



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**

Tesis para acceder al título de Doctor
en Ciencia, Tecnología e Innovación Agropecuaria

**Epidemiología y caracterización molecular de la
cryptosporidiosis bovina en sistemas de crianza artificial
de la cuenca lechera del departamento
General San Martín, Córdoba**

Médico Veterinario Joaquín Andrés Lombardelli

DIRECTORA: PhD Karina Ivana Tiranti

CODIRECTOR: PhD Douglas McIntosh

Río Cuarto, Octubre 2020



COMISIÓN ASESORA Y JURADO

Nombre y Apellido: Dra. María Marta Reynoso. *Lugar de Trabajo:* Depto. de Microbiología e Inmunología. Fac. de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. UNRC.

Firma: Aclaración:

Nombre y Apellido: Dr. Leonhard Schnittger. *Lugar de Trabajo:* Instituto de Patobiología, CICVyA-INTA Castelar, Buenos Aires.

Firma: Aclaración:

Nombre y Apellido: Dr. Carlos Esteban Rossanigo. *Lugar de Trabajo:* EEA-INTA San Luis

Firma: Aclaración:

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha.....

Calificación.....



Dedicatoria y Agradecimientos



Resumen

La crianza de terneros es uno de los aspectos de mayor relevancia en el proceso de producción de leche, cumpliendo primariamente la función de reposición de las vacas que anualmente son eliminadas del rodeo. La diarrea neonatal de los terneros es uno de los principales problemas de salud en tambos en todo el mundo. La cryptosporidiosis bovina es una de las principales causas de diarrea neonatal en terneros de tambos. Las principales especies de *Cryptosporidium* que infectan a los bovinos son *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium andersoni* y *Cryptosporidium ryanae*. Entre ellas, *C. parvum* y *C. bovis* son las especies más comúnmente identificadas en terneros pre-destete. Los tamaños de los ooquistes de las especies de *Cryptosporidium* que afectan a los terneros de tambo son similares, por lo tanto, es indispensable para su clasificación y determinación utilizar técnicas de biología molecular. Es por todo esto que se pretende caracterizar molecularmente la importancia del género *Cryptosporidium* spp. en terneros de la cuenca lechera del Departamento General San Martín (Córdoba), evaluar los factores de riesgo de la cryptosporidiosis, el patrón espacial presente respecto del tipo de suelo y determinar la transmisibilidad hasta los 30 días de vida. Como primer objetivo se planteó realizar la optimización de la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar a nivel molecular las especies de *Cryptosporidium*. Para concretar el mismo se probaron tres métodos de extracción de ADN, se realizaron diversos ensayos para optimizar la técnica de PCR y se realizaron análisis de RFLP-PCR para muestras con alta y baja intensidad de infección. La técnica de extracción de ADN que utiliza un primer paso de congelado y descongelado de las muestras resultó ser el método más conveniente para ser utilizado. Fue necesario utilizar una concentración de 1,5mM de MgCl₂ y una temperatura de anidación de 58°C. La técnica resultó ser altamente dependiente de la intensidad de infestación de ooquistes y demanda que se realicen modificaciones cuando son de baja o alta intensidad de infestación. El segundo objetivo fue caracterizar las especies de *Cryptosporidium* presentes, calcular la prevalencia global y describir la asociación entre los factores de riesgo de los terneros de tambo y la presencia de *Cryptosporidium parvum* en terneros. En cada uno de los 54 establecimiento visitados se extrajo una muestra de materia fecal a todos los terneros menores de 60 días de vida. Se utilizó una encuesta para recopilar datos acerca del manejo de los terneros con el fin de identificar los factores de riesgo. Se determinó la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. mediante la tinción modificada en frío de Ziehl-Neelsen. Posteriormente, se determinó cual era la especie de *Cryptosporidium* presente en las muestras que resultaron positivas a través de RFLP-PCR. Se calculó la prevalencia de *C. parvum* global para todos los terneros muestreados y la prevalencia por establecimiento. Además, se estudió la asociación entre cada uno de los factores del ternero y la presencia en heces de *C. parvum*. La especie de *Cryptosporidium* prevalente en terneros menores de 60 días es *C. parvum*, resultando una prevalencia global de 25,5%. Las prevalencias más altas se observaron en terneros de dos y tres semanas de vida. Los terneros parasitados con *C. parvum* fueron asociados fuertemente con el riesgo de presentar diarrea, resaltando la importancia de *C. parvum* como uno de los principales microorganismos responsables de la diarrea neonatal en terneros de tambos del área de estudio. Medidas de manejo en los establecimientos como reducir el tiempo de permanencia de los terneros junto a sus madres después de nacer fue una medida con una tendencia a disminuir el riesgo de sufrir cryptosporidiosis en terneros de tambos. El tercer objetivo consistió en describir la distribución espacial y de conglomerados de *C. parvum* en sistemas de crianza artificial y su relación con el tipo de suelo. Para esto se registraron las coordenadas geográficas utilizando un



GPS Garmin en cada establecimiento visitado. El análisis espacial consistió en la descripción de la prevalencia de *C. parvum* para cada establecimiento por medio de un mapa de puntos en el sistema de información geográfica QGIS 3.6.0. Se realizó un análisis visual de la superposición en el mapa de los establecimientos afectados y el tipo de suelo que éstos poseen. Además, el análisis espacial se utilizó para identificar y localizar conglomerados espaciales significativos para la prevalencia predial de *C. parvum* en la zona de estudio. Todos los análisis espaciales fueron realizados en el programa SaTScan® v 9.4.4. La prevalencia de *C. parvum* observada fue muy variable entre los establecimientos. Dos conglomerados estadísticamente significativos fueron determinados. En uno de ellos, el riesgo de tener establecimientos con altas prevalencias fue casi dos veces mayor (RR: 1,64, p: 0,008). En el otro conglomerado, se observó que el riesgo de encontrar establecimientos con baja prevalencia es cuatro veces mayor (RR: 0,26, p: 0,003). El suelo que poseen los establecimientos ubicados en el primer conglomerado son imperfectamente drenados presentando una moderada salinidad lo que genera una pobre vegetación en los espacios donde se alojan los terneros.



Resumo



Abstract



Índice de contenido

Dedicatoria y Agradecimientos	3
Resumen	4
Resumo	6
Abstract.....	7
INTRODUCCIÓN GENERAL	12
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS.....	21
Objetivo General.....	21
Objetivos Específicos.....	21
Capítulo I: Optimización de la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar las especies de <i>Cryptosporidium</i> a nivel molecular.	23
Conclusiones	30
Capítulo II: Prevalencia, factores de riesgo y subgenotipos de <i>Cryptosporidium parvum</i> en terneros de tambos de la cuenca lechera del Departamento General San Martín, Córdoba. 32	
Introducción	32
Objetivo.....	34
Hipótesis de la investigación.....	34
Preguntas de investigación	34
Materiales y métodos	35
Resultados	40
Discusión.....	47
Conclusiones	51
Capítulo III: Distribución espacial y de conglomerados de <i>Cryptosporidium parvum</i> en sistemas de crianza artificial y su relación con el tipo de suelo. ¡Error! Marcador no definido.	



Introducción;Error! Marcador no definido.
Objetivo.....;Error! Marcador no definido.
Hipótesis de la investigación.....;Error! Marcador no definido.
Preguntas de investigación;Error! Marcador no definido.
Materiales y métodos;Error! Marcador no definido.
Resultados;Error! Marcador no definido.
Discusión.....;Error! Marcador no definido.
Conclusiones;Error! Marcador no definido.

Capítulo IV: Dinámica de la infección por *Cryptosporidium parvum* en terneros desde el nacimiento hasta los 30 días de vida y los factores que influyen en su incidencia. ;Error!

Marcador no definido.

Introducción;Error! Marcador no definido.
Objetivo.....;Error! Marcador no definido.
Hipótesis de la investigación.....;Error! Marcador no definido.
Preguntas de investigación;Error! Marcador no definido.
Materiales y métodos;Error! Marcador no definido.
Resultados;Error! Marcador no definido.
Discusión.....;Error! Marcador no definido.
Conclusiones;Error! Marcador no definido.

CONCLUSIONES FINALES 53

BIBLIOGRAFIA 55

ANEXOS 61

Anexo 1: Extracción de ADN. 61

Anexo 2: Determinación de la intensidad de infección. Purificación de ooquistes. 62

Anexo 3. Variables medidas en cada uno de los terneros muestreados. 63



Anexo 4. Datos descriptivos del total de terneros muestreados en la cuenca lechera Villa María, Departamento General San Martín, Córdoba, Argentina.	63
Anexo 5. Número de vacas totales y terneros muestreados por establecimiento lechero	66
Anexo 6. Asociación entre subgenotipo de <i>C. parvum</i> y edad. Frecuencia de subgenotipos por establecimiento	99
Anexo 7. Distribución de la prevalencia de <i>C. parvum</i> por semana de edad y por establecimientos	100
Anexo 8: Estudio de cohorte. Media, mediana y rango de inicio y duración de excreción de ooquistes de <i>C. parvum</i> . Correlación entre inicio y duración de excreción de ooquistes de <i>C. parvum</i>	101
Anexo 9: Estudio de cohorte. Asociación entre la infección con <i>C. parvum</i> en edad temprana y casos de diarrea, duración de diarrea y aumentos diarios de peso vivo. ..	102



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN GENERAL

La crianza de terneros es uno de los aspectos de mayor relevancia en el proceso de producción de leche, cumpliendo primariamente la función de reposición de las vacas que anualmente son eliminadas del rodeo. Al mismo tiempo, se requiere maximizar el nivel de inmunidad del ternero contra enfermedades y minimizar la exposición a agentes infecciosos (Godden, 2008).

La producción de leche en Argentina está concentrada mayoritariamente en las provincias de Córdoba (37%), Santa Fe (32%) y Buenos Aires (25%), y en menor medida en Entre Ríos (3%), Santiago del Estero (1%) y La Pampa (1%) (Sanchez *et al.* 2012). En el año 2018 había 7069 tambos, que se distribuían en un 30% en Santa Fe, 27% en Córdoba, 21% en Buenos Aires y 8,6% en Entre Ríos (Censo Nacional Agropecuario-CNA-2018). Dentro de la provincia de Córdoba se pueden diferenciar claramente 3 cuencas lecheras (región dentro de la provincia en la cual existe una mayor densidad de tambos) de suma importancia: cuenca Sur (zona de Huinca Renancó), cuenca Noreste (zona de San Francisco) y cuenca del departamento General San Martín (zona de Villa María). Esta última aporta el 43% de la producción tambera provincial (Censo Nacional Agropecuario 2018). Dentro de la cuenca General San Martín el 72 % del total de vacas y el 68 % de los tambos se concentran en los estratos de 101 a 500 vacas totales (Sanchez *et al.* 2012).

La diarrea neonatal, definida como la manifestación de diarrea en el primer mes de vida de los terneros, es uno de los principales problemas de salud en tambos en todo el mundo (De la Fuente *et al.* 1999; Castro-Hermida *et al.* 2002; Bazeley, 2003) y además es la principal condición responsable por pérdidas de terneros durante los primeros dos meses de vida (Gulliksen *et al.* 2008; Wudu *et al.* 2008; Razzaque *et al.* 2010). En nuestro país, la diarrea neonatal de los terneros es una enfermedad grave y frecuente, que produce pérdidas económicas cuantiosas, incluyendo pérdidas directas (gastos de prevención, gastos por tratamientos medicamentosos y mortalidad asociada) y pérdidas indirectas (disminución del peso, retraso en el crecimiento de los terneros afectados, pérdida de mejora genética, tiempo que el personal dedica a atender a los animales enfermos, etc.) (Parreño, 2008; Stanton *et al.*



2012). El período comprendido entre el nacimiento y el desleche constituye una situación altamente estresante para el ternero, haciéndolo muy susceptible a un amplio espectro de microorganismos patógenos, lo que provoca que la morbilidad y mortalidad sean muy elevadas en esta etapa inicial (Jasper *et al.* 2008). La diarrea neonatal es una enfermedad multifactorial que involucra la interacción de microorganismos patógenos con el estado inmune-nutricional del ternero y los diferentes factores ambientales y de manejo (alimentación, higiene y tipo de crianza). La severidad y duración de la diarrea dependen de la virulencia del agente patógeno implicado, de la dosis infectante, edad del ternero, eficiencia de la inmunidad pasiva y del grado de estrés ambiental. Las causas de la diarrea neonatal pueden ser de origen infeccioso o no. *Escherichia coli* K99/F5, rotavirus, coronavirus y *Cryptosporidium* spp. (más del 85% de los casos *C. parvum*) son los 4 enteropatógenos causantes de diarrea neonatal en terneros más importantes reportados en el mundo (Meganck *et al.* 2014). Mientras que rotavirus y *C. parvum* son frecuentemente aislados en terneros menores de quince días de edad, *E. coli* K99/F5 es la causa de diarrea en terneros de 1-4 días de edad (McGuirk, 2008). Las causas no infecciosas más frecuentes son: peso al nacimiento del ternero, concentración de IgG en suero, tipo de ventilación, humedad relativa del ambiente, alimentación con sustituto lácteo entre otros (Ballou *et al.* 2015; Urie *et al.* 2018).

La cryptosporidiosis bovina es una de las principales causas de diarrea neonatal en terneros de tambos, los terneros con cryptosporidiosis pueden padecer diarrea profusa, letargia, anorexia y deshidratación. En casos de terneros con cryptosporidiosis severa pueden tardar de 4 a 6 semanas en recuperarse (Olson *et al.* 2004), ocasionando pérdidas económicas debido a las infestaciones relacionadas con la diarrea y costos especiales extras para el cuidado que demandan los terneros diarreicos. En las vaquillonas y vacas adultas causa infecciones asintomáticas (Santin *et al.* 2008). Si bien se han aislado diferentes especies de *Cryptosporidium* spp. tanto en humanos, animales domésticos y animales vertebrados silvestres, estudios de epidemiología molecular han demostrado que el bovino es una de las especies más comunes de mamíferos infectados con *Cryptosporidium* spp. (Xiao, 2010). Los terneros recién nacidos, especialmente en sistemas de crianza artificial de tambo, es la categoría de bovinos mayormente afectados (Santin *et al.* 2008; Silverlas *et al.* 2009a). Las



principales especies de *Cryptosporidium* que infectan a los bovinos son *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium andersoni* y *Cryptosporidium ryanae* (Santin, *et al.* 2004; Feng, *et al.* 2007; Ryan *et al.* 2014). Entre ellas, *Cryptosporidium parvum* y *C. bovis* son las especies más comúnmente identificadas en terneros pre-destete, mientras que *C. andersoni* y *C. ryanae* son reportadas frecuentemente en terneros post-destete, vaquillonas y vacas adultas (Santin, *et al.* 2008; Ryan *et al.* 2014). Estudios de biología molecular determinaron un amplio rango de especies y genotipos de *Cryptosporidium* en animales, muchos de los cuales no son comúnmente encontrados en humanos. Sin embargo, el ganado, y en particular el ganado bovino y ovino, son un importante reservorio de subgenotipos de *C. parvum* que puede ser transmitidos por vía fecal/oral a los humanos, luego del contacto directo o indirecto con los animales infectados (Robertson *et al.* 2002; Ryan *et al.* 2014; Kinross *et al.* 2015). Si bien *C. bovis* y *C. andersoni* han sido reportado en humanos, se sostiene que solamente *C. parvum* es un agente zoonótico importante y responsable de brotes de diarrea en humanos tanto en países desarrollados como en desarrollo, afectando especialmente a personas inmunocomprometidas y niños (Xiao y Feng, 2008; Ryan *et al.* 2014). Además, en países en desarrollo de África y el sudoeste de Asia, las infecciones asociadas a *Cryptosporidium* han demostrado estar asociadas con un incremento en la mortalidad de niños con diarrea entre los 12 y 23 meses de edad (Kotloff *et al.* 2013). Por el contrario, estudios de subgenotipificación molecular basados en la glicoproteína de superficie de 60 kDa (GP60) han demostrado que muchas de las infecciones en humanos con *C. parvum* no son el resultado de transmisiones zoonóticas (Xiao 2010).

Altos valores de prevalencia de *Cryptosporidium* spp. han sido reportados en terneros de tambo. La prevalencia en todo el mundo, a nivel del número de establecimientos en los cuales la infección por *Cryptosporidium* spp. fue reportada, es muy variable, pudiendo ser desde 13 hasta 100% (Hamnes *et al.* 2006; Brook *et al.* 2008; Trotz-Williams *et al.* 2008; Silverlas *et al.* 2009a; Tiranti *et al.* 2011; Smith *et al.* 2014; Al Mawly *et al.* 2015; Delafosse *et al.* 2015; Avedaño *et al.* 2018). Controlar la prevalencia de *Cryptosporidium* y en particular las infecciones con *C. parvum* puede ser ventajoso porque se encuentra asociado con enfermedad en los terneros y es un potencial agente zoonótico. Pero para lograr este objetivo es pertinente identificar los factores de riesgo. Medidas de manejo que actúan como factores



de riesgo de cryptosporidiosis en los terneros han sido descriptos, como por ejemplo el método y la frecuencia de la limpieza, tipo de piso, tipo de fuente de agua, tipo de alojamiento, carga animal, tiempo de permanencia con la madre después de nacer y distribución del calostro en baldes (Castro-Hermida et al. 2002; Starkey et al. 2006; Trots-Williams et al. 2008; Silverlas et al. 2009a; Delafosse et al. 2015; Díaz et al. 2018). Factores de riesgo como preventivos fueron determinados en diferentes estudios, con diferentes enfoques en la recolección de datos y análisis estadísticos, así como distintas rutinas de manejo en los establecimientos lecheros (ej: vacunación, razas, alimentación, etc.). Es por esta razón, que los resultados no pueden ser directamente extrapolados a los sistemas de crianza artificial de terneros de Argentina.

