FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y CLÍNICAS DE LA INFECCIÓN POR CRYPTOSPORIDIUM SPP. EN GRANJAS PORCINAS INTENSIVAS DE ARGENTINA

Méd. Vet. Hernán José Lovera

Trabajo de tesis para optar al título de Magister en Ciencias
Maestría en Salud y Producción Porcina

Directora: Mag. M.V. Mercedes Vázquez
Co-Directora: Mag. M.V. Bibiana Pelliza

2014

El presente trabajo para optar al grado de Magister en Ciencias – Maestría en Salud y Producción Porcina fue realizado en el Departamento de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.

Maestrando: Med. Vet. Hernán José Lovera.

Directora: Mag. M. V. Mercedes Vázquez.

Codirectora: Mag. M.V. Bibiana Pelliza

Aprobado por el Jurado Evaluador de Tesis:

Dr. Carlos Rossanigo

Dra. Silvia Romanini

Dr. Pablo Tamiozzo

AÑO 2014

A mi amada esposa Laura, compañera inseparable e incondicional de la vida.

A mis padres,...

...a la memoria de mi padre Santiago, que estuvo siempre presente durante este proceso.

...a mi madre Betty, que ha velado siempre por mi bienestar y educación. Es por ellos que soy lo que ahora soy.

Agradecimientos

El presente trabajo de Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas, leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, escuchando, dandome ánimo, acompañandome en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Primeramente me gustaría agradecerle a Dios por estar conmigo en cada paso que doy, dandome fortaleza para continuar y llegar hasta donde he llegado.

A Mercedes Vazquez, por haber confiado en mi persona. Por la paciencia, su apoyo, la dirección y conclusión de éste trabajo.

A mi Codirectora, Bibiana Pelliza, por sus conocimientos, paciencia y motivación permanente.

Al Dr. José Santos Tolosa, Profesor y amigo. Le digo Gracias...!!! ya que por su visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, por su rectitud en su profesión como docente y por sus consejos me fomentó esta pasión por la docencia. Y le digo Gracias...!!!, ya que con su palabra me enseñó mucho más que parasitología.

A mis compañeros de cohorte, que sobre todo son mis amigos y que participaron de una u otra manera en éste trabajo: Judith Bertone, Paola Corrales, Natalia Illanes, Roberto Ambrogi. Por tantos viajes compartidos y tantas anecdotas vividas en éste proceso, y porque en esta armonía grupal hemos logrado éste objetivo final.

A Carlos Motta, Guillermo Bagnis, Vivian Martín, Silvia Romanini, Gabriel Di Cola, Arnaldo Ambrogi, Alicia Chiaretta, Ana Sbaffo por alentarme en la conclusión de este trabajo.

A los miembros del tribunal evaluador Dr. Carlos Rossanigo, Dra. Silvia Romanini y Dr. Pablo Tamiozzo por su dedicación y colaboración para la corrección y evaluación de éste trabajo.

Quisiera hacer extensivo mi agradecimiento a todos mis compañeros del Departamento de Patología Animal, por su amistad y apoyo.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, prestigiosa institución, por haberme brindado la oportunidad de realizar y concluir mis estudios de grado y posgrado.

En fin, son muchas las personas que han formado parte de mi vida personal y profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos buenos y no tan buenos de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón. Sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí y por todo lo que me han brindado.

Resumen

La criptosporidiosis en los cerdos fue descripta por primera vez en cerdos (*Sus scrofa*) en Estados Unidos en 1977. De allí en adelante, ha sido descripta en países de todo el mundo como Australia, Japón, Estados Unidos y Vietnam, aunque el limitado número de estudios epidemiológicos hace dificultoso conocer la prevalencia de la infección en muchos otros países y muestra grandes variaciones. Los cerdos son muy susceptibles a la infección por varias especies de *Cryptosporidium* y las tasas de prevalencia son similares a las encontradas en el ganado bovino de la misma región estudiada. Es usualmente una enfermedad subclínica o en su defecto desarrollan una enfermedad diarreica autolimitante. Su potencial zoonótico lo ha convertido en un problema importante para la salud pública por los innumerables brotes de enfermedades parasitarias relacionadas al agua de consumo.

Los patrones acerca de la infección y su duración en infecciones naturalmente adquiridas permanece sin reportes como así también su importancia económica. Los estudios sugieren que la contribución de *Cryptosporidium* a la coccidiosis porcina puede estar subestimada y los reportes de los diferentes países han mostrado no solo que es prevalente en los cerdos, sino que puede ocurrir simultáneamnete con *Isospora* e incluso en animales mayores, lo que pudo aportar a su subestimación. En Argentina no hay hasta el presente estudios que hayan determinado la prevalencia de la enfermedad en los cerdos, ni sus características epidemiológicas y clínicas.

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia y distribución (tanto de establecimientos como intrapredial) de *Cryptosporidium* spp. en cerdos de granjas intensivas de Argentina, como así mismo establecer su contribución a las características tanto de consistencia como de color de la materia fecal.

Se tomaron muestras de materia fecal de 10 cerdos de 8, 15 y 22 semanas de edad y se determinó la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* mediante técnicas de concentración (Telleman Modificado) y posterior Tinción de Ziehl-Neelsen. Se determinó la catidad de ooquistes por gramo (opg) de materia fecal, y se establecieron las características de consistencia y color de cada una de las muestras para correlacionarlas con la presencia o no del agente, con la edad, con la cantidad de opg y con el tipo de piso utilizado.

Se concluyó que *Cryptosporidium* spp. es un agente con alta frecuencia de presentación en granjas porcinas intensivas de la República Argentina. Su presencia se detectó en el 86,4% de los establecimientos relevados, con una frecuencia dentro de los establecimientos positivos entre el 6,66% al 26,66%. Podemos afirmar que es altamente prevalente en animales de 8 semanas de edad (22,20%) y de 15 semanas de edad (10,0%). Parece no ser un patógeno presente en categorías de 22 semanas de edad. La materia fecal de los animales con infección por *Cryptosporidium* spp. fue mayormente de color amarronada (hasta amarillenta) y consistencia cremosa (hasta líquida). El 89% de los animales que resultaron positivos mostró una clara disminución en la consistencia de sus materias fecales (materias fecales desde cremosas a líquidas) y en general los niveles de opg más altos se observaron en éste tipo de materias fecales. Por último, existiría una probable asociación entre el tipo de piso (enrejillado/sólido) y el nivel de presentación de diarreas.

CONTENIDO

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

INTRODUCCIÓN E HISTORIA

GENERALIDADES

Cryptosporidium, junto con *Giardia*, son los parásitos entéricos mas comunes de los animales domésticos y humanos, y son crecientemente reconocidos como parásitos de diversos rangos de especies animales (Quintero-Betancourt y col., 2003; Thompson y col., 2003; Hunter y Thompson, 2005; Chen y col., 2011; Zang y col., 2013) y fundamentalmente *Cryptosporidium* por estar ampliamente distribuído en el mundo (Gasser y O´Donoghue, 1999).

El interés por *Cryptosporidium* se ha incrementado enormemente durante las últimas décadas (Tzipori y Ward, 2002). Básicamente constituye un protozoario emergente de notable importancia en salud pública y animal (Umemiya y col., 2005; Singh y col., 2006).

Este auge en el estudio de *Cryptosporidium* en los últimos años se fundamenta por sus implicancias en la industria alimenticia. Esta preocupación, se basa en tres parámetros a saber:

-que el agente causal de esta enfermedad puede transmitirse a través del agua y alimentos contaminados (Smith y Nichols, 2010; Ruecker y col., 2012).

-que cuando se ingiere el agente causal es capaz de provocar un alto grado de morbilidad en la población sana.

-que no hay tratamiento antimicrobiano eficaz para la erradicación de éste agente del tracto gastrointestinal de individuos sintomáticos ni asintomáticos (Moore y col., 2003).

Cryptosporidium parvum, es comúnmente identificado como infectante para el ganado y humanos (Tzipori y Ward, 2002; Guselle y col., 2003), aunque se lo reconoce como infectante para muchos otros vertebrados incluyendo mamíferos en general, aves, reptiles y peces (Sulaiman y col., 1998; Morgan y col., 1999-a, b; Watanabe y col., 2005; Santín y col., 2006; Singh y col., 2006). Los avances en la inmunobiología de la criptosporidiosis han incrementado el reconocimiento de *C. parvum* como parásito zoonótico de importancia médica y veterinaria (Noordeen y col., 2000; Riggs, 2002), y como una de las mayores causas de enfermedad humana entérica tanto en morbilidad como en mortalidad en huéspedes inmunocomprometidos como así también para individuos jóvenes (Noordeen y col., 2000).

Se estima que este pequeño protozoo, hasta 1970 se lo consideró muy poco importante (Quiroz y col., 2000; Upton, 2004). El conocimiento sobre *C. parvum* se ha incrementado considerablemente desde esa fecha, cuando fue descubierto como una causa de diarrea en humanos y animales, y hoy el organismo es reconocido como uno de los parásitos oportunistas mas comunes (Enemark y col., 2003-b; Yu y col., 2004), y una de las tres o cuatro principales causas de diarrea autolimitante en humanos y varias especies animales (Theodos y col., 1998).

El género *Cryptosporidium* fue mencionado a comienzos del siglo XX, pero tardó casi 50 años en ser reconocido como potencial causa de enfermedad (Tilley y Upton, 1997; De Graaf y col., 1999; Fayer, 2004), para el ganado doméstico, gallinas, animales de compañía y salvajes, con implicancias en salud pública (Fayer, 2004). Ernest Edwars Tizzer fue el primero en reconocer, describir claramente y publicar un informe de un parásito frecuentemente encontrado en las glándulas gástricas de ratones de laboratorio. En 1907, él describió estadíos sexuales, asexuales y esporas (ooquistes), con organelas especializadas en ratones de laboratorio y remarcó que las esporas eran excretadas en las heces (Tilley y Upton, 1997; Tzipori y Ward, 2002). Reconociendo al parásito como un

esporozoo de estatus taxonómico incierto lo denominó *C. muris*. *Cryptosporidium* podría traducirse como "espora oculta" (o quizás mas específicamente en latín *"espora subterránea"*). Tizzer explica el nombre en la página 504 de su paper de 1910 (J Med Res 23:487-509) de la siguiente manera: "...con la intención de significar que se trata de un esporozoo en el que las esporas son indistinguibles o están ausentes en el ooquiste..." (Thompson y col., 2003). En 1910, con mas detalles propuso a *Cryptosporidium* como un nuevo género y *C. muris* como una especie tipo y especulando que los esporozoitos de los ooquistes en las glándulas gástricas podrían autoinfectar al huésped (Upton, 2004). Excepto los estadíos de desarrollo extracelulares, la descripción original de Tizzer del ciclo de vida ha sido confirmada por microscopía electrónica (Fayer y col., 1997; Tilley y Upton, 1997; Graczyc y col., 1997; Dillinghan y col., 2002; Fayer, 2004). En 1911 Leger estableció la familia Cryptosporidiidae (Upton, 2004).

En 1912 Tizzer describió una nueva especie, *C. parvum*. Mediante ratones infectados experimentalmente demostró que *C. parvum* se desarrolla sólo en el intestino delgado y que sus ooquistes son mas pequeños que los de *C. muris*. Tizzer permaneció ambiguo sobre el argumento de que los estadios estuvieran ubicados intracelular o extracelularmente y notó que estos estadios eran similares a aquellos de *C. parvum* (Fayer y col., 1997; Fayer, 2004; Upton, 2004). En 1913 Poche también intentó crear la familia Cryptosporidiidae, pero fue dos años tarde (Upton, 2004).

En 1929 Tizzer ilustró, pero no describió claramente los estadios evolutivos de *Cryptosporidium*, en el epitelio cecal de pollos, que actualmente es considerado *C. baileyi*. En ese mismo año hablo del hallazgo de *C. parvum* en conejos (Fayer y col., 1997; Tilley y Upton, 1997; Upton, 2004).

Luego de 48 años de la primera publicación de Tizzer, dado que *Cryptosporidium* parecía no tener importancia económica, médica o veterinaria, quedó relativamente en el

olvido, hasta que en 1955, Slavin hace el primer reporte de una nueva especie, *Cryptosporidium meleagridis*, asociado con enfermedad y muerte en pavos jóvenes, presentando una completa descripción de los ooquistes y de otros estados evolutivos. Hasta la fecha es considerada una especie válida (Fayer, 2004; Upton, 2004). Luego de varios años de quietud en el estudio de éste agente, un cierto interés despertó cuando en 1971, se encontró a *Cryptosporidium* asociado con diarrea bovina (Fayer y col., 1997; De Graaf y col., 1999; Fayer, 2004).

En 1974 Barker y Carbonell describen como nuevas especies a *C. agni* de corderos y *C. bovis* de terneros, basados solamente en la especificidad de huéspedes. Ambos, son ahora considerados sinónimos de *C. parvum* (Tilley y Upton, 1997; Upton, 2004).

En 1976, dos grupos reportaron el primer caso de cryptosporidiosis humana, en una niña de la zona rural de Tennessee, quien sufrió una severa gastroenteritis de una duración de dos semanas (Tzipori y Ward, 2002; Yu y col., 2004; Upton, 2004; Magi y col., 2006).

En 1977, Browstein y colaboradores reportaron patologías en serpientes infectadas con una nueva especie de *Cryptosporidium*. Mas tarde fue llamada por Levine como *C. serpentis*. Especie que actualmente se considera como válida. Durante 1979 se sucedieron algunos hallazgos, como el de Inman y Takeuchi con la denominación de *C. cunniculus*, a partir del íleon de conejos. Levine intentó considerarlo, erróneamente, como sinónimo de *C. muris*. Otro de los reportes para ese mismo año fue el de Iseki con *C. felis*. Especie que a lo largo de los años permanece como válida (Upton, 2004). Subsecuentemente, los reportes descriptos en un amplio rango de mamíferos, aves y reptiles comenzaron a aparecer. La identificación de especies fue basada primariamente sobre el tamaño y forma de los ooquistes y la susceptibilidad de huéspedes (Fayer, 2004; Upton, 2004).

Pocos casos fueron reportados hasta 1982 (Graczyc y col., 1997; Dillinghan y col., 2002). Hasta que los Centros para el Control de Enfermedades comunican que 21 varones de seis grandes ciudades de los Estados Unidos tuvieron severa diarrea crónica causada por *Cryptosporidium* en asociación con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido (SIDA), condujo hasta el presente a la era del interés mundial y estudio de organismos del género *Cryptosporidium* (Fayer y col., 1997; Theodos y col., 1998; Fayer, 2004; Magi y col., 2006). Esto alentó a los científicos a trabajar más sobre *Cryptosporidium* en muchas áreas, tal como en el campo veterinario, para explicar como la cría de animales puede ser fuente de infección para humanos (Sulaiman y col., 1998; De Graaf y col., 1999).

Resumiendo, entre 1980 y 1993 tres grandes entidades de la criptosporidiosis fueron reconocidas. La primera fue la revelación en 1980 que *Cryptosporidium* fue, de hecho, una común y seria causa primaria de brotes de casos esporádicos de diarrea en ciertos mamíferos. La segunda fue a partir de 1983 con el comienzo de la epidemia de SIDA, donde *Cryptosporidium* surgió como una enfermedad que amenaza la vida de esta subpoblación (Sulaiman y col., 1998; Tzipori y Ward, 2002; Upton, 2004). Aunque los brotes asociados con agua de bebida y recreacional (piscinas) fueron reportados relativamente escasos hasta 1980, la tercera entidad vino en 1993 con el brote de enfermedad de origen hídrico mas grande en la historia, en Milwaukee, WI, involucrando alrededor de 400.000 personas de un total de 1.610.000 (Sulaiman y col., 1998; Hannahs, 1999).

A partir de allí se sucedieron los reportes de criptosporidiosis asociado a consumo de agua o alimentos contaminados (Smith y Nichols, 2010). En la década de los ´90 fueron numerosos los brotes asociados no sólo a sistemas de aguas municipales para consumo sino también piscinas, lagos recreacionales, y parques acuáticos en general (Noordeen y col., 2000; Quiroz y col., 2000).

A menos que se lo requiera específicamente, la mayoría de los laboratorios de los Estados Unidos no realizan test para *Cryptosporidium* y el microorganismo no puede ser detectado en tests de rutina para la detección de huevos y parásitos (Quiroz y col., 2000). No obstante, el interés por la criptosporidiosis en el campo veterinario surge más del hecho con respecto al daño y/o dificultad para el control de la enfermedad de muchos animales que resultan en pérdidas económicas significativas (De Graaf y col., 1999). En resumen, pasaron algo mas de 30 años para que este parásito fuera considerado como un importante patógeno productor de enfermedad intestinal severa, tanto en humanos como en animales (Quiroz y col., 2000).

La criptosporidiosis ha sido reportada en mas de 90 países en los 6 continentes (Dillinghan y col., 2002; Tzipori y Ward, 2002; Moore y col., 2003; Chen y Huang, 2007). *C. parvum* es regularmente aislado de muestras clínicas en países en desarrollo y desarrollados, tanto en zonas urbanas como rurales. En USA, la incidencia de esta infección en la población humana ha sido estimada en 10 millones de casos por año. En Reino Unido, 6000 personas cada año se reportan infectadas, mientras que en países en desarrollo la prevalencia varía entre un 20-30% (Duffy, 1999).

A pesar de todo, poco es lo que se conoce acerca de la patogénesis del parásito y consecuentemente ningún tratamiento efectivo y seguro ha sido desarrollado para combatir la criptosporidiosis (Tzipori y Ward, 2002).

ETIOLOGÍA Y TAXONOMIA

El phylum Apicomplexa comprende más de 5000 especies de parásitos protozoos, incluyendo al *Plasmodium* spp. responsable de la Malaria, a *Toxoplasma gondii* que es bien conocido como un productor de defectos congénitos y neurológicos en recién nacidos, mientras que *Cryptosporidium* y *Cyclospora* (junto con *Toxoplasma*) han surgido como infecciones oportunistas asociadas con condiciones inmunosupresoras y como fuentes de

infección humanas a través de alimentos contaminados o el suministro de agua. Muchos de estos apicomplejos son importantes en medicina veterinaria (Ruecker y col., 2012; Slapeta , 2013).

Todos son referidos como coccidios (Thompson y Smith, 2011). Particularmente *Cryptosporidium* es un parásito ooquiste formador, intracelular obligado que infecta el borde microvelloso del epitelio del tracto gastrointestinal de gran cantidad de animales (Moon y Woodmansee, 1986; Quílez y col., 1996; Hijjawi y col., 2002; Moore y col., 2003; Barta y col., 2006; Slapeta J., 2013), y del hombre (Quiroz y col., 2000), y son crecientemente reconocidos como uno de los mayores causales de diarrea a nivel mundial (Patel y col., 1999), aunque también puede ser asintomático (Casemore y col., 1997; Jellison y col., 2002). Ha sido reconocido desde hace tiempo como un coccidio atípico con una afinidad filogenética controvertida. Aún no se ha podido hacer un estudio detallado de su ciclo de vida en ausencia de adecuados modelos *in vivo* e *in vitro*. El reciente desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro* capaces de mantener el ciclo de vida completo de *Cryptosporidium* en sistemas con y sin células huésped, no solo ha revelado estadios no descriptos previamente, sino que han cuestionado el requerimiento obligado del parásito de invadir células huésped (Thompson, 2005; Boxell y col., 2008).

Casi cien años más tarde de su descubrimiento y después de más de dos décadas de intensas investigaciones, la criptosporidiosis, en muchos sentidos, sigue siendo enigmática. *Cryptosporidium* infecta las cinco clases de vertebrados, y probablemente a todas las clases de mamíferos (Kaplan, 2002; Monis y Thompson, 2003; Zhou y col., 2004; Roy y col., 2006; Neumayerova y Koudela, 2008). Entre ellos, los roedores salvajes han recibido una particular atención y han sido sugeridos como reservorios de infección para los animales domésticos y humanos. El rol actual de los animales salvajes en la epidemiología, como en la contaminación, por ejemplo de fuentes de agua para consumo, permanece desconocido (Zhou y col., 2004; Ruecker y col., 2012).

La especiación del género sigue siendo un desafío para los taxonomistas (Barta y col., 2006), agravada por numerosos factores, incluyendo las actuales dificultades de técnicas y la aparente falta de especificidad del hospedador de la mayoría, aunque no todas, de las cepas y especies (Tzipori y Ward, 2002; Kaplan, 2002; Fayer, 2010; Slapeta J., 2013).

Hoy se sabe que los *Cryptosporidium* replican dentro de una vacuola parasitófora de localización intracelular pero extracitoplasmática en la superficie de las células epiteliales del intetino delgado (Gookin y col., 2002-a; Gookin y col., 2002-b; Gookin y col., 2004; Gookin y col., 2005; Rodriguez y Royo, 2005; Uehlinger y col., 2006; Slapeta J., 2013) dentro de las cuales se dividen. Así en la medida que su número aumenta, aumenta el número de células afectadas, al punto que aumenta tanto el número de células muertas que compromete la vida del hospedador (Brooks, 2005), y junto con *Giardia* spp. componen una de las causas más comunes de diarrea entre los agentes no bacterianos (Atwill y col., 1997; Quintero-Betancourt y col., 2003; Maddox-Hyttel y col., 2006).

Dentro del phylum Apicomplexa, la clasificación taxonómica ha sido propuesta para ubicar a una serie de parasitos eucariotas que poseen un complejo apical en algún momento de su ciclo vital (Barta y col., 2006). La taxonomía se ha basado en combinación de rasgos morfológicos detectados por microscopía de luz o electrónica, ciclo de vida y especificidad de huésped (Morgan y col., 1999-a; Morgan y col., 2002). Así, algunos coccidios son homogónicos y estrictamente huésped específicos, otros tienen ciclos de vida heterogónicos complejos que involucran a un amplio rango de especies huéspedes diferentes (Tenter y col., 2002). Las características del ooquiste al microscopio, ha sido usada más que cualquier otra característica para designar género y especie, como así también el número de esporocistos como el de esporozoítos para definir género (Xiao y col., 1998; Jellison *et al.*, 2002; Xiao, 2005-b; Slapeta J., 2013). El tamaño y forma del ooquiste, la presencia/ausencia de micrópila, tamaño y forma de los esporocistos, presencia/ausencia de cuerpo de Stieda, y el tamaño de los esporozoítos han sido usados

en gran medida para designar especies (Xiao y col., 1999; Morgan y col.,1999-b; Tenter y col., 2002).

Evidentemente el nivel taxonómico está en una permanente necesidad de revisión, sobre todo porque un número cada vez mayor de nuevos genotipos se describen en varias especies animales (Morgan y col., 2001; Perz y Le Blanc, 2001; Fayer, 2010; Slapeta J., 2013).

Cryptosporidium fue originalmente clasificado como un coccidio por poseer características similares en su ciclo de vida a los coccidios. Sin embargo, demostró varias particularidades que lo separan de cualquier otro coccidio (Hijjawi y col., 2002). De hecho, la afinidad del género *Cryptosporidium* con las *Eimerias*, está cada vez más en tela de juicio. Especies de *Cryptosporidium* son constantemente colocados por separado de los taxones de los coccidios eimeridos en estudios moleculares y en el mas reciente análisis filogenético basado en secuencias de los genes 18S rARN por Carreño y col., (1999), donde demostraron una estrecha afinidad con las gregarinas. Esto es apoyado por el desarrollo atípico de *Cryptosporidium*, y en particular en su forma de asociación con la célula huésped (Hijjawi y col., 2001; Thompson y col., 2003; Helmy y col., 2013).

Los *Cryptosporidium* pertenecen al phylum Apicomplexa (poseen complejo apical), Clase Sporozoasida (se reproduce por ciclos sexuales y asexuales, con formación de ooquistes), Subclase Coccidiasina (ciclo de vida con merogonia, gametogonia y esporogonia), Orden Eucoccidiorida (ocurren esquizogonias), Suborden Eimeriorina (desarrollo de macrogametos y microgametos independientes), Familia Cryptosporidiidae (cuatro esporozoitos desnudos dentro del ooquiste). Sin embargo, los estudios moleculares cuestionaron esta clasificación y revelaron que los *Cryptosporidium* están mas estrechamente relacionados a las gregarinas que a las coccidias (Moon y Woodmansee, 1986; Tzipori y Ward, 2002; Egyed y col., 2003; Thompson y col., 2003; Rosales y col.,

2005; Rodriguez y Royo, 2005; Rimhanen-Finne, 2006) y el hallazgo de estadíos en el ciclo de vida similares al de las gregarinas sostienen esta sugerencia (Fayer, 2004; Fayer, 2010).

Las características particulares de *Cryptosporidium* que lo alejarían del resto de los coccidios, entre otras son:

-La ubicación dentro de la célula huésped donde los estadíos endógenos de desarrollo están confinados a la superficie apical de las células epiteliales (como en el caso de las gregarinas), intracelular pero extracitoplasmático, diferente a cualquier otra coccidia.

-La fijación del parásito a la célula huésped donde un anclaje multimembranoso u organela alimentadora, similar al conoide de las gregarinas, se forma en la base de la vacuola parasitófora para facilitar la toma de los nutrientes desde la célula huésped.

-La presencia de dos tipos de ooquistes diferentes morfofuncionales. Unos de pared gruesa y otros de pared delgada, responsables estos últimos de la iniciación del ciclo autoinfectivo en las células del huésped infectado.

-Ooquistes esporulados e infecciosos al momento de la excreción de los mismos a través de la materia fecal (Forslund y col., 2011).

-El pequeño tamaño de los ooquistes (7,4-5,6 µm para *C. muris*. Y 5,0-4,5 µm para *C. parvum*) y que carecen de estructuras morfológicas tales como esporocistos, micrópilas y gránulos polares.

-Finalmente, la insensibilidad de *Cryptosporidium* a todos los agentes anticoccidianos testeados desde siempre, como sulfas y amprolium (Moon y Woodmansee, 1986; Fayer y col., 1997; Carreño y col., 1999; Hijjawi y col., 2002; Hijjawi y col., 2004; Zanaro y Garbossa, 2008).

Otros hallazgos importantes son la descripción de estadíos tipo gamontes extracelulares en el ciclo vital de *Cryptosporidium* con evidentes *Syzygy* (del griego syn=junto, zygon=huevo) en algunos de estos estadíos (Hijjawi y col., 2002; Rosales y col., 2005). Estos estadíos en *Syzygy* resultan de la fusión de dos gamontes de diferente sexo que se rodean por una cubierta protectora y se transforman así en un gametoquiste. Cada forma sexual se divide y origina gametos masculinos y femeninos los cuales, posteriormente se fusionan para originar ooquistes. Este mecanismo de formación de *Syzygy*, ya descripto en las gregarinas, apoyaría la reclasificación fenotípica de *Cryptosporidium* (Hijjawi y col., 2002; Rosales y col., 2005; Zanaro y Garbossa, 2008)

Apoyándo estos últimos comentarios, Hijjawi y col. (2004), demostraron la posibilidad de cultivar *Cryptosporidium* extracelularmente (en cultivos libres de células huésped), pudiendo por primera vez desarrollar todo el ciclo completo de *Cryptosporidium* en cultivos libres de células. Esto refuerza mas aún los análisis filogenéticos de Carreño y col. (1999), y las mismas observaciones hechas por Hijjawi y col. (2002) y Rosales y col. (2005) que este organismo tiene una mas estrecha relación con protozoos tales como las gregarinas que con las coccidias. Aunque un estudio posterior ha reportado una falla de *Cryptosporidium* spp. para propagarse en cultivos libres de células huésped, sugiriendo que éste método puede tener que ser modificado antes de que la reproducción pueda ser obtenida (Thompson y Smith, 2011). Sin embargo, esto es más probable debido al hecho que el protocolo para los medios libres de células y las condiciones descriptas por Hijjawi y col., (2004) no se cumplen (Boxell y col., 2008).

