers a few hours after birth. Calves are held in wooden cages where they are with other animals of the same age to feed them with a bottle, commonly used to feed more than one

el 53.3 % (Vergara & Quilez, 2004) y 48 % (Pulido-Medellín *et al.*, 2014); y en Venezuela se reportó una prevalencia del 43 % al 75 % (Valera *et al.*, 2001). En otros países latinoamericanos como Brasil, la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. es baja en comparación con México. Por ejemplo, Meireles *et al.* (2011), encontraron que el 10.7 % de los bovinos de establos en São Paulo, Brasil contenían la presencia de *Cryptosporidium* spp. Paz e Silva *et al.* (2013), determinaron una prevalencia del 14 % en bovinos también en São Paulo, Brasil, en los que los terneros mostraron una prevalencia del 26 % y los adultos sólo en el 2 %. Lombardelli *et al.* (2019), encontraron una prevalencia del 25.5 % de *Cryptosporidium parvum* en la región central de Argentina, determinando una correlación positiva entre los animales con diarrea en comparación con aquellos que no presentaban el síntoma. Por su parte, Palacios-Ordóñez (2017), identificó la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en terneros de 0 a 4 meses de edad y su relación con la contaminación de cuerpos hídricos en la región del cantón San Fernando, provincia del Azua, Ecuador. En esta investigación se determinó que el 93.3 % de los terneros contenían la presencia de *Cryptosporidium* y en el 92.2 % de las muestras de agua también se encontró la presencia del parásito, en concentraciones de 5 oocistas/100 mL. Esta investigación sugiere que los animales de engorda pueden ser considerados como responsables de la presencia del parásito en cuerpos de agua y de la incidencia en niños en el área de estudio, quienes presentaron una incidencia del 14.3 %.

En bovinos adultos, 17 de las 39 muestras analizadas resultaron negativas. Los estudios realizados por Castro-Hermida *et al.* (2002); Fayer *et al.* (2007) y Castillo-García *et al.* (2009), sugieren que la edad no es un factor de riesgo para la infección por *Cryptosporidium* spp., lo que se confirmó en el presente estudio, donde el análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los grupos de edad (Tabla 1). Es importante mencionar que la mayoría de los resultados negativos en los terneros analizados provinieron de establecimientos lácteos con 2 a 10 bovinos, donde se crían los terneros con sus madres. Cacciò & Widmer (2014), sugirieron que el número de animales en la granja determina la incidencia de infección por *Cryptosporidium*, con una mayor frecuencia en animales no sanos presentes en grandes bandadas, debido a una carga alta de patógenos fecales. En el presente estudio, la mayoría de las muestras provenían de sistemas intensivos de producción de lácteos, donde frecuentemente el número de animales supera los 600 y en los que es una práctica común la separación de los animales de sus madres (unas horas después de nacer). Los terneros se mantienen en jaulas de madera donde están con otros animales de la misma edad para alimentarlos con un biberón, comúnmente utilizado