En Argentina hasta el momento, existe escasa información en cuanto a la epidemiología molecular de la cryptosporidiosis en terneros de tambo. Los primeros resultados reportados derivan de observaciones al microscopio óptico (Bellinzoni et al. 1990; Del Coco et al. 2008, Tiranti et al. 2011). Estudios previos revelan que la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en terneros de tambo en Argentina se encontraría entre el 16 y 19% (Tiranti et al. 2011; Garro et al. 2016). La caracterización molecular de *C. parvum* y sus subgenotipos puede permitir evaluar su distribución y el potencial zoonótico, así como sus vías de transmisión en los seres humanos y animales en diferentes situaciones epidemiológicas (Thompson y Ash 2016). Además, como los tamaños de los ooquistes de las especies de *Cryptosporidium* que afectan a los terneros de tambo son similares, es indispensable utilizar técnicas de biología molecular para su identificación y determinación (Chalmers y Katzer, 2013). A fin de poder evaluar las posibles fuentes de transmisión de *C. parvum*, la subtipificación intraespecífica del gen que codifica para la glicoproteína de superficie de 60 kDa (GP60) es comúnmente utilizada (Xiao 2010). En consecuencia, la identificación de las variaciones intraespecíficas de *Cryptosporidium* ha sido central en el entendimiento de la dinámica de transmisión de especies con potencial zoonótico. La designación de los diferentes subgenotipos de *C. parvum* se basa en el análisis de la secuencia en la región de repeticiones polimórficas del gen GP60. La nomenclatura de los diferentes subgenotipos consiste en el número de trinucleótidos “TCA” (designado por la letra A), “TCG” (designado con la letra G) y del hexanucleótido “ACATCA” (designado por la letra



R) repetidos en la región microsatélite del gen GP60 (Suleiman *et al.* 2005). Así por ejemplo, en el subgenotipo nombrado IIAA18G1R1, IIA indica que el subgenotipo pertenece a la familia de alelos IIA; A18 indica que el subgenotipo presenta 18 copias repetidas de TCA en su secuencia; G1 indica que presenta una sola copia de TCG y R1 que presenta una copia del hexanucleótido ACATCA. La caracterización molecular de *C. parvum* a nivel de subgenotipo en terneros de tambo, importante para determinar el potencial zoonótico, ha sido realizado en varios países (Santín *et al.* 2008; Xiao y Fayer 2008; Amer *et al.* 2010; Silverlås *et al.* 2013; Smith *et al.* 2014; Kaupke y Rzeżutka 2015). En Argentina dos estudios previos han reportado a *C. parvum* como la única especie presente en 120 terneros de tambo predestete y los subgenotipos identificados fueron: IIAA16G1R1, IIAA17G1R1, IIAA18G1R1, IIAA19G1R1, IIAA20G1R1, IIAA21G1R1, IIAA22G1R1, y IIAA23G1R1 (Tomazic *et al.* 2013; Del Coco *et al.* 2014). Mientras que la asociación entre subgenotipos y las diferentes manifestaciones clínicas han sido demostradas en humanos, escasos estudios han probado la hipótesis que un determinado subgenotipo de *C. parvum* está asociado con diarrea en terneros de tambo (Cama *et al.* 2007; Insulander *et al.* 2013; Adamu *et al.* 2014).

Se ha demostrado que los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. son capaces de infiltrarse a través de distintos tipos de suelos (Mawdsley *et al.* 1996), y que los niveles de excreción en terneros son más altos cuando el ambiente es fresco y húmedo (Barwick *et al.* 2003; Fayer, 2004; Maddox-Hytell *et al.* 2006). La capacidad de infiltración de los ooquistes de *C. parvum* depende del tipo de suelo y la vegetación de cobertura de éste. La utilización de vegetación colocada en lugares estratégicos puede reducir el riesgo de contaminación del agua con *C. parvum* de los sistemas ganaderos (Tate *et al.* 2004; Koch *et al.* 2013). La recuperación de ooquistes infectivos de la superficie de suelos es muy alta cuando éstos son pobremente escurridos, sin vegetación de cobertura y con alto contenido de arcilla (Davidson *et al.*, 2014). En un estudio realizado en la zona central de Argentina, Tiranti *et al.* (2011) observaron que establecimientos con alta prevalencia de *Cryptosporidium* spp. estaban localizados en áreas de suelos con poco drenaje. Además, localizaron un conglomerado primario de establecimientos con alta prevalencia en la misma zona, observando un riesgo de casi 3 veces mayor comparado con rodeos fuera del conglomerado. El efecto del establecimiento detectado en éste estudio podría deberse a la ubicación geográfica de los



mismos, debido a que los suelos pobremente drenados mejoran las condiciones ambientales de los ooquistes de *Cyptosporidium* para que éstos se mantengan viables en la superficie por un largo periodo de tiempo (Davies *et. al*, 2005).

Existe una gran variación en cuanto a la incidencia de enfermedades en los sistemas de crianza artificial de terneros, con un importante impacto en los tambos comerciales. Además de los costos del tratamiento de los terneros afectados, las consecuencias económicas pueden incluir una reducción en la tasa de crecimiento, mayor mortalidad, incremento en la edad al primer servicio y mayor dificultad de parir en el primer parto (Lopez de Maturamna *et al*. 2007; Stanton *et al*. 2012). Kaneene y Hurd (1990) estimaron que el costo anual para terneros con problemas en los sistemas de crianza artificial puede ser entre U\$S 14,71 y U\$S 33,46 por ternero a riesgo de enfermarse. Las pérdidas económicas específicamente asociadas a la cryptosporidiosis aún no fueron estudiadas y hasta el momento no se ha determinado el efecto a largo plazo que causa *C. parvum* en los terneros de tambo. Limitar el contacto entre los terneros y retrasar el inicio de eliminación de ooquistes son dos factores que han demostrado indicios que influyen en la incidencia de *Cryptosporidium* spp. (Zambriski *et al*. 2013a). Estudios anteriores observaron que mientras más joven el ternero adquiere la infección, más largo será el periodo infeccioso (Castro-Hermida *et al*. 2002; Zambriski *et al*. 2013a). En infecciones experimentales se demostró que tan sólo 17 ooquistes de *C. parvum* son suficientes para causar diarrea neonatal (Zambriski *et al*. 2013b) y que terneros naturalmente infectados pueden eliminar cantidades excesivas de ooquistes tales como treinta y ocho mil millones de ooquistes ($3,8 \times 10^{10}$) por un período de seis días (Nydham *et al*. 2001). La habilidad de *C. parvum* de multiplicarse rápidamente en el intestino y de poder establecerse luego de la exposición a un pequeño número de ooquistes, hace de la cryptosporidiosis una de las enfermedades más dificultosas para su control en los establecimientos lecheros. Además, las drogas utilizadas para tratar terneros con cryptosporidiosis son de baja eficacia, los desinfectantes comúnmente empleados en los establecimientos no son efectivos y no existe hasta la actualidad una vacuna que prevenga casos nuevos.



Es por ello, que se considera necesario evaluar la relevancia de *Cryptosporidium parvum* en terneros de sistemas de crianza artificial, como posible fuente de contaminación de la cadena alimentaria, visto que la diseminación no ha sido estudiada en sistemas no estabulados presentes en el área de estudio propuesta. Si bien se evaluará la presencia de otras especies de *Cryptosporidium* spp. los análisis realizados fueron para *C. parvum*, debido a que es la única especie aislada hasta el momento en terneros de tambo en nuestro país.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



HIPÓTESIS

- A) *Cryptosporidium parvum* es la única especie de *Cryptosporidium* spp. en los establecimientos estudiados, siendo predominante en terneros menores de 30 días de vida.

- B) La prevalencia de *C. parvum* en terneros está asociada a suelos con poco drenaje formando un conglomerado de alta prevalencia.

- C) La infección por *C. parvum* muestra su mayor incidencia entre los 15 y 20 días de vida de los terneros.

- D) La infección por *C. parvum* puede verse influenciada por atributos y factores del ternero tales como el consumo inadecuado de calostro.

- E) La infección por *C. parvum* puede verse influenciada por eventos relacionados al parto.



OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar a nivel molecular las especies de *Cryptosporidium* spp. aisladas de terneros de la cuenca lechera del Departamento General San Martín (Córdoba), evaluando los factores de riesgo de la cryptosporidiosis, el patrón espacial presente respecto del tipo de suelo, y determinar la transmisibilidad hasta los 30 días de vida.

Objetivos Específicos

1. Optimizar la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar a nivel molecular las especies circulantes de *Cryptosporidium* en la región estudiada.
2. Determinar la prevalencia global y describir la asociación entre los factores de riesgo de los terneros de tambo y la presencia de *Cryptosporidium parvum* en la cuenca lechera del Departamento General San Martín (Córdoba).
3. Describir la distribución espacial y de conglomerados de *Cryptosporidium parvum* en sistemas de crianza artificial y su relación con el tipo de suelo.
4. Describir la dinámica de la infección por *Cryptosporidium parvum* en terneros desde el nacimiento hasta los 30 días de vida y los factores que influyen en su incidencia.



CAPÍTULO 1



*Capítulo I: Optimización de la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar las especies de *Cryptosporidium* a nivel molecular.*

El desarrollo de este capítulo fue dividido en tres secciones:

- I. Extracción de ADN
- II. Optimización de la técnica PCR
- III. Análisis RFLP-PCR para muestras de alta y baja intensidad de infestación

I. Extracción de ADN

Se evaluaron tres métodos diferentes de extracción de ADN, éstos se denominaron:

- A) LAPC.QUIAGEN: Lisis Alcalina, fenol-cloroformo y QIAamp DNA Stool Mini Kit. Se realizó un primer paso de digestión de la pared de los ooquistes a través del agregado de una solución alcalina para luego obtener el ADN por medio de la utilización de un kit comercial.
- B) CDPC.QUIAGEN: Congelado/descongelado, fenol-cloroformo y QIAamp DNA Stool Mini Kit. Se realizó un primer paso de ruptura de la pared de los ooquistes a través del congelado y descongelado para luego obtener el ADN por medio de la utilización de un kit comercial.
- C) CDPC.AE: Congelado/descongelado, fenol-cloroformo y alcohol isopropílico/etanol. Se realizó un primer paso de ruptura de la pared de los ooquistes a través del congelado y descongelado para luego precipitar las moléculas de ADN obtenidas a través del agregado de alcohol isopropílico.

Los tres métodos fueron comparados en cuanto a la concentración de ADN, calidad de ADN y el costo por muestra procesada (ANEXO 1). Previo a la extracción de ADN, las muestras fueron procesadas con la técnica de purificación de ooquistes (ANEXO 2). Para medir la concentración de ADN se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop ND 2000 (Thermo Fisher Scientific, Willington, USA). La cuantificación de las muestras fue realizada a 260 nm. Dado que las proteínas presentes en las muestras evaluadas absorben a 280 nm, se emplea



el cociente A260/A280 para calcular la pureza del ADN (cuantificación de la calidad de ADN). La relación para ADN puro está entre 1,8 y 2,0.

Con el método CDPC.AE se obtuvo mayor cantidad de ADN en promedio, siendo además el más costo/efectivo (a un menor costo mayor cantidad de ADN obtenida por muestra). Por otra parte, con este método, se obtiene una menor calidad relativa de ADN puro si es comparado con los otros dos (Relación A260/A280 promedio: 1,2) (ANEXO 1).

En conclusión, de las técnicas de extracción de ADN analizadas, CDPC.AE fue el método más conveniente por obtener la mayor cantidad de ADN a un menor costo.

El ADN extraído por esta metodología fue utilizado durante la optimización de la técnica molecular PCR.

II. Optimización de la técnica molecular PCR

Para los primeros ensayos se utilizaron las concentraciones de los reactivos necesarios para la PCR como fueron descritos por Xiao *et al.* (1999), basado en la amplificación del gen 18S del ARNr como blanco. Para lograr una amplificación de un producto de 1325 pb se utilizaron los siguientes iniciadores: 5'- TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' y 5'- CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3'. Cada mezcla de PCR contenía (en volumen final de 50ul), 5ul de PCR buffer, 6 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada uno de los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP mix, PROMEGA), 2 μM de cada uno de los iniciadores, 2,5 U de *Taq* polimerasa (GoTaq polimerasa, PROMEGA), agua bidestilada estéril a volumen final y 2 μl de ADN molde. Un total de 35 ciclos fueron llevados a cabo, cada uno consistió de 94°C por 45seg, 55°C por 45seg y 72°C por 1 min, con una desnaturalización inicial a 94°C por 3 min y una extensión final a 72°C por 7 min (Termociclador: IVEMA, T21, Lavallol-Bs.As, Argentina).

Posteriormente se decidió probar con concentraciones de MgCl₂ más bajas que las descriptas por Xiao *et al.* (1999) porque los resultados obtenidos no fueron los esperados. Además, en los siguientes ensayos se probaron dos temperaturas de anidación diferentes. Una temperatura (55°C) es la recomendada por Xiao *et al.* (1999) y la otra surge de realizar una simple operación matemática que contempla la cantidad de cada nucleótido que posee la secuencia nucleica de los iniciadores utilizados.



La fórmula utilizada fue:

$$\checkmark T \text{ de Anidación} = (2 * (A + T)) + (4 * (C + G))$$

Donde A es el número total de adenina, T es el total de timina, C es el total de citosina y G el total de guanidina.

A partir de esta fórmula se obtuvo una temperatura de anidación diferente para cada iniciador (56 y 62°C, respectivamente), por lo tanto, se decidió hacer una prueba con gradiente de temperatura de anidación para determinar la óptima para esta reacción. Concluida ésta, se obtuvo una temperatura óptima de anidación de 58°C. En todos los ensayos se utilizó la misma muestra como control positivo.

Como resultados destacables, se observó amplificación de un producto de 1300pb aproximadamente cuando se utilizó una concentración de 1,5mM de $MgCl_2$ (Línea 1, 2 y 3. Figura 1.1) y una temperatura de anidación de 58°C (A Figura 1.1). Con igual temperatura de anidación y diferentes concentraciones de $MgCl_2$ se observaron productos inespecíficos (Línea 2 y 3. Figura 1.1). Con temperatura de anidación de 55°C y con diferentes concentraciones de $MgCl_2$ no se observaron productos amplificados (Línea 4, 5 y 6. Figura 1.1).

Como conclusión, se puede afirmar que para realizar la técnica molecular PCR para la amplificación del gen 18S del ARNr como blanco (1325 pb) se debe utilizar una concentración de 1,5mM de $MgCl_2$ y una temperatura de anidación de 58°C.

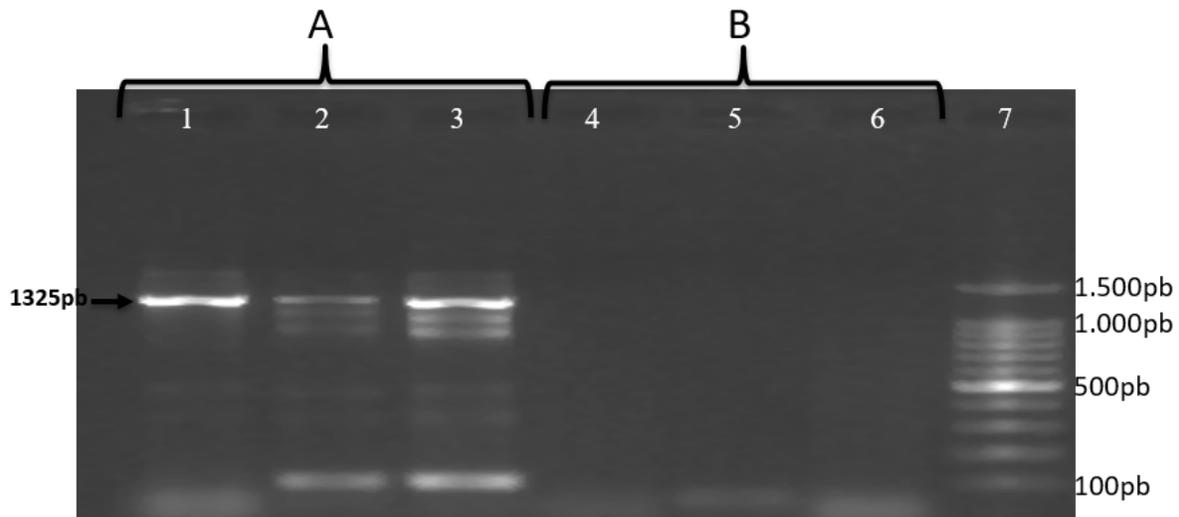


Figura.1.1 Optimización de la técnica molecular PCR basados en la amplificación del gen 18S ARNr como blanco, con la utilización de dos temperaturas de anidamiento diferentes y tres concentraciones de $MgCl_2$ distintas. Temperatura de anidamiento de $58^\circ C$ (A) y $55^\circ C$ (B). Línea 1y 4: $1,5mM$ de $MgCl_2$, Línea 2 y 5: $2mM$ de $MgCl_2$, Línea 3 y 6: $2,5mM$ de $MgCl_2$, Línea 7: marcador de peso molecular. Línea 1, 2 y 3, producto amplificado de $1325pb$. Línea 2 y 3, productos inespecíficos de diferentes tamaños de pb.