En otro estudio, se demostró que en una prueba con anticuerpos fluorescentes con anticuerpos monoclonales anti *Cryptosporidium*, hubo una reacción cruzada con ooquistes de una gregarina *Monocystis* (Bull y col., 1998). Se sugirió que la reactividad cruzada fue hecha por propiedades biológicas similares entre los dos parásitos no compartidos por otros apicomplejos tales como las coccidias (Carreño y col., 1999; Hijjawi y col., 2002).

Si *Cryptosporidium* es una gregarina, esto explicaría porque es insensible en su lucha a las drogas anticoccidias, así como la frecuente aparicion de resultados falsos positivos con muestras ambientales cuando métodos basados en anticuerpos son utilizados, los cuales podrían estar reaccionando cruzadamente con otros estadíos de gregarinas. Esto, una vez mas, pone en relieve que corregir las clasificaciones de los protozoos parásitos no son solo de interés científico, sino que son de considerable importancia para su aplicación en los campos de la parasitología y la epidemiología (Tenter y col., 2002; Rosales y col., 2005; Thompson y Smith, 2011).

Varias especies de *Cryptosporidium* fueron nombradas según en el huésped en que fueron encontradas. Mas de 20 especies de *Cryptosporidium* fueron descriptas en varios huéspedes animales a lo largo de los años sin embargo la validez de la mayoría de las especies no ha sido establecida aún (Fayer y col., 1997; Xiao y col., 1999; Morgan y col., 1999-b; Egyed y col., 2003; Fayer, 2010; Slapeta J., 2013). Subsecuentes estudios de transmisiones cruzadas y morfológicas han invalidado muchas especies de *Cryptosporidium* (Fayer y col., 1997; Egyed y col., 2003; Fayer, 2010).

El número exacto de especies no está todavía claro, pero los métodos moleculares son por hoy la mejor opción para comprender la taxonomía de éste género. De *Cryptosporidium*, había sólo 6 sobre 20 especies reconocidas en 1990. Mientras que para el 2002 son 10 las especies aceptadas como válidas taxonómicamente como resultados de las caracterizaciones moleculares (Andrew Thompson, 2002). Hoy tenemos 24 especies válidas de *Cryptosporidium* (Rossle y Latif, 2013; Slapeta J., 2013) (Tabla 1), y mas de 70 genotipos han sido descriptos (Zhang y col., 2013). Puede incluso haber mas de una especie en peces. Hay varias especies sin denominación (Slapeta J., 2013).

TABLA 1. ESPECIES RECONOCIDAS DE CRYPTOSPORIDIUM, HUÉSPED Y LOCALIZACIÓN (ZANARO Y GARBOSSA, 2008; FAYER, 2010; ROSSLE Y LATIF, 2013; ZHANG Y COL., 2013; SLAPETA J., 2013)

Especies	*Dimensión de los ooquistes (mm)*	*Sitio de infección*	*Hospedador*
C. andersoni	5,0-6,5 x 6,0-8,1	Estómago	Bovinos, camellos
C. baileyi	4,6 x 6,2	Tráquea, bursa,, cloaca	Gallinas, pavos
C. bovis	4,76-5,35 x 4,17-4,76	Intestino delgado	Bovinos
C. canis	4,95 x 4,71	Intestino delgado	Caninos, humanos
C. fayeri	4,5-5,1 x 3,8-5,0	Epitelio intestinal	Canguro rojo
C. felis	4,5 x 5,0	Intestino delgado	Gatos
C. fragile	4,70 x 4,37	Intestino delgado	Ranas
C. galli	8,5-8,8 x 6,2-6,4	Pro ventrículos	Aves
C. hominis	4,5 x 5,5	Intestino delgado	Humanos, monos
C. macropodum	no proporcionado	Intestino	Canguro gris
C. meleagridis	4,0-4,5 x 4,6-5,2	Intestino delgado	Pavos
C. molnari	4,72 x 4,47	Estómago	Peces
C. muris	5,6 x 7,4	Estómago	Roedores, mamíferos
C. parvum	4,5 x 5,5	Intestino delgado	Bovinos, ovejas, cabras, humanos
C. ryanae	5,3 x 4,40	Intestino delgado	Bovinos
C. scophthalmi	3,7-5,03 x 3,03-4,69	Epitelio y lumen intestinal	Peces
C. saurophilum	4,0-5,0 x 4,8-5,6	Epitelio y lumen intestinal	Lagartos, serpientes
C. serpentis	4,8-5,6 x 5,6-6,6	Estómago	Serpientes, lagartijas
C. suis	5,05 x 4,41	Intestino delgado	Cerdos
C. scrofarum	5,45 x 4,63	Intestino delgado	Cerdos
C. tyzzeri	4,73 x 4,41	Epitelio y lumen intestinal	Roedores, mamíferos
C. varanii	4,2-5,2 x 4,4-5,6	Intestino y mucosa cloacal	Lagartijas
C. wrairi	4,0-5,0 x 4,8-5,6	Intestino delgado	Cobayos
C. xiaoi	4,21-5,0 x 4,0-5,0	Intestino delgado	Ovejas, yak, cabras

Dentro del género, muchas especies han sido descriptas con diferencias en el rango de huéspedes, localización en órganos o patogenicidad (Egyed y col., 2003; Fayer, 2010). A pesar de la amplia variedad de especies de criptosporidios actualmente descriptos, *C. parvum* es el mas comúnmente identificado en los mamíferos (Guselle y col., 2003).

A pesar de todo esto, la taxonomía de *Cryptosporidium* permanece aún hoy parcialmente resuelta y el estado de especies y variantes genéticas será un importante y controvertido ítem futuro para resolver (Cacció y col., 2005). Al presente, la mayoría de los autores coinciden que varias especies son las que existen dentro del género, pero su número exacto no está claro (Egyed y col., 2003; Slapeta J., 2013).

GENOTIPOS

El desarrollo de las herramientas moleculares para identificar especies morfológicamente indistinguibles, permitió a los investigadores definir relaciones entre especies, potenciales huéspedes y vías de transmisión (Fayer, 2010; Helmy y col., 2013).

Aunque los aislamientos de *C. parvum* de humanos, animales de granja, animales de compañía y roedores son similares evolutiva y morfológicamente, se observaron diferencias en la especificidad de huéspedes, períodos de prepatencia, patencia y patogenicidad. Por ejemplo, muchos de los aislamientos de humanos no son infectivos en terneros, ratones, o cobayos. Por el contrario, los aislados bovinos, son infectivos para humanos, terneros neonatos y ratones (Xiao y col., 1999).

Esto promovió una reestructuración de los aislamientos de diferentes huéspedes y orígenes geográficos, y condujo al establecimiento de varios genotipos. *C. parvum* venía siendo considerado la única especie infectiva para humanos. Sin embargo hubo estudios que demostraron que pacientes inmunocomprometidos son especialmente susceptibles a una amplia variedad de especies de *Cryptosporidium* y genotipos, lo cual posteriormente complica el reconocimiento de su implicancia en salud pública de varias especies y

aislados (Egyed y col., 2003; Slapeta J., 2013). Además, las diferencias entre aislamientos han sido demostradas a nivel molecular por varias técnicas, como el análisis por microsatélites. Así un estudio reciente demostró la existencia de cuatro diferentes alelos en aislados daneses de *Cryptosporidium* de origen humano y bovino (Kvác y col., 2013).

Así la criptosporidiosis humana es causada por 2 genotipos de *C. parvum*: Tipo I (también conocido como genotipo humano o antroponótico, y actualmente denominados *C. hominis*) responsable de aproximadamente entre el 25% y el 37,8% de los casos, y Tipo II (o genotipo bovino. Actualmente *C. parvum*), responsables entre el 61,5% y 98% de las infecciones en humanos (Sulaiman y col., 1998; Akiyoshi y col., 2003; Hunter y Thompson, 2005). El porcentaje restante correspondió a *C. meleagridis* (Hunter y Thompson, 2005). Estos genotipos tienen diferencias biológicas en términos de rangos de huéspedes. El genotipo II (actualmente *C. parvum*) parece ser infeccioso para una amplia variedad de mamíferos, mientras que el genotipo I (actualmente *C. hominis*) parece ser altamente selectivo, infectando principalmente a humanos, aunque se logró experimentalmente infecciones en cerdos neonatos gnotobióticos (Pereira y col., 2002), con lo que se confirma que *C. parvum* no es una simple especie uniforme (Monis y Thompson, 2003; Cacció y col., 2005; Helmy y col., 2013; Slapeta J., 2013), y que está compuesta al menos por 8 diferentes genotipos morfológicamente idénticos (humano, mono, ganado, ratón, perro, cerdo, marsupiales y hurón) (Abe y col., 2003; Egyed y col., 2003).

Por lo tanto, las especies de *Cryptosporidium* encontradas en humanos, tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos, incluyen *C. meleagridis, C. felis, C. canis, C. muris, C. genotipo pig* (actualmente *C. scrofarum*) y *C. genotipo cervine* (Akiyoshi y col., 2003; Moore y col., 2003; Cacció y col., 2005; Fayer, 2010; Kvác y col., 2013). En particular, *C. meleagridis*, es un parásito originalmente descripto en pavos, pero ahora reconocido como un patógeno emergente en humanos, responsable del 1% de todas las infecciones de Reino Unido y del 10% de las infecciones en Perú, donde su prevalencia es tan alta como la

de *C. parvum*. La implicancia de estos hallazgos es que animales de granja, mascotas domésticas e incluso algunos animales salvajes son potencial fuente de infección para humanos (Cacció y col., 2005).

CICLO VITAL

Muchos aspectos acerca de la biología y naturaleza de la interacción entre *Cryptosporidium* y la célula huésped no se conocen en su totalidad (Tzipori y Ward, 2002), la infección ocurre principalmente por la ingestión de ooquistes eliminados con las heces de animales infectados o portadores adultos asintomáticos (Tzipori y Ward, 2002; Castro-Hermida y col., 2006; Thompson y col., 2003). El ciclo es directo y monógeno, y sigue el patrón de ciclo descripto para otras coccidias entéricas, el cuál incluye un ciclo merogónico con dos generaciones de merontes, y una fase gametogónica con macrogametas, microgametas, cigotos y esporogonia (De Graaf y col., 1999; Tzipori y Ward, 2002; Monis y Thompson, 2003; Thompson y col., 2003; Zanaro y Garbossa, 2008; Rossle y col., 2013).

El ciclo vital (Figura 1) es complejo e involucra seis diferentes etapas de desarrollo (Hannahs, 1999; Monis y Thompson, 2003; Brooks, 2005; Nemejc y col. 2013):

-Desenquistamiento del ooquiste ingerido en el intestino delgado con la liberación de los cuatro esporozoítos (Smith y col., 2005) (Figura Nº 1-a).

-Invasión de las células epiteliales intestinales a través del extremo apical diferenciado del esporozoíto dentro de una vacuola parasitófora formada por las membranas de la célula huésped, y el inicio de la etapa de multiplicación asexual (Nesterenko y col., 1999) (Figura Nº 1-b y c).

-Diferenciación de microgametos y macrogametos (Figura Nº 1-g y h).

-Inicio de la fertilización de la reproducción sexual (Figura Nº 1-i).

-Desarrollo de los ooquistes (Smith y col., 2005) (Figura Nº 1-j y k).

-La formación de nuevos esporozoítos infecciosos dentro del ooquiste, el cuál es luego excretado en las heces. Un nuevo ciclo da comienzo cuando este ooquiste es ingerido por un nuevo huésped (Sulaiman y col., 1998; Hannahs, 1999; Rossle y col., 2013) (Figura Nº 1-j).

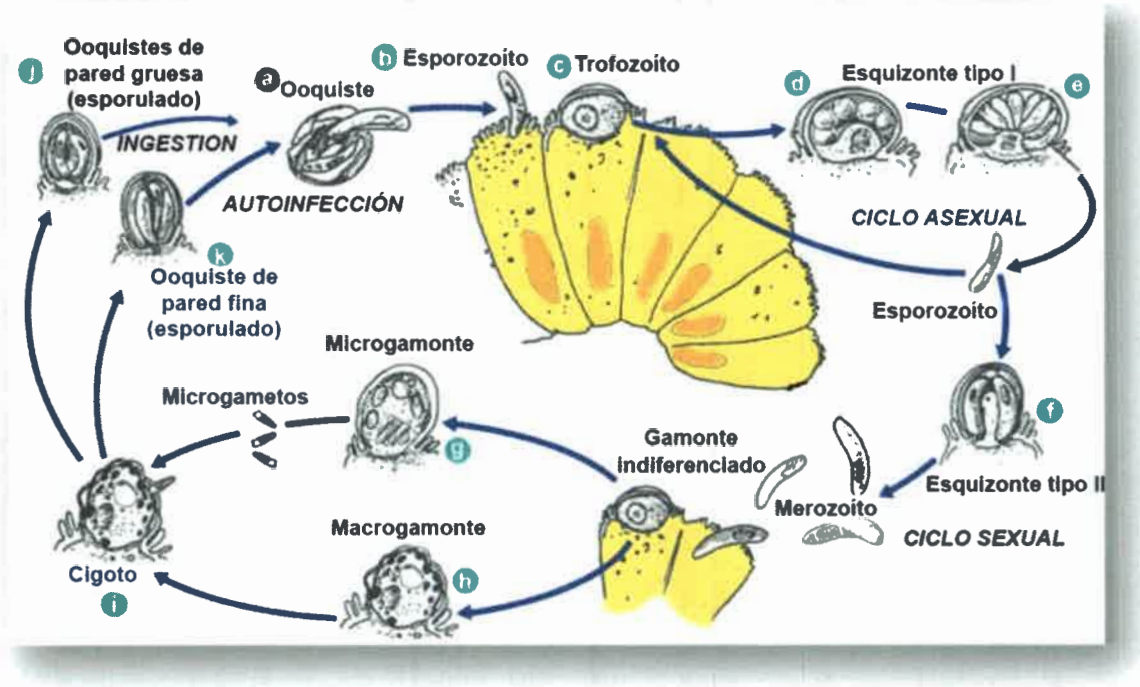

FIGURA Nº 1. CICLO VITAL DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. (Adaptado de Current , 1991)

Aunque la parte activa del ciclo ocurre en el intestino delgado de animales domésticos, salvajes y del hombre, en el medio ambiente está presente un estadío bajo la forma de ooquistes esporulados ovoides de 4-6 µm de longitud con una doble pared, y que es resistente a la mayoría de los procesos de oxidación y clorado (Darnault y col., 2004; Barta y col., 2006). Tienen un volumen promedio de 57,613 μm^3 (Thompson y col., 2003). Este ooquiste esporulado es el único estadio exógeno. Consiste de cuatro esporozoítos contenidos dentro de una doble pared gruesa, y que son excretados desde el interior del cuerpo de un huésped infectado a través de sus heces (Fayer y col., 1997; Thompson y col.,

2003; Rimhanen-Finne, 2006). Constituye la forma transmisiva de este organismo y se encuentra frecuentemente en agua, ya sea por descarga de desechos o directamente agua derivada de terrenos de pastoreo de ganado o proveniente de animales salvajes (Davies y col., 2003; Quiroz y col., 2000).

La fase endógena comienza luego que el ooquistes es ingerido (ó inhalado) por un huésped susceptible. Los esporozoitos desenquistan del ooquiste, se liberan los 4 esporozoítos desnudos y parasitan las células epiteliales del tracto gastrointestinal o tracto respiratorio (Figura Nº 1-b) (Lindsay y Blagburn, 1991; Duffy, 1999; Okhuysen y col., 2002; Tzipori y Ward, 2002; Monis y Thompson, 2003; Rimhanen-Finne, 2006; Rossle y col., 2013). Para la mayoría de los coccidios, el desenquistamiento de los esporozoítos requiere exposición a condiciones de reducción seguida de exposición a enzimas pancreáticas y/o sales biliares (Smith y col., 2005). Para *Cryptosporidium*, tal exposición puede exacerbar el desenquistamiento, pero los esporozoítos pueden desenquistar en solución acuosa tibia solamente, posiblemente permitiendo la infección y autoinfección de sitios extraintestinales: la conjuntiva ocular, el tracto respiratorio, la vejiga urinaria, los nódulos linfáticos, testículo, ovario, útero y vagina (Fayer y col., 1997; Quiroz y col., 2000; Smith y col., 2005).

Una vez desenquistados, cada esporozoíto se adhiere a la superficie luminal de la célula epitelial, rodeándose de la microvellocidad, haciéndolo intracelular pero extracitoplasmático. Una organela única alimentadora se desarrolla entre el citoplasma de la célula huésped y el parásito, precisamente en el margen basal de la vacuola parasitófora (Nesterenko y col., 1999). Esta función no está bien dilucidada. Excepto por los microgametos y merozoítos, los cuales dejan las células huésped para invadir otras células, todos los estadios endógenos están localizados sobre la superficie epitelial. Cada esporozoíto se diferencia en un trofozoíto esférico (Figura Nº 1-c) (Koudela y col., 1989; Fayer y col., 1997; Okhuysen y Chappell, 2002; Zanaro y Garbossa, 2008).

Ningún otro organismo altera tan extensivamente la membrana celular para crear un nicho para si mismo entre la membrana celular y el citoplasma celular. No se explican los mecanismos de este proceso, ni las implicancias de la inusual accesibilidad del parásito en este lugar. La ubicación y la naturaleza de este doble secuestro desde el lumen del intestino y el citoplasma celular, es la clave para su enigmática resistencia a la quimioterapia. Además, de esta manera se encuentra protegido de la respuesta inmune del huésped y del entorno hostil del intestino, mientras accede a los reservorios energéticos y nutricionales de la célula huesped. A diferencia de cualquier otro coccidio, *Cryptosporidium* tiene además una estructura única conocida como organela alimentadora de membrana, que directamente separa el citoplasma celular del citoplasma del parásito. Se asume que la membrana vacuolar parasitófora provee solo una función protectiva, mientras que la organela alimentadora de membrana es el sitio de absorción de energía y nutrientes de la célula huésped (Duffy, 1999; Nesterenko y col., 1999; Tzipori y Ward, 2002). Es de esperar, sin embargo, que la membrana vacuolar parasitofora es también selectivamente permeable a ciertas moléculas del lumen intestinal. Esto se basa en el hecho que la membrana vacuolar parasitofora, originalmente derivada de la membrana de la célula huésped, puede mantener parte de su función absortiva y otras actividades funcionales (Tzipori y Ward, 2002; Monis y Thompson, 2003; Thompson y col., 2003).

La multiplicación asexual se desarrolla con dos generaciones sucesivas de esquizontes liberando 8 y 4 merozoítos respectivamente (Figura Nº 1-e y f) (Tzipori y Ward, 2002; Rimhanen-Finne, 2006). Esta multiplicación asexual, llamada esquizogonia o merogonia, resulta cuando el núcleo del trofozoíto se divide. *C. baileyi* tiene tres tipos de esquizontes o merontes, y *C. parvum* tiene dos. Para *C. parvum*, de los esquizontes tipo I se desarrollan seis a ocho núcleos y cada uno es incorporado dentro de un merozoíto, un estadio estructuralmente similar al esporozoíto. Cada merozoito maduro, teóricamente, deja el esquizonte para infectar otra célula huésped y se desarrolla nuevamente otro

esquizonte tipo I o uno tipo II el cual produce cuatro merozoítos (Lindsay y Blagburn, 1991). Se especula que sólo los merozoítos de los esquizontes tipo II inician la multiplicación sexual (gametogonia) infectando nuevas células huésped diferenciándose ya sea en un microgamonte (masculino) o macrogamonte (femenino) (Okhuysen y col., 2002; Rimhanen-Finne, 2006).

Cada microgamonte se transforma en una estructura multinucleada y cada núcleo es incorporado dentro de un microgameto, equivalente a una célula espermática. Los macrogamontes permanecen uninucleados, equivalentes a un óvulo. Esto hace asumir que sólo a partir de los macrogamontes fertilizados, se desarrolla un ooquistes que esporula *in situ* y contiene cuatro esporozoítos. Los ooquistes en el tracto gastrointestinal son excretados con las heces, mientras que aquellos en el tracto respiratorio salen del organismo con las secreciones nasales o respiratorias (Lindsay y Blagburn, 1991; Fayer y col., 1997; Monis y Thompson, 2003; Thompson y col., 2003).

Hoy se sabe que existen dos tipos de ooquistes: unos con paredes delgadas (Figura Nº 1-k) y otros con paredes gruesas (Figura Nº 1-j). Los ooquistes con paredes delgadas liberan esporozoítos que autoinfectan al huésped dando una enfermedad crónica y persistente, mientras que aquellos con paredes gruesas, dejan el organismo para infectar a otros huéspedes (Fayer y col., 1997; Duffy, 1999; Monis y Thompson, 2003).

La autoinfección en el cuál la secuencia de las fases sexuales y asexuales del ciclo vital son repetidas dentro del mismo huésped, es inusual entre otros géneros coccidios. Los ooquistes de *Eimeria, Hammondia, Isospora* y *Toxoplasma* deben esporular fuera del huésped para volverse infecciosos. Los ooquistes de *Frenkelia* y *Sarcocystis* esporulan internamente pero son infectivos sólo para otras especies huéspedes. *Cryptosporidium* y *Caryospora* son los únicos coccidios en los que los ooquistes esporulan *in situ* y autoinfectan (Fayer y col., 1997). Justamente la capacidad del parásito de persistir dentro

de un único huésped se le atribuye a estas reiteradas merogonias de primera generación y a la producción de estos ooquistes esporulados de paredes delgadas (Tzipori y Ward, 2002).

El período prepatente es el tiempo mas corto después de la ingestión del ooquiste infectante para completar el ciclo de vida endógeno y excretar nuevamente ooquistes desarrollados. Este tiempo varía con el huésped y especies de *Cryptosporidium*. Experimentalmente el período de prepatencia determinado para *C. parvum* varió de dos a siete días para terneros, dos a catorce días para perros, tres a seis días para cerdos, dos a cinco días para corderos y cuatro a veintidós días para humanos. El período patente es la duración de la excreción de ooquistes. Experimentalmente el período patente determinado para *C. parvum* varió de uno a doce días para terneros, tres a treinta y tres días para perros, cinco a catorce días para cerdos y uno a veinte días para humanos (Fayer y col., 1997; Thompson y col., 2003).

Las fases extraintestinales que se le describen a este parásito, no deben ser menospreciadas. Ooquistes inyectados al torrente circulatorio de ratones o esporozoitos colocados dentro de la cavidad abdominal condujeron a infección intestinal. El curso de la migración de los esporozoitos desde estos sitios al intestino no se conoce. Estas fases extraintestinales han sido también observadas en *Eimeria tenella* y *E. maxima* (Tzipori y Ward, 2002).

Infecciones extraintestinales

Los *Cryptosporidium* han sido siempre descriptos como causantes de diarrea en diferentes especies animales, incluyendo humanos. En los mamíferos, estos protozoos usualmente infectan los enterocitos del intestino delgado, aunque células del intestino grueso, sistema biliar y tracto respiratorio pueden encontrarse infectados, fundamentalmente de individuos inmunocomprometidos (Fleta y col., 1995).

La infección de la vejiga urinaria y del epitelio del conducto biliar ha resultado en colecistitis y colangitis esclerosante en pacientes con SIDA (Arrowood, 1997). También fue descripta en animales naturalmente infectados. La vejiga, conducto biliar y pancreático infectados fueron descriptos en un mono *rhesus* joven y en un verraco joven (Fleta y col., 1995). Los síntomas reportados incluyen fiebre, dolor no irradiado del costado superior derecho abdominal, nauseas, vómitos y en algunos casos diarrea e ictericia. Suelen ser hallazgos frecuentes la bilirrubina sérica y las enzimas hepáticas elevados acompañados de dilatación y engrosamiento de la pared de la vejiga urinaria y de los conductos biliares. El diagnóstico debe ser confirmado mediante el examen de biopsias o por identificación de ooquistes en la bilis (Arrowood, 1997).

La criptosporidiosis pancreática con colonización de los conductos pancreáticos ha sido reportada en varias oportunidades en individuos inmunocomprometidos. Sólo existe un único reporte caso de criptosporidiosis pancreática en un individuo inmunocompetente. En este individuo, una semana después que la enteritis fue diagnosticada, altos niveles de amilasa sérica fueron detectados. Los análisis de laboratorio revelaron ascitis con agrandamiento del páncreas. Ningún otro agente etiológico fue identificado. Pacientes con SIDA con infecciones criptosporidiales pancreáticas, han exhibido además infecciones del conducto biliar y de la vejiga urinaria (Arrowood, 1997).

En cuanto a la criptosporidiosis respiratoria ha tenido reportes en forma creciente, particularmente en individuos inmunocomprometidos. (Arrowood, 1997). Se ha reportado el caso de un ternero lactante con invasión del epitelio respiratorio y que padecía de criptosporidiosis intestinal (Fleta y col., 1995). Los síntomas incluyen fundamentalmente tos y respiración superficial. Pocos reportes han demostrado *Cryptosporidium* en el epitelio de la mucosa bronquial. La mayoría de los casos han sido diagnosticados por la

presencia de ooquistes en el esputo, aspirados traqueales, fluidos de lavajes broncoalveolares, y exudado alveolar (obtenido por biopsia pulmonar) (Arrowood, 1997).

Las especies de *Cryptosporidium* presentes en el tracto respiratorio son probablemente *C. parvum*, como así también las especies específicas de las aves como *C. meleagridis* y *C. Baileyi*, los cuales pueden infectar el tracto respiratorio de pavos y otras aves, pero no se ha demostrado que infecten a mamíferos. Una excepción es un caso de *C. baileyi* que infectó un humano con SIDA (Fleta y col., 1995; Arrowood, 1997).

En cerdos infectados experimentalmente, las infecciones del tracto respiratorio o de la tráquea y sacos conjuntivales fueron reportados. La infección de la mucosa uterina también fue inducida después de la inoculación experimental intrauterina con *Cryptosporidium* spp. de ratones adultos. (Fleta y col., 1995; Fayer y col., 1997).

En resumen, aunque la criptosporidiosis extraintestinal no es común en mamíferos, esto está muy bién documentado en humanos inmunocomprometidos y aves (Anderson, 1986; Angus, 1990). La demostración de varios estadios del ciclo vital de *Cryptosporidium*, incluyendo ooquistes, en la tráquea y saco conjuntival de cerdos experimentalmente infectados confirma que el ciclo completo como se describe para la infección intestinal puede tomar lugar en tejidos extraintestinales, pero la vía de llegada a los diferentes sitios extraintestinales, permanece aún poco clara (Fleta y col., 1995).

EPIDEMIOLOGÍA

Generalidades

La información epidemiológica de la infección criptosporidial en animales está muy dirigida a animales de importancia económica, particularmente muy estudiada en rumiantes. Este parásito ha sido reconocido en más de 80 especies mamíferas del mundo entero y la susceptibilidad es edad dependiente y las infecciones clínicas están

circunscriptas, en términos generales, a neonatos (Tzipori y col., 1994; Casemore y col., 1997; Fayer y col., 2000a).