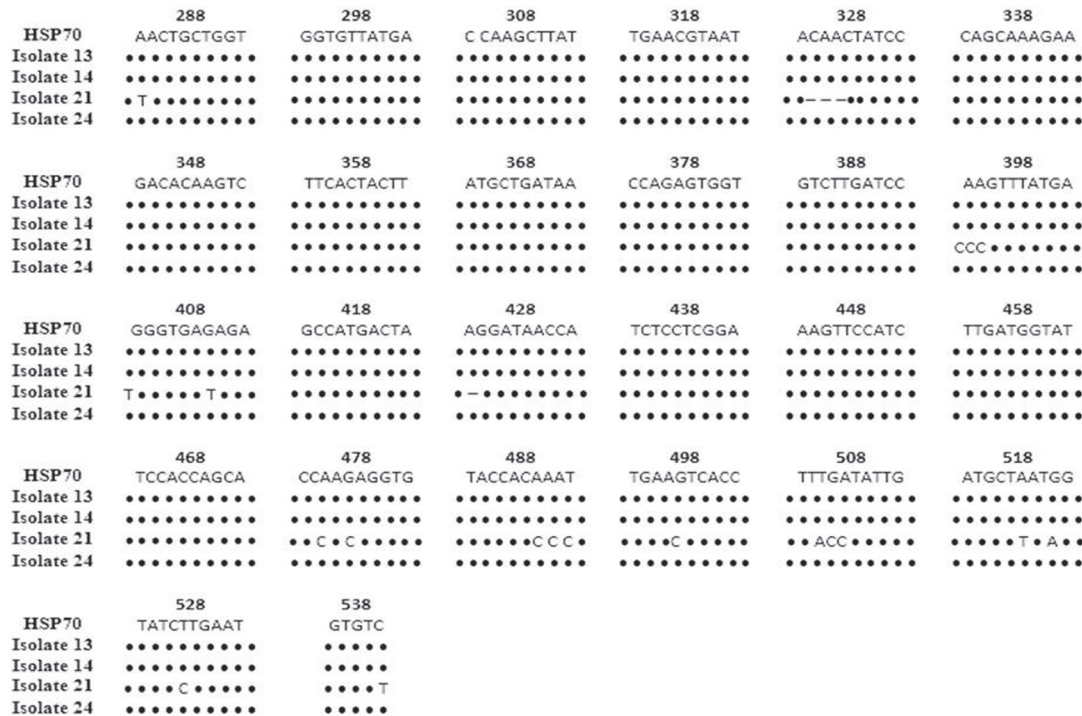


Figura 2. Análisis de secuencias del gen *Hsp 70* de cuatro aislados seleccionados (13, 14, 21, 24) obtenidas en la LR durante el presente estudio. Los círculos negros muestran la homogeneidad entre los nucleótidos aislados y las referencias del GenBank. Las secuencias ausentes y las sustituciones de bases nitrogenadas son representadas

Figure 2. Sequence analysis of the *Hsp 70* gene of four selected isolates (13, 14, 21, 24) obtained from the LR during the actual study. Dots show homology between isolated nucleotides and GenBank references. Sequence deletions and nucleotide substitutions are represented by hyphens and nitrogenous bases, respectively.

animal, and where Good Management and Cleaning Practices are not generally applied, increasing the probability to transmit *Cryptosporidium* spp. and other microorganisms (Fayer & Xiao, 2008; Cacciò & Widmer, 2014). Studies conducted by Castro-Hermida *et al.*, (2002), showed that *Cryptosporidium parvum* infection decreases when lactating animals were kept together with their mothers, in contrast to those in contact with animals of the same age.

For the molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in the stool samples analyzed, PCR products of *Hsp 70* gene were selected and sequenced from 25 samples that were positive and they were compared with data published in the GenBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). This analysis showed 100 % identity with *Cryptosporidium parvum*.

para alimentar a más de un animal, y donde generalmente no se aplican las Buenas Prácticas de Manejo y de limpieza, aumentando la probabilidad de transmisión de *Cryptosporidium* spp. y otros microorganismos (Fayer & Xiao, 2008; Cacciò & Widmer, 2014). Estudios realizados por Castro-Hermida *et al.* (2002), mostraron que la infección por *Cryptosporidium parvum* disminuye cuando los animales lactantes se mantienen junto con sus madres, en contraste con los que están en contacto con animales de la misma edad.

Para la identificación molecular de *Cryptosporidium* spp. en las muestras de heces analizadas, se seleccionaron y secuenciaron los productos de PCR del gen *Hsp 70* de 25 muestras que resultaron positivas y se compararon con los datos publicados en el GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Este análisis mostró una

Only isolate 21 showed a 91 % similarity with *Hsp 70* gene (Figure 2), which suggests that *C. parvum* may be responsible for the cryptosporidiosis of calves in the LR, which differs with other studies, where up to four *Cryptosporidium* species causing cryptosporidiosis in cattle have been identified (Amer et al., 2013; Ananta et al., 2014).