III. Análisis PCR-RFLP

Dentro de las variantes de PCR se decidió realizar una técnica que se denomina PCR-RFLP (análisis del polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción). Se utilizó el gen 18S ARNr como blanco, siguiendo las recomendaciones propuestas por Xiao *et al.* (1999), con algunas modificaciones.

Durante la optimización de la técnica molecular PCR, se observó que la misma es altamente dependiente de la intensidad de infección de ooquistes, por lo tanto, se realizaron dos métodos diferentes:

- a. PCR-RFLP para muestras de baja intensidad de infección: *Anidada PCR-RFLP*
- b. PCR-RFLP para muestras de alta intensidad de infección: *Simple PCR-RFLP*

Cabe recordar que la intensidad de infección se obtiene semi-cuantitativamente en base al número promedio de ooquistes observados en 20 campos seleccionados al azar (ANEXO 2). Las muestras categorizadas como 1 se consideran de baja intensidad siendo las categorías



2, 3 y 4 de alta intensidad de infección. Las muestras de la categoría 1 poseían 50 ooquistes por gramo de materia fecal en promedio (Anexo 2).

a. **Anidada PCR-RFLP**

Se realizó una técnica denominada PCR anidada (Nested PCR), que consistió en realizar una primera reacción de amplificación del producto de 1.325 pb con los siguientes iniciadores: 5'- TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' y 5'- CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3'. La mezcla de reacción contenía 1X de PCR buffer (con 1,5 mM de MgCl₂), 0,2 mM de cada uno de los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP mix, PROMEGA), 1 μM de cada uno de los iniciadores, 1,5 U de Taq polimerasa (GoTaq polimerasa, PROMEGA), agua bidestilada estéril a volumen final y 2 μl de ADN molde en un volumen total de reacción de 20 μl. Un total de 35 ciclos fueron llevados a cabo, cada uno consistió de 94°C por 45seg, 58°C por 45seg y 72°C por 1min, con una desnaturalización inicial a 94°C por 3 min y una extensión final a 72°C por 7min (IVEMA, T21, Lavallol-Bs.As, Argentina).

La reacción secundaria para amplificar un producto final de 864 pb fue realizada con los siguientes iniciadores 5'-AGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3' y 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'. La mezcla de reacción contenía 1X de PCR buffer (con 1,5 mM de MgCl₂), 0,1 mM de cada uno de los dNTP, 0,8 μM de cada uno de los iniciadores, 1,5 U de Taq polimerasa, agua bidestilada estéril a volumen final, 1 mM de MgCl₂ y 2 μl del producto final de la primera reacción como molde en un volumen total de reacción de 25μl. Un total de 35 ciclos fueron llevados a cabo, cada uno de 94°C por 30seg., 62°C por 45seg. y 72°C por 45seg., con una desnaturalización inicial a 94°C por 3 min. y una extensión final a 72°C por 5 min (IVEMA, T21, Lavallol-Bs.As, Argentina). En cada ronda de PCR se incluyó ADN proveniente de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* como control positivo y agua doble destilada estéril como control negativo. Los productos finales de las dos rondas de PCR y los controles, se sembraron en un gel de agarosa al 1%, los productos fueron visualizados por tinción del gel con bromuro de etidio (10 mg/ml).

Para el análisis de los fragmentos de restricción, 20 μl del producto final de la segunda reacción fue digerido en una mezcla de 25 μl de volumen final: 2,5 μl del buffer específico



de la enzima de restricción (Buffer G, para SspI y Buffer O, para VspI), 1 µl de la enzima de restricción SspI (10 U/µl, Thermo Fisher Scientific Inc.) o 1 µl de la enzima de restricción VspI (10 U/µl, Thermo Fisher Scientific Inc.) y 1,5 µl agua bidestilada estéril. La mezcla final se colocó en un termobloque (Labnet Accublock D-1100, Biotech, S.L.) y se incubó a 37°C por 1 hora, posteriormente se colocó a 4 – 8 °C durante 2 min, por último, se incubó a 65°C por 20 min. para inactivar la enzima. En cada análisis se incluyó un control positivo (producto de PCR proveniente de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* y agua doble destilada estéril como control negativo).

Los productos de la digestión fueron sembrados en un gel de agarosa al 2% para ser separados por electroforesis, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml) y posteriormente visualizados bajo luz UV. En cada electroforesis una calle fue sembrada con un marcador de peso molecular (100pb DNA Ladder, PROMEGA) (Figura 1.2).

b. Simple PCR-RFLP

Se realizó una única reacción similar a la reacción secundaria realizada a las muestras con baja intensidad de infección, con algunas modificaciones.

La amplificación del producto final de 864 pb se realizó con los siguientes iniciadores 5'-AGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3' y 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'. La mezcla de reacción contenía 1X de PCR buffer (con 1,5 mM de MgCl₂), 0,1mM de cada uno de los dNTP, 1 µM de cada uno de los iniciadores, 1,5 U de Taq polimerasa, agua bidestilada estéril a volumen final, 1 mM de MgCl₂ y 2 µl de ADN molde en un volumen total de reacción de 25µl. Un total de 35 ciclos fueron llevados a cabo, cada uno consistió en 94°C por 30seg., 62°C por 45seg. y 72°C por 45seg., con una desnaturalización inicial a 94°C por 3 min. y una extensión final a 72°C por 5min (IVEMA, T21, Lavallol-Bs.As, Argentina). Los productos finales se sembraron en un gel de agarosa al 1%, y fueron visualizados por tinción del gel con bromuro de etidio (10 mg/ml). Para el análisis de los fragmentos de restricción, se utilizaron las mismas enzimas y condiciones a las desarrolladas para las muestras con baja intensidad de infección. (Figura 1.2).

Como resultados destacables, se logró realizar una técnica molecular (PCR – RFLP), reproducible y que permitió la identificación de las especies de *Cryptosporidium* que afectan



a los terneros. Al digerir los productos de amplificación con las enzimas de restricción (independientemente de la intensidad de infección), se obtuvieron 3 fragmentos con *SspI* (108, 254 y 459pb) y 2 fragmentos con *VspI* (104 y 628pb) (Figura 1.2). Comparando los pesos moleculares de los productos obtenidos con los controles (Figura 1.2 **B**) se observó que la especie identificada correspondió a *Cryptosporidium parvum*. (Figura 1.2 **J2** y **J3**).

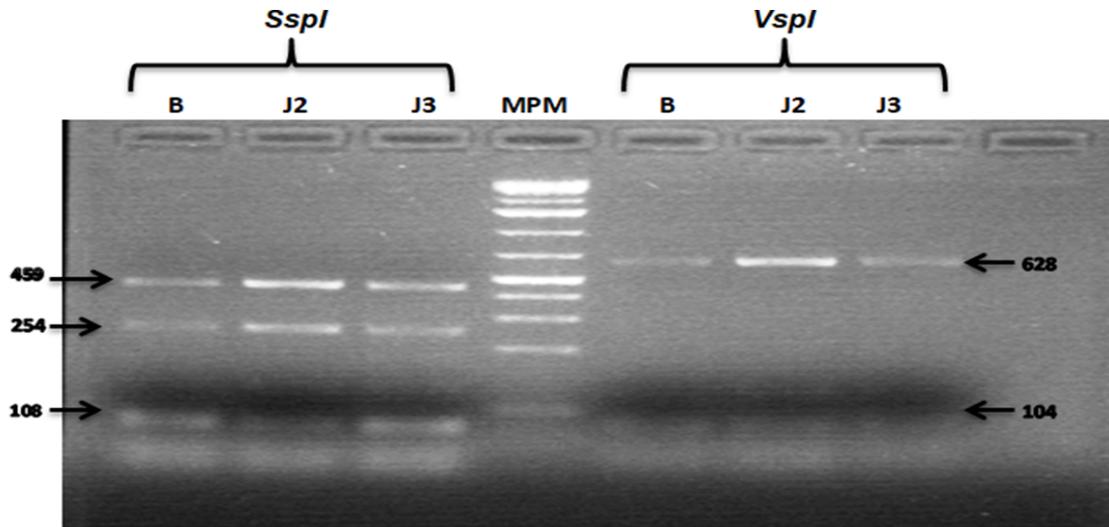


Figura.1.2 Resultado del diagnóstico de especies de *Cryptosporidium* a través de la digestión del producto de la PCR (simple -**J2**- y anidada-**J3**-), basados en la amplificación del gen 18S ARNr como blanco. Se utilizaron dos enzimas de restricción (*SspI* y *VspI*) para analizar el polimorfismo del peso molecular de los fragmentos obtenidos. **B** Control positivo del genotipo *Cryptosporidium parvum* aislado de ternero. **J2** Producto de simple PCR de muestra de alta intensidad de infección digerido con enzimas de restricción. **J3** Productos de PCR de muestra de baja intensidad de infección digerido con enzimas de restricción. **MPM** Marcador de peso molecular. [**J2** y **J3** muestras de materia fecal de terneros de la cuenca lechera Villa María].



Conclusiones

La técnica de extracción de ADN más conveniente fue la denominada “CDPC.AE” debido a que se obtuvo la máxima cantidad de ADN y resultó ser de mayor efectividad a un menor costo, en comparación a las otras dos metodologías.

Para amplificar el gen 18S del ARNr (1325 pb) es recomendable, una concentración de 1,5mM de MgCl₂ y una temperatura de anidación de 58°C.

Esta técnica molecular es altamente dependiente de la intensidad de infección, por lo tanto, es necesario realizar modificaciones cuando las muestras son de baja o alta intensidad de infección.

Si bien un análisis de sensibilidad diagnóstica no fue realizado, el límite de detección para simple PCR se encontraría cerca de los 100 ooquistes. Si la muestra a procesar posee una menor cantidad de ooquistes es recomendable realizar una PCR anidada.



CAPÍTULO 2



*Capítulo II: Prevalencia, factores de riesgo y subgenotipos de *Cryptosporidium parvum* en terneros de tambos de la cuenca lechera del Departamento General San Martín, Córdoba.*

Introducción

La cryptosporidiosis es una enfermedad muy frecuente en terneros de crianza artificial de tambos y puede causar diarreas severas, letargia, anorexia y deshidratación generando cuantiosas pérdidas económicas relacionadas al retraso del crecimiento de los terneros afectados y a la aplicación de tratamientos preventivos y paliativos. De las dos especies de *Cryptosporidium* más comúnmente aislada en los terneros pre-destete de tambo, *Cryptosporidium parvum* es la única que se ha registrado asociada a diarrea neonatal (Brook *et al.* 2008; Trotz-Williams *et al.* 2008; Silverlås *et al.* 2009; Smith *et al.* 2014; Delafosse *et al.* 2015; Al Mawly *et al.* 2015; Avedaño *et al.* 2018). Además, es la única especie aislada en los terneros de tambo de Argentina (Tomazic *et al.* 2013; Del Coco *et al.* 2014). Debido a estas razones es necesario enfocarse en los factores de riesgo específicos de *Cryptosporidium parvum* en el área de estudio, sin dejar de analizar la posibilidad de determinar la presencia de otra especie diferente.

Se han identificado medidas de manejo que actúan como factores de riesgo de cryptosporidiosis en los terneros de tambo como por ejemplo el método y la frecuencia de la limpieza, tipo de piso, tipo de fuente de agua, tipo de alojamiento, carga animal, tiempo de permanencia con la madre después de nacer y distribución del calostro en baldes (Castro-Hermida *et al.* 2002; Starkey *et al.* 2006; Trotz-Williams *et al.* 2008; Silverlas *et al.* 2009a; Delafosse *et al.* 2015). Un significativo incremento de la prevalencia de *Cryptosporidium* se observó en los terneros menores de 30 días de vida (Tiranti *et al.* 2011; Smith *et al.* 2014; Delafosse *et al.* 2015; Avedaño *et al.* 2018). Entre los terneros de este grupo etario, la diarrea neonatal es la principal patología y su control representa el mayor desafío en los sistemas de crianza artificial (Urie *et al.* 2018). Se ha demostrado que *Cryptosporidium parvum* es uno de los principales agentes biológicos asociados a la diarrea neonatal en terneros de tambo de todo el mundo (Trotz-Williams *et al.* 2008; Gulliksen *et al.* 2009; Megnack *et al.* 2015).



Estudios previos en Argentina demostraron que *Cryptosporidium* está fuertemente asociado a la ocurrencia de diarrea neonatal en terneros de tambo y que el factor más significativo es la edad de los mismos, siendo más frecuente la infección en terneros menores de 20 días de edad (Tiranti *et al.* 2011; Garro *et al.* 2016).

Como se ha mencionado anteriormente, la caracterización molecular de *C. parvum* a nivel de subgenotipos en terneros de tambo es importante para determinar el potencial zoonótico, y se han realizado innumerables estudios al respecto (Santín *et al.* 2008; Xiao y Fayer, 2008; Amer *et al.* 2010; Silverlås *et al.* 2013; Smith *et al.* 2014; Kaupke y Rzeżutka 2015). Como resultado de la diversidad intra-especie y el potencial zoonótico diferente de los distintos subgenotipos de *C. parvum*, se han desarrollado diversas técnicas de subgenotipificación molecular. Entre estas técnicas la más ampliamente difundida y utilizada es el análisis de la secuencia de ADN del gen que codifica para la glicoproteína de 60 kDa (GP60) (Xiao, 2010). En Argentina, dos estudios previos informaron la presencia de ocho subgenotipos diferentes de *C. parvum* en terneros de tambo, resultando IIaA21G1R1 y IIaA20G1R1 los subgenotipos más frecuente aislados (Tomazic *et al.* 2013; Del Coco *et al.* 2014). Diferentes manifestaciones clínicas han sido demostradas en humanos dependiendo de la especie y subgenotipo presente (Cama *et al.* 2007; Insulander *et al.* 2013; Adamu *et al.* 2014), no encontrándose dicha asociación en terneros de tambo hasta la actualidad.



Objetivo

Determinar a nivel molecular las especies de *Cryptosporidium* presentes y sus subgenotipos, calcular la prevalencia global y describir la asociación entre los factores de riesgo y la presencia de *Cryptosporidium parvum* en terneros de tambo de la cuenca lechera del Departamento General San Martín (Córdoba).

Hipótesis de la investigación

La especie más abundante de *Cryptosporidium* spp. en los establecimientos estudiados es *Cryptosporidium parvum*, siendo predominante en terneros menores de 30 días de vida.

Preguntas de investigación

¿Cuál es la especie de *Cryptosporidium* más frecuente en terneros de tambo del área de estudio?

¿Cuál es la prevalencia global de *Cryptosporidium parvum* en terneros de tambo del área de estudio?

¿Cuál/es son los factores de riesgo asociados a la cryptosporidiosis en terneros de tambo?

¿La cryptosporidiosis en terneros se asocia al riesgo de presentar diarrea?

¿Cuál/es son los subgenotipos de *C. parvum* presentes en la zona de estudio?

¿Cuál/es son los subgenotipos de *C. parvum* más frecuentes en terneros con diarrea?



Materiales y métodos

Área de estudio y selección de los establecimientos

Cuenca lechera de Villa María ubicada en el Departamento General San Martín en la provincia de Córdoba, Argentina. Dicha cuenca consiste de 564 tambos y concentra el 68% del total de tambos en los estratos de 101 a 500 vacas (Sanchez *et al.* 2011).

Los establecimientos fueron seleccionados al azar desde una base de datos proporcionada por la Asociación Rural de Productores, inscriptos en la Unidad Ejecutora Local-Villa María. La base de datos contaba con el Registro Nacional Sanitario de Productores Pecuarios (RENSPA), nombre y apellido del propietario, dirección postal, teléfono de contacto y total de vacas. Para realizar la selección al azar se utilizó el número de RENSPA. El criterio de inclusión fue establecimientos lecheros que poseían entre 100 y 300 vacas totales, dato tomado en enero de 2013. Un total de 365 establecimientos localizados en el Dpto. General San Martín, Córdoba (Argentina) tenían el criterio de inclusión, de éstos, se seleccionó al azar una muestra de 60 establecimientos (Microsoft Excel, 2010).

Modo de contactar e invitar a los productores

Cada uno de los 60 productores seleccionados fueron contactados por correo postal (febrero, 2013), explicando el objetivo del estudio A través de y posterior comunicación telefónica se coordinó la visita al establecimiento. A comienzos de abril de 2013 se empezó a contactar telefónicamente a los productores seleccionados y coordinando día y horario de la visita. Entre 3 y 5 productores fueron visitados por día, la cantidad de establecimientos, dependió de la disponibilidad de tiempo, la cantidad de terneros que estaban criando en ese momento y la cercanía en distancia entre un establecimiento y otro.