En términos generales la distribución ambiental de *Cryptosporidium* depende de la distribución de las diferentes fuentes como poblados, actividad agrícola y animales de vida silvestre. La importancia o el aporte de cada una de las fuentes con respecto a la presencia de este tipo de parásitos en el medio ambiente se desconoce (Heitman y col., 2002; Reinoso y col., 2007).

Las fuentes potenciales de infección para los animales de producción son:

1) Otros animales infectados jóvenes (o adultos) de su misma especie infectados, especialmente en situaciones de hacinamiento (cría intensiva).

2) Otras especies animales infectadas como roedores, gatos, perros o animales salvajes.

3) Transportadores mecánicos tales como insectos, pájaros y humanos.

4) Pezones, alimentos, agua, camas, comederos, elementos de limpieza, palas, ruedas de vehículos, todo contaminado con materia fecal de animales infectados (Forslund y col., 2011).

5) Los destetes a edades tempranas parecen ser un factor de riesgo muy importante.

En países, como por ejemplo en Dinamarca, existe una tendencia creciente en permitir a los animales a pastar en zonas marginales cerca de arroyos así como también el uso de desechos provenientes de explotaciones porcinas como fertilizante en los campos, lo que constituye un érea muy importante a estudiar como potencial zoonótico de estas prácticas al contaminar fuentes de agua para consumo (Maddox-Hyttel y col., 2006; Ruecker y col., 2012). Recientemente, *Cryptosporidium* y *Giardia* han sido encontrados en

la mas alta prevalencia en Dinamarca, sin embargo su impacto es aún desconocido (Roepstorff, 2005). El impacto sobre la salud humana y animal sobre éstas prácticas ha llamado la atención, dado que muchos microorganismos se encuentran en la heces de animales, tales como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157, y *Yersinia enterocolitica*, y que pueden causar enfermedad en seres humanos. El agravante es que los ooquistes de *Cryptosporidium* pueden sobrevivir por períodos mucho mayores que el resto de éstos agentes infecciosos (Xiao y col., 2006).

Varios estudios de los años ´80 remarcaron la importancia del parásito como causa de gastroenteritis esporádica aguda (Casemore y col., 1997). La enfermedad gastrointestinal causada por *Cryptosporidium* es usualmente autolimitante (Baumgartner y col., 2000). Los brotes de criptosporidiosis pueden tener un marcado impacto en la salud pública ya que causa una prolongada diarrea y deshidratación con severo riesgo para individuos inmunocomprometidos (Quiroz y col., 2000). Por lo tanto, la implicancia epidemiológica a la salud humana de la infección del ganado por *C. parvum* realza la importancia de recolectar información sobre la prevalencia en especies mamíferas las cuales pueden servir como reservorio del parásito (Quílez y col., 1996a; Roy y col., 2006), aunque los estudios realizados por Uehlinger y col. (2006) demuestran que las vacas adultas, por ejemplo, no revisten importancia como fuente de *C. parvum* para humanos. Mientras que estos animales si resultan ser susceptibles a *C. bovis* y *C. andersoni*, que no son de carácter zoonótico.

El vínculo entre las infecciones animales y humanas ha sido una cuestión que ha dominado gran parte del esfuerzo de los investigadores. Dado que puede transmitirse por agua, la fuente de contaminación a la misma sigue siendo un tema crítico (Ruecker y col., 2012). El rol que las infecciones animales pueden jugar en éste aspecto sigue siendo una controversia, en especial la de animales de producción y los animales silvestres porque su potencial como reservorio de la infección (Hunter y Thompson, 2005). Los animales de

compañía son considerados como fuente de infección potencial de *Cryptosporidium* para los humanos, el único estudio en el cuál los ooquistes recuperados de perros y gatos han sido genotipificados han mostrado que usualmente están infectados con especies huésped adaptadas: *C. canis* y *C. felis* (Abe y col., 2002). Así, los perros y los gatos, y posiblemente otros animales de compañía pueden no ser importantes reservorios zoonóticos de infección por *Cryptosporidium*. Sin embargo, hay datos epidemiológicos demostrando fuertes vínculos entre el contacto del hombre y los animales de producción (Fayer y col., 2000b; Hunter y Thompson, 2005) como fuera señalado anteriormente.

La mayor parte de los datos disponibles en la bibliografía acerca de la incidencia de *C. parvum* en animales domésticos está relacionada al ganado bovino, ya que es la especie animal en donde mas se ha estudiado este protozoo. Los estudios sostienen que la edad de mayor nivel de infección en bovinos está antes del primer mes de vida, sugiriendo que es el grupo etario más vulnerable a la criptosporidiosis (Roy y col., 2006).

Existen numerosos reportes acerca de la prevalencia en ganado doméstico tales como cabras, llamas, ganado, ovejas, caballos y cerdos (Guselle y col., 2003; Zhang y col., 2013), en donde la prevalencia es variable (Rodriguez y Royo, 2005). En los Estados Unidos existen grandes variaciones en cuanto a la incidencia, tanto como que en algunos establecimientos no revelaron infección criptosporidial, mientras que otras granjas mostraron más del 50% de sus terneros infectados con variaciones del 7% al 75% de terneros infectados. Otro estudio sugiere que el 90% de las granjas lecheras de América albergan a este coccidio, y el 92% de las vacas adultas asintomáticas tienen anticuerpos IgG, IgG1, IgG2 e IgM específicos anti *C. parvum* (Zhu y col., 2000).

En cambio, las infecciones en cerdos han sido reportadas esporádicamente en todo el mundo (Weng y col., 2005; Zhang y col., 2013), pero la prevalencia permanece poco clara, dado que la mayoría de los estudios involucraron pocas granjas y animales. La

infección por *Cryptosporidium* spp. en cerdos es común (Nguyen y col., 2013) y tiene potencial como contaminante ambiental pero las infecciones pueden no demostrarse debido a su naturaleza asintomática. En Trinidad y Tobago, 19,6% (54 de 275) de los lechones muestreados estaban infectados con *Cryptosporidium*, de los cuales aproximadamente la mitad presentaba diarrea. Sobre dos granjas porcinas en Ohio, infecciones leves estuvieron confinadas a la maternidad y destete. (Casemore y col., 1997).

En Australia, *Cryptosporidium* fue detectado en el 22,1% de los cerdos muestreados (Johnson y col. 2008). Este reporte es mayor que los hechos previamente por Ryan y col. (2003), donde reportaron un 6% de cerdos positivos. En cuanto a la distribución etaria de los animales positivos, en general los estudios indican mayores prevalencias en animales post destete que en pre destete (Maddox-Hyttel y col., 2006; Vittovec y col., 2006). Johnson y col. (2008) reportó una prevalencia del 10,6% en lechones de pre destete y del 32,7% en los de post destete.

En Irlanda se detectaron 39 de 342 cerdos (11,4%), con tasas de infección más altas en los destetados (15%) y en las cerdas (13,3%) (Zintl y col., 2007).

En el este de China, la prevalencia fue del 12% similar a los hallazgos en Korea (10,5%) y Canadá (11%), pero diferente a la reportada en España (21,9%), Estados Unidos (5,3%) y Alemania (1,4%). Muchos factores pueden contribuir a estas diferencias, incluyendo el clima, prácticas de manejo y cría en diferentes países (Weng y col., 2005; Chen y Huang, 2007). En Vietnam recientes estudios reportaron una prevalencia entre el 14,5% (Nguyen y col., 2013) y el 18,1% de cerdos infectados y con un 71,9% de granjas positivas (Nguyen y col., 2012).

Por cierto, resulta complejo el comprtamiento epidemiológico de la enfermedad en los cerdos. No está claro el amplio espectro de la enfermedad, por lo que se atribuyen factores del huésped (como por ejemplo factores inmunitarios de la población expuesta) y

factores del parásito o la naturaleza de la infección de ellos (Casemore y col., 1997; Akiyoshi y col., 2003; Reinoso y col., 2007). Estos factores son complejos y se desarrollan o bien indirectamente, o por mecanismos específicos. El estado inmune claramente juega el mayor rol en términos de resolución y/o reinfección (Akiyoshi y col., 2003). Un individuo susceptible generalmente tiene más habilidad para transmitir la infección. El rol del parásito, en muchos aspectos todavía no es muy claro. Los ooquistes excretados al final de una infección pueden ser menos viables que los excretados en fases más tempranas, sugiriendo la posibilidad que tales sujetos infectados inmunes pueden limitar la infectividad de los ooquistes excretados a través de mecanismos inmunes pobremente comprendidos (Casemore y col., 1997; Reinoso y col., 2007).

Otros factores importantes son los inherentes al propio parásito como la viabilidad, virulencia y la capacidad infectiva de cada aislamiento (Reinoso y col., 2007). En cepas bien adaptadas en huéspedes gnotobióticos la mínima dosis infectiva puede ser tan baja como un solo ooquiste. En una situación normal con corderos calostrados, un mismo aislamiento mostró una dosis infectiva determinada pero la infección fue algo menor para desarrollarse y fue clínicamente menos severa. Otros aislamientos podrían tener una dosis infectiva diferente (Casemore y col., 1997).

Uno de los aspectos más relevantes es la especificidad de huésped. En muchos estudios, los ooquistes de *Cryptosporidium* fueron obtenidos de animales de una especie y administrados en animales de otra especie. Generalmente los aislamientos de una clase de vertebrados no han sido infectivos para animales de otra clase. (Casemore y col., 1997; Fayer y col., 1997). Los ooquistes de los reptiles y aves no infectaron a mamíferos con la posible excepción de *C. baileyi* en un humano inmunocomprometido, y aquellos de mamíferos no infectaron aves. Así, dentro de una clase de vertebrados, los ooquistes de una especie de *Cryptosporidium*, no siempre infectaron más de una especie huésped. Por ejemplo, *C. wrairi* infectó sólo cobayos y *C. felis* infectó sólo gatos. En contraste, los

ooquistes de *C. parvum* han sido encontrado infecciosos para, virtualmente, casi todos los mamíferos (Fayer y col., 1997).

Pereira y col. (2002) y Ryan y col. (2004) informaron de cerdos infectados con el Tipo II (*C. scrofarum*) que desarrollaron enfermedad más severa y tuvieron prepatencia y patencia más corta que lo sucedido con cerdos infectados con el Tipo I (*C. tyzzeri*).

Dada la naturaleza ubicua del Tipo II (*C. scrofarum*) y el aparente rango restringido de huéspedes del Tipo I, los datos sugieren que el Tipo I (*C. tyzzeri*) ha desarrollado un muy efectivo método para la transmisión entre humanos. Llamativamente la mayoría de estos estudios no reportados, o sólo un muy extremadamente bajo número de casos fueron del Tipo I (*C. tyzzeri*) y Tipo II (*C. scrofarum*) en el mismo huésped (Quiroz y col., 2000).

Preliminarmente, las observaciones en el laboratorio sugirieron que, cuando los dos Tipos infectaban simultáneamente al mismo huésped, el Tipo II (*C. scrofarum*) predominaba invariablemente, desplazando al Tipo I (*C. tyzzeri*) en un corto período. Esto ha sido observado en humanos infectados, terneros y cerdos gnotobióticos (Akiyoshi y col., 2003).

Las características más comunes que influencian marcadamente la epidemiología de estas infecciones son:

-*Epocas de año*: según las investigaciones es variable. Los patrones estacionales muestran una buena correlación con la temperatura (Jellison y col., 2002). Las infecciones criptosporidiales son típicamente vistas durante las épocas cálidas o estaciones húmedas en zonas tropicales, cuando se incrementan las lluvias presumiblemente resulta en una gran diseminación en aguas superficiales contaminadas. Un efecto que no parece ser visto en otros protozoos entéricos (Yui y Seo, 2004; Roy y col., 2006; Thompson y Smith, 2011), aunque existen algunas contradicciones al respecto (Chen y Huang, 2007). Mohammed y

col. (1999) encontraron en bovinos que los muestreos de primavera fueron significativamente menos positivos respecto a los muestreos de invierno del sudeste del estado de Nueva York. En contraste a estos hallazgos, Becher y col. (2004) encontraron que no hubo estacionalidad en la prevalencia sobre establecimientos bovinos en el oeste de Australia. En cambio, en el este de China, Chen y Huang (2007) encontraron que la prevalencia de *Cryptosporidium* en invierno fue mayor, indicándo que las bajas temperaturas y la alta humedad, como frecuentemente ocurre en esta estación en esa zona, pueden favorecer la transmisión. Maddox-Hyttel y col. (2006) encontraron un efecto significativo de la estación del año para los destetes porcinos con mayores niveles de excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* durante el invierno que durante el verano, en concordancia con los hallazgos de Chen y Huang (2007).

-*Potencial infectivo y variedad de huéspedes*: se han reportado más de 152 especies animales diferentes capaces de ser infectadas con *C. parvum* (Dillinghan y col., 2002).

-*Dosis infectiva baja*: algunos trabajos reportan cantidades tan bajas de ooquistes como 1-10 ooquistes (Dillinghan y col., 2002; Cacció y col., 2005).

-*Los ooquistes* son inmediatamente infecciosos cuando son excretados por las heces, pudiendo ser transmitidos de individuo a individuo por contacto (Casemore y col., 1997; Dillinghan y col., 2002; Reinoso y col., 2007).

-*Los ooquistes* son marcadamente estables y pueden sobrevivir por semanas a meses en el ambiente (Dillinghan y col., 2002; Darnault y col., 2004; Reinoso y col., 2007). A diferencia de otros patógenos intestinales *Cryptosporidium* puede infectar a varios huéspedes diferentes y puede sobrevivir en la mayoría de los diferentes medioambientes por largos periodos debido a su "quiste resistente", y habita en todos los climas y localidades (Okhuysen y col., 2002; Tzipori y Ward, 2002; Reinoso y col., 2007). *C. parvum* puede sobrevivir al almacenamiento de desechos bovinos y a los procesos habituales de

tratamiento de estos desechos (Xiao y col., 2006). Algunos autores sostienen una sobrevivencia en el medioambiente de hasta 18 meses (Duffy, 1999). Esta resistencia a las condiciones medioambientales y a los desinfectantes convencionales es casi el aspecto epidemiológico más sobresaliente, ya que inclusive tiene una gran habilidad de pasar a través de los tratamientos de agua (resistente a la cloración del agua para consumo) que sumado a la dosis infectante baja que posee contribuye a la persistencia de esta parasitosis en el medio ambiente (Duffy, 1999; Dillinghan y col., 2002; Okhuysen y col., 2002; Tzipori y Ward, 2002; Castro-Hermida y col., 2006). Los ambientes más húmedos y fríos pueden prolongar la supervivencia de los ooquistes (Maddox-Hyttel y col., 2006; Reinoso y col., 2007). Sin embargo, Li y col. (2005) en un estudio en California, pudieron determinar una rápida inactivación de ooquistes debida a la fluctuación de temperatura ambiental en las heces expuestas al sol durante los meses de verano, dado al aumento de temperatura interna de las heces.

Cuando los ooquistes son sometidos a temperaturas de 20°C por 6 meses, muchos de ellos permanecieron infecciosos para ratones lactantes (Fayer y col., 1998). Temperaturas mayores, resultaron en una más rápida pérdida de viabilidad. Algunos ooquistes sometidos a 25 y 30°C fueron infecciosos sólo 3 meses. El calentamiento de ooquistes desde 9 a 55°C durante 20 minutos resultó en pérdida de la infectividad para ratones lactantes. Ooquistes sometidos a 59,7°C por 5 minutos tuvieron muy baja infectividad, y otros a 71,7°C murieron a solo 5 segundos de sometidos. El congelamiento mata los ooquistes, inclusive en presencia de una variedad de crioprotectores (Fayer y col., 2000a). Estos hallazgos sugieren que los fluidos dentro de los ooquistes ofrecen una mínima protección a los esporozoítos. La desecación es letal para los ooquistes. Sólo el 3% se encontraron viables luego de 2 horas de desecación y la muerte del 100% se informó a las 4 horas (Anderson, 1986)

En un estudio que evaluó los efectos individuales y combinados de la temperatura, pH, amonio y tiempo de exposición sobre la viabilidad de los ooquistes de *C. parvum* se concluyó que la interacción entre éstas variables pueden tener efectos adverso sobre la supervivencia de los ooquistes en el agua. Bajas concentraciones de amonio son comúnmente encontradas en sistemas de lagunas de tratamiento basadas en algas, y que sobre largos períodos de tiempo pueden producir altas tasas de inactivación de ooquistes de *C. parvum* (Neumayerova y Koudela, 2008).

-La *dispersión medioambiental* puede conducir a la contaminación de agua de bebida o alimento. La contaminación de fuentes de agua por declive ha sido demostrada (Darnault y col., 2004), pudiendo ingresar a la cadena alimenticia a través de fuentes de agua para consumo (Ruecker y col., 2012), suelo o alimentos de origen animal. Hay que tener en cuenta, que prácticamente la única manera de remoción del agua para consumo, es la remoción física a través del filtrado (Duffy, 1999).

En muchos sistemas productivos, la transmisión directa o indirecta entre huéspedes infectados e individuos susceptibles puede estar influenciada por la densidad poblacional. Los factores de riego para una criptosporidiosis esporádica incluyen edad, viajes, contacto con individuos diarreicos y con animales de granja (Cacció y col., 2005). En alemania, se pudo determinar que la ocurrencia de estos patógenos entéricos estuvo significativamente asociada a animales jóvenes (Moore y col., 2001).

Sin embargo, el conocimiento de la influencia de los diferentes factores de manejo sobre la ocurrencia e intensidad de la criptosporidiosis, particularmente en cerdos, es limitado; se sabe que existe una influencia del ambiente como por ejemplo el tipo de piso utilizado, siendo mas predisponente de la enfermedad, aquellos pisos sólidos (Xiao y col., 1994).

HUÉSPEDES

Generalidades

C. parvum infecta a humanos y a una amplia variedad de animales domésticos y animales salvajes (Quiroz y col., 2000; Quílez y col., 2002). Otras especies de *Cryptosporidium* infectan aves (*C. Bailey, C. meleagridis*), peces (*C. molnari*), reptiles (*C. serpentis*) y pequeños roedores (*C. muris*) (Quiroz y col., 2000; Fayer, 2010; Xiao, 2010; Slapeta, 2013).

Criptosporidiosis en especies no mamíferas

Cryptosporidium ha sido reportado en especies de peces de agua dulce y marinos en todo el mundo (Casemore y col., 1997; Fayer y col., 1997). Dentro de las infecciones que ocurren naturalmente, la enfermedad ha sido reportada en al menos 30 diferentes huéspedes aviarios, donde es mas manifiesta como enfermedad respiratoria (Abbassi y col., 2000).

En anfibios existe solo un reporte de infección natural. Aunque los ooquistes fueron detectados, el autor sugiere que esto podría haber venido de la ingestión de ratones infectados. Ninguna otra información fue provista. Un grupo de investigadores reportó la infección experimental de anfibios con ooquistes de *C. parvum* de origen humano, mientras que para otro grupo les fue imposible infectar ranas con ooquistes de *C. parvum*, los cuales fueron infecciosos para ratones lactantes (Fayer y col., 1997).

En el caso de los reptiles, *Cryptosporidium* fue reportado en 57 especies de reptiles, incluyendo 40 especies de serpientes, 15 especies de lagartos y dos especies de tortugas. Poco se conoce de su distribución y prevalencia en estos animales (Fayer y col., 1997; Kaplan, 2002).

Criptosporidiosis en mamíferos

RUMIANTES

Debido a que en la especie donde mejor fue estudiada esta enfermedad es en los rumiantes, es que se incluyen algunas características relevantes acerca de la enfermedad en esta especie animal.

En un principio, sólo dos especies de *Cryptosporidium* habían sido comunicadas en rumiantes. La especie intestinal, *C. parvum*, que causa comúnmente criptosporidiosis aguda en rumiantes jóvenes. Y una especie abomasal, *C. muris* ha sido reportado en adultos crónicamente infectados (Fayer y col., 1997). Estudios posteriores hablan de *C. parvum* y *C. andersoni*, como las dos especies responsables de la criptosporidiosis en los rumiantes (Castro-Hermida y col., 2006). Actualmente son tres las especies de *Cryptosporidium*, de las 21 actualmente aceptadas (Rossle y Latif, 2013), que se describen como infectantes de los rumiantes domésticos: *C. parvum* (con predominio en terneros pre destete), *C. bovis*, recientemente descripto (con predominio en terneros post destete) y *C. andersoni* (en terneros mayores y adultos) (Robinson y col., 2006). De todos modos, *C. parvum* es el mas extendido enteropatógeno identificado en los terneros recién nacidos (Zhu y col., 2000; Watanabe y col., 2005; Singh y col., 2006; Uehlinger y col., 2006; Zhang y col., 2013). Si bien es una entidad que afecta en gran medida a animales jóvenes, Singh y col. (2006) pudieron observar que la criptosporidiosis por *C. parvum* es igualmente patógena tanto para vacas como para búfalos de todas las edades. *C. parvum* es altamente prevalente en terneros jóvenes de todo el mundo (Xiao, 2010). La infección natural ha sido reportada en animales tan jóvenes de hasta 4 días de edad, pero es mas común alrededor de las 2 semanas de edad y raro en terneros de menos de 1 semana y mayores de 4 semanas de edad. Los terneros recién nacidos experimentan una elevada morbilidad, pero con baja mortalidad cuando se trata de monoinfecciones (Zhu y col., 2000).

La mayoría de los signos de criptosporidiosis son vistos en terneros de predestete e incluyen diarrea acompañados de letargia, inapetencia, deshidratación y/o pobre condición corporal (Xiao, 2010). El número pico de ooquistes en animales diarreicos tanto en infecciones naturales como experimentales puede variar desde 10^5 a 10^7 ooquistes por gramo de materia fecal. En infecciones experimentales con un máximo de 1.5 x 10^6 ooquistes de *C. parvum* solo, causó diarrea de 4 a 18 días de duración (usualmente 6 días), y condujo a una severa deshidratación. Muchos brotes con diarrea prolongada e incluso alta mortalidad *C. parvum* fue el único enteropatógenos hallado (Becher y col., 2004; Fayer y col., 1997).

La criptosporidiosis ovina ha sido reportada en todo el mundo y su primer diagnóstico fue informado en 1974, en corderos diarreicos de 1-3 semanas de edad en una granja de Australia dedicada a la producción de ovinos. Mientras que la criptosporidiosis caprina tuvo su primer reporte en Tasmania (Australia) en 1981 (Fayer y col., 1997).

NO RUMIANTES: PORCINOS

La criptosporidiosis en los cerdos ha sido reportada en todo el mundo (Jeníková y col., 2011). Estudios sobre heces diarreicas de lechones lactantes y posdestete han identificado diversos géneros de virus considerados agentes causales de enteritis incluyendo rotavirus, coronavirus, calicivirus y astrovirus. En condiciones de campo, se han detectado combinaciones entre estos géneros y también asociaciones entre alguno de éstos con bacterias, como *Escherichia coli*, o con protozoarios como *Isospora suis* o *C. parvum* (Aguirre y col., 2000).

Actualmente, seis especies de *Cryptosporidium* han sido identificadas de cerdos, incluyendo a *C. suis*, *C. scrofarum* (anteriormente conocido como *Cryptosporidium* pig genotipo II), *C. parvum*, *C. muris*, *C. tyzzeri* (anteriormente conocido como *Cryptosporidium* pig genotipo I), y *C. andersoni*, aunque no se considera al cerdo como fuente importante de

C. parvum (Xiao, 2010; Kvác y col., 2013). Mientras tanto, experimentalmente, se reveló la susceptibilidad de los cerdos a *C. hominis* y *C. meleagridis* (Zhang y col., 2013; Kvác y col., 2013). Actualmente se sabe que las infecciones en cerdos son comunmente producidas por *C. suis* y *C. scrofarum* (Chen y col., 2011; Jeníková y col., 2011; Nemejc y col., 2012; García-Presedo y col., 2013; Yin y col., 2013). Con respecto a *C. muris* y *C. tyzzeri*, si bien se aislaron de cerdos, la infección no pudo ser confirmada experimentalmente (Kvác y col., 2013).

De las especies que afectan a los cerdos, *C. suis* es mas comunmente visto en lechones jóvenes, mientras que *C. scrofarum* es relativamente más común en cerdos mayores (Wang y col., 2010; Chen y col., 2011; Jeníková y col., 2011; García-Presedo y col., 2013; Nemejc y col. 2013).

Los cerdos son muy susceptibles a la infección por varias especies de *Cryptosporidium* y las tasas de prevalencia son similares a las encontradas en el ganado bovino de la misma región estudiada (Quílez y col., 1996b). La criptosporidiosis en los cerdos es usualmente subclínica (Núñez y col., 2003; Hamnes y col., 2007; Zintl y col., 2007) o en su defecto desarrollan una enfermedad diarreica autolimitante (Tzipori y col., 1994).

Los parásitos de los cerdos y su potencial para infectar a humanos se ha convertido recientemente en un problema importante entre la opinión pública por los innumerables brotes de enfermedades parasitarias relacionadas al agua de consumo entre ellas la criptosporidiosis. (Quiroz y col., 2000; Tzipori y Ward, 2002). Existen marcadas diferencias en la estructura poblacional de los criptosporidios de los cerdos y en su caracterizacion molecular entre y dentro de los diferentes paises (Helmy y col., 2013). A pesar del hecho de que los criptosporidios de los cerdos no siempre resultan en signos clínicos, los casos humanos infectados con *C. suis* y *C. scrofarum*, sugieren que estas dos

especies adaptadas al cerdo son potencialmente zoonóticas (Zhang y col., 2013; García-Presedo y col., 2013).

La prevalencia de *C. parvum* en cerdos ha sido reportada en algunos estudios, sin embargo, los patrones acerca de la infección y su duración en infecciones naturalmente adquiridas permanece sin reportes (Guselle y col., 2003; Chen y col., 2011). Se sabe muy poco acerca de la incidencia de este parásito en los cerdos (Ryan y col., 2003; Maddox-Hyttel y col., 2006; Suarez-Luengas y col., 2007; Xiao, 2010), como así también acerca de su importancia económica (Ryan y col., 2003; Xiao, 2010; Nemejc y col., 2012). La infección en cerdos está asociada generalmente a infecciones subclínicas sin diarrea, aunque otros estudios revelan la presencia de síntomas clínicos (Suarez-Luengas y col., 2007).

Los estudios sugieren que la contribución de *Cryptosporidium* a la coccidiosis porcina puede haber sido subestimada y los reportes de los diferentes países han mostrado no solo que es prevalente en los cerdos, sino que puede ocurrir simultáneamnete con *Isospora* y en animales mayores, lo que pudo aportar a su subestimación (Morgan y col., 1999-a).