Conclusions

In the present study, a general prevalence of 71.79 % of *Cryptosporidium* was determined in dairy herd animals of the Lagunar Region (LR), where freshly weaned calves showed the highest prevalence, with 87.17 %; while the adults evaluated had a prevalence of 56.41 %. *Cryptosporidium parvum* was the species that was present in 100 % of the 25 samples sequenced and compared in NCBI GenBank, so it can be considered as an endemic species in the LR. Results suggest that the age of cattle is not a factor that determines *Cryptosporidium* infection, since its prevalence in calves did not show significant differences compared to adults. The high prevalence of *C. parvum* in cattle of dairy herds represents a risk for the dairy industry in the LR, as well as public health if manure is applied as a fertilizer in agricultural fields. It is suggested to continue monitoring the presence of microorganisms of interest such as *Cryptosporidium*, which provide evidence for a better management of cattle in dairy herds in the LR, as well as to reduce milk-associated sanitary and public health risks.

References

- Amer, S., Zidan, S., Adamu, H., Ye J., Roellig, D. and Xiao, L. (2013). Prevalence and characterization of *Cryptosporidium* spp, in dairy cattle in Nile River delta provinces, Egypt. *Experimental Parasitology*, 135: 518-523. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.09.002>
- Ananta, SM., Hidayat, A. and Matsubayashi, M. (2014). Survey on gastrointestinal parasites and detection of *Cryptosporidium* spp. on cattle in West Java, Indonesia. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7: 197–201. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60020-1](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60020-1)
- Budu-Amoako, E., Greenwood, S.J., Dixon, B.R., Barkema, H.W. and McClure J.T. (2012). Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* on beef farms and water sources within the vicinity of the farms on Prince Edward Island, Canada. *Veterinary Parasitology*, 184: 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.10.027>
- Cai, M., Guo, Y., Pan, B., Li, N., Wang, X., Tang, C., Feng, Y. and Xiao, L. (2017). Longitudinal monitoring of *Cryptosporidium* species in pre-weaned dairy calves on five farms in Shanghai, China. *Veterinary Parasitology*, 241: 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.05.005>

identidad del 100 % con *Cryptosporidium parvum*. Solo el aislado 21 mostró un 91% de similitud con el gen *Hsp70* (Figura 2), lo que sugiere que *C. parvum* puede ser responsable de la criptosporidiosis de terneros en la LR, que difiere con otros estudios, donde se han identificado hasta cuatro especies de *Cryptosporidium* causando criptosporidiosis en el ganado (Amer et al., 2013; Ananta et al., 2014).

Conclusiones

En el presente estudio, se pudo determinar una prevalencia general del 71.79 % de *Cryptosporidium* en animales de hatos lecheros de la Región Lagunar (LR), donde los terneros recién destetados mostraron la mayor prevalencia, con el 87.17 %; mientras que los adultos evaluados tuvieron una prevalencia del 56.41 %. *Cryptosporidium parvum* fue la especie que estuvo presente en el 100 % de las 25 muestras que fueron secuenciadas y comparadas en el GenBank de NCBI, por lo que se puede considerar como una especie endémica en la LR. Los resultados sugieren que la edad de los bovinos no es un factor que determine la infección por *Cryptosporidium*, ya que su prevalencia en terneros no mostró diferencias significativas en comparación con la de los adultos. La alta prevalencia de *C. parvum* en bovinos de hatos lecheros representa un riesgo para la industria lechera de la LR, así como de salud pública si el estiércol es aplicado como abono en los campos agrícolas. Se sugiere continuar monitoreando la presencia de microorganismos de interés como *Cryptosporidium*, que aporten evidencia para un mejor manejo de los bovinos en hatos lecheros de la LR, así como disminuir los riesgos sanitarios y de salud pública asociados a la leche.