Recolección de las muestras

En cada establecimiento se extrajo una muestra de materia fecal a todos los terneros menores de 60 días de vida, presentes en el momento de la visita. Las muestras de materia fecal fueron tomadas directamente del recto, utilizando guantes y bolsas plásticas con su



respectiva rotulación (número de identificación del ternero). Luego de la extracción, las muestras fueron colocadas en una conservadora con geles conservantes, permitiendo una temperatura $\leq 8^{\circ}\text{C}$, durante el traslado al laboratorio. En el momento de la toma de muestra se recolectó información sobre cada uno de los terneros muestreados, en una planilla se registró el número de identificación del ternero, sexo, fecha de nacimiento, cantidad de partos de la madre, dificultad o no al nacer, consistencia y color de la materia fecal, y presencia de diarrea (Anexo 3).

A todos los terneros que tuvieran entre 24 y 120 horas de nacido (entre 1 y 5 días) se les extrajo una muestra de sangre de la vena yugular, con una aguja (21G x 1 1/2"; 0.8x40mm) y una jeringa descartable (10 ml) para cada ternero. Esta muestra de sangre se utilizó para medir el total de proteínas del suero por refractometría, como una estimación de la concentración total de inmunoglobulinas del suero (Weaver *et al.* 2000).

Encuesta

En cada visita se utilizó una encuesta para recopilar datos acerca del manejo de los terneros con el fin de identificar los factores de riesgo de la infestación por *Cryptosporidium parvum*. Las variables registradas fueron: tipo de cama del ternero, tipo de protección contra el frío, vacunación de la madre para proteger a los terneros de diarrea neonatal, presencia de corral destinado para el parto, tiempo en días que el ternero pasó con la madre luego del parto, desinfección del ombligo al nacimiento, modo de administrar el calostro (forma artificial o naturalmente mamando de la madre), cantidad de calostro en litros administrados artificialmente e utensilio utilizado, tipo de alimento líquido administrado, veces al día que se administró el alimento líquido, cantidad de alimento líquido proporcionado por día y la estación del año en la que nacieron los terneros (Anexo 3). Todas estas medidas de manejo, fueron evaluadas como posibles factores de riesgo, ya que su presencia en los establecimientos podría generar un aumento del número de animales infectados con *C. parvum*. Los factores estudiados fueron seleccionados de acuerdo a la bibliografía consultada, y la encuesta se confeccionó teniendo en cuenta las prácticas de manejo más comunes en los establecimientos.



Técnicas de Laboratorio

Las muestras de materia fecal fueron procesadas con la técnica de Telleman (Allen y Ridley, 1970; Young *et al.* 1979) para concentrar las estructuras parasitarias. Brevemente, se colocaron 5 gramos o 10 ml (si la materia fecal era líquida) en un mortero, al que se le agregó de 10 a 20 ml. de agua destilada, con la ayuda de un pilón se maceró la materia fecal hasta formar una mezcla homogénea, se tamizó con un embudo con malla y la emulsión obtenida fue vertida en un tubo de centrífuga hasta sus 2/3 partes (aprox. 9mL). Posteriormente, se agregó 2 mL de éter etílico y se procedió a la agitación del tubo destapándolo luego lentamente, se centrifugó a 1500 ×g durante 5 minutos, con un golpe seco se eliminó el sobrenadante reservando el sedimento. Seguidamente, se realizó un frotis en un portaobjeto con el sedimento resultante de la técnica mencionada. El frotis se dejó secando a temperatura ambiente durante 24 horas y luego teñido mediante la tinción modificada en frío de Ziehl-Neelsen (Fayer y Xiao, 2008). Para la confirmación de la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. las muestras teñidas fueron observadas al microscopio a aumento de 1000X con el agregado de aceite de inmersión. En las muestras clasificadas como positivas se observaron estructuras redondas de color fucsia/rosadas de un tamaño de 4,5 a 7 µm en contraste con un fondo azul (Fayer y Xiao, 2008). La intensidad de infección fue estimada semi-cuantitativamente en base al número promedio de ooquistes observados en 20 campos seleccionados al azar, las categorías fueron: 0 (sin ooquistes), 1 (1-5 ooquistes por campo), 2 (6-10 ooquistes), 3 (11-15 ooquistes) y 4 (>15 ooquistes) (Chartier *et al.* 2013) (Anexo 2). Para la purificación de ooquistes de las muestras positivas se siguió la metodología propuesta por Coklin *et al.* (2007), con algunas modificaciones (Anexo 2). Posteriormente, se procedió a realizar la extracción de ADN y RFLP-PCR como se describió en el capítulo 1 sección III.

Para realizar la subtipificación de *C. parvum* se seleccionaron las muestras de terneros con diarrea y alta intensidad de infección (grado 3 y 4). Se procedió a amplificar el gen de 878pb que codifica para la glicoproteína de 60kDa (GP60) con PCR, siguiendo el protocolo propuesto por Alves *et al.* (2003). Posteriormente, los productos de PCR fueron secuenciados en ambas direcciones utilizando los mismos iniciadores (Macrogen Inc., Corea). Los cromatogramas de las secuencias obtenidas fueron alineadas y examinados con el programa Vector NTI (InforMax, Inc., USA). Los subgenotipos de *C. parvum* fueron designados



basados en el número de trinucleótidos TCA y TCG, y de hexanucleótido ACATCA repetidos en la región microsatélite del gen GP60 (Sulaiman *et al.* 2005). Las secuencias de nucleótidos fueron depositadas en la base de datos GenBank, con los números de acceso KX768771-KX768816.

Análisis estadístico

La prevalencia de *Cryptosporidium parvum* global para todos los terneros muestreados y por establecimiento fue calculada. Para evaluar la asociación entre la edad de los terneros y la infección de un determinado subgenotipo de *C. parvum* se realizó un test de chi-cuadrado (χ^2).

La asociación entre cada uno de los factores del ternero y la presencia en heces de *Cyptosporidium parvum* fue analizada. La selección de las variables para ser analizadas se basa en la literatura consultada. Las variables analizadas a nivel de ternero fueron: sexo, edad, número de partos de la madre, dificultad en el parto, diarrea, momento del día de la toma de muestra, tipo de cama del ternero, vacunación de la madre para proteger a los terneros de diarrea neonatal, presencia de corral destinado para el parto, tiempo medido en horas que el ternero pasó con la madre luego del parto, si se realizaba una desinfección del ombligo al nacimiento, modo en el que el ternero recibió el calostro después de nacer, cantidad de calostro en litros administrados artificialmente e utensilio utilizado, tipo de leche administrada, veces al día que se administró la leche, cantidad de leche proporcionada por día y la estación del año en la que nacieron los terneros.

Todas estas variables fueron categorizadas (Anexo 3) y se analizó si eran potenciales factores de riesgo para los terneros. Se construyeron modelos de regresión logística para cada variable individualmente. Todas las variables que obtuvieron un valor $p \leq 0,20$ fueron consideradas para construir el modelo de regresión logística multivariado. En el modelo de regresión logística multivariado para evaluar cuanto influye cada variable predictora en la variable respuesta se determinó su significación estadística con un valor $p \leq 0,05$.

La estimación de Odds ratio (OR) fueron analizadas a través de la estimación de máxima probabilidad incondicional (Wald) y los intervalos de confianza fueron calculados utilizando aproximación normal (Wald). Todos los análisis fueron realizados utilizando el



software estadístico R 3.2.3 (Epitools package). Para la selección del modelo final se tuvo en cuenta el criterio de información de Akaike (AIC) que describe la calidad relativa del modelo construido. Las variables con un valor $p > 0,05$ fueron removidas del modelo final.



Resultados

Establecimientos seleccionados

Un total de 60 establecimientos lecheros del departamento General San Martín, Córdoba, Argentina fueron seleccionados al azar, de los cuales 54 fueron analizados (Anexo 5). Seis establecimientos no participaron del estudio, debido a que tenían datos de contactos incorrectos (3), enviaban a sus terneros a un sistema de crianza artificial colectivo (2) y venta de todos los animales en el momento del estudio (1). Los establecimientos fueron visitados en una oportunidad entre los meses de abril de 2013 y marzo de 2014.

Datos descriptivos

Se recolectó un total de 1073 muestras de materia fecal, con un promedio de 20 muestras analizadas por establecimiento (rango 10-66). Un 25% de los terneros presentó diarrea (IC 95%: 22,34; 27,6) en el momento del estudio. Datos descriptivos, distribución de las variables recolectadas de los terneros y de manejo de los establecimientos se detallan en el Anexo 4.

Resultados de laboratorio

Del total de 1073 muestras recolectadas, 282 (26,3%) fueron positivas a la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. El análisis de los fragmentos de restricción obtenidos por PCR-RFLP reveló que un total de 274 terneros presentaron cryptosporidiosis, siendo *Cryptosporidium parvum* la única especie identificada. Las ocho muestras donde la amplificación por PCR no pudo ser obtenida, poseían una baja intensidad de infección (grado 1). De los 274 terneros positivos a *C. parvum*, 35% (n=96) poseían una baja (grado 1), 41% (n=113) mediana (grado 2), 13% (n=36) alta (grado 3) y 11% (n=29) una muy alta (grado 4) intensidad de infección (Tabla 2.1). Con respecto a la consistencia de las heces, 17% (63/372) de los terneros positivos a *C. parvum* presentaron heces clasificadas como sólida (S), 24% (104/432) semisólida (SS), 44% (39/89) líquida (L), 45% (66/147) semilíquida (SL), y 6 % (2/33) meconio (M).



Tabla 2.1 Prevalencia *Cryptosporidium parvum* por semana de edad de los terneros y grados de intensidad de infección.

Edad en semanas	Prevalencia	Intensidad de infección (en grados*)	Porcentaje sobre el total de terneros
1°	19,8%	1	7,9%
		≥ 2	11,9%
2°	46,4%	1	11,9%
		≥ 2	34,4%
3°	29,5%	1	9,8%
		≥ 2	19,6%
4°	19,9%	1	11,6%
		≥ 2	8,2%
5°	18,0%	1	9,0%
		≥ 2	9,0%
6°	22,2%	1	13,9%
		≥ 2	8,3%
7°	8,2%	1	4,1%
		≥ 2	4,1%
ND**	24,04%	1	7,42%
		≥ 2	16,62%

*1 (1-5 ooquistes por campo), 2 (6-10 ooquistes), 3 (11-15 ooquistes) y 4 (>15 ooquistes). Anexo 2.

**ND: edad del ternero no determinada.

Subgenotipos de Cryptosporidium parvum

Para la amplificación y secuenciación del gen GP60, se seleccionaron muestras de 47 terneros con diarrea, de los 65 terneros positivos a *Cryptosporidium parvum* con alta (grado 3) y muy alta (grado 4) intensidad de infección. Todos los subgenotipos de *C. parvum* analizados pertenecieron a la familia IIa. Cinco subgenotipos GP60 *C. parvum* diferentes (IIaA18G1R1, IIaA20G1R1, IIaA21G1R1, IIaA22G1R1, and IIaA24G1R1), fueron identificados (Tabla 2.2). Curiosamente, en todas las secuencias GP60 analizadas, se observó un cambio de un nucleótido de “GAC” a “GGC”, correspondiendo a un cambio de aminoácido (Asparagina a Glicina) en la posición 99, como previamente fue reportado en Argentina (Tomazic *et al.* 2013).

El subgenotipo de *C. parvum* predominante en terneros con diarrea y alta intensidad de infección fue IIaA20G1R1 (25/47), seguido por IIaA18G1R1 (12/47) (Tabla 2.2). Además, un nuevo subgenotipo no anteriormente descrito, IIaA24G1R1 fue aislado de dos terneros.

Tabla 2.2: Subgenotipos GP60 de *Cryptosporidium parvum* en terneros de tambos.

Subgenotipo	Semana de edad ^a				Total	Región geográfica ^b	Referencia
	1°	2°	3°	4°			
IIaA18G1R1	0	5	6	1	12	Argentina (1/46; 13/75)	Tomazic <i>et al.</i> 2013, Del Coco <i>et al.</i> 2014
						Inglaterra (2/51)	Brook <i>et al.</i> 2009
						Holanda (2/129)	Wielinga <i>et al.</i> 2008
						Suecia (3/171)	Silverlås <i>et al.</i> 2013
						Republica Checa (3/137)	Kváč <i>et al.</i> 2011
						Hungría (1/21)	Plutzer <i>et al.</i> 2007
						Serbia y Montenegro (2/18)	Misic y Abe 2007
						Brasil (1/28)	do Couto <i>et al.</i> 2013
IIaA20G1R1	1	16	7	1	25	Argentina (8/46; 27/75)	Tomazic <i>et al.</i> 2013, Del Coco <i>et al.</i> 2014
						Suecia (5/171)	Silverlås <i>et al.</i> 2013
						Serbia y Montenegro (2/18)	Misic y Abe 2007
						Uruguay (40/166)	Caffarena <i>et al.</i> 2020
IIaA21G1R1	0	2	0	0	2	Argentina (15/46; 10/75)	Tomazic <i>et al.</i> 2013, Del Coco <i>et al.</i> 2014
						Suecia (11/171)	Silverlås <i>et al.</i> 2013
						Uruguay (4/166)	Caffarena <i>et al.</i> 2020
IIaA22G1R1	1	5	0	0	6	Argentina (5/46; 16/75)	Tomazic <i>et al.</i> 2013, Del Coco <i>et al.</i> 2014
						Suecia (7/171)	Silverlås <i>et al.</i> 2013
						Alemania (1/53)	Broglia <i>et al.</i> 2008
						Republica Checa (12/137)	Kváč <i>et al.</i> 2011
						Uruguay (19/166)	Caffarena <i>et al.</i> 2020
IIaA24G1R1	0	2	0	0	2	Ninguna	Ninguna
Total	2	30	13	2	47		

^a Frecuencia de aislamiento del subgenotipo GP60 de *C. parvum* por semana de edad de los terneros.

^b País en el cual el subgenotipo fue reportado. Numero de muestras positivas y estudiadas en cada grupo.



Con respecto a la asociación entre la edad del ternero y la infección con un determinado subgenotipo, no hubo diferencia estadísticamente significativa (valor p 0,49) (Anexo 5). Sin embargo, subgenotipos particulares se encontraron sólo en terneros de cierta edad. Por ejemplo, los subgenotipos IIAA21G1R1, IIAA22G1R1, y IIAA24G1R1 sólo fueron observados en terneros de dos semanas de edad o menores. Por el contrario, el subgenotipo IIAA18G1R1 fue encontrado exclusivamente en terneros de dos semanas o mayores, mientras que el subgenotipo predominante, IIAA20G1R1, fue identificado en terneros de todas las edades (Tabla 2.2). El subgenotipo IIAA20G1R1 fue identificado en el 48% (23/48) de los establecimientos que poseían al menos un ternero infectado con *C. parvum* (Anexo 5).

Prevalencia de Cryptosporidium parvum

La prevalencia global de *Cryptosporidium parvum* para todos los terneros estudiados fue del 25,5% (IC 95%: 22,9; 28,2). La prevalencia de *C. parvum* en los terneros menores de 21 días de edad fue del 35% (142/405). Se observó una mayor prevalencia en la segunda semana de vida (46,35%) disminuyendo luego, con un leve incremento en la sexta semana de vida (Figura 2.1). Además, los terneros de segunda semana de edad eliminaron una alta cantidad de ooquistes. En particular, de casi 200 terneros de dos semanas de edad analizados, 70 (34,4%) presentaron un grado de intensidad de infección > 2 (Tabla 2.1), lo que representa la mayor cantidad de ooquistes eliminados al medio ambiente, en comparación con los terneros de diferente edad.

En 48 de los 54 establecimientos se identificó al menos un ternero positivo a *C. parvum* resultando una prevalencia de 89% de establecimientos positivos. La prevalencia de *C. parvum* por establecimiento varió desde 0% al 57% (media, 25%; primer cuartil, 14,7%; tercer cuartil, 36%). En el 50 % de los establecimientos visitados, la prevalencia de *C. parvum* dentro del establecimiento, fue mayor a la media ($> 25,5\%$) (Figura 2.2). No hubo casos de diarrea en seis establecimientos, en tres de estos no se identificaron terneros positivos a *C. parvum*, mientras que en los restantes, uno o dos terneros fueron positivos con un grado 1 (bajo) de intensidad de infección.