La criptosporidiosis fue reportada por primera vez en cerdos (*Sus scrofa*) en Estados Unidos en 1977. De allí en adelante, ha sido descripta en países de todo el mundo como Australia, Japón, Estados Unidos y Vietnam (Quílez y col., 1996b; Fayer y col., 1997; De Graff y col., 1999; Izumiyama y col., 2001; Morgan y col., 1999; Nemejc y col., 2012; Quiroz y col., 2000; Vitovec y col., 2006; Suarez-Luengas y col., 2007; Johnson y col., 2008; Kvác y col., 2009b; Kvác y col., 2013), aunque el limitado número de estudios epidemiológicos hace dificultoso conocer la prevalencia de la infección en muchos otros países (Quílez y col., 1996b; Ryan y col., 2003). Esto último se debe a la opinión establecida en general que *Cryptosporidium* no es un serio causante de enteritis ya sea en lechones neonatos o post destete, ya que no se observan manifestaciones clínicas en lechones infectados

experimentalmente de mas de 15 días de edad, aunque los ooquistes eran detectados en las heces (Tzipori y col., 1982). Sin embargo, la criptosporidiosis en cerdos puede ser de interés económico, ya que un efecto negativo se ha asociado con la infección experimental en lechones de 8 días de edad (Quílez y col., 1996b).

El *Cryptosporidium* porcino genotipo I fue establecido como una nueva especie llamada *C. suis*, basado en caracterización biológica y estudios moleculares (Xiao y col., 2006; Suarez-Luengas y col., 2007; Kvác y col., 2009b; Helmy y col., 2013; Kvác y col., 2013). Actualmente *C. suis* permanece como una especie válida (Zhang y col., 2013). Esta especie tiene el mas amplio rango de huéspedes de todos los *Cryptosporidium* (Xiao y col., 2006; Neumayerova y Koudela, 2008). De todos modos se sabe que el cerdo se infecta además con *C. parvum*, lo que indica que el cerdo, potencialmente puede desempeñar algún papel como reservorio de infección para los seres humanos y otros animales (Morgan y col., 1999-a; Núñez y col., 2003; Ryan y col., 2003; Yu y Seo, 2004; Chen y Huang, 2007). De todos éstos, *C. parvum* es el mas importante de las especies zoonóticas, aunque el cerdo no es importante en la diseminación de esta especie (Xiao, 2010). *Cryptosporidium* porcino genotipo II (*C. scrofarum*) y *Cryptosporidium* pig genotipo I (*C. tyzzeri*) no han sido comunicados en humanos hasta el momento, pero hay un pequeño número de reportes de infecciones por *C. suis* y *C. muris* tanto en personas inmunocompetentes como inmunocomprometidas (Johnson y col., 2008; Kvác y col., 2013). *C. suis* ha sido aislado de un paciente con Virus de la Inmunodeficiencia Humana, aunque su potencial zoonótico es incierto y requiere estudios adicionales (Chen y Huang, 2007; Suarez-Luengas y col., 2007).

Si bien es *Cryptosporidium* porcino genotipo II (*C. scrofarum*) el mas frecuentemente reportado, y que también se cita a *C. muris* y *C. parvum*, también se describieron infecciones por *Cryptosporidium* mouse Genotipo I (*C. tyzzeri*) y un nuevo genotipo *Cryptosporidium spp.* cepa *Eire w65.5*. Es decir que se describian cinco especies y genotipos

de *Cryptosporidium* capaces de infectar a los cerdos (Johnson y col., 2008; Kvác y col., 2009a; Jeníková y col., 2011; Kvác y col., 2013). Actualmente se sabe que son seis con la nueva taxonomía (Nemejc y col. 2013; Zhang y col., 2013).

Aunque la infectividad de *C. parvum* de los cerdos ha sido experimentalmente confirmada (Vitovec y Koudela, 2002; Chen y col., 2011; Nemejc y col., 2012), las infecciones con esta especie ha sido poco reportada (Morgan y col., 1999-a; Xiao, 2010). Similarmente a otros estudios, se encontraron infecciones en cerdas adultas, aunque esta especie es generalmente sabido de producir infecciones en animales juveniles solamente. Los análisis de secuencia de genes GP60 de *C. parvum* de los aislados hechos por Kvác y col., (2009b) revelaron que el alelo IIa del subtipo A16G1R1, el cuál fué descripto para ganado y humanos solamente. Este se convirtió en el primer reporte de este subtipo de *C. parvum* en cerdos. Aunque como se dijo anteriormente, las infecciones naturales por *C. parvum* en cerdos son raras, los resultados del genotipado mostraron la importancia epidemiológica de los cerdos como una baja fuente potencial zoonótica de los subtipos de *C. parvum* (Xiao, 2010).

Los estudios genéticos han demostrado profundas diferencias entre el genotipo "porcino" de *C. parvum*, versus los genotipos "humano" y "bovino". Analizándo la infectividad y la patogenicidad del genotipo "porcino" (aislado CPP-13) y comparándo los resultados con datos publicados acerca del genotipo "bovino" (aislado CPB-0), el aislado CPP-13 parece estar adaptada solo a la especie porcina. Estos hallazgos apoyan los resultados de otros estudios moleculares, de la existencia de esta nueva especie de *Cryptosporidium* adaptada a los cerdos (Enemark y col., 2003-a).

C. suis está perfectamente adaptado a los huéspedes porcinos, pero muy pobremente adaptado a los huéspedes rumiantes, y no es infectivo para ratones (Ryan y col., 2003; Ryan y col., 2004; Vitovec y col., 2006). La patogenicidad de *C. suis* en cerdos infectados

naturalmente no fue aún reportada y sólo fue descripta la infección experimental por Enemark H., *et al* (2003-b). De todos modos, algunos estudios revelaron que la mayoría de los cerdos infectados ya sea con el tipo I (*C. tyzzeri*) como por el tipo II (*C. scrofarum*), no estaban asociadas con diarrea, sugiriendo mas fuertemente que ambos genotipos están adaptados al huésped, aunque se requieren mas estudios para confirmar esta hipótesis (Ryan y col., 2003; Nemejc y col., 2012; Zhang y col., 2013). Aunque hay estudios en Alemania, donde *Cryptosporidium* fue detectado en el 1,4% de los lechones, todos presentaron diarrea (Ryan y col., 2003).

Los ooquistes de *C. parvum* genotipo bovino son morfológicamente idénticos al los ooquistes de *C. suis* (Ryan y col., 2004). El tamaño y la forma de los ooquistes de *C. parvum* porcino genotipo II no ha sido aún comunicado. Por lo tanto la prevalencia de *C. suis* en las granjas porcinas no es aún conocida. La mayoría de los reportes han descripto la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. (Vitovec y col., 2006; Xiao, 2010; Kvác y col., 2013).

Numerosos factores de riesgo, incluyendo la edad han sido asociados con la excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en terneros, sin embargo, ha sido reportado que las granjas porcinas con buenas prácticas de manejo y buena higiene pueden reducir la contaminación ambiental y de este modo retrasar las infecciones por *Cryptosporidium* spp. (Guselle y col., 2003).

Está bien demostrado entonces que la criptosporidiosis puede ser responsable de diarrea en los lechones (Quiroz y col., 2000). En neonatos y sobre todo en individuos inmunocomprometidos puede causar diarrea severa y enfermedad intestinal fatal (Guselle y col., 2003). En general, la prevalencia en maternidad bajo condiciones de infección natural, se reportan muy bajas (Quílez y col., 1996b; De Graaf y col., 1999). Un trabajo en Japón demostró una prevalencia del 33,2 % en lechones entre 1-3 meses de edad y que las probabilidades de excretar ooquistes en esta categoría era 100 veces mayor que en

animales de 6 meses de edad. Esto sugiere que los lechones luego del destete son importantes reservorios cuyo potencial de contaminación tiene consecuencias epidemiológicas importantes (Izumiyama y col., 2001).

Existen muchos trabajos que demuestran que naturalmente la criptosporidiosis está postergada hasta después del destete, con infecciones mayormente asintomáticas y usualmente de baja intensidad sin asociación estadística entre infección y síntomas clínicos (De Graaf y col., 1999; Zhang y col., 2013). Quílez y col., (1996b) no detectaron ooquistes en lechones lactantes ni adultos. Los mayores grados de infección los observó luego de que fueran destetados. Siempre se sugirió que la falta de infección en las cerdas adultas podría descartarlas como implicadas en algún rol en la epidemiología de la enfermedad en la maternidad. Esto contrasta con lo sugerido por otros autores en donde se implica directamente a las cerdas como fuente de infección para los lechones, pero sugiriendo que no tienen un rol importante, ya que el número de cerdos maduros eliminando ooquistes fue muy bajo (Quílez y col., 1996b).

Vitovec y Koudela (2002) reportaron no encontrar diferencias en ubicación y grado de infección criptosporidial entre lechones infectados experimentalmente ya sea, privados de calostro como alimentados con calostro, concluyendo que el calostro de las madres no parece proteger a los lechones contra la infección por *Cryptosporidium* spp. Sin embargo, llamativamente, Kvác y col., (2009a) observaron una prevalencia del doble a la reportada previamente por Vitovec y col., (2006) con anterioridad, para República Checa. En este mismo estudio se observó una correlación entre la edad y el genotipo/especie predominante. *C. suis*, sólo se registró en cerdos de menos de 7 semanas de edad, y *Cryptosporidium* pig genotipo II (*C. scrofarum*), se encontró con mayor frecuencia en cerdos de mas de 6 semanas de edad (Kvác y col., 2009a; Kvác y col., 2013). Quílez y col. (1996b) y Zhang y col., 2013, reportaron que *Cryptosporidium* es más prevalente y que es mas frecuentemente reportado en animales entre las 6 y 12 semanas de edad. Otros

estudios han demostrado bajas prevalencias en animales mayores. Hamnes y col. (2007) sugieren que el estrés que causa el destete podría hacer que sean más susceptible a la infección.

Estudios en Italia, Cuba y Checoslovaquia mostraron que los grados de infección en lechones lactantes fueron del 0,5 %, 2,1 % y 9 % respectivamente. Mientras que otros autores, también en Italia, no encontraron animales infectados de 88 lechones muestreados (Quílez y col., 1996a). Contrariamente a muchos de estos reportes, en Japón, en un estudio de prevalencia, los coccidios en general, siempre se aislaron con mayor frecuencia en lechones lactantes (Katsuda y col., 2006). Recientemente algunos estudios han indicado especificidad de edad para varias especies/genotipos de *Cryptosporidium* en cerdos, hecho ya demostrado con anterioridad en los rumiantes (Kvác y col., 2009b; Nemejc y col., 2012).

Se sugiere que el período de prepatencia para *C. suis* promedia los 4,8 días (con un rango de 2-9 días), comparado con los 3,5 días (con un rango de 2-5 días) para *C. parvum* genotipo bovino (Ryan y col., 2005).

En lechones, la concentración pico de ooquistes en las heces se correlacionó con diarrea en 11 de 12 lechones, pero la eliminación de ooquistes continuó por varios días luego de acabada la diarrea (Enemark y col., 2003-b). La edad media en la cuál los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. fueron detectados fue mayor en cerdos que en terneros de tambos (O'Handley y col., 1999). Guselle y col. (2003) estudió la eliminación de ooquistes en cerdos en una granja porcina al este de Calgary y reportó una edad promedio de detección inicial de ooquistes de 45,2 días después del destete, con una duración promedio de infección de 28,7 días (Ryan y col., 2005).

Respecto a la asociación de la enfermedad con otros patógenos, se ha confirmado en varias oportunidades que la diarrea en lechones lactantes y destetados es usualmente un

problema multifactorial donde infecciones mixtas entre *Cryptosporidium* spp. y *E. coli* o *Rotavirus* son frecuentes y que la presencia de otros patógenos podría realzar el desarrollo de criptosporidiosis clínica (Rossanigo y col., 1987; Quílez y col., 1996b; De Graff y col., 1999; Enemark y col., 2003-b).

La dosis infectiva de *Cryptosporidium* es de 10 ooquistes, y permanecen infectivos en el ambiente por semanas actuando como una potencial fuente de infección (Olson y col., 1999; Fayer y col., 1997; Tzipori y Ward, 2002). Guselle y col. (2003) en un estudio acerca de la dinámica de la criptosporidiosis en esta especie animal encontró una tasa de infección acumulada del 100%. Mientras que en otras investigaciones los niveles de infección mostraron valores mucho más bajos (Izumiyama y col., 2001; Wieler y col., 2001). Esta tasa de infección acumulada del 100% sugiere que *Cryptosporidium* spp. es fácilmente transmitido entre los cerdos.

En muchos países como por ejemplo en Croacia, se implementaron varias unidades de producción al aire libre. Al lograrse baja densidad de animales en producción, se influenciaba positivamente el crecimiento de los cerdos jóvenes que en unidades confinada, donde prevalecían las enfermedades respiratorias o *Lawsonia intracelulares*. Experiencias Húngaras y Alemanas citaron que la producción al aire libre trae aparejados otros problemas como *Ascaris summ* y *E. coli. Giardia duodenalis, Balantidum coli* y *Cryptosporidium* spp. son patógenos transmitidos por alimento, agua o ambiente contaminado (Ruecker y col., 2012). Desde el punto de vista veterinario, son patógenos que aparecen tanto en crianzas al aire libre como confinados. (Bilic y Bilkei, 2006).

La prevalencia de *Cryptosporidium* spp. muestra grandes variaciones en todo el mundo: Alemania (8,3 %), España (21,9 %), Japón (33,2 %), Canadá (9,7 %) y Estados Unidos (7,1 %) (Wieler, *et al.* 2001; Guselle N.J., *et al.* 2003). Algunos de estos resultados, subrayan el hecho de que a pesar de la higiene, técnicas diagnósticas y de los esfuerzos de

prevención durante los últimos años, los enteropatógenos en general son aún comunes en unidades de producción de lechones (Moore y col., 2001).

En Canadá hay varios estudios que determinaron diferentes niveles de prevalencia. En Ontario, basado sobre muestras histológicas, 5,3% de 3491 cerdos, estaban infectados. La mayoría estaban entre 1-12 semanas de edad, pero cerdos mayores, como de 30 semanas de edad estuvieron infectados (Fayer y col., 1997). Budu-Amoako y col. (2012) encontraron en Canadá una prevalencia del 26% sobre 633 cerdos muestreados y 86% de granjas infectadas.

Un ensayo pudo reproducir la infección exitosamente de *C. parvum* genotipo I (genotipo humano) en lechones e inclusive en corderos usando ooquistes de *Criptosporidium* de pacientes humanos diarreicos (Moon y col., 1988; Tzipori y col., 1982). Posteriormente, en otro ensayo, *C. parvum* genotipo I fue exitosamente establecido en lechones gnotobióticos (Widmer y col., 2000).

PATOGÉNESIS Y LESIONES

Los determinantes de virulencia son los factores presentes en un microorganismo que son responsables para la capacidad relativa de un parásito para causar daño en un huésped. Así como en cualquier otro agente infeccioso es importante determinar cuales son los factores responsables para la iniciación, establecimiento y perpetuación de la infección por *Cryptosporidium* spp. (Gookin y col., 2002-a; Gookin y col., 2002-b; Gookin y col., 2004; Gookin J. y col., 2005; Rodriguez y Royo G., 2005; Okhuysen y Chappell, 2002). Este parásito provoca importantes alteraciones en la absorción y en las funciones secretoras del intestino (Okhuysen y Chappell, 2002).

Los estadíos endógenos han sido encontrados en yeyuno, íleon, ciego y colon en la superficie de las microvellosidades de las células epiteliales de las vellosidades y criptas,

con leucocitos en las criptas. Pero mayoritariamente, los parásitos han sido encontrados en íleon terminal (Fayer y col., 1997; Núñez y col., 2003; Rossle y col., 2013).

Los mecanismos por los cuales *C. parvum* daña el intestino y produce efectos clínicos en algunos casos son especulativos. Los parásitos crecen y derivan energía desde el huésped para redireccionarlo a actividades de las células parasitadas o para la utilización de nutrientes absorbidos desde el lumen intestinal. Sobre el día 3 y 4 después de la infección hubo una completa alteración en la absorción de agua, sodio y glucosa en yeyuno e íleon de cerdos infectados. Sin embargo la absorción de electrolitos y agua de una solución básica de ringer, en ausencia de glucosa, no estuvo significativamente alterada (Argenzio y col., 1990).

Si las microvellosidades se reducen en número y tamaño por el avance de los estadios endógenos, la actividad disacaridasa de la vellosidad decrece permitiendo a la lactosa y otros azúcares entrar sin degradarse. Estos azúcares podrían promover el sobrecrecimiento bacteriano con la formación de ácidos grasos libres volátiles los cuales cambian la presión osmótica, o los nutrientes hipertónicos no absorbidos se acumulan en el lumen pudiendo inducir a diarrea. La hipersecreción de fluidos y electrolitos en el íleon, sugiere que podría existir una toxina similar al cólera que estimula la producción de AMP cíclico a través del sistema adenil ciclasa en los enterocitos (Fayer y col., 1997).

En varios estudios se ha demostrado que además de estar alterada la absorción de H_2O y Na^+, está incrementada la excreción de Cl^- en los tejidos afectados de los modelos animales utilizados (Argenzio y col., 1990; Argenzio y col., 1993; Moore y col., 1995). La disminución del flujo de aniones en presencia de inhibidores de la cicloxigenasa ha llevado a la hipótesis de mecanismos potenciales de actividad enterotoxigénica de *Cryptosporidum* spp. que pueden actualmente involucrar la secreción de prostaglandinas por parte de las células epiteliales intestinales infectadas. La producción de prostaglandinas

secretogénicas podría ser una consecuencia de la producción de citoquinas por las células epiteliales mismas, o de las células inflamatorias, o una molécula enterotóxica que aún no ha sido identificada (Okhuysen y col., 2002).

Es poco probable que la diarrea asociada con criptosporidiosis sea únicamente debido a un efecto enterotoxigenico dada la atrofia estructural de vellosidades y otras anormalidades estructurales que resultan en la mala absorción de los fluídos y nutrientes que conducen a la diarrea (Goodgame, 1996; Okhuysen y col., 2002).

La fiebre como un signo de criptosporidiosis parece no ser un buen marcador basado en los hallazgos de diferentes estudios. Por el contrario, una caída de la temperatura fue observada tanto en terneros como en lechones, correlacionados con la máxima eliminación de ooquistes y diarrea (Enemark y col., 2003-b).

Independientemente cuales mecanismos puedan ser, las interacciones iniciales parásito huésped de fijación e invasión son eventos primarios críticos en la patogénesis. El primer paso involucra el reconocimiento y vinculación al epitelio intestinal y la invasión de la célula huésped (Petry y Harris, 1999; Umemiya y col., 2005; Rossle y col., 2013). El conocimiento de éstas moléculas de reconocimiento e interacción es crucial para la comprensión de los mecanismos patogénicos empleados por este parásito (Theodos, 1998). Estas interacciones han sido estudiadas en apicomplejos tales como *Toxoplasma, Plasmodium* y *Eimeria* (Tzipori y Ward, 2002; Umemiya y col., 2005). Los estudios sugieren que una secuencia fija de eventos toma lugar, con la organela secretora jugándo el rol principal (Petry y Harris, 1999).

Los estadíos "zoito" invasivos de los apicomplejos son los que poseen estas organelas secretoras especializadas (rhoptrias, micronemas, granulos densos, conoide, microtúbulos, microporos), sólo visibles por microscopía electrónica, colectivamente conocidos como complejo apical (Langer y col., 2001; Tomley y Soldati, 2001; Zanaro y

Garbossa, 2008). Estas organelas, se especula que juegan un rol muy importante en la adhesión e invasión a la célula huésped, dado que desaparecen durante el estadío de conversión de zoíto al de trofozoíto (Petry y Harris, 1999).

Típicamente, cuatro esporozoítos son liberados desde un ooquiste y, como en el caso de otros apicomplejos, se deslizan sobre la célula epitelial intestinal liberándo el material desde el complejo apical que presumiblemente lo ayuda a adherirse y fusionarse con la membrana de la célula huésped (Okhuysen y Chappell, 2002; Tzipori y Ward, 2002; Umemiya y col., 2005; Rossle y col., 2013)

Por otro lado, acerca del daño epitelial en la mucosa, hay descripciones que el mismo es mediado por células. Luego que el esporozoíto se adhiere, se cree que las células de la mucosa epitelial liberan citoquinas que activan fagocitos residentes (Goodgame 1996; Hannahs, 1999). Estas células activadas liberan factores solubles que incrementan la secreción intestinal de agua y cloro e inhiben la absorción (Moore y col., 1995). Estos factores solubles incluyen a la histamina, serotonina, adenosina, prostaglandinas, leucotrienos y factores activadores de plaquetas, y que actúan sobre varios sustratos, incluyendo nervios entéricos y sobre las mismas células epiteliales (Keusch y col., 1995).

Los mecanismos involucrados en la disrupción de las membranas durante la etapa de invasión, permanece aún con muchos interrogantes (Tomley y Soldati, 2001). Dos proteínas específicas son de particular interés como candidatos que median en la invasión y pérdida de la función de barrera. La primera es un polipéptido hemolítico (Hemolisina H4) codificada por el gen *hemA*. La segunda proteína de interés es un gen transportador ABC. La función de este transportador es desconocida, pero su localización sugeriría que media en el flujo de iones u otras moléculas (Tomley y Soldati, 2001; Okhuysen y col., 2002).

Consecuentemente las células epiteliales son dañadas por uno de los modelos siguientes:

-La muerte celular es el resultado directo de la invasión del parásito, multiplicación y de la expulsión.

-El daño celular podría ocurrir a través de la inflamación mediada por células T, produciéndo atrofia de vellosidades e hiperplasia de criptas.

Uno u otro modelo produce distorsión de la arquitectura de las vellosidades y es acompañado por mala absorción de nutrientes y diarrea (Hannahs, 1999). Hay evidencias experimentales que sostienen que en esta hipótesis existe en un sistema de modelo porcino, en el que se redujo la absorción intestinal de sodio y que ha sido relacionado con la disminución del área de superficie vellosa y la inhibición por prostaglandina E2 producida por las células intestinales (Goodgame, 1996; Hannahs, 1999).

La identificación y caracterización de los determinantes de la virulencia permitirá avances en la comprensión de la patogénesis y contribuir al desarrollo farmacológico e inmunológico de los enfoques terapéuticos (Hijjawi y col., 2002; Okhuysen y Chappell, 2002).

Los cambios histopatológicos son similares entre rumiantes y cerdos infectados con *C. parvum* (Guselle y col., 2003). En el intestino durante los estudios agudos de la infección, han sido descriptos en cerdos y se demostró que durante el curso de la infección los cambios de la mucosa se mueven de proximal a distal en el tracto gastrointestinal (Enemark y col., 2003-b). Macroscópicamente el intestino, usualmente aparece normal. Las lesiones microscópicas pueden extenderse a través de todo el intestino, sin embargo, usualmente son encontradas en el íleon, donde se evidencia la lesión microscópica (Rossle y col., 2013).

Las lesiones están asociadas con atrofia y fusión marcada de vellosidades, metaplasia de la superficie del epitelio a células cuboidales o columnar bajo, degeneración o muerte de entericitos individuales, y acortamiento de microvellosidades. Infiltrado de neutrófilos y células mononucleares en la lámina propia. El duodeno, ciego y colon también pueden estar infectados (Fayer y col., 1997; Tzipori y Ward, 2002; Enemark y col., 2003-b; Guselle y col., 2003; Núñez y col., 2003; Vitovec y col., 2006). Sin embargo se ha visto que lechones muertos entre los 11 a 17 días post infección no evidenciaron lesiones histológicas ni evidencias de criptosporidiosis (Enemark y col., 2003-b; Vitovec y col., 2006).

La desaparición de los *Cryptosporidium* y de las células polimorfonucleares del íleon se asoció con la restauración de la estructura normal y se completó aproximadamente al día 12. Aunque los *Cryptosporidium* parecían estar además en el colon, la arquitectura general no se vió severamente afectada. Estos resultados son consistentes con enfermedad diarreica malabsortiva asociada con daño morfológico y son muy similares a aquellas vistas en enfermedad viral en cerdos, excepto que el intestino superior está mas severamente dañado en el último caso (Argenzio, y col., 1990).

GÉNESIS DE LA DIARREA Y MECANISMOS DE DEFENSA

La diarrea es el síntoma prominente de la criptosporidiosis, pero los mecanismos específicos por el cuál *Cryptosporidium* induce a la misma no han sido bien identificados (Moore y col., 1995). Usando enterocitos en cultivo de monocapas, el daño celular ha sido documentado por la alteración en las uniones celulares, pérdida de la función de barrera y liberación intracelular de lactato deshidrogenasa y muerte celular incrementada. La inflamación y las citoquinas asociadas pueden, de hecho, ser importantes en el control y erradicación del parásito. El daño directo del parásito y el flujo de llegada de células

inflamatorias son probablemente responsables para las anormalidades morfológicas y bioquímico funcionales que resultan en diarrea (Okhuysen y Chappell, 2002).

Se ha demostrado que la diarrea por criptosporidios es secretora y por mala absorción producida por la destrucción parcial de la mucosa así como niveles elevados de prostaglandinas E2 y prostaciclina. Este último mediador es el responsable de activar neuronas secretomotoras entéricas (Zhu y col., 2000; Gookin y col., 2002-a; Gookin y col., 2002-b; Gookin y col., 2006).

Por mucho tiempo se postuló que *Cryptosporidium* producía una enterotoxina (que aún no han sido identificada) debido a la profusa diarrea secretora que algunos individuos experimentan, inclusive en ausencia de ingesta oral (Okhuysen y col., 2002).

La disminución en el flujo de aniones en presencia de inhibidores de la cicloxigenasa ha llevado a la hipótesis de que un posible mecanismo enterotoxigénico de que puede llegar a implicar la secreción de prostaglandinas secretogénicas por las células epiteliales intestinales infectadas. Es poco probable que la diarrea asociada con criptosporidiosis sea únicamente debida a un efecto enterotoxigénico ya sea por la atrofia y fusión estructural de las vellosidades u otra anormalidad estructural que resulte en malabsorción de fluidos y nutrientes que conduzcan a la diarrea (Goodgame, 1996; Okhuysen y Chappell, 2002).

TRANSMISIÓN

Cryptosporidium es uno de los más importantes agentes causales de enfermedad gastrointestinal, y en el humano, casi la principal de origen hídrico por contaminación del agua de consumo y recreacional (Guan y Holley, 2003; Galván y col., 2014). Mas de 50 brotes, ya sea a través de agua de consumo o recreacional han sido comunicados desde 1983, con el agravante que no hay tratamiento efectivo disponible de esta patología (Rochelle y col., 2002).

El ooquiste es el estadío transmitido de un huésped infectado a uno susceptible mediante la ruta fecal-oral, o indirecta a través de la ingestión de alimentos o agua contaminados con ooquistes excretados en las heces de animales o humanos infectados (Smith y Nichols, 2010; Forslund y col., 2011; Ruecker y col., 2012; Rossle y col., 2013).

En un trabajo realizado en Alberta, los ooquistes fueron demostrados en sólo el 1% de las muestras del líquido de desecho de los cerdos y no se encontraron ooquistes en muestras del suelo cuando estos desechos habían sido esparcidos. Estos datos podrían estar sugiriendo que este parásito en cerdos no reviste de amenaza ambiental, siempre que el estiércol se maneje responsablemente (Quintero-Betancourt y col., 2003). De no ser así, podría especularse que los ooquistes eliminados por cerdos infectados podrían contaminar agua y alimentos, conduciéndo a criptosporidiosis humana (Suarez-Luengas y col., 2007).