- Cacciò, S. M. & Widmer, L. (2014). *Cryptosporidium*: parasite and disease. (1st Ed.) Springer-Verlag, Wien. XI: 564. <http://www.springer.com/gp/book/9783709115619>
- Cardona, G.A., Carabin, H., Goñi, P., Arriola, L., Robinson, G., Fernández-Crespo, J.C., Clavel, A., Chalmers, R. M. and Carmena, D. (2011). Identification and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in children and cattle populations from the province of Álava, North of Spain. *The Science of the Total Environment*, 413: 101-108. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.09.076>
- Casemore, D.P., Armstrong, M. and Sands, R. (1985). Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Pathology*, 38: 1337-1341. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.38.12.1337>
- Castillo-García, C., Cruz-Vázquez, C., Lopez-Revilla, R., Sanchez-Garza, M., Rosario-Cruz, R., Vitela-Mendoza, I. and Medina, Esparza L. (2009). Frequency and identification of *Cryptosporidium* spp. in confined suckling dairy calves in Aguascalientes, Mexico. *Técnica Pecuaria en México*, 47: 425-434.
- Castro-Hermida, J., González-Losada, Y.A. and Ares-Mazás, E. (2002). Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, 106: 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00036-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00036-5)
- Degerli, S., Celiksoz, A., Kalkan, K. and Ozcelik, S. (2005). Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in Cows and Calves in Sivas. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29: 995-999. <http://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/issues/vet-05-29-4/vet-29-4-8-0403-4.pdf>
- Di Giovanni, G.D. & LeChevellier, M.W. (2005). Quantitative-PCR assessment of *Cryptosporidium parvum* cell culture infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1495-1500. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1495-1500.2005>
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- Delafosse, A., Chartier, C., Dupuya, M.C., Dumoulin, M., Porsc, I. and Paraud, C. (2015). *Cryptosporidium parvum* infection and associated risk factors in dairy calves in western France. *Preventive Veterinary Medicine*, 118: 406-412. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.01.005>
- Fayer, R., Gasbarre, L., Pasquali, P., Canals, A., Almeria, S. and Zarlenga, D. (1998). *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *International Journal for Parasitology*, 28(1): 49-56. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00170-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00170-7)
- Fayer, R. (2004). *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, 126(1-2): 37-56. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.004>
- Fayer, R., Santin, M. and Trout, J.M. (2007). Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. *Veterinary Parasitology*, 145: 260-266. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.12.009>
- Fayer, R. & Xiao, L. (2008). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2nd edition, New York: CRC Press. 564.
- Figuerola-Viramontes, U., Núñez-Hernández, G., Reta-Sánchez, D.G. and Flores-López, H.E. (2015). Regional nitrogen balance in the milk-forage production system in the Comarca Lagunera, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 6: 377-392. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-11242015000400377&script=sci_arttext
- Feng, Y. & Xiao, L. (2017). Molecular Epidemiology of Cryptosporidiosis in China. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1701. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01701>
- Fortis-Hernández, M., Leos-Rodríguez, J.A., Preciado-Rangel, P., Orona-Castillo, I., García-Salazar, J.A., García-Hernández, J.L. and Orozco-Vidal, J.A. (2009). Aplicación de abonos orgánicos en la producción de maíz forrajero con riego por goteo. *Terra Latinoamericana*, 27: 329-336. <http://www.scielo.org.mx/pdf/tl/v27n4/v27n4a7.pdf>
- Garro, C.J., Morici, G.E., Utgés, M.E., Tomazic, M.L. and Schnitger, L. (2016). Prevalence and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. oocysts in dairy calves of Buenos Aires Province, Argentina. *Parasite Epidemiology and Control*, 1: 36-41. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2016.03.008>
- Henriksen, S.A. & Pohlenz, J. (1981). Staining of cryptosporidia by a modified Zihel-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 22(3-4): 594-596.
- Karanis, P., Eiji T., Palomino, L., Boonrod, K., Plutzer, J. and Ongerth, J. (2010). First description of *Cryptosporidium bovis*