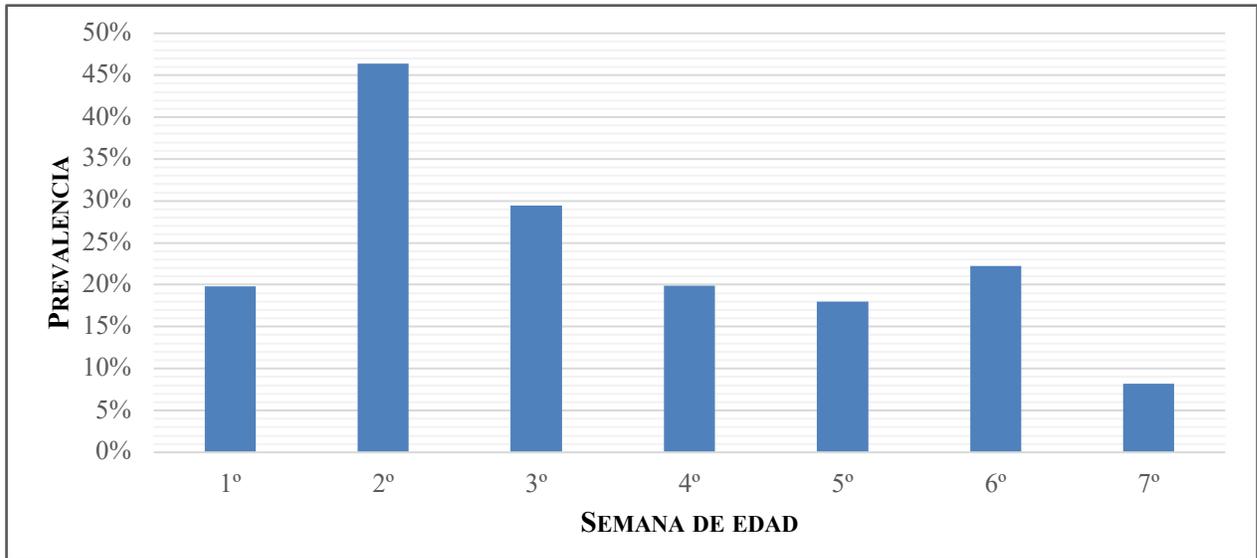


Figura.2.1 Prevalencia de *Cryptosporidium parvum* por semana de edad de los terneros muestreados (n=1073) durante los meses de abril 2013 y marzo 2014, cuenca lechera Villa María, Córdoba.

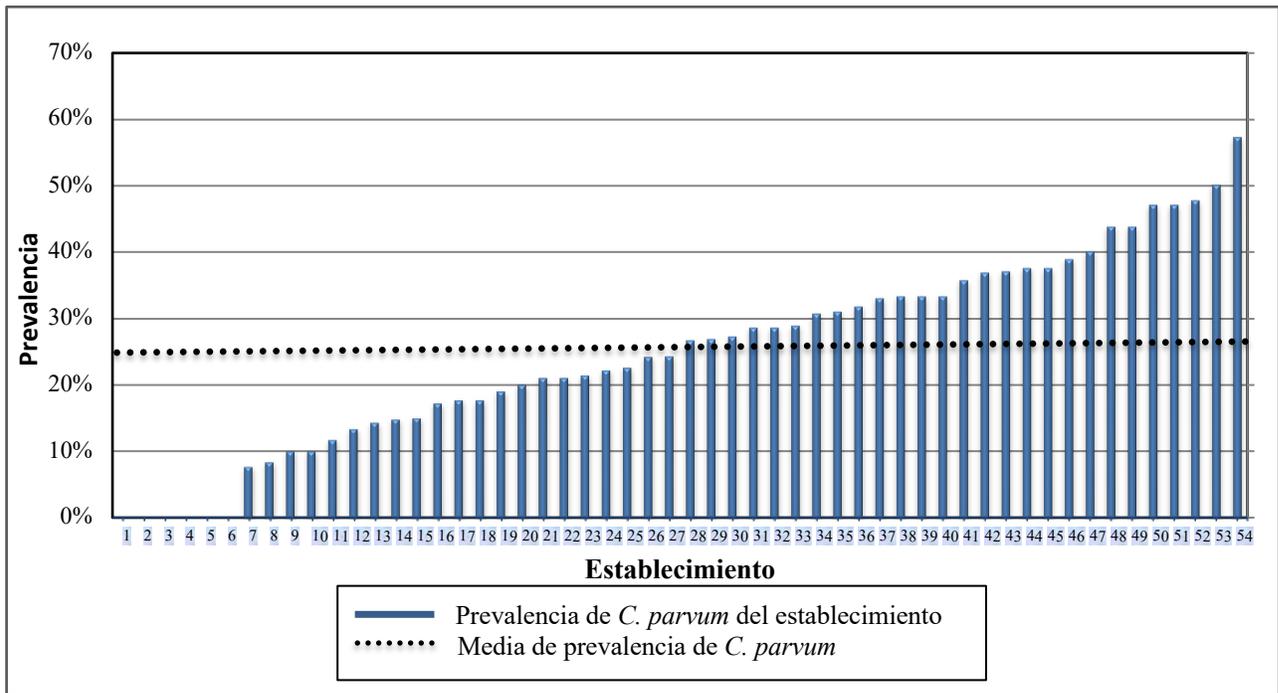


Figura.2.2 Prevalencia de *Cryptosporidium parvum* de cada uno de los establecimientos visitados (n=54), durante los meses de abril 2013 y marzo 2014. Cada barra representa la prevalencia de *C. parvum* observada en cada establecimiento. La línea punteada (...) es la media de prevalencia obtenida en el estudio (25,5%).



Modelo de regresión logística

En el modelo de regresión logística, se analizaron 21 variables de forma individual. De ellas, 13 variables obtuvieron un valor $p \leq 0,20$, por lo que fueron incluidas en un modelo de regresión logística multivariado. En el modelo final, cinco variables resultaron estadísticamente significativas (Tabla 2.3).

Para construir el modelo de regresión logística final se forzó la inclusión de la variable ombligo desinfectado (OD), que si bien no tiene una plausibilidad biológica en el efecto como factor de riesgo para la infestación con *C. parvum* en terneros de tambos, su inclusión mejoró la calidad relativa del modelo estadístico al disminuir el criterio de información de Akaike (AIC). Al incluir la variable OD en el modelo final, hubo una mejora en el AIC, justificando su presencia.

Las variables incluidas en el modelo final fueron: “Diarrea”, “Edad”, “Consistencia de la materia fecal”, “Tiempo con la Madre” y “Ombligo desinfectado” (Tabla 2.3).

Se observaron 2,5 casos de diarrea en terneros infectados con *Cryptosporidium parvum* por cada un caso de diarrea en terneros no parasitados. La edad de los terneros también estuvo asociada al riesgo de infección con *C. parvum*. Los terneros de dos y tres semanas de edad tuvieron más riesgo de estar parasitados con *C. parvum* en comparación con los de cuatro o más semanas de edad. (Tabla 2.3).



Tabla 2.3 Modelo final de regresión logística multivariado con variables asociadas a la infestación por *Cryptosporidium parvum* en terneros de 0 a 60 días de vida en establecimientos de producción lechera de la cuenca lechera del departamento General San Martín, Córdoba, Argentina (n=1073).

Variable	Niveles	OR (IC 95%)	Valor-p
Diarrea	Si vs. No	2,54 (1,89; 3,42)	<0,0001
Edad (en semanas)	1 vs. 4	1,19 (0,67; 2,09)	0,55
	2 vs. 4	3,98 (2,66; 5,96)	<0,0001
	3 vs. 4	2,01 (1,22; 3,30)	0,006
	ND ^a vs. 4	1,52 (1,04; 2,22)	0,03
Consistencia fecal ^b	L vs. S	3,42 (2,24; 5,21)	<0,0001
	SL vs. S	2,41 (1,41; 4,12)	0,001
	SS vs. S	1,62 (1,16; 2,27)	0,005
	M vs. S	0,29 (0,07; 1,23)	0,09
	≥ 3 días vs. ≤ 2		0,06
TCM ^c	días	1,29 (0,91; 1,84)	
OD ^d	Si vs. No	1,19 (0,91; 1,57)	0,0427

OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza 95%.

^a ND: No determinada.

^b L: líquida; SL: semilíquida; S: sólida; SS: semisólida; M: meconio.

^c TCM: Tiempo medido en días que el ternero estuvo junto a la madre después de nacer.

^d OD: Ombligo desinfectado.

Con respecto a la consistencia fecal, las consistencias líquida (L), semilíquida (SL) y semisólida (SS) estuvieron asociadas con la infección de *C. parvum*. Se observaron 3,4 casos de infección con *C. parvum* en terneros con materia fecal líquida por cada un caso de *C. parvum* en terneros con materia fecal sólida. La consistencia de la materia fecal SL y SS, también se comportaron como variables asociadas de riesgo, es decir que los terneros con materia fecal SL o SS tuvieron mayor probabilidad de estar parasitados con *C. parvum* (Tabla 2.3).

Si bien el tiempo medido en días que el ternero estuvo junto a su madre después de nacer, no resultó estadísticamente significativo (p 0,06), se observó una tendencia que, si los terneros permanecieron junto a su madre 3 o más días después de nacer, la probabilidad de estar parasitados con *C. parvum* sería mayor comparando con aquellos terneros que permanecieron al menos 2 días con la madre (Tabla 2.3).



Discusión

La infección con *Cryptosporidium parvum* en terneros es ampliamente extendida en los sistemas de crianza artificial de todo el mundo (Brook *et al.* 2008; Trotz-Williams *et al.* 2008; Al Mawly *et al.* 2015; Qi *et al.* 2015), lo que concuerda con el presente estudio. Además, *C. parvum* fue la única especie identificada en terneros, resultado similar a previos reportes en Argentina (Tomazic *et al.* 2013; Del Coco *et al.* 2014). Sin embargo, a diferencia de estudios previos en Argentina, se obtuvo una alta prevalencia global en terneros (Del Coco *et al.* 2008; Tiranti *et al.* 2011; Garro *et al.* 2016), en particular en terneros menores de 21 días (35%). Probablemente esta diferencia se debió al paso adicional de concentración de ooquistes antes de la observación al microscopio, incrementando significativamente la sensibilidad de detección de ooquistes. En el presente estudio, la fracción de muestras de terneros ≤ 30 días de edad fue del 83% (888/1073), el cual es el rango de edad en donde *C. parvum* es más frecuentemente identificado (Santín *et al.* 2008; Xiao 2010; Ryan *et al.* 2014). Además, Delafosse *et al.* (2015) encontraron que terneros con una alta intensidad de infección de *C. parvum* (grado 3 y 4), predijo un incremento de la tasa de mortalidad a los 90 días de edad. Basado en este descubrimiento, la probabilidad, de que el 23,7% de los terneros con alta intensidad de infección (o 6,1% del total de terneros), del presente estudio hayan muerto, es muy alta.

Al menos un ternero positivo a *C. parvum* fue detectado en el 89% de los establecimientos estudiados. La prevalencia de establecimientos positivos a *C. parvum* reportada en previos estudios es muy variable, pudiendo ser desde 13 hasta 100% (Castro-Hermida *et al.* 2006; Hamnes *et al.* 2006; Brook *et al.* 2008; Trotz-Williams *et al.* 2008; Silverlås *et al.* 2009; Tiranti *et al.* 2011; Smith *et al.* 2014; Al Mawly *et al.* 2015; Delafosse *et al.* 2015; Avedaño *et al.* 2018). De manera similar, a las diferencias considerables de la prevalencia global en terneros y en la prevalencia de establecimientos, también pueden atribuirse a la sensibilidad de las pruebas diagnósticas aplicadas. En efecto, en otro estudio realizado en Argentina, Garro *et al.* (2016) estimaron una prevalencia de establecimientos del 67% (prevalencia global en terneros 16,3%) comparada con 89% (prevalencia global en terneros 26,3%) obtenida en el presente estudio. Otro factor que puede generar valores de prevalencia más bajos, puede ser el hecho muestrear una mayor cantidad de animales de más



edad (30 a 60 días de edad). Es conocido que la prevalencia de *C. parvum* es alta en terneros menores de 30 días de edad (Santin *et al.* 2008). Al mismo tiempo, un número de muestras de animales por establecimiento pequeño reduce la probabilidad de encontrar terneros positivos, particularmente en establecimientos de baja prevalencia. En el presente estudio una sola muestra por ternero fue examinada, por lo tanto, la prevalencia real puede haber sido subestimada.

En el presente estudio se observó que en seis establecimientos no se detectaron terneros con diarrea en el momento de la visita, y en tres de estos seis no hubo terneros positivos a *C. parvum*. Los otros tres establecimientos sólo tenían 1 o 2 terneros positivos a *C. parvum* con grado 1 de intensidad de infección. Además, una alta y significativa asociación se encontró entre la infección con *C. parvum* y la presencia de diarrea (OR: 2,54, IC95%: 1,89; 3,42), lo que resalta la gran importancia de *C. parvum* como uno de los principales enteropatógenos causantes de diarrea neonatal en terneros de tambo (Izzo *et al.* 2010; Al Mawly *et al.* 2015; Meganck *et al.* 2015). Sin embargo, la asociación de *C. parvum* con los casos de diarrea puede haber sido sobreestimada, ya que las posibles co-infecciones con otros microorganismos no fueron evaluadas. Cabe destacar que se pudo identificar un nuevo subgenotipo IIA24G1R1, en dos terneros del mismo establecimiento. Ambos animales mostraron diarrea profusa, alto nivel de deshidratación y aunque recibieron tratamiento, finalmente murieron. Otras pruebas de laboratorio excluyeron a *Salmonella* spp., *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena, Rotavirus y Coronavirus como principales causantes de las muertes.

Si bien se describe un nuevo subgenotipo de *C. parvum* IIA24G1R1, los restantes cuatro subgenotipos reportados en el presente estudio han sido detectados previamente en Argentina. Una alta variabilidad ha sido encontrada en Argentina. Tomazic *et al.* (2013) reportaron seis subgenotipos: IIA17G1R1, IIA18G1R1, IIA20G1R1, IIA21G1R1, IIA22G1R1, y IIA23G1R1 en 45 terneros de tambo. Del Coco *et al.* (2014) describieron siete subgenotipos IIA16G1R1, IIA18G1R1, IIA19G1R1, IIA20G1R1, IIA21G1R1, IIA22G1R1, y IIA23G1R1 en 73 terneros de tambo. El subgenotipo IIA20G1R1 identificado en el presente estudio, fue descrito con alta frecuencia en terneros de tambos de



otras áreas de Argentina (Tomazic *et al.* 2013; Del Coco *et al.* 2014), además en Suecia (Silverlås *et al.* 2013), Serbia y Montenegro (Misic y Abe 2007) y Uruguay (Caffarena *et al.* 2020). El segundo subgenotipo más común, IIAA18G1R1, aparentemente posee una mayor distribución, siendo reportado en Inglaterra (Brook *et al.* 2009), Holanda (Wielinga *et al.* 2008), Suecia (Silverlås *et al.* 2013), República Checa (Kvác *et al.* 2011), Hungría (Plutzer y Karanis 2007), Serbia y Montenegro (Misic y Abe 2007), Brasil (do Couto *et al.* 2013), y Argentina (Tomazic *et al.* 2013; Del Coco *et al.* 2014). En Inglaterra este subgenotipo ha sido identificado en humanos (Chalmers *et al.* 2011) y recientemente el subgenotipo de *C. parvum* IIAA20G1R1 ha sido aislado en un paciente en España (Segura *et al.* 2015), sugiriendo un alto riesgo de transmisión zoonótica. A diferencia de estos hallazgos, un estudio realizado en Argentina y Brasil reportaron que *Cryptosporidium hominis* fue la especie mayormente detectada (Peralta *et al.* 2016) y ninguna persona en Argentina estuvo infectada con *C. parvum*.

En relación a los factores de riesgo analizados, la edad de los terneros y el tiempo que los terneros permanecieron con su madre después de nacer, fueron las únicas que se asociadas a la presencia *C. parvum*. Los terneros de dos y tres semanas de edad tuvieron mayor probabilidad de estar parasitados con *C. parvum* en comparación con los terneros de 4 semanas o mayores. Por el contrario, esta asociación no se observó en terneros de una semana de edad (Tabla 2.3). La categoría de edad asignada como no determinada (ND) estuvo también asociada significativamente con el incremento en el riesgo de infección por *C. parvum*, obteniendo un OR en el modelo final de 1,52, similar al obtenido en la categoría de terneros de entre 16 y 21 días de vida (OR: 2,01. IC95%: 1,22; 3,30). Esto sugiere que la mayoría de estos terneros tenían entre 16 y 21 días de vida. Resultados similares se han reportado en Latinoamérica (Maldonado-Camargo *et al.* 1998; Cardoso *et al.* 2008; Tiranti *et al.* 2011, Garro *et al.* 2016), en América del norte (Santín *et al.* 2004; Starkey *et al.* 2006; Trotz-Williams *et al.* 2007; Szonyi *et al.* 2012), en Europa (Sturdee *et al.* 2003; Kvác *et al.* 2006; Brook *et al.* 2008; Silverlås *et al.* 2009; Smith *et al.* 2014), como así también en Asia, África y Oceanía (Singh *et al.* 2006; Paul *et al.* 2008; Amer *et al.* 2010; Venu *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2015; Al Mawly *et al.* 2015) (Consultar Anexo 7). Esto sumado a que en el presente estudio se observó una alta prevalencia en terneros menores de 21 días (35%),



demuestra que la infección con *Cryptosporidium parvum* es sumamente importante en los terneros de este grupo etario en establecimientos de producción láctea mundialmente.