Las rutas de transmisión pueden ser (1) persona a persona, a través del contacto directo o indirecto; (2) animal a animal; (3) animal a humano; (4) de origen hídrico a través de agua de bebida o de uso recreacional; (5) de origen alimentario y (6) posiblemente aerógena (Fayer y col., 2000b; Fayer, 2010; Xiao, 2010; Rossle y col., 2013; Galván y col., 2014). Inclusive, el rol de los mamíferos silvestres como posible fuente de *C. parvum* para las aguas superficiales es un tema de interés en los brotes de enfermedades transmitidas por el agua, aunque el potencial zoonótico de los *Cryptosporidium* de los animales salvajes se desconoce en gran medida (Atwill y col., 1997).

En un ensayo se intentó determinar cuantos ooquistes son necesarios para reproducir la enfermedad. Con la administración de 30 ooquistes a individuos seronegativos se infectaron 1 de 5 individuos. Con la administración de 1000 ooquistes, se infectaron 7 de 7 individuos. La dosis infectiva cincuenta (DI_{50}) se determinó en 132 ooquistes (Fayer y col., 2000b).

C. parvum es zoonótico, aparentemente, con carencia de especificidad de huéspedes entre mamíferos. Las oportunidades para tales infecciones se incrementan con el contacto estrecho humano a humano y durante el cuidado de ganado, animales de zoológico o animales de compañía (Fayer y col., 1997; Baumgartner y col., 2000; Xiao, 2010), como así también personal veterinario que tiene contacto con animales infectados (Hannahs, 1999). Ya lo mencionaron Yu y col. (2004) afirmando que el contacto directo con animales infectados, se propone como un importante modo de transmisión de *C. parvum*, y en modo inverso, cuando en la población humana la enfermedad es altamente endémica, lo zona también tiene una alta incidencia de la criptosporidiosis en el ganado.

Varios animales son potencial fuente de transmisión para humanos (perros, cabras, ovejas, gatos, ratas, ratones, cerdos y bovinos), ya que comparten su hábitat. Tradicionalmente el ganado ha sido considerado como uno de los principales reservorios de las infecciones humanas (Kuczynska y col., 1999; Kuczynska y col., 2005; Gow y Waldner, 2006; Xiao, 2010; Rossle y col., 2013), aunque, los neonatos de todas las especies animales susceptibles, son particularmente propensos a la infección, y pueden excretar hasta 30 millones de ooquistes en un período de 1 a 2 semanas.

Cerdos destetados excretaban mayor cantidad de ooquistes que los lactantes y adultos, se sugiere que esta categoría son un importante reservorio de *C. parvum* para la contaminación del agua potable (Yu y Seo, 2004), aunque esta afirmación es contaria a lo descripto por Xiao (2010), en donde sugiere que los cerdos no son una importante fuente de *C. parvum*.

Hay antecedentes en la bibliografía internacional donde se menciona la posibilidad de participación de insectos vectores en la transmisión (cucarachas, escarabajos estercoleros, gaviotas, gansos, etc.) (Mathison y Dítrich, 1999; Fayer y col., 2000b; Gow y Waldner, 2006).

El agua de bebida o de uso recreacional sirve como vehículo para la transmisión, y muchos brotes han sido informados de ambas fuentes y fue reconocida como una de las mas eficientes fuentes de transmisión dada la resistencia a las condiciones ambientales (Fayer, 2004; Xiao, 2010; Rossle y col., 2013; Galván y col., 2014). Dada su resistencia a los métodos de cloración de rutina del agua de consumo y recreacional, el único método eficaz para su eliminación es el filtrado (Guan y Holley, 2003; Rodriguez y Royo, 2005; Rossle y col., 2013). Los reportes de alimentos relacionados a brotes son pocos, difíciles de documentar y generalmente no son comunicados. Casos individuales y en grupos pequeños de brotes son menos propensos a ser reconocidos (Egyed y col., 2003).

INMUNIDAD

Introducción

Los conocimientos relacionados con la inmunología de *Cryptosporidium* han sido generado a lo largo de más de diez años (Riggs, 1997). El enfoque inmunológico de la interacción entre el huésped y el parásito provee herramientas muy valiosas para estudios inmunológicos y seroepidemiológicos (Quílez y col., 2002).

El control inmunológico de la criptosporidiosis está indicado por las siguientes observaciones. Humanos, terneros, corderos, cabritos y ratones usualmente desarrollan infecciones autolimitantes las cuales permanecen localizadas en el tracto gastrointestinal. Tales huéspedes son resistentes a reinfección y enfermedad clínica luego de la recuperación. En contraste, los individuos inmunodeficientes, usualmente desarrollan infecciones persistentes, y progresivas de gran severidad, que incluso se pueden diseminar a tejidos extraintestinales. Las infecciones persistentes en individuos inmunosuprimidos reversiblemente, resuelven la infección con la restauración del sistema inmune. Además, con el uso de drogas inmunomoduladores, se puede aumentar la

resistencia a la infección y disminuir el tiempo de patencia (Riggs, 1997; Baumgartner y col., 2000).

Dado que la criptosporidiosis es resuelta o prevenida por la respuesta inmune normal, las inmunizaciones activas o pasivas han sido investigadas para su control (Riggs, 1997). Pero hay autores que sostienen que no hay anticuerpos específicos ni tratamiento clínico disponible para esta enfermedad (Duffy, 1999).

Inmunidad humoral

Según las investigaciones hechas en inoculaciones experimentales, los lechones destetados inoculados mostraron un pico de IgG e IgM e Ig totales al día 10 post inoculación. La producción de IgA específica llegó a un pico el día 20 En cambio en lechones neonatos no se detectó ningún pico de IgA específica (Arnault y col., 1994).

La infección por *C. parvum* provoca el desarrollo de inmunoglobulinas características en mucosa y suero (IgG, IgA e IgM) que responden contra antígenos del parásito detectables por ELISA, inmunofluorescencia y western blot (Riggs y col., 1997). Aunque la detección de anticuerpos específicos no debería ser considerados como indicativos de infección activa, algunos antígenos identificados por análisis de inmunoblot son reconocidos por anticuerpos séricos IgA, IgG e IgM de muchas especies animales, siendo considerados como excelentes marcadores de infección (Quílez y col., 2002).

La respuesta inmune mediada por células es claramente importante en la resistencia a los coccidios, muchas observaciones indican que la respuesta inmune humoral contra los estadíos extracelulares, puede contribuir a la protección contra la criptosporidiosis y a las estrategias de inmunización pasivas o activas, por lo que fue muy investigado en pos del control (Riggs y col., 1997).

La importancia del calostro en la protección neonatal fue estudiada en rumiantes contra la infección por *C. parvum* y se convirtió en un punto valorable para discutir. En condiciones de campo los anticuerpos adquiridos pasivamente no protegieron a los terneros ni corderos contra la infección adquirida naturalmente. Si embargo, terneros y corderos alimentados con calostro de madres inmunizadas con altos títulos de anticuerpos específicos, fueron parcialmente protegidos contra la infección (De Graaf y col., 1999). De hecho, se ha sugerido que individuos con anticuerpos preexistentes a algunos antígenos inmunodominantes son menos propensas a desarrollar la enfermedad, y varios estudios mas recientes han demostrado que el calostro hiperinmune específico para los antígenos recombinantes de *C. parvum* confiere protección contra la criptosporidiosis en ratones adultos inmunosuprimidos, terneros y niños (Quílez y col., 2002).

Inmunidad celular

En contraste a infecciones enteroinvasivas, *C. parvum* reside dentro de las células epiteliales intestinales y no invade las láminas mas profundas de la mucosa. No obstante, la infección resulta en el reclutamiento de neutrófilos a la lámina propia, peroxidación de lípidos de la mucosa, atrofia de vellosidades, diarrea marcada y disminución de función de barrera (Riggs, 2002). El papel de los neutrófilos en la mediación de estas secuelas patológicas, nunca ha sido estudiado, tal vez debido a la falta de modelos animales que imiten la enfermedad en los humanos. De todos modos se sabe que la presencia de neutrófilos en la mucosa infectada por *C. parvum* se asocia con una mejora en la función de barrera que no puede atribuirse a la elaboración por parte de la mucosa de prostaglandinas o a la estimulación de su síntesis. Está demostrado que la inflamación neutrofílica que surge en respuesta a la infección por un patógeno epitelial no invasivo como *C. parvum* tiene un impacto mínimo en la mediación de secuelas patológicas resultantes de esta infección (Riggs, 2002; Zadrozny y col., 2006).

IMPORTANCIA ECONÓMICA

Los efectos de las infecciones sobre la perfomance de los rumiantes han sido reportados en muchas revisiones, sin embargo, el efecto de *C. parvum* sobre la perfomance de los cerdos es escasa (De Graaf y col., 1999; Guselle y col., 2003; Suarez-Luengas y col., 2007). Pero si es bien conocido que *Cryptosporidium* spp. es un parásito protozoo que puede causar severa diarrea, anorexia y pérdida de peso en un amplio rango de vertebrados incluyendo al humano, y es crecientmente reconocido como parasito productor de diarrea en un gran rango de especies salvajes (García-Presedo y col., 2013).

Se encontró que la severidad de la infección tanto en hombre como en animales varía dependiendo del aislado específico (Enemark y col., 2003-b), pero se conoce que estos protozoos parásitos pueden provocar infecciones severas y diarrea grave de importancia en una variedad de mamíferos y problemas de rendimiento en animales productores de alimentos y en humanos (Quílez y col., 1996b; Guan y Holley, 2003; Gow y Waldner, 2006).

La infección causa pérdida acelerada de las células epiteliales intestinales absortivas e inflamación de la mucosa intestinal que resulta en malabsorción de nutrientes, secreción de fluidos y diarrea debilitante (Gookin y col., 2004; Gookin y col., 2005). Todos estos cambios, inequívocamente conducen a disminución de la ganancia de peso diaria como a la conversión alimenticia (Guselle y col., 2003). Se ha informado desde larga data que *C. parvum* es una grave causa principal de brotes de diarrea en los animales de granja, especialmente en recién nacidos y destetados resultando en pérdidas económicas significativas (De Graaf y col., 1999; Quílez y col., 2002; Rodriguez y Royo, 2005; Suarez-Luengas y col., 2007)

Si bien la criptosporidiosis es usualmente subclínica, hay que tener en cuenta que existen reportes de diarrea acompañado con anorexia y vómitos en lechones lactantes jóvenes experimentalmente infectados con *Cryptosporidium* (Hamnes y col., 2007). Bilic y

Bilkei (2006) también sugieren que bajo ciertas condiciones *Cryptosporidium* y *Giardia* (y *Balantidium*) pueden causar menores ganancias de peso y mayor mortalidad en cerdos de crecimiento y terminación en cerdos al aire libre. Thatcher y Friendship (2003) sugiere que *Giardia* y *Cryptosporidium* pueden ser clínica y económicamente importantes.

Trabajos realizados en Croacia, de 17 establecimientos al aire libre muestreados, se detectó *Cryptosporidium*, *Balantidium coli* y *Giardia duodenalis* en todos los establecimientos. Mientras que se detectaron tales patógenos en 8 de 21 establecimientos confinados. Estos trabajos concluyen que las infecciones por estos patógenos son comunes y que causan de acuerdo a las condiciones locales bajas ganancias de peso y mayor mortalidad en cerdos en terminación (Bilic y col., 2006).

Las pérdidas económicas asociadas a criptosporidiosis se asocian a mortalidad y el crecimiento retardado de animales, costo de drogas, asistencia veterinaria, etc. (De Graaf y col., 1999). Aunque Tzipori y col. (1994) encontró que la ganancia o pérdida de peso en ratones no fue una medida consistente de infección o impacto, es contrario a muchos estudios que demuestran una mayor ganancia de peso en los grupos controles no infectados (Enemark y col., 2003).

Hoy se reconoce a los cerdos como reservorio de *Cryptosporidium*, por lo tanto es de primordial importancia entender la prevalencia de *Cryptosporidium* en los cerdos para diseñar medidas de control y prevención de la criptosporidiosis tanto en animales como en humanos (García-Presedo y col., 2013).

DIAGNÓSTICO

Introducción

La infección es diagnosticada por la identificación de los ooquistes en las heces del huésped o en cortes histológicos de muestras tomadas durante la necropsia (Singh y col.,

2006; Chalmers y col., 2013). El método que es ampliamente usado para la detección de *Cryptosporidium* spp. en agua incluye la concentración por filtración (Webster y col., 1996), y técnicas microscópicas de inmunofluorescencia (Marshall y col., 2005; Mekaru y col., 2007). El inconveniente de éstas técnicas es que no diferencian ooquistes viables de no viables, y los resultados no siempre se correlacionan con los ensayos de infectividad *in vivo* e *in vitro* (Bukhari y col,. 2000; Neumann y col., 2000).

Este motivo es lo que condujo a distintos grupos de investigadores a desarrollar métodos de detección de viabilidad de ooquistes. Entre ellos se describen infectividad de cultivos celulares *in vitro* que luego son detectados mediante anticuerpos fluorescentes (Schets y col., 2005; Chalmers y col., 2013).

Cuando *C. parvum* fue primero identificado como patógeno humano, el diagnóstico fue hecho por biopsia de tejido intestinal (Keusch y col., 1995; Magi y col., 2006; Rodriguez y Royo, 2005). Sin embargo, este método puede dar falsos negativos debido a la naturaleza irregular de la infección parasítica intestinal (Hannahs, 1999).

Mientras que las diferencias biológicas y moleculares han sido conocidas entre los aislados de *C. parvum* infectando a varios mamíferos, subespecies o cepas, no son aún reconocidas. Las pruebas diagnósticas descriptas a continuación, variarán de aquellas que pueden ser ampliamente aplicadas a todas las especies de *Cryptosporidium* de aquellas que son especie específica (Arrowood, 1997). El mayor enfoque de la siguiente discusión estará dirigido a la detección de infecciones causadas por *Cryptosporidium* spp.

Los signos clínicos asociados asociados a generalmente no son patognomónicos en ausencia de la detección de parásitos o antígenos del parásito. La gran variabilidad en la presentación de los signos clínicos hace subjetiva la interpretación diagnóstica. Alguna utilidad tiene la observación de síntomas crónicos en huéspedes inmunocomprometidos, pero la confirmación parasitológica es necesaria (Arrowood, 1997).

Las técnicas que han sido tradicionalmente desarrolladas y optimizadas para la enumeración de ooquistes de *Cryptosporidium* en agua, son generalmente no aptas para la enumeración de ooquistes en heces animales. Adicionalmente, la eficiencia de las técnicas usadas en microbiología clínica para la examinación de heces y enumeración de los microorganismos depende de la adecuada separación y recuperación de los microorganismos de las partículas de la muestra (Davies y col., 2003; Mekaru y col., 2007).

El diagnóstico de las infecciones causadas por *Cryptosporidium* spp. requieren test de laboratorio para detectar al parásito o antígenos específicos en las heces, fluidos corporales, o tejidos del huésped. Una considerable labor y experiencia en microscopía son necesarias para la identificación de éste patógeno protozoo. En laboratorios donde los métodos de examen microscópico son una rutina, los ensayos de inmunofluorescencia comerciales y enzimoinmunoensayos han provisto invaluables herramientas para identificar y confirmar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* o antígenos en muestras clínicas (Chalmers y col., 2013)., aunque son costosas y no de uso rutinario (Ward y Cevallos, 1998; Tzipori y Ward, 2002).

Muchos métodos diagnósticos cualitativos y semicuantitativos han sido descriptos para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* en heces (Abbassi y col., 2000; Mekaru y col., 2007). Hay algunos métodos rápidos de evaluación semicuantitativa (descriptas en bovinos) como el método de Heine (1982) (Abbassi y col., 2000).

Recientes estudios sugieren que los ensayos serológicos para demostrar infecciones por *Cryptosporidium* recientes pueden ser prácticas, y hay grandes posibilidades para el desarrollo de ensayos específicos y sensibles para diferentes especies de *Cryptosporidium* y posiblemente diferentes cepas usando ensayos bioquímicos o pruebas moleculares específicas (Chalmers y col., 2013).

Una importante advertencia para recordar cuando las metodologías diagnósticas se discuten es la ausencia de terapias efectivas para resolver las infecciones criptosporidiales. Este hecho, más que cualquier otro, explica probablemente la resistencia de médicos y de veterinarios para solicitar test específicos para el diagnóstico de criptosporidiosis. Sin embargo, el diagnóstico es valioso dado que provee la oportunidad de evitar prescribir antibióticos que pueden provocar disturbios en la flora intestinal normal y posibilitar exacerbar la infección criptosporidial (Arrowood, 1997).

Métodos para la demostración de ooquistes

Las muestras pueden ser remitidas frescas, conservadas en formalina bufferada al 10%, ó suspendidas en medio de almacenamiento compuesto por dicromato de potasio (2,5% p/v de concentración final). Los ooquistes permanecen infecciosos en los medios de almacenamiento por períodos prolongados y debe tenerse en cuenta el riesgo biológico que esto implica (Rodriguez y Royo, 2005; Mekaru y col., 2007). Por lo tanto lo mas recomendado es preservar las muestras en formalina bufferada al 10% ó en solución SAF (acetato de sodio/ácido acético/formol) para convertir a los ooquistes en no infecciosos (Rodriguez y Royo, 2005).

La excreción de ooquistes es intermitente tanto en individuos sintomáticos como asintomáticos experimentalmente infectados con *C. parvum*. El examen de una sola muestra sólo identifica el 50% de los individuos infectados en un brote de enfermedad (Arrowood, 1997; De Graaf y col., 1999; Guselle y col., 2003; Rossle y col., 2013).

Los datos disponibles en cuanto a los métodos mas eficaces de rutina para la recuperación e identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* están en desacuerdo. Lo que si se afirma, es que las técnicas de sedimentación son una metodología esencial ya que permite la detección de siete veces mas de ooquistes que los frotis con materia fecal no

concentrada (Lindsay y Blagburn, 1991; Quílez y col., 1996a; Mekaru y col., 2007; Rossle y col., 2013).

En infecciones asintomáticas, o estudios epidemiológicos, los métodos de concentración son de gran importancia. La flotación con la solución de Sheather es muy popular, pero la sedimentación con éter-formalina se reporta como la más popular en los laboratorios de investigación. Otros métodos de concentración son la flotación con sulfato de zinc y con cloruro de sodio sobresaturado (Moon y Woodmansee, 1986; Arrowood, 1997; Gow y Waldner, 2006). Incrementar la velocidad de centrifugación (10 minutos a 500g) en la técnica de concentración con éter-formalina, puede garantizar la recuperación de los ooquistes (Rodriguez y Royo, 2005).

Métodos de tinción para identificación microscópica

Los métodos de identificación convencional incluyen la concentración y la tinción de frotis fecales (Fayer y col., 2000a; Rossle y col., 2013). Los ooquistes tienen un tamaño similar al de las levaduras y por lo tanto para su correcta identificación es necesario realizar tinciones (Rodriguez y Royo, 2005).

La identificación de los criptosporidios fue inicialmente hecha por tinciones histológicas de tejidos infectados, raspados de mucosa, o contenido intestinal. Posteriormente los ooquistes pudieron ser demostrados por técnicas de tinciones no invasivas de Giemsa, una gran mejora sobre las muestras de biopsias, pero no podía diferenciarse de otros ooquistes teñidos de similar tamaño como de levaduras fecales y otros especímenes. En 1981 Henriksen y Pohlenz propusieron la técnica ácida-rápida de Ziehl-Neelsen que finalmente proveyó a los laboratorios de investigación y clínicos con un simple y efectivo método poder identificar los ooquistes en las muestras: ooquistes rojos brillantes contra un fondo azul (Keusch y col., 1995; Moon y Woodmansee, 1986;

Arrowood, 1997; Fayer y col., 2000a). Su forma, medida y su superficie arrugada son caracteres suficientes para ser reconocidos sin dificultad (Rossanigo, 1986).

Las técnicas de tinción ácidas-rápidas han sido modificadas con los años. En 1983 se describieron técnicas ácidas-rápidas modificadas en caliente y en frío. Posteriores modificaciones incluyeron la incorporación de dimetilsulfóxido (DMSO) y la incorporación del detergente tergitol en el método modificado en frío de Kinyoung (Rossanigo, 1986; Moon y Woodmansee, 1986; Arrowood, 1997; Fayer y col., 2000b; Magi y col., 2006).

Según Quílez y col. (1996a), tras la comparación de técnicas, encontró una especificidad y valores predictivos positivos de la tinción ácida rápida del 100%, cuando la cantidad de ooquistes es de moderada a alta. Los mismos autores, sugieren que para diagnóstico de rutina de infecciones por *Cryptosporidium* en bovinos y cerdos, las muestras fecales deberían ser primeros sometidas a screening por la tinción de Zihel Neelsen Modificado. Las muestras negativas, o en los casos donde el número de ooquistes se sospecha que es muy bajo, podrían someterse a otras técnicas.

Otras alternativas para el microscopio de campo claro incluyen tinciones negativas, tinción azul-metil-zafranina, tinción de Kohn modificada, tinción de Koster modificada, tinciones fluorescentes y otras (Arrowood, 1997; Hannahs, 1999; Marshall y col., 2005).

Para el análisis diagnóstico de muestras de individuos inmunocompetentes (y por ende con pocos ooquistes, si fuese positivo) el test microscópico con tinción de Kinyoung parece ser la mejor opción en manos de un microscopista entrenado examinando un gran número de campos microscópicos. Además este método es barato, incluso para utilizarlo en un bajo número de muestras (Magi y col., 2006).

Los resultados de algunas experiencias que compararon la sensibilidad de la prueba de anticuerpos fluorescentes con las técnica de Ziehl Neelsen indicaron una mayor sensibilidad a favor de la técnica de inmunofluorescencia, que fue capaz de detectar la

presencia de ooquistes dos días antes que con la de Ziehl Neelsen (Marshall y col., 2005). Además, fue posible detectar ooquistes en profundidad en el tejido intestinal de animales infectados mediante los anticuerpos fluorescentes, pero no mediante la técnica de Ziehl Neelsen (Marshall y col., 2005). A pesar de ello, la técnica de Ziehl Neelsen tiene una sensibilidad óptima como para ser usadas como prueba screening (Rodriguez y Royo, 2005).

El hallazgo de ooquistes en heces diarreicas de bovinos es indicativo de infección. Los ooquistes de *C. parvum* varían desde 4,5-5,4 x 4,2-5,0 μm con un tamaño promedio de 5,0 x 4,5 μm y un índice de forma de 1,1 pero puede variar, dependiendo de si ellos están frescos o fijados y de cómo son procesados, a saber, los ooquistes tipo *C. muris* son mas grandes: 6,6-7,9 x 5,3-6,5 μm con un tamaño promedio de 7,4 x 5,6 μm y un índice de forma de 1,3 (Arrowood, 1997).

Los estadios endógenos y los ooquistes pueden ser detectados en frotis teñidos de la mucosa ileal y cortes histológicos de íleon fijados antes del comienzo de la autolisis, dentro de los 20 minutos luego de la muerte (Keusch y col., 1995; Arrowood, 1997; Hannahs, 1999; Guselle y col., 2003), y no mas allá de 1-2 horas posteriores a la misma (Moon y Woodmansee, 1986).

La eutanasia de terneros moribundos con fijación inmediata o congelado del intestino para histología, inmunocitoquímica, o identificación de agentes en heces pueden rendir excelentes resultados. Dado que los terneros adquieren anticuerpos vía calostro, y como la mayoría de los terneros han sido expuestos al organismo, los hallazgos serológicos no son diagnósticos confiables de infección aguda (Arrowood, 1997; Gow y Waldner, 2006).

Otras técnicas diagnósticas

MICROSCOPÍA DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE OOQUISTES

Las técnicas inmunológicas para la detección de *Cryptosporidium* fueron introducidas en 1985 y 1986 (Hannahs, 1999). Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta fueron descriptos en un comienzo para la detección de ooquistes empleando suero de humanos convalecientes y antisueros de conejos inmunizados con ooquistes. Estos ensayos mostraron un incremento significativo de la sensibilidad y especificidad comparadas con las técnicas de tinción convencionales y han encontrado una gran aplicabilidad en la detección de ooquistes en muestras ambientales, como en la detección de estructuras en los tejidos y demás muestras en instancias de investigación, pero no de rutina de campo (Quílez y col., 1996a; Arrowood, 1997; Marshall y col., 2005; Mekaru y col., 2007). El elevado costo del reactivo y la disponibilidad de microscopios de fluorescencias en laboratorios de rutina, pueden limitar el uso generalizado de éste método de inmunofluorescencia producidos comercialmente (Quílez y col., 1996a).

ENZIMOINMUNOENSAYO PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS CRIPTOSPORIDIALES

Las pruebas de Enzimoinmunoensayo para muestras fecales han sido reportadas utilizando anticuerpos monoclonales adaptados para la detección de antígenos en un ELISA de captura (Hannahs, 1999; Brooks, 2005; Mekaru y col., 2007). Algunos ensayos reportaron ser más sensibles que las técnicas de tinción pero menos sensibles que la inmunofluorescencia. Actualmente los kits comerciales disponibles se muestran mas sensibles que las técnicas convencionales de tinción y muestran una buena correlación con los ensayos de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales (Arrowood, 1997; Hannahs, 1999; Mekaru y col., 2007).

OTROS INMUNOENSAYOS PARA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS CRIPTOSPORIDIALES

La detección de ooquistes empleando partículas de látex recubiertas con antisueros de conejos inmunizados con ooquistes ha estado disponible y fue utilizado para la detección de antígenos de muestras homogeneizadas de contenido intestinal para ratones infectados con *C. parvum*. El ensayo fue rápido y simple y rápido de llevar a cabo, pero con inconvenientes en cuanto a la especificidad (se observaron falso positivos) (Arrowood, 1997).

TÉCNICAS MOLECULARES

Nuevos métodos genéticos de detección de *C. parvum* han sido desarrollados, usando PCR u otros métodos de detección de DNA (Webster y col., 1996; Hannahs, 1999). Aunque el PCR es relativamente rápido, altamente sensible y preciso, tiene varias limitaciones. Falsos positivos pueden resultar de la detección de acidos nucleicos desnudos, microorganismos no viables y contaminación laboratorial. Algunos contaminantes ambientales pueden interferir cuantitativa y/o cualitativamente con los ensayos (Fayer y col., 2000b).

Se han descripto varios métodos de amplificación basados en la PCR, con la utilización de cebadores específicos para *Cryptosporidium*, que consiguen una alta sensibilidad y especificdad en la detección de este parásito en muestras clínicas y ambientales. También mediante técnicas de biología molecular se ha conseguido diferenciar las distintas especies del género. La diferenciación de los genotipos de *C. parvum* también se realiza por esta metodología (Rodriguez y Royo, 2005).

Algunos ensayos propusieron un método para la identificación de especies de *Cryptosporidium* basado en un PCR multiplex para la secuencia de genes 18S rRNA, y

aplicar esto usándo un sencillo y rápido método de obtención de ADN a partir de heces enteras (Webster y col., 1996; Gasser y O'Donoghue, 1999; Patel y col., 1999).

PREVENCIÓN, CONTROL Y TRATAMIENTO

Mientras que los estudios concernientes a estructura genética han sido numerosos, el número de estudios biológicos ha sido relativamente restringido. Consecuentemente hay una urgente necesidad para estudios biológicos, así la variación genética puede ser correlacionada clínicamente de gran significancia para el diagnóstico, tratamiento y control de la criptosporidiosis (Enemark y col., 2003-b).