- in Japan and diagnosis and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in diarrheic pre-weaned calves in Hokkaido. *Veterinary Parasitology*, 169: 387-90. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.014>
- Lentze, T., Hofer, D., Gottstei, B., Gaillard, C. and Busato, A. (1999). Prevalence and importance of endoparasites in calves raised in Swiss cow-calf farms. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 106(7): 275-281. <https://europepmc.org/article/med/10481370>
- Levine, J.F., Levy, M.G., Walker, R.L. and Crittenden, S. (1988). Cryptosporidiosis in veterinary students. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 193(11): 1413-1414. <https://europepmc.org/article/med/3209453>
- Lombardelli, J.A., Tomazic, M.L., Schnittger, L. and Tiranti, K.I. (2019). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* in dairy calves and GP60 subtyping of diarrheic calves in central Argentina. *Research Parasitology*. 118(7): 2079-2086. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06366-y>
- Maldonado, C.S., Atwill, E.R., Saltijeral, O.J.A. and Herrera, A.L.C. (1998). Prevalence and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in Holstein Freisian dairy calves in central Mexico. *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)
- Meireles, M.V., de Oliveira, F.P., Teixeira, W.F.P., Coelho, W.M.D. and Mendes, L.C.N. (2011). Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from the state of São Paulo, Brazil. *Parasitology Research*. 109(3): 949-951. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2336-1>
- Palacios-Ordóñez, T.E. (2017). Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en terneros, y su presencia en agua y en niños con problemas digestivos en el cantón San Fernando, Ecuador. *MASKANA*. 8(1): 111-119. <https://doi.org/10.18537/mskn.08.01.10>
- Paz e Silva, F.M., Souza-Lopes, R. and Araújo-Junior, J.P. (2013). Identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy cattle in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 22(1): 22-28. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013005000010>
- Pulido-Medellín, M.O., Andrade-Becerra, R.J., Rodríguez-Vivas, R.I. and García-Corredor, D.J. (2014). Prevalence and possible risk factors for *Crptosporidium* spp. oocyst excretion in dairy cattle in Boyacá, Colombia. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 5(3): 357-364. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242014000300008
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). (2011). Suplemento de Economía, Comarca Lagunera. Publicación Anual. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Delegación en la Región Lagunera. Subdelegación de Ganadería. Lerdo, México. 25-30 pp.
- Salazar-Sosa, E., Trejo-Escareño, H.I., Vázquez-Vázquez, C. and López-Martínez, J.D. (2007). Producción de maíz bajo riego por cintilla, con aplicación de estiércol bovino. *International Journal of EXPERIMENTAL Botany* (ϕYTON), 76: 169-185. <http://www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar/vol76/salazar-sosa.pdf>
- Silverlas, C., Mattsson, J., Insulander, M. and Lebbad, M. (2012). Zoonotic transmission of *Cryptosporidium meleagridis* on an organic Swedish farm. *International Journal for Parasitology*, 42(11): 963-967. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.08.008>
- Sterk, A., Schijven, J., De Roda-Husman, A.M. and De Nijs, T. (2016). Effect of climate change on runoff of *Campylobacter* and *Cryptosporidium* from land to surface water. *Water Research*, 95: 90-102. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.005>
- Swaffer, B.A., Vial, H.M., King, B.J., Daly, R., Frizenschaf, J. and Monis, P.T. (2014). Investigating source water *Cryptosporidium* concentration, species and infectivity rates during rainfall-runoff in a multi-use catchment. *Water Research*, 67: 310-320. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.055>
- Thompson, R.C.A., Koh W.H. and Clode, P.L. (2016). *Cryptosporidium* — What is it?. *Food and Waterborne Parasitology*, 4: 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2016.08.004>
- Thompson, R.C.A. & Ash, A. (2016). Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infection Genetics and Evolution*, 40: 315-23. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.09.028>
- Valera Z., Quintero W., Villarroel R. and Hernández E. (2001). *Cryptosporidium* spp. en una finca del municipio Rosario del Perijá, Estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias-LUZ*, 11(3): 213-218. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/14771/14748>

- Vázquez-Flores S. 2000. Criptosporidiosis en bovinos. En: Temas Selectos de Parasitología. Ibarra VF, Quiroz RH, editores México, DF., 2: 1-18.
- Vergara, C. & Quílez, J. (2004). Criptosporidiosis: una zoonosis parasitaria. *MVZ-Córdoba*, 9(1): 363-372. <https://doi.org/10.21897/rmvz.504>
- Xiao, L. & Feng, Y. (2008). Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunology and Medicals Microbiology*, 52(3): 309-323. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00377.x>
- Yap, N.J., Koehler, A.V., Ebner, J., Tan, T.K., Lim, Y.A.L. and Gasser, R.B. (2016). Molecular analysis of *Cryptosporidium* from cattle from five states of Peninsular Malaysia. *Molecular and Cellular Probes*, 30(1): 39-43. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.01.002>
- Zanaro, N.L. & Garbossa, G. (2008). *Cryptosporidium*: cien años después. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42: h195-201. <https://www.redalyc.org/pdf/535/53542204.pdf>