El tiempo que los terneros permanecieron con sus madres después de nacer mostró una tendencia asociación a la parasitosis con *C. parvum*. Los terneros que permanecieron con su madre por más de 3 días después de nacer tuvieron un 29% más de probabilidad de estar parasitados con *C. parvum* en comparación con los terneros que estuvieron ≤ 2 días. Trotz-Williams *et al.* (2007) observaron que los terneros que permanecieron con sus madres por más de una hora después de nacer tuvieron un 39% más de riesgo de presentar diarrea en comparación con aquellos que fueron separados de su madre inmediatamente después de nacer. Estos autores no encontraron asociación estadísticamente significativa entre el riesgo de estar parasitado con *C. parvum* y el tiempo que los terneros permanecieron con su madre después de nacer. Por el contrario, Silverlås *et al.* (2009) observaron una tendencia decreciente del riesgo cuando se incrementa el tiempo junto con la madre, encontrando que los largos períodos (12-24 horas y de 1-4 días) fueron significativamente diferentes al período de referencia (< 5 horas). Ellos concluyeron que mantener al ternero junto con su madre por un largo período retrasa el contacto con la alta presión de infección encontrada en las instalaciones donde están los terneros al ser separados de su madre, y por lo tanto pueden retrasar la infección. En otros países se ha estudiado la infección de *Cryptosporidium* en vacas peri-parturientas (Fayer *et al.* 2007; Silverlas *et al.* 2009) obteniendo prevalencias muy bajas. Por lo tanto, la razón de la aparente asociación entre el tiempo de permanencia con su madre después de nacer y el riesgo de estar parasitado con *C. parvum* podría estar asociado a otros factores, como por ejemplo una alta contaminación del ambiente en el área de parto.



Conclusiones

La especie prevalente en terneros de tambo menores de 60 días de edad en la cuenca lechera del departamento General San Martín, Córdoba es *Cryptosporidium parvum*.

La prevalencia global de *Cryptosporidium parvum* en terneros de tambos menores de 60 días de edad fue de 25,5% y en los terneros menores de 21 días de edad fue del 35%, siendo estas prevalencias más altas que las esperadas para el área de estudio.

En total cinco subgenotipos GP60 de *C. parvum* fueron identificados, uno de ellos (IIaA24G1R1) representa un nuevo subgenotipo no descrito anteriormente.

El subgenotipo más frecuentemente aislado en terneros con diarrea y alta intensidad de infección fue IIaA20G1R1, seguido por IIaA18G1R1. Ambos subgenotipos fueron aislados en humanos, lo que sugiere un alto riesgo de transmisión zoonótico.

En terneros de dos y tres semanas de edad se observaron altas prevalencias, 46 y 29% respectivamente, por lo tanto, es necesario dirigir estrategias de control hacia los animales de este grupo etario a fin de disminuir el potencial riesgo en el mantenimiento de la parasitosis en los establecimientos.

Los terneros parasitados con *C. parvum* fueron asociados fuertemente con el riesgo de presentar diarrea (OR: 2,54. IC95%: 1,89; 3,42), lo que resalta la importancia de *C. parvum* como uno de los principales microorganismos responsables de la diarrea neonatal en terneros de tambos del área de estudio.

La reducción del tiempo de permanencia de los terneros junto a sus madres después de nacer, disminuiría el riesgo de infección con *C. parvum* en terneros de tambo, por lo tanto, sería una adecuada medida de manejo en los establecimientos.



CONCLUSIONES
FINALES



CONCLUSIONES FINALES

- ✓ ¿Cuál es la especie de *Cryptosporidium* más frecuentemente aislada y cuál es la prevalencia global de *C. parvum* en terneros de tambo del área de estudio?
C. parvum fue la única especie aislada reportando una prevalencia global de 25,5%.
- ✓ ¿Cuál/es son los factores de riesgo asociados a la cryptosporidiosis en terneros de tambo?
La edad de los terneros resultó estar fuertemente asociada a la cryptosporidiosis siendo más frecuente en terneros de 2 y 3 semanas, además, el tiempo que los terneros permanecieron con sus madres después de nacer, mostró una tendencia a aumentar el riesgo de cryptosporidiosis.
- ✓ ¿La cryptosporidiosis en terneros se asocia al riesgo de presentar diarrea?
Sí, resultó estar fuertemente asociado (OR:2,54; IC 95%: 1,89; 3,42), resaltando la importancia de *C. parvum* como uno de los principales microorganismos responsables de la diarrea neonatal en terneros de crianzas artificiales del área de estudio.
- ✓ ¿Cuál/es son los subgenotipos de *C. parvum* presentes en la zona de estudio?
Cinco subgenotipos GP60 *C. parvum* diferentes (IIaA18G1R1, IIaA20G1R1, IIaA21G1R1, IIaA22G1R1, y IIaA24G1R1), pudieron ser identificados en la cuenca lechera Villa María del departamento General San Martín, Córdoba.
- ✓ ¿Cuál/es son los subgenotipos de *C. parvum* más frecuentes en terneros con diarrea y alta intensidad de infección?
El subgenotipo de *C. parvum* predominante en terneros con diarrea y alta intensidad de infección fue IIaA20G1R1 (25/47), seguido por IIaA18G1R1 (12/47).
- ✓ ¿La prevalencia de *C. parvum* está distribuida uniformemente en todo el territorio estudiado?
No, la prevalencia de *C. parvum* es muy variable (Rango 0-57%) en los establecimientos del territorio estudiado.
- ✓ ¿Se puede identificar y localizar conglomerados espaciales para la prevalencia predial de *C. parvum* en la zona de estudio?
Sí, se pudieron identificar dos conglomerados estadísticamente significativos.
- ✓ ¿El tipo de suelo que los sistemas de crianza artificial poseen está asociado a la prevalencia de *C. parvum*?



Sí se encontró asociado. La prevalencia de *C. parvum* fue más alta en los sistemas de crianza artificial de terneros con un tipo de suelo imperfectamente drenado, alcalino y con moderada salinidad. Por el contrario, cuando el suelo presentó adecuadas condiciones de drenaje la prevalencia fue menor.

- ✓ ¿La incidencia de *C. parvum* está asociada a la edad de los terneros naturalmente infectados, y a qué edad experimentan una mayor incidencia?
Sí, estuvo asociada a la edad de los animales observándose una mayor frecuencia de casos nuevos en las terneras de 13 días de vida, en donde hubo 75 casos nuevos de *C. parvum* por cada cien terneros sanos al inicio del día trece de vida.
- ✓ ¿Cuándo los terneros se infectan con *C. parvum* a pocos días de nacer poseen un periodo de patencia más prolongado?
Sí, existió una correlación significativa ($p < 0,001$) entre la edad de inicio de la infección y la duración. Mientras menor es la edad que la ternera adquiere la infección, mayor será el período de patencia de *C. parvum*.
- ✓ ¿Cuáles de los factores individuales y de manejo estudiados posee un efecto en la incidencia de *C. parvum*?
Dos factores estudiados estuvieron asociados, siendo éstos, cuando las terneras sufren dificultad durante el parto y de falla de transferencia pasiva de inmunidad, la infección con *C. parvum* se produce en los primeros días de vida.
- ✓ ¿La incidencia de la infección con *C. parvum* está asociada a los casos de diarrea neonatal?
Sí, cuando las terneras fueron positivas a *C. parvum* antes de los 8 días de edad tuvieron 4 veces más probabilidad de presentar diarrea.
- ✓ ¿Cuál es el efecto de la infección por *C. parvum* en la duración y gravedad de los casos de diarrea neonatal?
Cuando la infección por *C. parvum* se presentó antes de los 8 días de edad, las terneras tuvieron 2,7 veces más probabilidad de presentar diarrea por ≥ 3 días.
- ✓ ¿Cuál es el efecto de la infección por *C. parvum* en el aumento diario de peso vivo?
Si las terneras se infectan con *C. parvum* antes de los 8 días de edad resultaron 7,6 veces con mayor probabilidad de presentar un aumento diario de peso vivo menor a 500 g/día.



BIBLIOGRAFIA

- Adamu, H., Petros, B., Zhang, G., Kassa, H., Amer, S. y Ye, J. 2014. Distribution and clinical manifestations of *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV/AIDS patients in Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis* 8 (4):e2831. doi: 10.1371/journal.pntd.0002831.
- Amer, S., Honma, H., Ikarashi, M., Tada, C., Fukuda, Y. y Suyama, Y. 2010. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in dairy calves in Egypt. *Vet Parasitol* 169:382-386. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.01.017.
- Avendaño, C., Ramo, A., Vergara-Castiblanco, C., Sánchez-Acedo, C. y Quílez, J. 2018. Genetic uniqueness of *Cryptosporidium parvum* from dairy calves in Colombia. *Parasitol Res* 117: 1317-1323. doi: 10.1007/s00436-018-5818-6.
- Allen, A.V.H. y Ridley, D.S. 1970. Further observations on the formol-ether concentration technique for faecal parasites. *J. Clin. Pathol.* 23, 545-546.
- Al Mawly J., Grinberg A., Prattley D., Moffat J., Marshall J. y French, N. 2015. Risk factors for neonatal calf diarrhoea and enteropathogen shedding in New Zealand dairy farms. *The Vet. Journal.* 203, 155-160.
- Almeida, A.J. De, Oliveira, F.C.R. De y Teixeira, C.S. 2008. Risco relativo da infecção por parasitos do gênero *Cryptosporidium* em bezerros bovinos no norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17, 243- 248.
- Atwill, E.R., L. Hou, B.M. Karle, T. Harter, K.W. Tate, and R.A. Dahlgren. 2002. Transport of *Cryptosporidium parvum* Oocysts through Vegetated Buffer Strips and Estimated Filtration Efficiency. *Applied and Environmental Microbiology.* 68:5517-5527.
- Atwill, E.R., K.W. Tate, M. Das Gracas C. Pereira, J.W. Bartolome, and G.A. Nader. 2006. Efficacy of Natural Grass Buffers for Removal of *Cryptosporidium parvum* in Rangeland Runoff. *J. Food Protection.* 69:177-184.
- Ballou, M.A, Hanson, C.J., Cobb, B.S., Obeidat, M.D., Sellers, A.R., Pepper-Yowell, J., Carroll, T., Earleywine, y Lawhon, S. 2015. Plane of nutrition influences the performance, innate leukocyte responses, and resistance to an oral *Salmonella enterica* serotype Typhimurium challenge in Jersey calves. *J. Dairy Sci.* 98:1972-1982.
- Bartels, C.J.M., Holzhauser, M., Jorritsma, R., Swart, W.A.J.M., Lam, T.J.G.M., 2010. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Prev. Vet.Med.* 93, 162–169.
- Barwick, R.S., Mohammed, H.O., White, M.E., Bryant, R.B. 2003. Factors Associated with the Likelihood of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in Soil from Dairy Farms. *Prev. Vet. Med.* 59, 1–11.
- Bellinzoni R. C., Blackiiall, J., Terzolo, H.R. , Morejrn, H.R., Auzn, N., Mattion , N., Micheo, G.L., La Torre, J.L. y Scodeller, E.A. 1990. Microbiology of diarrhoea in young beef and dairy calves in Argentina. *Rev. Arg. Micro.* 22, 130-137.
- Brook, E., Hart, C.A., French, N. y Christley, R. 2008. Prevalence and risk factors for *Cryptosporidium* spp. infection in young calves. *Vet. Par.* 152, 46-52.
- Brook, E.J., Hart, C.A., French, N.P. y Christley, R.M. 2009. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. *Vet. J.* 179, 378–382.
- Barwick, R.S., Mohammed, H.O., White, M.E. y Bryant, R.B. 2003. Prevalence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. on dairy farms in southeastern New York State. *Prev. Vet. Med.* 59, 1-11.
- Bazeley, K. 2003. Investigation of diarrhoea in the neonatal calf. *In Practice.* 25 (3), 152-159
- Castro-Hermida, J.A., González-Losada, Y.A. y Ares-Mazas, E. 2002. Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). *Vet. Par.* 106 (1), 1-10.
- Cama, V.A., Ross, J.M., Crawford, S., Kawai, S., Chavez-Valdez, R., Vargas, D., Vivar, A., Ticona, E., Ñavincopa, M., Williamson, J., Ortega, Y., Gilman, R.H., Bern, C., y Xiao, L. 2007. Differences in Clinical Manifestations among *Cryptosporidium* Species and Subtypes in HIV-Infected Persons. *JID.* 196, 684-691.
- Caffarena R. D., Meireles M.V., Carrasco-Letelier L., Picasso-Risso C., Nicoletti S., Riet-Correa F. y Giannitti F. 2020. Dairy Calves in Uruguay Are Reservoirs of Zoonotic Subtypes of *Cryptosporidium parvum* and Pose a Potential Risk of Surface Water Contamination. *Frontiers Vet Sci.* 7, 562 DOI=10.3389/fvets.2020.00562.
- Castro-Hermida, J.A., González-Losada, Y.A. y Ares-Mazas, E. 2002. Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). *Vet. Par.* 106 (1), 1-10.
- Chalmers RM, Smith RP, Hadfield SJ, Elwin K, Giles M (2011) Zoonotic linkage and variation in *Cryptosporidium parvum* from patients in the United Kingdom. *Parasitol Res* 108:1321-1325. doi: 10.1007/s00436-010-2199-x.
- Chartier, C., Rieux, A., Delafosse, A., Lehebel, A. y Paraud, C. 2013. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fresh calf faeces: Characteristics of two simple tests and evaluation of a semi-quantitative approach. *Vet J* 198:148-152. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.06.011.
- Coklin, T., Farber, J., Parrington, L. y Dixon, B. 2007. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. *Vet. Par.* 150, 297- 305.
- Davies, C.M., Ferguson, C.M., Kaucner, C., Krogh, M., Altavilla, N., Deere, D. A., & Ashbolt, N. J. 2004. Dispersion and transport of *Cryptosporidium* oocysts from fecal pats under simulated rainfall events. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1151–1159.
- Davidson, P.C., Kuhlenschmidt, T.E., Bhattarai, R., Kalita P.K. y Kuhlenschmidt, M.S. 2014. Effects of Soil Type and Cover Condition on *Cryptosporidium parvum* Transport in Overland Flow. *WAS Pollut.* 225:1882.



- Delafosse, A., Chartier, C., Dupuya, M.C., Dumoulin, M., Pors, I., Paraud, C. 2015. Cryptosporidium parvum infection and associated risk factors in dairy calves in western France. *Prev. Vet. Med.* 118, 406-412.
- Del Coco, V.F., Córdoba, M.A. y Basualdo, J.A. 2008. *Cryptosporidium* infection in calves from a rural area of Buenos Aires, Argentina. *Vet. Par.* 158, 31-35.
- Del Coco, V.F., Córdoba, M.A., Bilbao, G., Pinto de Almeida Castro, A., Basualdo, J.A., Fayer, R., y Santí, M. 2014. *Cryptosporidium parvum* GP60 subtypes in dairy cattle from Buenos Aires, Argentina. 96, 311-314.
- de la Fuente, R., Luzón, M., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., García, A., Cid, D., Orden, J.A., García, S., Sanz, R. y Gómez-Bautista, M. 1999. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. *Vet. Par.* 80:179-185
- Dirección general de estadísticas y censos provincia de Córdoba. *Sector económico Agropecuario: Lechería*. Recuperado el 1 de marzo de 2016 en <http://estadistica.cba.gov.ar/>
- Dohoo, I.R., Martin, W. y Stryhn, H. 2009. *Veterinary Epidemiologic Research*. (2da ed.) Canada: AVC Inc., University Prince Edward Island.
- Do Couto, M.C., Lima, M.D., Bomfim, T.C. 2013. New *Cryptosporidium parvum* subtypes of IIa subfamily in dairy calves from Brazil. *Acta Tropica* 130:117-122. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.11.
- Duranti A, Caccio SM, Pozio E, Di Egidio A, De Curtis M, Battisti A et al (2009) Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in cattle. *Zoo Publ Health* 56:176-182. doi: 10.1111/j.1863-2378.2008.01173.x.
- Elsobaby, I., McClure, J.T. y Keefe, G.P. 2015. Evaluation of Digital and Optical Refractometers for Assessing Failure of Transfer of Passive Immunity in Dairy Calves. *J Vet Intern Med.* 29, 721-726.
- Fayer, R. 2004. *Cryptosporidium*: a waterborne zoonotic parasite. *Vet. Par.* 126, 37-56.
- Fayer, R., Santin, M. y 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. *Vet. Par.* 145, 260-266.
- Fayer, R. y Xiao, L. 2008. *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. (2da ed.) Estados Unidos: CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC
- Fayer, R. 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.* 124, 90-97.
- Feng, Y., Ortega, Y., He, G., Das, P., Xu, M., Zhang, X., Fayer, R., Gatei, W., Cama, V. y Xiao, L. 2007. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Vet. Par.* 144, 1-9.
- Garro, C.J., Morici, G.E., Utgés, M., Tomazic, M.L. y Schnittger, L. 2016. Prevalence and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. oocysts in dairy calves of Buenos Aires Province, Argentina. *Parasite Epidemiol Control* 1:36-41. doi: 10.1016/j.parepi.2016.03.008.
- Godden, S. 2008. *Colostrum management for dairy calves*. In *Dairy Heifer Management*, Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 24 (1): 19-39.
- Goff, J. 2006. Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. *J. Dairy Sci.* 89:1292-1301.
- Gulliksen, S.M., Lie, K.I., Løken, T., Østeras, O. 2008. Calf mortality in Norwegian dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 92: 2782-2795.
- Hannes, I.S., Gjerde, B., Robertson, L. 2006. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in three areas of Norway. *Vet. Par.* 140, 204-216.
- Henriksen, S.A. y Pohlenz, J.F.L. 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scand* 22:594-596
- Instituto Nacional de Estadística y Censos de la República Argentina (INDEC). Censo Nacional Agropecuario <http://www.indec.gov.ar/>. (Accessed 09.07.16)
- Izzo MM, Kirkland PD, Mohler VL, Perkins NR, Gunna AA, House JK (2011) Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhea. *Aust Vet J* 89 (5):167-173. doi: 10.1111/j.1751-0813.2011.00692.x.
- Kinross P, Beser J, Troell K, Silverlås C, Björkman C, Lebbad M et al (2015) *Cryptosporidium parvum* infections in a cohort of veterinary students in Sweden. *Epidemiol Infect* 143:2748-2756. doi: 10.1017/S0950268814003318.
- Koch, D. J., Davidson, P. C., Kalita, P. K., Kuhlenschmidt, M. S., Kuhelenschmidt, T. B. (2013). Fate and transport of *Cryptosporidium parvum* under small-scale rainfall simulator. *J Med Res Develop*, 2(4), 92-99.
- Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S et al (2013) Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet* 382:209-222. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60844-2.
- Kulldorff, M. 1997. A spatial scan statistic. *Commun. statist.- theory method.* 26, 1481-1496.
- Kulldorff, M. 2010. Information management services. *Software for the spatial and space-time scan statistics*. Inc. SatScan v. 40.
- Kváč M, Hromadová N, Kvetonová D, Rost M, Sak B (2011) Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned dairy calves in the Czech Republic: absence of *C. ryanae* and management-associated distribution of *C. andersoni*, *C. bovis* and *C. parvum* subtypes. *Vet Parasitol* 177: 378-382. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.11.048.
- Lombard, J., Garry, F., Tomlinson S. y Garber, L. 2007. Impacts of dystocia on health and survival of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 90:1751-1760.
- Lopez de Maturana, E., Ugarte, E. y Gonzalez-Recio, O. 2007. Impact of calving ease on functional longevity and herd amortization costs in Basque Holsteins using survival analysis. *J. Dairy Sci.* 90:4451-4457.