Como el único mecanismo de transmisión, los ooquistes han evolucionado para ser dispersados y sobrevivir en medios hostiles por largos períodos de tiempo. Así, son inusualmente resistentes a tensiones naturales y muchos desinfectantes químicos sintéticos (Fayer y col., 1997; Egyed y col., 2003). Así mismo, son resistentes a los procesos de cloración del agua (Biswas y col., 2005).

Dado que todas las infecciones con *Cryptosporidium* son iniciadas por la ingestión o inhalación de ooquistes, las medidas para prevenir o limitar la dispersión de la infección debe ser tendiente a eliminar o reducir los ooquistes infecciosos en el medio ambiente. No existen drogas 100% eficaces aprobadas para la profilaxis o terapia para humanos o animales que prevengan o detengan la producción de ooquistes por individuos infectados. La higiene, incluyendo la desinfección, continúa siendo la más efectiva herramienta para el control (Fayer y col., 1997; Theodos y col., 1998). Los estudios de laboratorio han intentado dilucidar los límites de sobrevivencia de los ooquistes expuestos al calor, frío, desecación y radiación ultravioleta. Los ooquistes son susceptibles a las desinfecciones basadas en métodos de secado o desecación (Fayer y col., 1997), ya que a métodos rutinarios y eficaces para otros patógenos como la cloración del agua, es ineficaz contra varios microorganismos, incluyendo *Criptosporidium* spp. (Darnault y col., 2004).

A pesar de los esfuerzos, no se han identificado antibióticos ni drogas antiprotozoarias que hayan sido aprobadas para la profilaxis o terapia de la criptosporidiosis (Blagburn y Soave, 1997; Zhu y col., 2000; Gookin y col., 2002-a; Gookin y col., 2002-b; Gookin y col., 2005). Numerosos compuestos han pasado diferentes evaluaciones contra *Criptosporidium* spp. en huéspedes no humanos, pero al presente permanecen con tratamiento incierto, aunque existen varios grupos químicos que fueron evaluados y que se han mostrado prometedores (Theodos y col., 1998; Akiyoshi y col., 2003; Egyed y col., 2003; Shahiduzzaman y col., 2012).

Para terneros infectados experimentalmente bajo condiciones controladas, la actividad anticriptosporidial fue reportada para el lasalocid, halofuginona, decoquinato y paramomicina. La profilaxis con paramomicina fue altamente eficaz y no tóxica, pero no ha sido testeado bajo condiciones de campo (Tzipori y col., 1994; Blagburn y Soave, 1997; Brooks, 2005; Castro-Hermida y col., 2006), y se mostró como poco eficaz en lechones gnotobióticos. En esta especie animal se mostró levemente eficaz en criptosporidiosis moderadas a leves, e ineficaz en criptosporidiosis severas (Shahiduzzaman y col., 2012). Aunque el cloro y componentes relacionados pueden reducir la capacidad de los ooquistes para desenquistar o infectar, necesitan relativamente altas concentraciones o tiempos prolongados de exposición, limitando la aplicación práctica. Para la mayoría de los químicos citados por la literatura, las concentraciones efectivas no son generalmente prácticas para la desinfección fuera del laboratorio (Fayer y col., 1997; Biswas y col., 2005).

Muchos compuestos se mostraron prometedores. Entre ellos están la maduramicina, alborixina, lasalocid, varias amidinas aromáticas, salinomicinas, dehidroepiandosterona, paromomicina, L-arginina, glucantina, claritromicina, azitromicina, eritromicina, oleandomicina, spiramicina, pristinamicina, arprinocid, halofuginona, sinenfungin, metronidazole, sulfadimetoxina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfaquinoxalina,

sulfisoxazole, diclazuril, glucantina, norfloxacina, mefloquina y pentamidina. En algunos casos, las eficacias superaban el 90% con los no tratados y los controles. Los tratamientos con otros compuestos resultaron en un modesto pero demostrable reducción en el número de parásitos comparado con los controles (Fayer y col., 1997; De Graaf y col., 1999). La nitrazoxanida es un benzamida nitrothiazole que tiene un amplio rango de actividad antimicrobiana contra parásitos helmintos, particularmente céstodos, y patógenos bacterianos. Los resultados en las pruebas han sido variados. En un modelo porcino, por ejemplo, fue parcialmente efectiva, e inefectiva en un modelo ratón, aunque en cultivos celulares (*in vitro*) fue altamente efectiva (Shahiduzzaman y col., 2012).

La evaluación de la eficacia *in vitro* de estos agentes ancriptosporidiales han confirmado su eficacia *in vivo* de algunos de ellos tales como la maduramicina, paromomicina, y sinenfungina y también ha identificado agentes adicionales tales como colchicina y vinblastina, los cuales presumiblemente funcionan por interacción con las membranas de los esporozoitos y merozoitos invasivos (Tzipori y col., 1994; De Graaf y col., 1999). La eficacia terapeutica de la paromomicina en lechones depende de la severidad de la enfermedad diarreica (Shahiduzzaman y col., 2012). Diarreas moderadas a suaves se despejaron luego del tratamiento con paromomicina. Sin embargo, el tratamiento no tuvo ningún efecto sobre lechones severamente afectados (Tzipori y col., 1994).

Otras drogas de última generación que resultan muy efectivas para otras coccidiosis como el toltrazuril, resultan ineficaces para el caso de *Cryptosporidium*, aunque en algunos ensayos, sólo inhibió el establecimiento del agente (Ryan y col., 2003).

Existen algunos ensayos con suero bovino hiperinmune. Estas inmunoglobulinsa provenientes de calostro bovino hiperinmune redujo moderadamente el grado de

infección por *C. parvum* en ratones y sólo suavemente en lechones (Tzipori y col., 1994; Hunt y col., 2002).

La inmunidad pasiva protectiva por alimentación profiláctica mediante calostro bovino hiperinmune redujo la severidad de la diarrea y el número de ooquistes excretados en terneros experimentalmente infectados con *C. parvum.* Los estudios al respecto encontraron efectos muy beneficiosos y la presencia de factores de crecimiento (presentes en el suero y calostro) en mejorar la reparación de la mucosa del intestino diarreico y en la recuperación de la lesión intestinal isquémica descripta en estos casos. El suero contiene factores de crecimiento específicos que experimentalmente estimuló la proliferación celular de células intestinales cultivadas, además de proveer anticuerpos específicos anti *Cryptosporidium* spp. (Tzipori y col., 1994; Blagburn y Soave, 1997; Zhu y col., 2000; Hunt y col., 2002; Shahiduzzaman y col., 2012).

Similar a la recomendación para humanos, el tratamiento efectivo de los animales que sufren de criptosporidiosis pueden requerir de rehidratación con fluidos y electrolitos, además de quimioterápicos antidiarreicos con las supuestas drogas anticriptosporidiales (Fayer y col., 1997; Blagburn y Soave, 1997; Brooks, 2005). Por último debería recibir terapia antibiótica si alguna bacteria patógena está involucrada (Fayer y col., 1997).

Dada la limitada disponibilidad de drogas efectivas, las medidas higiénicas y el buen manejo son actualmente las armas más válidas en el control de la enfermedad (Shahiduzzaman y col., 2012). En estudio de riesgo, los factores involucrados en la diseminación de la criptosporidiosis en neonatos ha sido demostrado que los métodos de limpieza, el tipo de suelo y la frecuencia de lavado son todos factores de alta significancia (Castro-Hermida y col., 2006).

La prevención de la criptosporidiosis en animales, consiste como base en evitar el contacto con la fuente de ooquistes viables. Esto tiene dificultades, principalmente a nivel de campo, dada la resistencia de los ooquistes a los desinfectantes y medio ambiente. La prevención se basa en el conocimiento de la biología, ciclo de vida y modos de transmisión de *Cryptosporidium*. Los animales afectados deberían permanecer en cuarentena en ambientes donde pudiera ser limpiado y desinfectado. Los posibles fomites, deberían ser decontaminados o descartados. El personal a cargo del cuidado de los animales debería usar ropa que pueda lavarse regularmente. Asegurar la provisión de agua y alimentos limpios. Debería controlarse el aspecto de roedores y otras alimañas, restringiendo el acceso al predio. Asegurar que los neonatos reciban un calostrados adecuado, lo mas tempranamente como sea posible. Los animales que no maman deberían asegurarles calostro sustituto y además administrar complejos vitamínicos para que le despierte el apetito (Fayer y col., 1997).

En general, los métodos de control de la criptosporidiosis en los animales consisten en aquello publicado previamente. Una combinación de prácticas higiénicas, efectiva quimioterapia y medidas de sostén resultarían en un efectivo control de la mayoría de los brotes de criptosporidiosis (Fayer y col., 1997; De Graaf y col., 1999; Castro-Hermida y col., 2006).

En cuanto a la higiene y el manejo medioambiental los desinfectantes comúnmente usados en granjas incluyen hipoclorito de sodio, y una variedad de preparaciones conteniéndo amonio, cloro, peroxido de hidrógeno, glutaraldehído o formaldehído (Shahiduzzaman y col., 2012). En estos estudios, usando los químicos en diferentes concentraciones, tiempo de exposición, y métodos para evaluar la viabilidad, e infectividad de los ooquistes, se llegó a la conclusión que el peróxido de hidrógeno y el formaldehído fueron los que demostraron tener algún efecto anticriptosporidial (Castro-Hermida y col., 2006). El objetivo es destruir las formas externas del parásito y prevenir su transmisión

entre los animales y desde el medio ambiente a los huéspedes susceptibles. En las prácticas de campo, la destrucción de ooquistes en las instalaciones con la aplicación de calor húmedo y/o desinfectantes químicos, el uso de camas limpias, ayuda a prevenir brotes de criptosporidiosis y minimiza la mortalidad y morbilidad en establecimientos infectados (De Graaf y col., 1999).

Las medidas basadas en manejo, desinfección e higiene pueden reducir significativamente la morbilidad y la diseminación. La infección puede prevenirse en las 2-3 semanas de vida por reducción de ooquistes en el medio ambiente (Blagburn y Soave, 1997). A pesar de lo expresado anteriormente, los ooquistes pueden ser marcadamente resistentes a desinfectantes químicos no irritantes y no tóxicos., haciendo virtualmente imposible de mantener a los animales en ambientes completamente libres de ooquistes. Los siguientes procedimientos son recomendados:

1) Asegurar la limpieza del lugar de alojamiento. Todos los animales deberían entrar y salir al mismo tiempo, y no con reemplazo continuo.

2) Las instalaciones individuales deberían ser escrupulosamente limpiados y secados antes de alojar nuevos animales.

3) Los animales al nacimiento deberían ubicarse en ambiente limpio y seco.

4) Los neonatos deberían ser acondicionados en lugares solos por un período de 2-3 semanas.

5)Los animales enfermos deberían ser aislados de los animales sanos y tener diferente cuidado.

6) Los operarios deberían usar guantes, botas y ropa protectiva limpias como así también libre de materia fecal de otros animales.

7) Los utensilios deben ser esterilizados diariamente.

8) Perros, gatos y alimañas deberían ser controlados.

9) Suplementos nutricionales y calostro deberían ser provistos.

10) Por último, una buena profilaxis contra otros agentes debería llevarse a cabo, tal como vacunas contra rotavirus y *Escherichia coli* enteropatógena (Blagburn y Soave, 1997).

HIPÓTESIS

-*Cryptosporidium* spp. se presenta frecuentemente en granjas porcinas intensivas de Argentina y está relacionado a la presencia de diarreas en cerdos post destete.

OBJETIVOS

GENERAL:

Determinar la presencia de *Cryptosporidium* spp. en granjas porcinas de Argentina y su asociación con diarrea en cerdos post destete.

ESPECÍFICOS:

-Determinar la presencia y frecuencia de presentación de *Cryptosporidium* spp. en granjas intensivas porcinas (predial e intrapredial).

-Determinar la distribución etaria de la infección por *Cryptosporidium* spp. en cerdos post destete.

-Caracterizar la materia fecal de los animales positivos a *Cryptosporidium* spp.

-Establecer una relación entre la presentación de diarreas y el tipo de piso utilizado en las categorías estudiadas.

-Establecer una relación entre el evento diarrea y la cantidad de ooquistes por gramo de materia fecal (opg) de *Cryptosporidium* spp.

MATERIALES Y MÉTODOS

POBLACIÓN A ESTUDIAR (ANIMALES Y ESTABLECIMIENTOS)

Para la detección de la prevalencia de predios se requirió de 27 granjas, considerando una prevalencia estimada de 80%, un nivel de confianza del 95% y un error del 15%. Los establecimientos se consideraron positivos con la detección de al menos un animal positivo a *Cryptosporidium* spp. Para el cálculo del tamaño de la muestra y ajuste por tamaño, se consideraron 280 establecimientos de ciclo completo en Argentina según GITEP (2005) y se utilizaron las fórmulas citadas por Thrusfield (1990). Basándose en estos datos, si la prevalencia medida coincide con la esperada, entonces la prevalencia verdadera estará entre el 59,7% y el 94,3%. Debido a que no se pudo concertar la visita con las 27 granjas, finalmente se terminaron muestreando 22 granjas.

Se realizó un estudio de corte transversal. Los establecimientos se seleccionaron utilizando un método de muestreo por conveniencia (Thrusfield, 1990). La condición para estar incluidos en la muestra, fue que contaran con etapas productivas de parto a terminación y que su ubicación geográfica ayudara a contemplar las diferentes provincias de mayor producción porcina del país. La visita se coordinó previamente con cada productor. Al momento de la visita se realizó una encuesta para relevar información relacionado con aspectos de manejo y sanidad.

Para definir el número de animales a muestrear en cada granja y determinar la presencia o ausencia de animales positivos a *Cryptosporidium* spp. en las categorías de 8, 15 y 22 semanas de vida, se utilizó una confianza del 95% y una prevalencia estimada del 30%, resultando un total de 30 animales por establecimiento (10 animales por cada una de las categorías de 8, 15 y 22 semanas de vida) lo que totalizaron 660 muestras (22 granjas por 30 muestras/granja).

Cabe destacar que en cada visita se llevó a cabo un estricto protocolo de bioseguridad para minimizar la posible introducción de patógenos porcinos, evitando por ejemplo visitar establecimientos con intervalos menores a 72 horas. Al momento de la visita se procedió a ingresar a las salas que alojan a los animales de 8, 15 y 22 semanas de edad, en ese orden. En cada faja etaria se extrajo al azar materia fecal de 10 animales por categoría.

CARACTERIZACIÓN DE LAS INSTALACIONES

Se tuvo en cuenta el tipo de pisos sobre los que se encontraban alojadas las diferentes categorías bajo estudio. Sólo se registró si el piso era sólido (concreto o cemento) (Figura Nº 13 y Figura Nº 14), parcialmente enrejillado (Figura Nº 12) o totalmente enrejillado (Figura Nº 10. piso enrejillado completo de slats plástico y Figura Nº 11). En estos últimos dos casos, no se tuvo en cuenta el tipo de material de construcción (plástico, metal o cemento).

CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA FECAL

Color: para su calificación al comienzo del estudio se adapto de una tabla de colores a partir de una escala de color utilizada en pinturerías, que contenía las posibles gamas o variantes de colores que pudieron necesitarse (Figura Nº 2).

FIGURA Nº 2. CARTILLA DE COLORES UTILIZADA PARA DEFINIR LOS COLORES DE LAS DIFERENTES MATERIAS FECALES

Una vez que fueron realizadas las primeras visitas, durante las cuales se tomaron fotos con ayuda de una cámara digital *HP Photosmart M23*, se desarrolló una escala de color con las diferentes tonalidades registradas, a medida que el estudio fue realizándose la escala se fue adaptando de acuerdo a los hallazgos. Finalmente y con el objeto de cubrir las diferentes gamas de colores posibles a encontrar se eláboró la tabla definitiva (ver Tabla 2. caracterización de la materia fecal por color). Vale aclarar que el color caracterizado como amarillo incluye todas las variantes de tonalidades del color, al igual que para el amarronado, gris y rojizo incluyen todas las variantes del color base. En la Figura Nº 2 se muestra la escala de colores definitivo.

TABLA 2. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA FECAL POR COLOR

Nro.	**Color**	
1	Amarillo	
2	Amarronado	 
3	Gris	 
4	Rojizo	

Consistencia: su calificación fue adaptada de acuerdo con una ya existente realizada por Sobestiansky y col. (1985). En la Tabla 3 se muestra la escala definitiva de cada tipo de consistencia para luego ser cargados en la base de datos.

TABLA 3. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA FECAL POR CONSISTENCIAS

Nro.	Consistencia	
1	Pastosa	
2	Cremosa	
3	Líquida	

MUESTRAS

Las muestras de materia fecal fueron tomadas directamente del recto de los cerdos, sujetándo al animal manualmente o mediante lazo (en función del tamaño del animal), e introduciendo los dedos protegidos con un guante y bolsa estéril en el recto (Figura Nº 3). Para estimular la defecación del animal se masajeaba con el/los dedo/s introducido/s en el recto repetidamente sobre la papila rectal (ubicada a unos 1,5-2,5 cm. del orificio anal en la parte superior de la pared intestinal), según lo descripto por Sobestiansky y col., (2005). La muestra tomada se almacenó individualmente en bolsa de polietileno a 4ºC en conservadora de telgopor, debidamente sellada e identificada con la fecha de toma de la muestra, identificación del establecimiento e identificación de la categoría a la que pertenecía el animal muestreado. A su llegada al laboratorio se acondicionaron en heladera a 4ºC hasta su procesamiento (Figura Nº 4). El mismo se realizaba no mas allá de las 48 horas de arribada la

muestra al laboratorio para evitar posibles cambios en la materia fecal que interfirieran con el diagnóstico.

FIGURA Nº 3. SUJECIÓN DE UN ANIMAL PARA PROCEDER A LA EXTRACCIÓN DE MATERIA FECAL DIRECTAMENTE DEL RECTO

FIGURA Nº 4. MATERIAS FECALES ACONDICIONADAS EN BOLSAS INDIVIDUALES E IDENTIFICADAS CON LOS DATOS DE ESTABLECIMIENTO, FECHA Y FAJA ETARIA

PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO:

Cada muestra fue homogeneizada manualmente en su recipiente (bolsa de polietileno), se tomó una alicuota de 1 gr. y la misma fue procesada y concentrada mediante la técnica de Telleman Modificado (Allen y Ridley, 1970).

El sedimento obtenido de cada una de las muestras, se resuspendió con solución salina formulada hasta llevarlo a un volumen de 1 ml y se almacenó en tubos tipo *eppendorf* de 1,5 ml con tapa a presión.

De cada una de las muestras se extrajo con micropipeta (previa homogeneización con vórtex) un volumen de 200 µl, y se realizó un extendido sobre un portaobjetos el cuál se secó a temperatura ambiente y se fijó en alcohol etanol absoluto por 10 minutos. Luego se realizó la coloración de Zielh-Neelsen modificado (Henriksen y Pohlenz, 1981).

El extendido se examinó mediante microscopía óptica con objetivo de 40x, contabilizándo la totalidad de ooquistes observados en la totalidad del extendido. La misma se multiplicó por 5, para estimar así la cantidad de opg de materia fecal.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

-Se calculó la frecuencia de establecimientos positivos a *Cryptosporidium* spp., y dentro de cada establecimiento la fercuencia del total de animales positivos y por edad.

-Se analizó la existencia de asociacion entre la edad y la presencia del agente mediante tablas de contingencia, y se calculó el chi cuadrado, razón de prevalencia e intervalos de confianza (IC) de la razón de prevalencia.

-Para cada una de las proporciones obtenidas para color, consistencia de materia fecal y sus combinaciones se determinó un intervalo de confianza al 95%.

-Se determinó la mediana de opg y se describió la distribución de cada consistencia de materia fecal respecto a la mediana de opg.

-Se describió la distribución de las diferentes consistencias de materia fecal para los diferentes tipos de pisos registrados en cada categoría.

-Los datos se cargaron en planilla de cálculo Microsoft Office Excel 2007 (12.0.6425.1000) SP2 MSO (12.0.6425.1000).

-Para el procesamiento de la información se utilizó el Programa para Análisis Epidemiológico de Datos Tabulados. Versión 3.1 (EPIDAT), Enero 2006.

RESULTADOS

Se muestrearon 22 establecimientos, debido a que no se pudo concretar la visita con algunos de los productores. Los mismos se encontraron distribuidos de la siguiente manera: Córdoba (6), Buenos Aires (5), Santa Fe (4), Tucumán (2), Entre Ríos (2), La Pampa (1), San Juan (1) y San Luis (1). Abarcando el muestreo las siete provincias de mayor producción porcina del país Figura Nº 5.

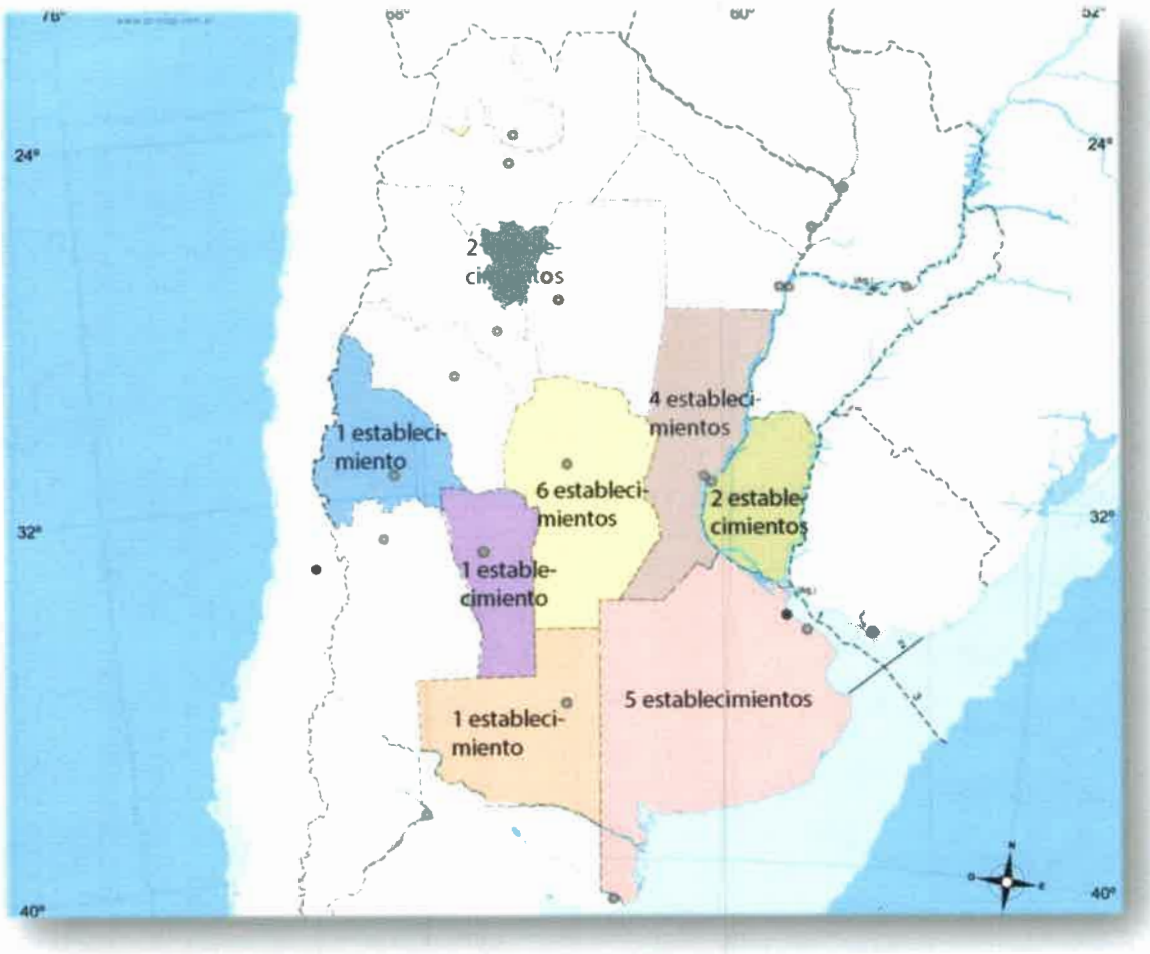

FIGURA Nº 5. MAPA DEL ÁREA RELEVADA Y NÚMERO DE ESTABLECIMIENTO MUESTREADOS POR CADA PROVINCIA

Sólo el 13,6% (3/22) de los establecimientos fueron negativos. El 86,3% (19/22) de los establecimientos resultó positivo a la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium spp.* en materia fecal (Figura Nº 6).

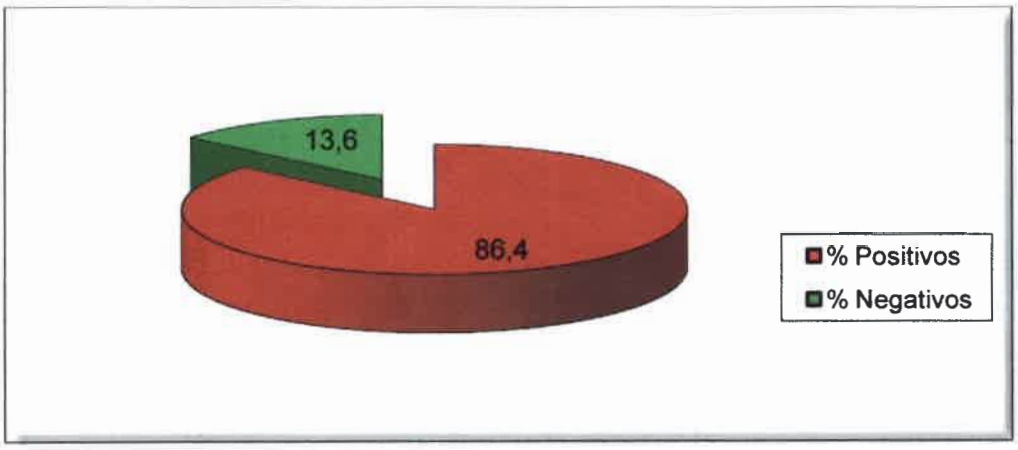

FIGURA Nº 6. PORCENTAJE DE ESTABLECIMIENTOS POSITIVOS Y NEGATIVOS

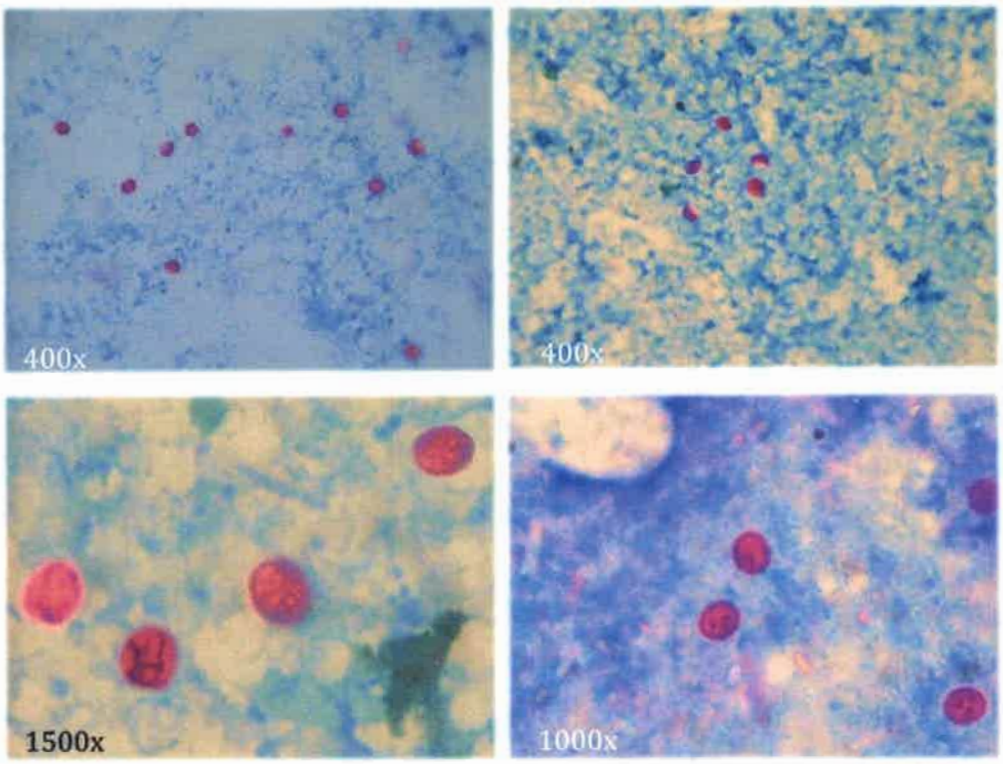

FIGURA Nº 7. IMAGEN DE CUATRO EXTENDIDOS DE MATERIA FECAL QUE RESULTARON POSITIVOS A LA TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN

Al analizar los resultados de manera individual, se encontró que independientemente de la edad de los cerdos, fueron positivos el 10,7% (71/660) de los animales muestreados (Figura Nº 8).