- Maddox-Hyttel, M., Langkjær, R.K., Enemark, H.L. y Vigre, H. 2006. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs—Occurrence and management associated risk factors. *Vet Par.* 141, 48-59.
- McGuirk, S.M. 2008. Disease management of dairy calves and heifers. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 24:139-153.
- McGuirk, S.M. y Collins, M. 2004. Managing the production, storage, and delivery of colostrum. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 20:593-603
- Meganck V, Hoflack G, Piepers S, Opsomer G (2015) Evaluation of a protocol to reduce the incidence of neonatal calf diarrhoea on dairy herds. *Prev Vet Med* 118:64-70. doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.11.007.
- Mawdsley, J.L., Brooks, A.E. y Merry, R.J. 1996. Movement of the protozoan pathogen *Cryptosporidium parvum* through three contrasting soil types. *Biology and Fertility of Soils*, 21, 30–36.
- Mosier DA, Oberst RD. 2000. Cryptosporidiosis. A global challenge. *Annals of the New York. Academy of Sciences.* 916, 102–111.
- Murray, C. F., and K. E. Leslie. 2013. Newborn calf vitality: Risk factors, characteristics, assessment, resulting outcomes and strategies for improvement. *Vet. J.* 198:322-328. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.06.007>.
- Nonnecke, B., Foote, J., Smith, B., Pesch, A. y Van Amburgh, M.E. 2003. Composition and functional capacity of blood mononuclear leukocyte populations from neonatal calves on standard and intensified milk replacer diets. *J. Dairy Sci.* 86:3592-3604.
- Nydam DV, Wade SE, Schaaf SL, Mohammed HO .2001. Number of *Cryptosporidium parvum* oocysts or *Giardia* spp cysts shed by dairy calves after natural infection. *Am J Vet Res* 62:1612–1615
- Olson, M.E., O’Handley, R.M., Ralston, B.J., McAllister, T.A., Thompson, R.C.A. 2004. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends in Parasitol.* 20 (4), 185- 191.
- Parreño, V. 2008. Diarrea neonatal bovina: protegerlos desde la panza. *Revista Angus* 241: 61-65.
- Peng X, Murphy T, Holden NM. Evaluation of the effect of temperature on the die-off rate for *Cryptosporidium parvum* oocysts in water, soils, and feces. 2008. *Appl Environ Microbiol.* 74:7101– 7107
- Plutzer J. y Karanis, P. 2007. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. *Vet Parasitol* 146:357-362. doi : 10.1016/j.vetpar.2007.02.030.
- Qi MZ, Fang YQ, Wang XT, Zhang LX, Wang RJ, Du SZ. 2015. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned calves in Shaanxi Province, north-western China. *J Med Microb* 64:111-116. doi: 10.1099/jmm.0.079327-0.
- Urie, NJ, Lombard, JE, Shivley, CB, Koprak, CA, Adams, AE, Earleywine, TJ, Olson, TJ, y Garry, FB. 2018. Preweaned heifer management on US dairy operations: Part V. Factors associated with morbidity and mortality in preweaned dairy heifer calves. *JDS*.101: 9229-9244. doi.org/10.3168/jds.2017-14019.
- Razzaque, M.A., Al-Mutawa, T., Mohammed, S.A. 2010. Diarrhea in pre-weaned calves: relative risk rates for morbidity and mortality in 13 commercial farms of hot arid zone. *American J Animal & Vet Sci.*, 5 (3): 215-220.
- Rieux, A., Chartier, C., Pors, I., Delafosse, A., y Paraud, C. 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from high-excreting young dairy calves in dairy cattle herds in Western France. *Parasitol Res.* 112: 3423-3431. DOI 10.1007/s00436-013-3520-2.
- Robertson, L.J., Björkman, C., Axén, C., Fayer, R., 2014. Cryptosporidiosis in farmed animals. In: Caccio, S.M., Widmer, G. (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Springer-Verlag, Wien, pp. 149–235.
- Ryan, U., Fayer, R. y Xiao, L. 2014. Cryptosporidium species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology.* 141:1667–1685. doi: 10.1017/S0031182014001085.
- Sanchez, C., Suero, M, Castignani, H, Terán, JC y Marino M. *La lechería Argentina: estado actual y su evolución*. Recuperado el 1 de Marzo de 2016 en <http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-la-lecheria-argentina-estado-actual-y-su-evolucion.pdf>
- Santín, M., Trout, J.M. y Fayer, R. 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Vet. Par.* 155, 15–23.
- Segura R, Prim N, Montemayor M, Valls ME, Muñoz C. 2015. Predominant virulent IbA10G2 subtype of *Cryptosporidium hominis* in human isolates in Barcelona: a five-year study. *PLoS ONE.* 10:1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0121753
- Sharon, K., Liang, Y., Burdick Sanchez, N., Carroll, J., Broadway, P. y Ballou M.A. 2015. Preweaning plane of nutrition and *Mannheimia haemolytica* dose influence inflammatory responses to a combined bovine herpesvirus-1 and *Mannheimia haemolytica* challenge in postweaned Holstein calves. *J. Dairy Sci.*98(Suppl. 2):193.
- Singh B.B, Sharma R, Kumar H., Banga H.S., Singh Aulakh R., Singh Gill J.P., Sharma J.K. 2006. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in Punjab (India) and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Vet. Par.* 140, 162–165
- Silverlas C., Emanuelson, U., de Verdier K. y Bjorkman, C. 2009a. Prevalence and associated management factors of *Cryptosporidium* shedding in 50 Swedish dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 90, 242-253.
- Silverlas, C., Bjorkman, C., Egevall, A. 2009b. Systematic review and meta-analyses of the effects of halofuginona against calf cryptosporidiosis. *Prev. Vet. Med.* 91, 73-84.



- Silverlås, C., Bosaeus-Reineck, H., Näslund, K. y Björkman, C. 2013. Is there a need for improved *Cryptosporidium* diagnostics in Swedish calves?. *Inter J Parasit* 43:155-161. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.10.009.
- Singh BB, Sharma R, Kumar H, Banga HS, Singh Aulakh R, Singh Gill JP. 2006. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in Punjab (India) and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Vet Parasitol* 140:162-165. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.03.029.
- 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. *Vet. Par.* 204, 111-119.
- Stanton, A.L., Kelton, D.F., LeBlanc, S.J., Wormuth, J., Leslie, K.E., 2012. The effect of respiratory disease and a preventative antibiotic treatment on growth, survival, age at first calving, and milk production of dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 95, 4950-4960.
- Starkey, S.R., Wade, S.E., Schaaf, S., Mohammed, H.O. 2005. Incidence of *Cryptosporidium parvum* in the dairy population in a New York City watershed. *Vet. Par.* 131, 197-205.
- Stout, W.L., Pachepsky, Y.A., Shelton, D.R., Sadeghi, A.M., Saporito, L.S. y Sharpley, A.N. 2005. Runoff transport of faecal coliforms and phosphorus released from manure in grass buffer conditions. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 230-234.
- Tate, K.W., E.R. Atwill, M.R. George, N.K. McDougald, and R.E. Larsen. 2000. *Cryptosporidium parvum* Transport from Cattle Fecal Deposits on California Rangeland Watersheds. *J. Range Management.* 53:295-299.
- Tate, K.W., M. Das Gracias C. Pereira, and E.R. Atwill. 2004. Efficacy of Vegetated Buffer Strips for Retaining *Cryptosporidium parvum*. *J. Environmental Quality.* 33:2243-2251.
- Thompson, H.P., Dooley, J.S., Kenny, J., McCoy, M., Lowery, C.J., Moore, J.E., Xiao, L. 2007. Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland. *Parasitol. Res.* 100, 619-624.
- Thompson, R.C.A. y Ash, A. 2016. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infec Gen Evolut* 40:315-323. doi: 10.1016/j.meegid.2015.09.028.
- 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. *Vet. Res.* 48, 42
- Tiranti, K., Larriestra, A., Vissio, C., Picco, N., Alustiza, F., Degioanni, A., Vivas, A. 2011. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp., spatial clustering and patterns of shedding in dairy calves from Córdoba, Argentina. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20 (2), 65-72.
- Tomazic, M. L., Maidana, J., Dominguez, M., Louge Uriarte, E., Galarza, R., Garro, C., Florin-Christensen, M., y Schnittger, L. 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from calves in Argentina. *Vet. Par.* 198, 382-386.
- Trask, J. R., Kalita, P. K., Kuhlenschmidt, M. S., Smith, R. L., y Funk, T. L. (2004). Overland and near-surface transport of *Cryptosporidium parvum* from vegetated and nonvegetated surfaces. *Journal of Environmental Quality*, 33, 984-993.
- Trotz-Williams, L.A., Jarvie, B.D., Martin, S.W., Leslie, K.E. y Peregrine, A.S. 2005. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in south-western Ontario and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Can. Vet. J.* 46, 349-351.
- Trotz-Williams, L.A., Martin, S.W., Leslie, K.E., Duffield, T., Nydam, D.V., Peregrine, A.S. 2008. Association between management practices and within-herd prevalence of *Cryptosporidium parvum* shedding on dairy farms in southern Ontario. *Prev. Vet. Med.* 83, 11-23.
- Venu R, Latha BR, Abdul Basith S, Dhinakar Raj G, Sreekumar C, Raman M (2012) Molecular prevalence of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves in southern states of India. *Vet Parasitol* 188:19-24. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.02.025.
- Wudu, T., Kelay, B., Mekonnen, H.M., Tesfu, K. 2008. Calf morbidity and mortality in smallholder dairy farms in Ada's Liben district of Oromia, Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 40: 369- 376.
- Weaver, D.M., Tyler, J.W., VanMetre, D.C., Hostetler, D.E., Barrington, G. 2000. Passive Transfer of Colostral Immunoglobulins in Calves. *J. Vet. Intern. Med.* 14, 569-577
- Wielinga PR, de Vries A, van der Goot TH, Mank T, Mars MH, Kortbeek LM et al (2008) Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. *Int J Parasitol* 38:809-817. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.10.014.
- Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R.C.A., Fayer, R., Lal, A.A. 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (8), 3386- 3391.
- Xiao, L., Zhou, L., Santin, M., Yang, W., Fayer, R. 2007. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States. *Parasitol. Res.* 100, 701-706.
- Xiao, L. y Feng, Y., 2008. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 309-323.
- Xiao, L. y Fayer, R. 2008. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *I J Par.* 38: 1239-1255.
- Xiao, L. 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp. Parasitol.* 124, 80-89.



- Young, K.H., Bullock, S.L., Melvin, D.M., Spruill, C.L. 1979. Ethyl acetate as a substitute for diethylether in the formalin ether sedimentation technique. *J. Clin. Microb.* 10, 852-853.
- Zambriski, J.A., Nydam, D.V., Bowman, D.D., Bellosa, M.L., Burton, A.J., Linden, T.C., Liotta, J.L., Ollivett, T.L., Tondello-Martins, L. y Mohammed, H.O. 2013**a**. Description of fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in experimentally challenged dairy calves. *Parasitol Res* 112:1247–1254
- Zambriski, J.A., Nydam, D.V., Wilcox, Z.J., Bowman, D.D., Mohammed, H.O. y Liotta, J.L. 2013**b** *Cryptosporidium parvum*: determination of ID50 and the dose response relationship in experimentally challenged dairy calves. *Vet Parasitol.* 197:104–112



ANEXOS



ANEXOS

Anexo 1: Extracción de ADN.

- A) LAPC.QUIAGEN - Lisis Alcalina, fenol-cloroformo y QIAamp DNA Stool Mini Kit-
 En esta metodología el ADN de *Cryptosporidium* se extrajo de los ooquistes purificados mediante tres pasos:
 I-digestión alcalina.
 II-tratamiento con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico
 III- QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)
 Para la digestión alcalina se añadió 66,6 µl de hidróxido de potasio 1M y 18,6 µl de ditiotreitil 1M, se agitó vigorosamente y se incubó a 65 °C durante 15 min. Luego se agregó 8,6 µl de ácido clorhídrico al 25% y 160 µl de Tris-HCl₂ (pH 8,3), se mezcló vigorosamente. Posteriormente, se agregó 250 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, v/v), se mezcló por unos segundos y se centrifugó a 3300 Xg durante 5 min. Luego se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo plástico de 2 ml conteniendo 1 ml del buffer ASL del kit comercial (QIAamp DNA stool Mini Kit, QIAGEN). Luego, se utilizó el kit comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente el ADN se conservó a – 20 °C hasta su uso.
- B) CDPC.QUIAGEN – Congelado/descongelado, fenol-cloroformo y QIAamp DNA Stool Mini Kit
 En esta metodología el ADN de *Cryptosporidium* se extrajo de los ooquistes purificados mediante tres pasos:
 I-Tres ciclos de congelado y descongelado.
 II-Tratamiento con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico
 III- QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)
 Se realizaron 3 ciclos de congelamiento y descongelamiento de las muestras de ooquistes purificadas con el objetivo de romper la pared de los ooquistes.
 A cada tubo se le agregaron 50 µl de Proteínasa K [50µg/ml] y luego se incubó 60 min a 55 °C. Posteriormente, se agregó 250 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, v/v), se mezcló por unos segundos y se centrifugó a 3300 ×g durante 5 min. Luego se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo plástico de 2 ml conteniendo 1 ml del buffer ASL del kit comercial (QIAamp DNA stool Mini Kit, QIAGEN). Luego, se utilizó el kit comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, el ADN se conservó a –20°C hasta su uso.
- C) CDPC.AE -Congelado/descongelado, fenol-cloroformo y alcohol isopropílico/etanol-
 En esta metodología el ADN de *Cryptosporidium* se extrajo de los ooquistes purificados mediante tres pasos:
 I-Tres ciclos de congelado descongelado.
 II-Tratamiento con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico.
 III- Precipitación del ADN con alcohol isopropílico.
 Se realizaron 3 ciclos de congelamiento y descongelamiento de las muestras de ooquistes purificadas con el objetivo de romper la pared de los ooquistes.
 A cada tubo se le agregaron 25 µl de proteínasa K [50µg/ml], 300 µl de CTAB 2% se mezcló vigorosamente y se incubó 90 min a 65 °C. Posteriormente, se agregó 500 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, v/v), se mezcló por unos segundos y se centrifugó a 3300 ×g durante 5 min. Luego se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo plástico de 1,5 ml. Se agregó 500 µl de alcohol isopropílico frío y se incubó a -20°C por 8 horas. Se centrifugó a 10.000 ×g por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se agregaron 500 µl de Etanol 70%, luego de homogeneizar se centrifugó a 12.000 ×g por 5 minutos. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y se dejaron los tubos secando a temperatura ambiente por una hora. Se re suspendió con agua bidestilada estéril. Finalmente, el ADN se conservó a – 20 °C hasta su uso.
- ✓ Comparación del promedio de ug/ul y relación a260/280 del ADN obtenido por los tres métodos estudiados.

MÉTODO	x ug/ul de ADN	x A260/280
LAPC-QUIAGEN	20,5	1.80
CDPC-QUIAGEN	35,3	1.92
CDPC-AE	265,7	1.2



Anexo 2: Determinación de la intensidad de infección. Purificación de ooquistes.

Determinación de la intensidad de infección

La intensidad de infestación fue estimada semi-cuantitativamente en base a el número promedio de ooquistes observados en 20 campos seleccionados al azar, las categorías fueron: 0 (sin ooquistes), 1 (1-5 ooquistes por campo), 2 (6-10 ooquistes), 3 (11-15 ooquistes) y 4 (>15 ooquistes) (Chartier, *et al.* 2013).