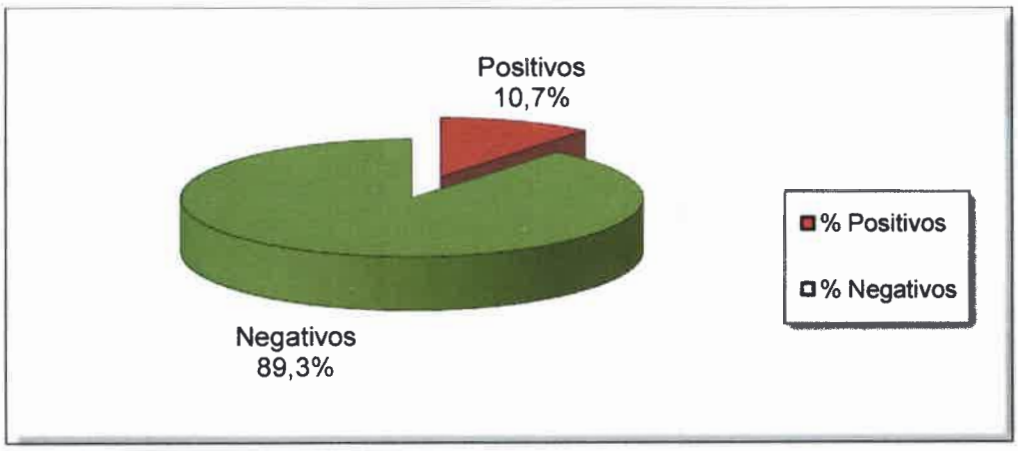

FIGURA Nº 8. PREVALENCIA DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. EN EL TOTAL DE LA POBLACIÓN MUESTREADA

En la Figura Nº 9 se observa la distribución de animales positivos y negativos para las diferentes edades muestreadas. Puede observarse una clara tendencia declinante de la frecuencia de presentacion del agente a medida que los animales aumentan en edad.

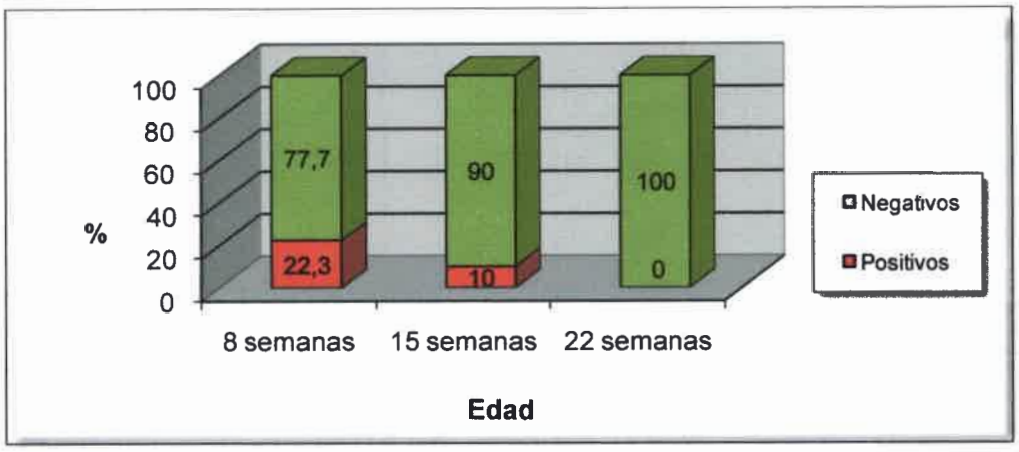

FIGURA Nº 9. PORCENTAJE DE ANIMALES POSITIVOS Y NEGATIVOS SEGÚN EDAD

Puede observarse como disminuye francamente el número de animales positivos a medida que aumenta la edad de los animales. De las muestras tomadas al azar, en todos los establecimientos que resultaron positivos (19) se encontraron animales positivos a las 8

semanas de edad. En cuatro establecimientos hubo animales positivos a las 15 semanas de edad, y no se encontraron animales positivos en la categoría de 22 semanas de edad.

Al ser la poblacón de 8 semanas de edad la que mas manifestó la presencia del agente se intentó poner en evidencia que los animales perttenecientes a esta faja etaria fueron los mas susceptibles de adquirir el agente. Para éste fin se utilizó una tabla de contingencia con un nivel de confianza del 95% en donde se evaluaron los animales positivos y negativos de 8 semanas de edad, y los animales positivos y negativos mayores a 8 semanas de edad (Tabla 4).

TABLA 4. TABLA DE CONTINGENCIA (TABLA 2X2 SIMPLE)

Edad	Positivos a ooquistes de *Cryptosporidium* spp.	Negativos a ooquistes de *Cryptosporidium* spp.	Total
8 semanas	49	171	220
Mayor de 8 semanas	22	418	440
Total	71	589	660

Como resultado de la tabla de contingencia obtenemos una razón de prevalencia igual 4,45, es decir, que por cada un individuo mayor a 8 semanas de edad, tenemos 4,45 individuos positivos de 8 semanas de edad (Tabla 5).

TABLA 5. RAZÓN DE PREVALENCIA DE LOS ANIMALES DE 8 SEMANAS DE EDAD

Prevalencia de la enfermedad	Estimación	IC (95%)	
En expuestos	0,22	-	-
En no expuestos	0,05	-	-
Razón de prevalencia	4,45	2,76	7,17

La prueba *chi*-cuadrado arrojó un valor P igual a 0,0000.

La Tabla 6 muestra el tipo de piso sobre el que estaban alojados los animales bajo estudio, y el porcentaje de animales positivos total y en cada una de las categorías de los 22 establecimientos muestreados. Vemos que la categoría de 8 semanas es la que mayor

frecuencia de presentación tuvo del agente (10% a 50%). La frecuencia de presentación intrapredial varió entre el 10% y el 26,66%. De la observación general de ésta tabla podemos apreciar que la categoría de 8 semanas de edad fue la que mas presentación tuvo del agente. Si nos centramos en ésta categoría, el 80% de los establecimientos que tienen pisos parcialmente enrejillados tienen 30% o más en porcentaje de psotividad. Mientras que en la categoría de 15 semanas de edad, el 57% de los establecimientos que resultaron negativos a ésta categoría, tenían pisos enrejillados completos.

TABLA 6. TIPO DE PISO PARA CADA CATEGORÍA MUESTREADA EN CADA ESTABLECIMIENTO Y PORCENTAJE DE ANIMALES POSITIVOS POR CATEGORÍA Y TOTAL POR ESTABLECIMIENTO

Establecimiento	Tipo de enrejillado (8 semanas)	% positivo	Tipo de enrejillado (15 semanas)	% positivo	Tipo de enrejillado (22 semanas)	% positivo	% total de positivos
1	completo	0	completo	0	parcial	0	0
2	completo	30	completo	20	parcial	0	16,66
3	completo	20	completo	20	parcial	0	13,33
4	parcial	50	Sólido	30	Sólido	0	26,66
5	completo	20	parcial	10	parcial	0	10,00
6	completo	0	completo	0	Sólido	0	0
7	completo	20	parcial	0	Sólido	0	6,66
8	completo	20	completo	0	parcial	0	6,66
9	completo	30	parcial	10	Sólido	0	13,33
10	parcial	40	parcial	20	parcial	0	20,00
11	parcial	30	parcial	10	parcial	0	13,33
12	parcial	30	parcial	10	Sólido	0	13,33
13	parcial	30	parcial	20	parcial	0	16,66
14	completo	10	completo	10	parcial	0	6,66
15	completo	20	completo	0	Sólido	0	6,66
16	parcial	20	parcial	0	parcial	0	6,66
17	parcial	30	parcial	20	parcial	0	16,66

18	parcial	30	parcial	10	parcial	0	13,33
19	parcial	20	parcial	0	Sólido	0	6,66
20	completo	0	parcial	0	parcial	0	0
21	completo	10	parcial	30	parcial	0	13,33
22	parcial	30	parcial	0	parcial	0	10,00

Algunos ejemplos de diferentes tipos de pisos de los establecimientos bajo estudio se muestran en las Figura Nº 10, Figura Nº 11, Figura Nº 12, Figura Nº 13 y Figura Nº 14.

FIGURA Nº 10. PISO ENREJILLADO COMPLETO DE SLATS PLÁSTICO

FIGURA Nº 11. PISO ENREJILLADO COMPLETO DE SLATS DE CEMENTO

FIGURA Nº 12. PISO CON ENREJILLADO PARCIAL DE SLAT PLÁSTICO COMBINADO CON PISO SÓLIDO DE CEMENTO, DONDE PUEDEN OBSERVARSE SERIAS DEFICIENCIAS EN LA HIGIENE.

FIGURA Nº 13.PISTA DE FRENTE ABIERTO TECHADA CON SLAT DE CEMENTO INTERNO Y PATIO EXTRENO DE PISO SÓLIDO, EN DONDE PUEDE OBSERVARSE ACUMULACIÓN DE AGUA Y MATERIA FECAL.

FIGURA Nº 14. PISO SÓLIDO DE CEMENTO CON ACUMULACIÓN DE MATERIA FECAL

La Figura Nº15 muestra las características de la consistencia observadas de las materias fecales del total de los animales muestreados discriminados por edad.

En la distribución de las diferentes consistencia de materia fecal de la totalidad de la población muestreada podemos observar que en todas las edades estudiadas la consistencia predominante fue la pastosa, seguida por la cremosa y luego la líquida en menor proporción.

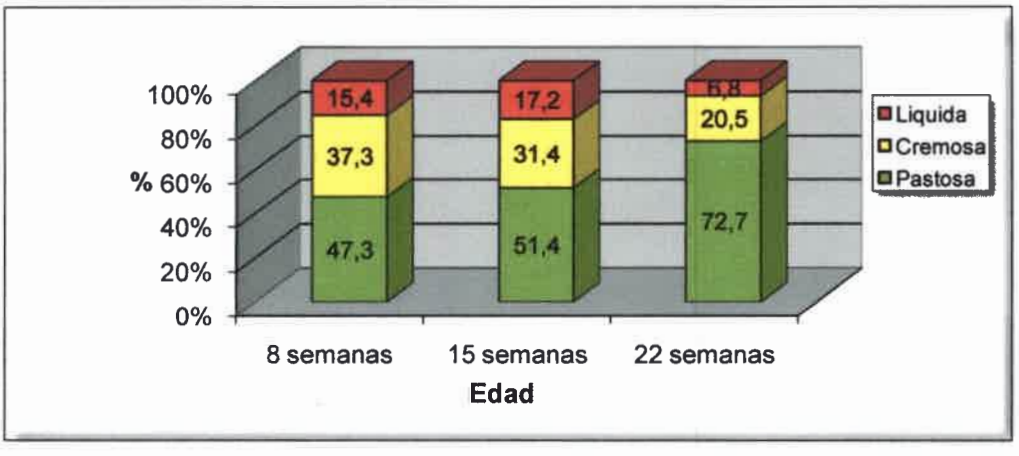

FIGURA Nº15. CLASIFICACIÓN DE LAS MATERIA FECALES POR CONSISTENCIA SEGÚN LA EDAD EN EL TOTAL DE LA POBLACIÓN MUESTREADA

En la Figura Nº 16 se muestra la coloración de las materias fecales de toda la población estudiada.

Todas las variantes de colores fueron encontradas en las diferentes fajas etarias en distintas proporciones. En relación a la coloración de las materias fecales de toda la población estudiada, la coloración que predominó fue la amarronada, seguidas en orden decreciente por la gris, la amarilla y por último, en muy baja proporción la rojiza.

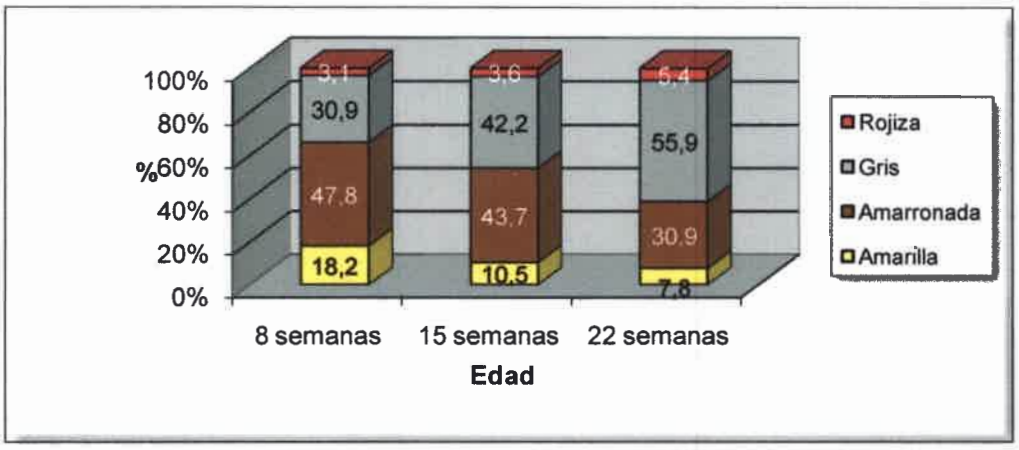

FIGURA Nº 16. CLASIFICACION DE LAS MATERIAS FECALES POR COLOR SEGÚN LA EDAD EN EL TOTAL DE LA POBLACIÓN MUESTREADA

Sin embargo, si vemos como se distribuyeron los colores y consistencia de materias fecales en los animales negativos observamos que el color predominante de materia fecal fue el gris (con una participación creciente a mayor edad), que junto a la amarronada (en segundo lugar) fueron los colores predominantes. En el caso de la amarronada, mostró una participación decreciente a mayor edad.

En la Figura Nº 17 y Figura Nº 18 se muestran como se distribuyeron las características de consistencias y de colores de las materias fecales de los animales negativos.

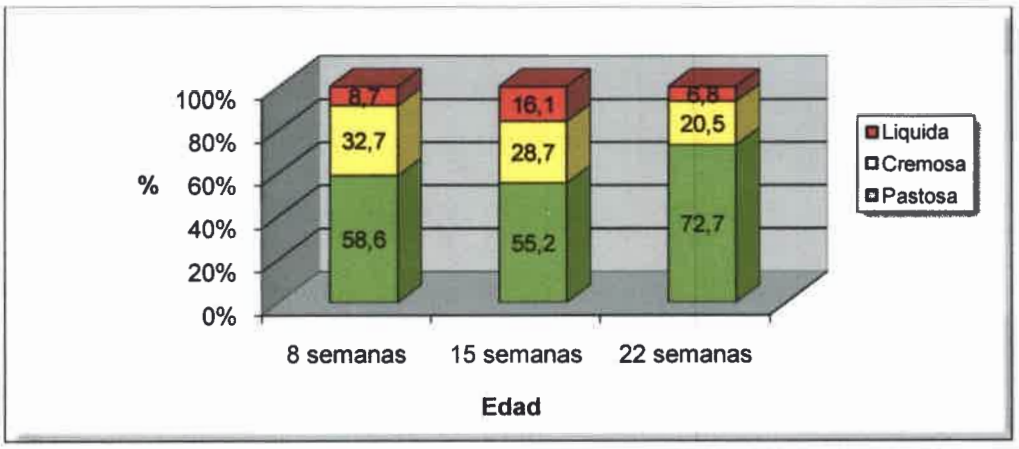

FIGURA Nº 17. CLASIFICACIÓN DE LA MATERIA FECAL POR CONSISTENCIA DE LOS ANIMALES NEGATIVOS

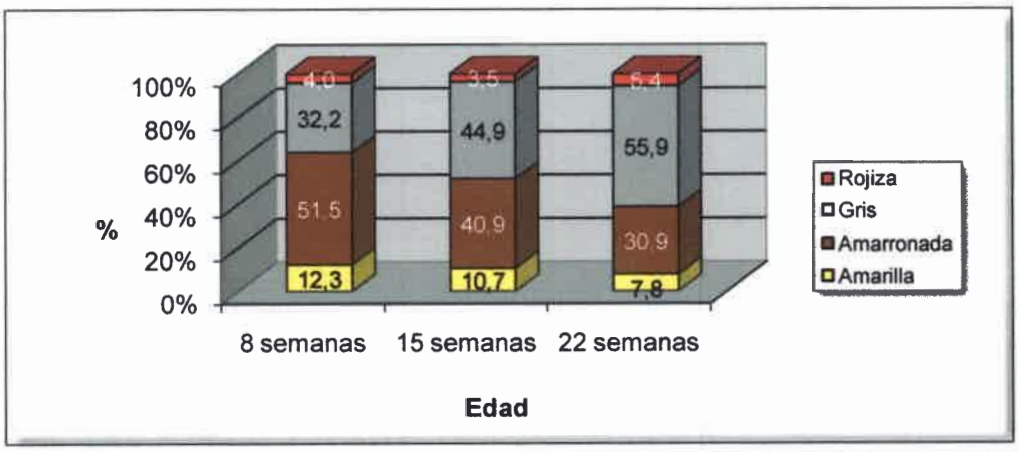

FIGURA Nº 18. CLASIFICACIÓN DE LA MATERIA FECAL POR COLOR DE LOS ANIMALES NEGATIVOS

Algunos ejemplos de las materias fecales observadas durante el estudio se muestran en la Figura Nº 19, Figura Nº 20, Figura Nº 21 y Figura Nº 22.

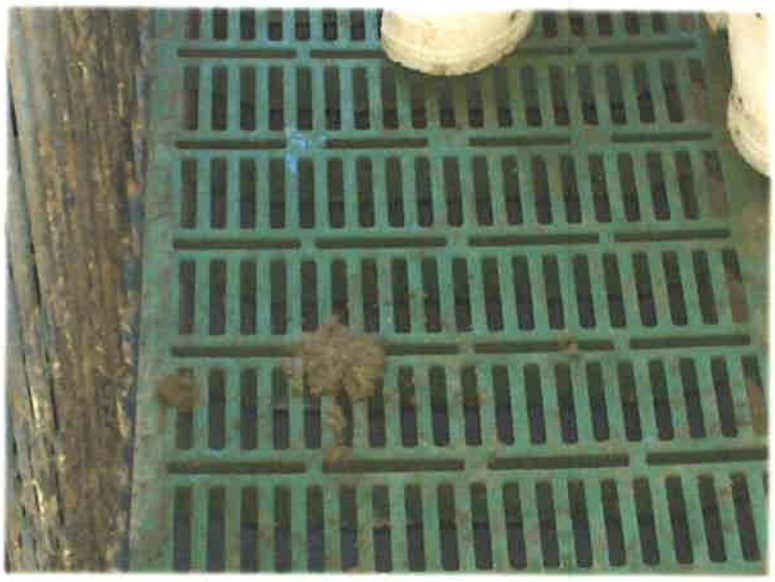

FIGURA Nº 19. MATERIA FECAL PASTOSA Y AMARRONADA EN LA CATEGORÍA DE 8 SEMANAS DE EDAD

FIGURA Nº 20. MATERIA FECAL CREMOSA Y GRIS EN LA CATEGORÍA DE 8 SEMANAS DE EDAD.

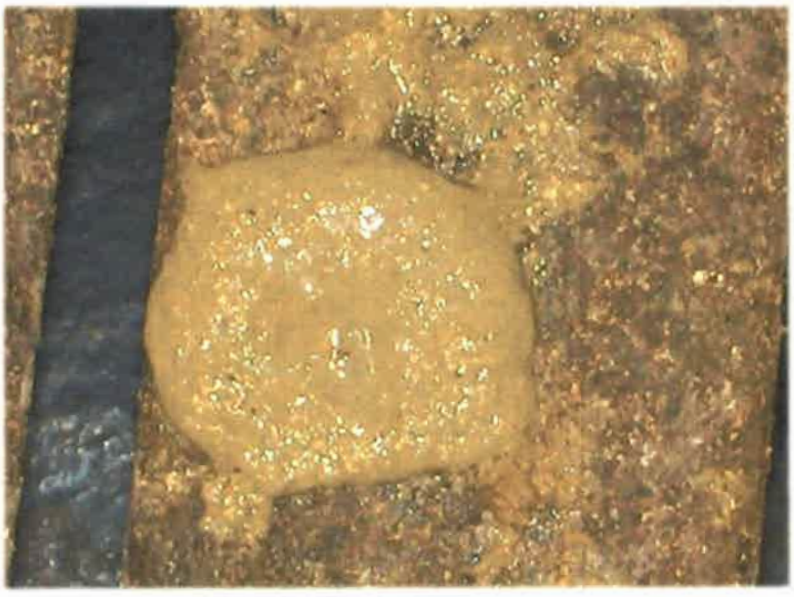

FIGURA Nº 21. MATERIA FECAL CREMOSA Y AMARRONADA EN LA CATEGORÍA DE 15 SEMANAS DE EDAD.

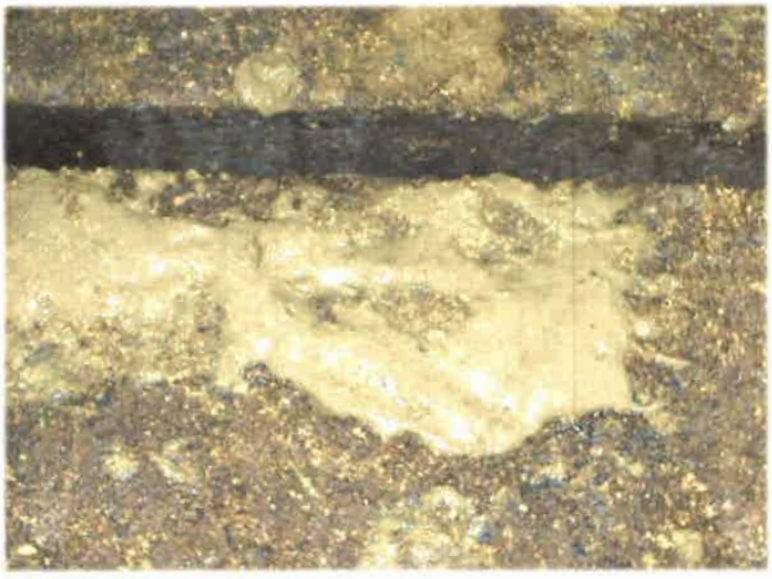

FIGURA Nº 22. MATERIA FECAL CREMOSA Y AMARILLENTA EN LA CATEGORÍA DE 22 SEMANAS DE EDAD

Con respecto a la distribución según la edad de las consistencias y color de las materias fecales, dentro de la población que resultó positiva la podemos observar en la Figura Nº 23 y Figura Nº 24, respectivamente.

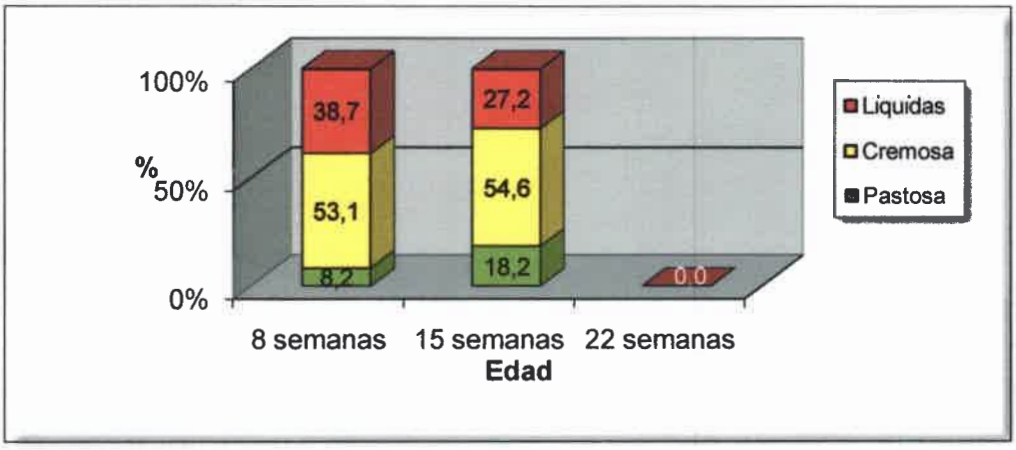

FIGURA Nº 23. CLASIFICACIÓN DE LA MATERIA FECAL POR CONSISTENCIA DE LOS ANIMALES POSITIVOS

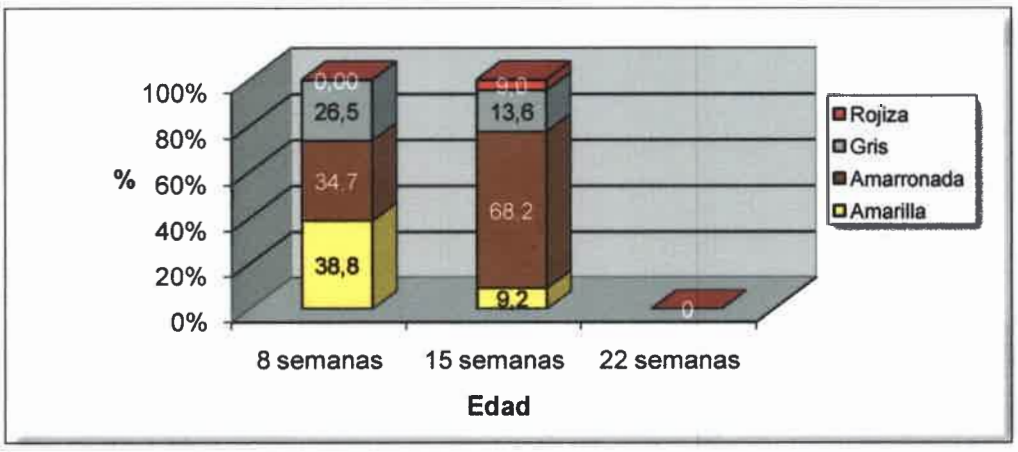

FIGURA Nº 24. CLASIFICACIÓN DE LA MATERIA FECAL POR COLOR DE LOS ANIMALES POSITIVOS

En la página siguiente vemos la Tabla 7 en la que se muestran en detalle las características tanto de consistencia como color de la totalidad de los animales muestreados, mostrando además el porcentaje que representan y su correspondiente

intervalo de confianza (IC) al 95%. En esta tabla podemos apreciar que la consistencia más frecuente de observar, incluso en todas las edades evaluadas, es la consistencia pastosa (57,12%-IC 53,27-60,97). Mientras que lo que respecta al color de la materia fecal, en las categorías de 8 semanas (47,27%-IC 40,45-54,10) y 15 semanas (43,64%-IC 36,85-50,41) es el color amarronado, y en los animales de 22 semanas de edad, el color predominante fue el gris. Si consideramos al total de animales, sin discriminar por edades, el mayor número de animales se encasilló en la materia fecal de color gris (43,03%-IC 39,17-46,88).