Previo a la observación a microscopio y con el objetivo de incrementar la probabilidad de observar ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se realizó una técnica de concentración con formol/éter etílico.

El objetivo fue concentrar las estructuras parasitarias y los pasos son listados a continuación:

1. Pesar 5 gr, o 10 ml de heces líquidas.
2. Agregar 20 ml de solución de formol/sal, mezclar.
3. Filtrar (mesh 50 u).
4. Transferir 12 ml de la mezcla a un tubo tipo falcon.
5. Agregar 2 ml de éter etílico.
6. Centrifugar 10 minutos a 1000Xg.
7. Remover 12 ml del sobrenadante.
8. El sedimento es mezclado y los frotis son preparadas con pipeta.

Solo el sedimento (2 ml volumen) fue utilizado para realizar los extendidos que posteriormente fueron teñidos. Para la preparación de los frotis, solamente fueron utilizados 50ul del sedimento.

El número de ooquistes por gramo de heces (opg) fue calculado utilizando la siguiente formula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de ooquistes observados} / (\text{volumen de muestra examinada (ml)} \times \text{gramos de heces (g)}) *$$

*Formula adaptada de Rieux *et al.* (2013).

El número promedio y rango de ooquistes de *Cryptosporidium* para las diferentes categorías de intensidad de infección fueron los siguientes:

Categoría 1= promedio: 50 opg; rango: 10-100 opg

Categoría 2= promedio: 480 opg; rango: 150-680 opg

Categoría 3= promedio: 880 opg; rango: 720-1040 opg

Categoría 4= promedio: 1300 opg; rango: 1150-2040 opg

Los cálculos de número promedio de ooquistes por gramo de materia fecal fue realizado con 15 muestras en cada una de las cuatro categorías de intensidad de infección. Primero se categorizó a cada una de las muestras y luego se contabilizaron los ooquistes.

Purificación de ooquistes

La purificación de ooquistes de las muestras positivas se realizó según la metodología propuesta por Coklin, *et al.* (2007) con algunas modificaciones. Brevemente, se pesaron las bolsas que contenían cada una de las muestras y cada 5 gramos de heces se agregó 10 ml de agua destilada (pH 7,4) dentro de la bolsa de plástico, se hizo una mezcla homogénea que luego fue filtrada a través de cuatro capas de gasa hacia un tubo Falcon limpio que contenía 5 mL de sacarosa 1M (gravedad específica 1.13), posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 800 Xg por 5 minutos, la parte superior e interfase del sobrenadante (aprox. 9 mL), utilizando una pipeta descartable, fueron transferidos a un tubo limpio que luego fue centrifugado a 1200 Xg por 10 minutos. El sobrenadante se desechó y el sedimento final resultante de 1,5 mL se conservó en microtubos que fueron guardados en freezer a -20°C hasta su utilización, para la extracción de ADN.



Anexo 3. Variables medidas en cada uno de los terneros muestreados.

VARIABLE	DEFINICIÓN	NIVELES
Edad	Edad del ternero el día de la colección de la muestra (en días)	≤ 7 > 7 y ≤ 15 ≥ 16 y ≤ 21 ≥ 22
Sexo	Sexo del ternero	Hembra Vs. Macho
Número de parto	Cantidad de partos que tiene la madre de cada ternero	$\leq 3^{\circ}$ Parto 4° , 5° o 6° Parto $\geq 7^{\circ}$ Parto
Tipo de parto	Dificultad sufrida por el ternero durante el parto	Si Vs. No
Consistencia de heces	Consistencia de la materia fecal cuando se recolectó la muestra	Líquida Semilíquida Sólida Semisólida Meconio
Diarrea	Consistencia de heces líquida/semilíquida más $>39.5^{\circ}\text{C}$ de temperatura rectal o contenido mucoso/fibrinoso/sangre en las heces	Si Vs. No
Tipo de cama	Material con el cual se le brindaba una cama al ternero	Arena Paja de trigo Ninguno
Vacunación madre	Vacunación de la madre para prevenir diarrea neonatal	Si Vs. No
Corral de parto	Presencia de un corral destinado para el parto	Si Vs. No
Tiempo con la madre	Tiempo que el ternero pasa junto a la madre después de nacer (en días)	≤ 2 ≥ 3
Ombbligo desinfectado	Si se realizó desinfección del ombligo al nacimiento del ternero	Si Vs. No
Obtención calostro	Modo en el que el ternero recibe el calostro después de nacer	Artificialmente Mamando de la madre
Cantidad de calostro	Cantidad de calostro administrado a cada ternero (en litros)	No medido (Ternero con la madre) ≤ 3 ≥ 4
Leche rodeo sano	Ternero alimentado con leche del rodeo sano sin antibióticos	Si Vs. No
Leche de descarte	Ternero alimentado con leche con presencia de antibióticos	Si Vs. No
Sustituto lácteo	Ternero alimentado con sustituto lácteo	Si Vs. No
Leche en polvo	Ternero alimentado con leche en polvo	Si Vs. No
Vaca nodriza	Ternero alimentado con una vaca nodriza o vaca ama	Si Vs. No
Veces al día	Cantidad de veces por día que se le ofrece alimento al ternero	≤ 2 veces por día ≥ 3 veces por día
Cantidad de leche	Cantidad de leche administrada a cada ternero por día (en litros)	No medido (ternero con vaca ama) ≤ 4 ≥ 5
Estación del año	Estación del año en la cual nació el ternero	Otoño Invierno Primavera Verano

Anexo 4. Datos descriptivos del total de terneros muestreados en la cuenca lechera Villa María, Departamento General San Martín, Córdoba, Argentina.

Datos descriptivos del total de terneros muestreados entre los meses de abril 2013 y marzo 2014, cuenca lechera Villa María, Departamento General San Martín, Córdoba, Argentina (n= 1073).



VARIABLE	NIVELES	TOTAL DE TERNEROS
Edad (en días)	≤ 7	101
	> 7 y ≤ 15	192
	≥ 16 y ≤ 21	112
	≥ 22	331
	ND ^a	337
Sexo	Hembra	609
	Macho	464
Número de partos	$\leq 3^{\circ}$ Parto	774
	4 ^o , 5 ^o o 6 ^o Parto	237
	$\geq 7^{\circ}$ Parto	62
Tipo de parto	Normal	241
	Asistido	17
Consistencia de heces	Líquida	143
	Semilíquida	77
	Sólida	377
	Semisólida	443
	Meconio	33
Tipo de Cama	Arena/Paja de trigo	143
	Ninguna	930
Vacunación Madre	Si vacunada	184
	No vacunada	889
Corral de parto	Si	36
	No	1037
Tiempo con la madre	≤ 2 días	217
	≥ 3 días	856
Ombligo desinfectado	Si	532
	No	541
Obtención calostro	Artificialmente	388
	Mamando de la madre	685



Cantidad de calostro	No medido (Ternero con la madre)	675
	≤ 3 Litros	259
	≥ 4 Litros	139
Tipo de leche recibida	Leche rodeo sano	344
	Leche de descarte	327
	Sustituto lácteo	187
	Leche en polvo	147
	Vaca nodriza	68
Veces al día alimentado con leche	≤ 2 veces por día	1054
	≥ 3 veces por día	19
Cantidad de leche	No medido (ternero con vaca ama)	68
	≤ 4 Litros	131
	≥ 5 Litros	874
Estación del año	Otoño	382
	Invierno	458
	Primavera	167
	Verano	66

^aND: no determinada



Anexo 5. Número de vacas totales y terneros muestreados por establecimiento lechero

Establecimientos visitados, número de vacas totales y terneros muestreados en el departamento General San Martín, Córdoba, Argentina.

Tambos	Vacas (n)	Terneros (n) ^a
1	101	16
2	218	27
3	130	28
4	274	18
5	277	15
6	199	19
7	176	28
8	148	12
9	155	19
10	255	44
11	245	26
12	294	29
13	209	11
14	206	13
15	235	27
16	212	17
17	232	15
18	155	19
19	149	11
20	294	22
21	300	66
22	187	10
23	125	20
24	279	17
25	141	14
26	160	18
27	284	10
28	123	15
29	120	20
30	162	17
31	167	32

32	237	12
33	179	12
34	167	16
35	188	17
36	163	45
37	205	12
38	191	19
39	173	11
40	128	14
41	121	16
42	199	10
43	164	10
44	278	31
45	241	35
46	133	17
47	293	13
48	191	10
49	161	21
50	228	12
51	125	10
52	152	33
53	108	17
54	179	37
Total	10416	1073

^a Todos los terneros presentes en el establecimiento fueron muestreados

Anexo 6. Asociación entre subgenotipo de *C. parvum* y edad. Frecuencia de subgenotipos por establecimiento

Asociación entre la edad de los terneros y los subgenotipos de *Cryptosporidium parvum* aislados.

Subgenotipo	Edad en semanas				Total
	1°	2°	3°	4°	
IIaA18G1R1	0	5	6	1	12
IIaA20G1R1	1	16	7	1	25
IIaA21G1R1	0	2	0	0	2
IIaA22G1R1	1	5	0	0	6
IIaA24G1R1	0	2	0	0	2
Total	2	30	13	2	47

Test de Chi-cuadrado de Pearson con simulación del valor p (basado en 2000 replicaciones)
 $\chi^2 = 10,788$, $\text{valor } p = 0,4978$

Frecuencia de subgenotipo GP60 de *Cryptosporidium parvum* y su distribución en establecimientos lecheros del departamento General San Martín, Córdoba, Argentina.

Subgenotipo	No. de muestras (%) ($n = 47$)	No. de establecimientos (%) ($n = 48^a$)
IIaA18G1R1	12 (25,5%)	16 (34%)
IIaA20G1R1	25 (53,2%)	23 (48%)
IIaA21G1R1	2 (4,3%)	2 (4%)
IIaA22G1R1	6 (12,8%)	6 (12%)
IIaA24G1R1	2 (4,3%)	1 (2%)

^aÚnicamente los establecimientos lecheros positivos a *Cryptosporidium parvum* (48 positivos/54 totales).



Anexo 7. Distribución de la prevalencia de *C. parvum* por semana de edad y por establecimientos

País	Prevalencia de <i>C. parvum</i> por semana de edad				Prevalencia de establecimientos positivos a <i>C. parvum</i>	Referencia
	1°	2°	3°	4°		
México	-	30%	25%	-	94 (29/31)	Maldonado –Camargo <i>et al.</i> 1998
Brasil	5	20	10	-	100 (1/1)	Cardoso <i>et al.</i> 2008
Argentina	23	36	17	12	77 (33/43)	Tiranti <i>et al.</i> 2011
Argentina	26 (\leq 20 días)				67 (18/27)	Garro <i>et al.</i> 2016
USA	53	67	46	20	93 (14/15)	Santin <i>et al.</i> 2004
USA	32 ($<$ 31 días)				42 (8/19)	Starkey <i>et al.</i> 2006
USA	59 ($<$ 30 días)				100 (44/44)	Szonyi <i>et al.</i> 2012
Canadá	5	53	-	-	100 (11/11)	Trotz-Williams <i>et al.</i> 2007
Inglaterra	16	57	50	25	66 (27/41)	Brook <i>et al.</i> 2008
República Checa	27 ($<$ 30 días)				100 (11/11)	Kvác <i>et al.</i> 2006
Suecia	52 ($<$ 30 días)				96 (48/50)	Silverlas <i>et al.</i> 2009
India	79 ($<$ 30 días)				100 (4/4)	Singh <i>et al.</i> 2006
India	45 ($<$ 15 días); 37 (16-30)				100 (4/4)	Paul <i>et al.</i> 2006
Egipto	30 ($<$ 45 días)				100 (2/2)	Amer <i>et al.</i> 2010
China	14 ($<$ 45 días)				68 (13/19)	Zhang <i>et al.</i> 2015
Nueva Zelanda	6 (\leq 5 días); 16 (9-21)				50 (49/97)	Al Mawly <i>et al.</i> 2015

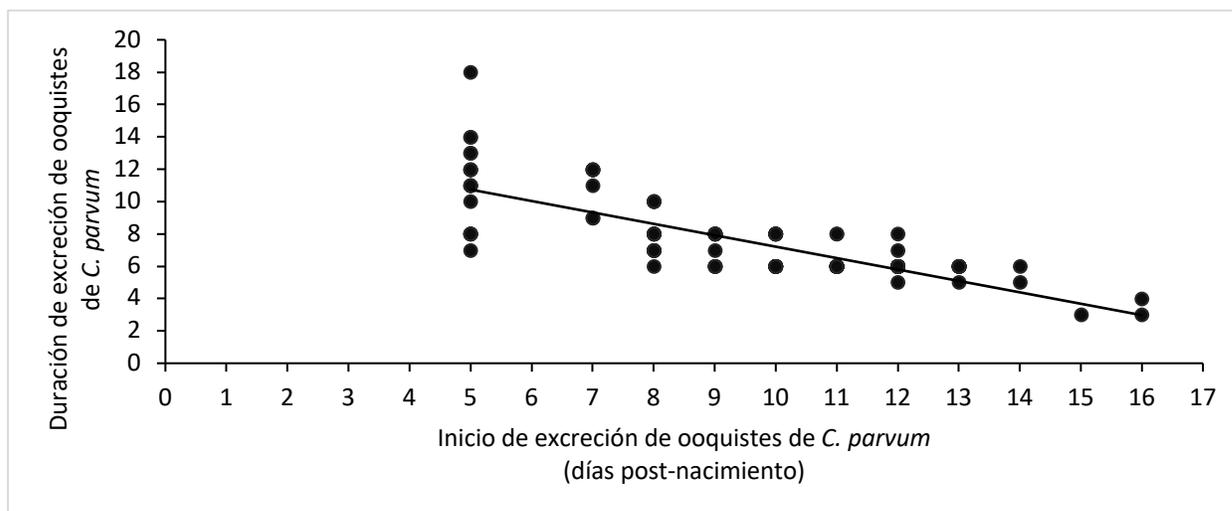


Anexo 8: Estudio de cohorte. Media, mediana y rango de inicio y duración de excreción de ooquistes de *C. parvum*. Correlación entre inicio y duración de excreción de ooquistes de *C. parvum*.

Media, mediana y rango de número de días después del nacimiento en el cual las terneras comenzaron a excretar ooquistes y número de días de la duración de la excreción de ooquistes de *C. parvum* en 140 terneras de dos crianzas artificial.

	Media	Mediana	Rango
Inicio de excreción de ooquistes de <i>C. parvum</i>	9,9	9	5-16
Duración de excreción de ooquistes de <i>C. parvum</i>	7,3	6	3-18

Nota: Los valores expresados en la tabla corresponden a la media, mediana y rango de número de días después del nacimiento en el cual las terneras iniciaron a excretar ooquistes y el número de días de la duración de la excreción de ooquistes de *C. parvum*.



Correlación entre el inicio de la excreción y la duración de la excreción de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en terneras naturalmente infectadas.

Coefficiente de correlación= -0,8; valor $p < 0,001$.



Anexo 9: Estudio de cohorte. Asociación entre la infección con *C. parvum* en edad temprana y casos de diarrea, duración de diarrea y aumentos diarios de peso vivo.

Asociación entre infección con *Cryptosporidium parvum* antes de los 8 días de vida y los casos de diarrea.

Predictor*	Diarrea		Total
	Si	No	
Si	35	4	39
No	70	31	101
Total	105	35	140

*Ternero positivo a *Cryptosporidium parvum* antes de los 8 días de vida.

Modelo: glm(formula = Diarrea ~ *C. parvum*, familia = binomial(link = logit))

	Estimado	EE	Valor z	Valor p
Intercepto	0,8145	0,2157	3,775	0,00016
Predictor	1,3545	0,5702	2,376	0,01751

Razón de probabilidades (OR) con 95% I.C. = 3,87 (1,27; 11,85)

Asociación entre infección con *Cryptosporidium parvum* antes de los 8 días de vida y la duración de los casos de diarrea.

Predictor*	Duración de la diarrea		Total
	≥ 3 días	≤ 2 días	
Si	33	6	39
No	68	33	101
Total	101	39	140

*Ternero positivo a *Cryptosporidium parvum* antes de los 8 días de vida.

Modelo: glm(formula = Duración ~ *C. parvum*, familia = binomial(link = logit))

	Estimado	EE	Valor z	Valor p
Intercepto	0,7230	0,2122	3,408	0,0006
Predictor	0,9817	0,4919	1,996	0,04

Razón de probabilidades (OR) con 95% I.C. = 2,67 (1,02; 6,99)

Asociación entre infección con *Cryptosporidium parvum* antes de los 8 días de vida y los aumentos diarios de peso vivo (ADPV).

Predictor*	ADPV		Total
	≤ 500g/día	>500g/día	
Si	32	7	39
No	38	63	101
Total	70	70	140

*Ternero positivo a *Cryptosporidium parvum* antes de los 8 días de vida.

Modelo: glm(formula = ADPV ~ *C. parvum*, familia = binomial(link = logit))

	Estimado	EE	Valor z	Valor p
Intercepto	0,505	0,2054	2,46	0,0138
Predictor	-2,025	0,465	-4,355	0,00001

Razón de probabilidades (OR) con 95% I.C. = 7,58 (3,05; 18,86)