TABLA 7. CARACTERÍSTICAS DE LA MATERIA FECAL (CONSISTENCIA Y COLOR) DE **TODOS** LOS ANIMALES MUESTREADOS EN FUNCIÓN DE LA EDAD. SE MUESTRA EL NÚMERO DE ANIMALES (N), PORCENTAJE (%) DEL TOTAL EN ESA CATEGORÍA E INTERVALOS DE CONFIANZA (IC) AL 95%.

Edad en semanas	**Consistencia**									**Color**											
	Pastosa			Cremosa			Líquida			Amarillenta			Amarronada			Gris			Rojiza		
	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%
8 semanas	104	47,3	40,4-54,0	82	37,3	30,6-43,8	34	15,4	10,4-20,4	40	18,2	12,8-23,5	104	47,8	40,4-54,1	67	30,9	24,1-36,7	9	3,1	1,2-6,9
15 semanas	113	51,4	44,5-58,1	69	31,4	25,0-37,7	38	17,2	0,2-3,9	23	10,5	6,1-14,7	96	43,7	36,8-50,4	92	42,2	35,0-48,5	9	3,6	1,2-6,9
22 semanas	160	72,7	66,6-78,8	45	20,5	14,8-26,0	15	6,8	3,2-10,3	17	7,8	3,9-11,4	68	30,9	24,5-37,2	123	55,9	49,1-62,6	12	5,4	2,2-8,6
Subtotal	377	57,1	53,2-60,9	196	29,7	26,1-33,2	87	13,1	10,5-15,8	80	12,1	9,5-14,6	269	40,7	36,9-44,5	284	43,0	39,1-46,8	27	4,0	2,5-5,6
TOTAL					660										660						

En la pàgina siguiente vemos la Tabla 8 en donde se muestra la misma información que la Tabla 7, pero en éste caso, correspondiente a los animales que resultaron negativos.

Haciendo una observación similar a la hecha anteriormente, podemos apreciar que la consistencia predominante en este grupo de animales fue la pastosa (62,65%-IC 58,66-66,64), coincidente con lo visto en laTabla 7, correspondiente a la totalidad de la población.

En cuanto al color de la materia fecal, observamos que el color predominante en los animales de 8 semanas de edad fue el amarronado (50,88%-IC 43,09-58,66), mientras que para los animales de 15 y 22 semanas de edad fue el gris (43,94%-IC 36,77-51,10 y 55,91%-IC 49,12-62,70, respectivamente). Si consideramos al total de ésta población (animales negativos), sin discriminar por edades, el mayor número de animales se encasilló dentro de la materia fecal de color gris (45,33%-IC 41,23-49,44). Estas observaciones coinciden mayoritariamente con lo observado en la tabla 3, por lo que nos permiten definir que la materia fecal de consistencia pastosa, y color gris es la que podría tomarse como de características predominantes en la mayoría de los establecimientos intensivos confinados, y definirla como "*normal*" o la que mayor frecuencia de presentación tuvo en la población estudiada.

TABLA 8. CARACTERÍSTICAS DE LA MATERIA FECAL (CONSISTENCIA Y COLOR) DE LOS ANIMALES **NEGATIVOS** EN FUNCIÓN DE LA EDAD. SE MUESTRA EL NÚMERO DE ANIMALES (N), PORCENTAJE (%) DEL TOTAL EN ESA CATEGORÍA E INTERVALOS DE CONFIANZA (IC) AL 95%.

Edad (semanas)	**Consistencia**									**Color**											
	Pastosa			Cremosa			Líquida			Amarillenta			Amarronada			Gris			Rojiza		
	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%
8 semanas	100	58,6	50,8-66,1	56	32,7	25,4-40,0	15	8,7	4,2-13,3	21	12,3	7,0-17,4	87	51,5	43,0-58,6	55	32,2	24,8-39,4	8	4,0	1,2-8,1
15 semanas	109	55,2	47,8-62,2	57	28,7	22,2-35,3	32	16,1	10,7-21,5	21	10,7	6,0-15,1	81	40,9	33,8-48,0	87	44,9	36,7-51,1	9	3,5	1,3-7,7
22 semanas	160	72,7	66,6-78,8	45	20,4	14,9-26,0	15	6,8	3,2-10,3	17	7,8	3,9-11,4	68	30,9	24,5-37,2	123	55,9	49,1-62,7	12	5,4	2,2-8,6
Subtotal	369	62,6	58,6-66,6	158	26,8	23,1-30,4	62	10,5	7,9-13,0	59	10,0	7,5-12,5	237	40,2	36,1-44,2	267	45,3	41,2-49,4	26	4,4	2,6-6,1
TOTAL					589										589						

En la página siguiente vemos la Tabla 9 en la que se presentan en detalle las características tanto de consistencia como color de los animales muestreados que resultaron positivos, mostrando además el porcentaje que representan y su correspondiente intervalo de confianza (IC) al 95%. Cuando analizamos ésta información, vemos que el 53% de los animales tuvieron materia fecal cremosa (IC=38,06-68,05), mostrando una clara disminución en la consistencia de la materia fecal (respecto a la totalidad de la población y a los animales que resultaron negativos), y un 35% de los animales tuvo materia fecal líquida (IC=23,40-47,02). Los animales que tuvieron materia fecal cremosa y líquida en conjunto representaron el 89% del total de positivos (IC=80,67-96,79). Mientras que el color que prevaleció fue el amarillento para los animales de 8 semanas de edad (con 39% de presentación y un IC=24,11-53,44), y el amarronado para los animales de 15 semanas de edad (con un 68% de presentación y un IC=45,13-86,13). Si consideramos al total de ésta subpoblación positiva, sin discriminar por edades, el mayor número de animales se encasilló dentro de la materia fecal de consistencia cremosa (54%-IC=41,22-65,83) y color amarronado (45%-IC=32,79-57,35).

TABLA 9. CARACTERÍSTICAS DE LA MATERIA FECAL (CONSISTENCIA Y COLOR) DE LOS ANIMALES **POSITIVOS** EN FUNCIÓN DE LA EDAD. SE MUESTRA EL NÚMERO DE ANIMALES (N), PORCENTAJE (%) DEL TOTAL EN ESA CATEGORÍA E INTERVALOS DE CONFIANZA (IC) AL 95%.

Edad (semanas)	**Consistencia**									**Color**											
	Pastosa			Cremosa			Líquida			Amarillenta			Amarronada			Gris			Rojiza		
	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%
8 semanas	4	8,2	2,2-19,6	26	53,1	38,0-68,0	19	38,7	24,1-53,4	19	38,8	24,1-53,4	17	34,7	20,3-49,0	13	26,5	13,1-39,9	0	-	-
15 semanas	4	18,2	5,1-40,2	12	54,6	31,4-77,6	6	27,2	10,7-50,2	2	9,2	1,1-29,1	15	68,2	45,1-86,1	3	13,6	2,9-34,9	2	9,0	1,1-29,1
22 semanas	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	0,0-84,1	0	-	0,0-84,1	0	-	0,0-84,1	0	-	-
Subtotal	8	11,2	3,2-19,3	38	53,5	41,2-65,8	25	35,2	23,4-47,0	21	29,5	18,2-40,9	32	45,0	32,7-57,3	16	23,9	13,3-34,5	2	2,8	1,3-9,8
TOTAL				71									71								

La Tabla 10 presenta las muestras individuales que resultaron positivas (71), edad de los animales, la cantidad de ooquistes por gramo (opg) de materia fecal, la consistencia y el color de la materia fecal.

TABLA 10. NIVELES DE OPG EN FUNCIÓN DE LA EDAD, LA CONSISTENCIA Y EL COLOR DE LA MATERIA FECAL.

Establecimiento	Muestra	Edad (días)	opg	Consistencia	color
2	6	50	400	Pastosa	Amarronado
2	4	50	700	Cremosa	Amarillo
2	8	50	700	Liquida	Amarillo
2	20	100	300	Cremosa	Amarronado
2	19	100	450	Cremosa	Amarronado
3	6	50	450	Liquida	Amarillo
3	2	50	800	Liquida	Amarillo
3	19	100	150	Pastosa	Amarronado
3	20	100	350	Cremosa	Amarronado
4	6	50	450	Cremosa	Amarillo
4	2	50	600	Liquida	Amarillo
4	3	50	600	Cremosa	Amarronado
4	8	50	750	Liquida	Amarillo
4	7	50	850	Cremosa	Amarronado
4	13	100	150	Cremosa	Amarronado
4	14	100	350	Cremosa	Amarronado
4	19	100	400	Cremosa	Amarronado
5	8	50	450	Cremosa	Amarronado
5	7	50	550	Cremosa	Amarronado
5	15	100	300	Cremosa	Amarronado
7	9	50	350	Cremosa	Amarronado
7	3	50	450	Liquida	Gris

8	1	50	350	Cremosa	Gris
8	10	50	450	Cremosa	Gris
9	3	50	450	Cremosa	Amarillo
9	4	50	450	Liquida	Amarillo
9	5	50	950	Liquida	Gris
9	15	100	650	Cremosa	Gris
10	9	50	300	Cremosa	Amarillo
10	10	50	350	Pastosa	Amarronado
10	2	50	600	Liquida	Gris
10	1	50	900	Cremosa	Amarillo
10	14	100	150	Liquida	Amarronado
10	15	100	250	Liquida	Gris
11	4	50	350	Liquida	Gris
11	6	50	650	Liquida	Amarillo
11	3	50	950	Liquida	Amarronado
11	13	100	300	Cremosa	Amarronado
12	5	50	400	Cremosa	Amarronado
12	4	50	600	Liquida	Gris
12	6	50	850	Liquida	Amarillo
12	14	100	50	Liquida	Amarronado
13	7	50	450	Cremosa	Amarillo
13	2	50	600	Liquida	Amarillo
13	8	50	700	Cremosa	Amarillo
13	18	100	600	Liquida	Amarillo
13	17	100	900	Liquida	Amarronado
14	4	50	1100	Cremosa	Amarronado
14	15	100	850	Liquida	Gris

15	6	50	450	Liquida	Gris
15	7	50	750	Cremosa	Gris
16	4	50	450	Cremosa	Gris
16	10	50	750	Cremosa	Amarillo
17	6	50	450	Pastosa	Amarronado
17	10	50	700	Liquida	Amarillo
17	5	50	850	Cremosa	Amarronado
17	16	100	150	Pastosa	Rojizo
17	15	100	550	Pastosa	Amarronado
18	5	50	150	Pastosa	Amarronado
18	8	50	800	Liquida	Gris
18	6	50	1050	Cremosa	Amarronado
18	13	100	750	Cremosa	Amarillo
19	8	50	900	Cremosa	Gris
19	1	50	1150	Cremosa	Amarronado
21	5	50	700	Cremosa	Amarronado
21	20	100	200	Pastosa	Amarronado
21	14	100	300	Cremosa	Gris
21	15	100	450	Cremosa	Amarronado
22	5	50	600	Cremosa	Amarillo
22	3	50	900	Liquida	Gris
22	2	50	1250	Cremosa	Amarronado

Con respecto a la cantidad de ooquistes que eliminaban los animales, por gramo de materia fecal varió desde 50 a 1250 ooquistes por gramo.

Para una mejor visualización de los resultados, se determinó la mediana del número de ooquistes por gramo de materia fecal que fue de 550 opg, y mostrar estos resultados en función de la consistencia de la materia fecal en las distintas edades relevadas. Podemos ver estos datos en la Tabla 11, Tabla 12 y Tabla 13.

En la Tabla 11 vemos claramente una mayor cantidad de animales (38/71)que presentan materia fecal cremosa distribuídos casi equitativamente por encima y por debajo de la mediana de ooquistes por gramo que eliminaban estos animales (20/38 por debajo de la mediana de opg y 18/38 por encima de la mediana de opg). Pero si observamos a los animales que presentaron materia fecal líquida, que representan el 35,2% (25/71) del total de animales positivos, hay casi un 100% más de animales con materia fecal líquida que está eliminando ooquistes por encima de la mediana de opg (17/25) respecto a los que eliminan por debajo de la mediana de opg (8/25).

Ahora, volvemos a la necesidad de definir a que llamamos diarrea. Si es una disminución de la consistencia de la materia fecal con respecto al parámetro de normalidad establecido (consistencia mas frecuente de encontrar en la población total o en la población que resultó negativa), que para nuestro caso fue la pastosa, entonces significaría que las cremosa y la líquida serían materias fecales con diferentes grados de diarreas (leve y marcado o severo).

En éste caso (si consideramos dirrea a las materias fecales cremosas y las líquidas), significa que el 89% (63/71) de la población que resultó positiva padeció del evento diarrea. De los cuales el 55,5% (35/63) se encontraban por encima de la mediana de opg. Es decir que mas de la mitad de éstos animales presentó diarrea.

TABLA 11. CARACTERÍSTICAS DE LAS MATERIAS FECALES DE LOS ANIMALES **POSITIVOS** EN FUNCIÓN DE LA MEDIANA DE OPG CON RESPECTO A LA CONSISTENCIA. SE MUESTRA EL NÚMERO DE ANIMALES (N), PORCENTAJE (%) DEL TOTAL EN ESA CATEGORÍA E INTERVALOS DE CONFIANZA (IC) AL 95%.

	Pastosa			**Cremosa**			**Líquida**			**Tot vl**
Mediana de opg	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	
Igual o menor de 549	7	87,5	47,3-99,7	20	53,0	35,4-70,0	8	32,0	11,7-52,3	35
Igual o mayor de 550	1	12,5	1,1-53,0	18	47,4	30,2-64,6	17	68,0	47,7-88,3	36
Total										71

En la Tabla 12 vemos la consistencia de la materia fecal de los animales positivos pero de 8 semanas de edad respecto a la mediana de opg. Haciéndo un análisis como el que hicimos en la Tabla 11 vemos una tendencia a disminuir la consistencia de la materia fecal. Si observamos sólo las líquidas vemos que el 38,8% (19/49) de éstos animales presentó éste tipo de consistencia de los cuales el 73,7% (14/19) de éstos animales que presentó materia fecal líquida se encontraba por encima de la mediana de opg. Si incluímos a los animales de materia fecal cremosa y tomamos en conjunto a los que tienen consistencia cremosas y líquidas observamos que el 91,8% (45/49) de éstos animales presentó diarrea (según lo definido anteriormente), de los cuales el 66,6% (30/45) de éstos animales con materia fecal cremosa y líquida se encontraban por encima de la mediana de opg (están eliminando mas de 550 opg).

TABLA 12. CARACTERÍSTICAS DE LAS MATERIAS FECALES DE LOS ANIMALES **POSITIVOS** DE **8 SEMANAS DE EDAD** EN FUNCIÓN DE LA MEDIANA DE OPG CON RESPECTO A LA CONSISTENCIA. SE MUESTRA EL NÚMERO DE ANIMALES (N), PORCENTAJE (%) DEL TOTAL EN ESA CATEGORÍA E INTERVALOS DE CONFIANZA (IC) AL 95%.

	Pastosa			**Cremosa**			**Líquida**			**Total**
Mediana de opg	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	
Igual o menor de 549	4	100,0	39,8-100,0	10	38,5	17,8-59,1	5	27,8	9,1-51,2	19
Igual o mayor de 550	0	-	-	16	61,5	41,0-82,2	14	72,2	46,5-90,3	30
Total	4	8,2		26	53					49

En la Tabla 13 vemos la consistencia de la materia fecal de los 22 animales positivos de 15 semanas de edad. Podemos observar que los animales con materia fecal líquida representaron el 27,3% (6/22), de los cuales el 50% (3/6) de éstos animales se encontraba por encima de la mediana de opg. Es decir, hubo una distribución equitativa de éstos animales con materia fecal líquida respecto a la mediana de opg. Si ahora observamos a los animales con materia fecal cremosa y líquida en su conjunto vemos que el 81,8% (18/22) de éstos animales tuvieron diarrea (por lo definido anteriormente), de los cuales el 72,2% (13/18) se encontraban por debajo de la mediana de opg. A diferencia de lo visto en la Tabla 11 y Tabla 12 en este caso hubo mayor cantidad de animales que eliminaban ooquistes por debajo de la mediana de opg (13/18) que los animales que tuvieron materia fecal cremosa y líquida que eliminaban ooquistes por encima de la mediana de opg que alcanzaron sólo el 27,8% (5/18).

TABLA 13. CARACTERÍSTICAS DE LAS MATERIAS FECALES DE LOS ANIMALES **POSITIVOS** DE **15 SEMANAS DE EDAD** EN FUNCIÓN DE LA MEDIANA DE OPG CON RESPECTO A LA CONSISTENCIA. SE MUESTRA EL NÚMERO DE ANIMALES (N), PORCENTAJE (%) DEL TOTAL EN ESA CATEGORÍA E INTERVALOS DE CONFIANZA (IC) AL 95%.

	Pastosa			**Cremosa**			**Líquida**			**Total**
Mediana de opg	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	
Igual o menor de 549	4	100	39,8-100	10	83,3	51,6-98,0	3	50,0	11,8-88,2	17
Igual o mayor de 550	0	-	-	2	16,7	2,1-48,4	3	50,0	11,8-88,2	5
Total										22

DISCUSIÓN

FRECUENCIA DE PRESENTACIÓN DE ESTABLECIMIENTOS POSITIVOS

Como vimos en los resultados. de los 22 establecimientos relevados se encontró que el 86,36% (19/22) de los establecimientos estudiados fueron positivos a ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (Figura Nº 6). Respecto a estos hallazgos, en la bibliografía consultada hay pocas referencias a la prevalencia de granjas positivas. Sólo tres citas describen éste dato. Por un lado, un estudio hecho en Alberta, Canadá (Guselle y col., 2003) en donde se encontró que un 32% de un total de 50 granjas relevadas, fue positivo. Otro estudio menciona que se relevaron 89 granjas de las que el 71,9% resultaron positivas (Nguyen y col., 2012). Y por último, Budu-Amoako y col. (2012) citaron una prevalencia de 86% de granjas positivas, de 28 muestreadas. De estas descripciones, sólo éste último es coincidente con nuestro hallazgo. Esto, sin duda, es debido a diferentes factores a considerar. Según Chang y Huang (2007) son muchos los factores que pueden contribuir a estas diferencias como por ejemplo el clima, las prácticas de manejo, los sistemas productivos implementados en diferentes países y factores propios tanto del huésped como del parásito. Aún con diagnósticos convencionales, poco es lo que se conoce acerca de la prevalencia y significancia de los criptosporidios en los cerdos (Ryan y col., 2003). Un factor importante a tener en cuenta cuando comparamos resultados de otros autores con los nuestros es que nosotros muestreamos un número limitado de muestras, en comparación con los citados por otros autores donde fueron un número sustancialmente mayor de granjas relevadas.

La prevalencia hallada por diferentes autores, puede desempeñar un rol fundamental en la variabilidad de los resultados, pudiendo estar subestimada, en primer lugar, por la eliminación intermitente de ooquistes en la materia fecal. Este comportamiento es muy conocido en bovinos, pero aún no ha sido claramente demostrado

en cerdos de acuerdo a lo descripto por Guselle y col. (2003). Por otro lado, la criptosporidiosis puede encontrarse enmascarada, debido a que puede presentarse simultáneamente con otros patógenos como *Isospora suis* e incluso encontrarse en animales adultos, por lo que puede ser subestimada (Morgan y col., 1999-a). Así, resulta muy complejo el estudio epidemiológico de la enfermedad, ya que factores tanto del huésped (como por ejemplo, factores inmunitarios de la población expuesta) como factores del parásito juegan un rol fundamental, sobre todo al implementar estudios de tipo transversal (Fayer, 2010).

FRECUENCIA DE PRESENTACIÓN DE CERDOS POSITIVOS

Cuando analizamos la frecuencia de presentación individual encontramos que el 10,7% (71/660) de los animales que se muestrearon resultó positivo (Figura Nº 8). Sin embargo no hay datos de la enfermedad a nivel nacional tanto predial como intrapredial (Venturini y col. 1996). La bibliografía consultada, no hace referencia a las prevalencias nacionales de *Cryptosporidium* spp.

A nivel internacional, existen muchos estudios acerca de la prevalencia de *Cryptosporidium* en cerdos. Nuestros resultados son coincidentes a los encontrados por Zintl y col. (2007) donde reportaron una prevalencia del 11,4%. En China, Corea y Canadá, Chen y Huang (2007) reportaron una prevalencia del 12%, 10,5% y 11% respectivamente. Aunque otros autores describieron en Henan (China) prevalencia menores, del orden del 8,2% (Wang y col., 2010), y otros autores reportaron prevalencias mayores en Shangai (Chen y col., 2011).

En algunos trabajos se citan prevalencias menores a las encontradas en nuestro estudio. Por ejemplo, 5,3% en Canadá, 5% en un predio de California (Casemore y col., 1997), 6% en granjas relevadas de Australia (Ryan y col. 2003), entre 5,3% y 7,1% en

Estados Unidos (Cheng y Huang, 2007; Guselle y col, 2003), 1,4% en Alemania (Cheng y Huang, 2007).

Mientras que otros autores citan prevalencias mayores a las encontradas en nuestro estudio, por ejemplo las descriptas en España de 21,9%, Japón de 33,2% (Da Silva y col., 1994), Trinidad y Tobago del 19,6% (Casemore y col., 1997), Australia de 22,1% (Jonson y col., 2008)

Como podemos observar, existe una gran variabilidad de las prevalencias, lo que se puede atribuir a los factores mencionados anteriormente. Según Casemore y col. (1997), la prevalencia de *Cryptosporidium* permanece poco clara debido, entre otras cosas, a que la mayoría de los estudios involucran pocas granjas y pocos animales.

Además, éstos valores prevalenciales tienen grandes fluctuaciones, en función de la edad de los animales involucrados en los diferentes muestreos, tal como lo describen Moore y col. (2001) y Nguyen y col. (2012) en donde determinaron que la aparición de éstos patógenos entéricos estuvo significativamente asociada con la edad de los animales examinados.

La inmunidad claramente juega un rol importante en términos de resolución y/o reinfección y va ligado a la edad de los animales. La dosis infectante puede ser mas pequeña en un individuo susceptible que en otro parcialmente inmune. Todos estos factores son fundamentales en el desarrollo o no de una infección y por ende hacen variar la prevalencia, o la presencia o no del agente en un establecimiento. Estos hechos fueron claramente descriptos por Casemore y col. (1997) y por Akiyoshi y col. (2003).

FRECUENCIA DE PRESENTACIÓN DE CERDOS POSITIVOS POR EDAD

En relación a la edad, si bien es de esperar la mayor presentación del agente en los animales más jóvenes (Xiao y col., 2005-b), existe también un patrón de presentación

dentro de las diferentes etapas productivas que podemos tener, incluso dentro del primer mes de vida condicionado básicamente por la lactancia de los lechones. En definitiva podemos describir dos momentos en la vida de los lechones en los cuales se discute la mayor o menor presentación del agente en esta categoría: antes y después del destete.

En nuestro caso, cuando analizamos la frecuencia de presentación de la enfermedad en función de la edad (Tabla 4 y Tabla 5) se observa que hay una fuerte asociación (p=0,0000) entre los animales positivos y los animales de 8 semanas de edad, donde vemos que por cada 4,5 individuos IC 95% (2,76-7,17) positivos de 8 semanas de edad, hay un animal positivo mayor a 8 semanas de edad. La bibliografía consultada es bastante consistente en este aspecto, y muy coincidente con nuestros hallazgos. Por ejemplo, De Graff y col. (1999) y Nemejc y col. (2013) informaron que la prevalencia de los criptosporidios en cerdos es muy baja en la maternidad. A la vez que Quílez y col. (1996b) no detectaron ooquistes en lechones lactantes ni adultos, sino que los mayores grados de infección los observaron en los destetados. Varios estudios demostraron que en forma natural, la criptosporidiosis no se produce hasta después del destete, con infecciones mayormente asintomáticas y usualmente de baja intensidad sin asociación estadística entre infección y síntomas clínicos (De Graaf y col., 1999). Existe además una variación de presentación en la diferentes etapas productivas en función de la especie y genotipo de criptosporidios actuantes (Yin y col., 2013). A pesar de ello, Nguyen y col. (2012) describieron que los lechones en predestete fueron los de más alto riesgo de infección, seguidos por los lechones del pos destete.

Además siempre se supone que la falta de infección en las cerdas adultas podría descartarlas como implicadas en algún rol en la epidemiología de la enfermedad en la maternidad. Esto contrasta con lo sugerido por Quílez y col. (1996-b) y Nguyen y col. (2012) en donde se implica directamente a las cerdas como fuente de infección para los

lechones, pero sugiriendo que no tienen un rol importante, ya que el número de cerdos maduros eliminando ooquistes fue muy bajo.

Vitovec y col. (2006) en República Checa en un estudio que involucró 4338 muestras fecales (135 de cerdas, 3368 de lechones pre destete y 835 de lechones post destete) reportaron una prevalencia del 5,7% en lechones predestete, mientras que en los destetados fue bastante superior, alcanzando niveles del 24,1% de prevalencia. Algo similar fue descripto por Wang y col. (2010) en donde la mas alta tasa de infección (20,6%) la encontraron después del destete en animales de entre 1 a 2 meses de edad y la mas baja entre los 3 y los 6 meses de edad.

Si bien en éste trabajo no se muestrearon animales lactantes hasta el destete, en concordancia con estos autores, podemos afirmar que la infección por *Cryptosporidium* spp. en cerdos es muy prevalente en las categorías jóvenes destetados, al menos de 8 semanas de edad. De acuerdo a nuestros hallazgos, la prevalencia va disminuyendo en la medida que los animales aumentan la edad. Encontramos una prevalencia de 22,2% (49/220) en animales de 8 semanas de edad de los 220 animales muestreados en esa categoría, muy similar a la prevalencia descripta por Vitovec y col. (2006) (Figura Nº 9). Es de destacar que este mismo autor, cuatro años antes había reportado no encontrar diferencias en ubicación y grado de infección criptosporidial entre lechones infectados experimentalmente ya sea, privados de calostro como alimentados con calostro, concluyendo en ese entonces que el calostro de las madres no parecía proteger a los lechones contra la infección de *Cryptosporidium* spp. (Vitovec y Koudela, 2002). Posiblemente, factores inmunes innatos o adquiridos en la leche de la madre podrían proteger a los lechones en la maternidad del desarrollo de las infecciones (Quílez y col., 1996b; Guselle y col., 2003; Zhang y col., 2013).

Según De Graaf y col. (1999), la presencia de la enfermedad se describe entre la primera y segunda semana de vida. Otros investigadores determinaron que la infección, predominantemente se dio en lechones destetados. A pesar de ello, estos hallazgos pueden relacionarse con el efecto de la inmunidad, y la discusión en la literatura sigue abierta (Zhang y col., 2013).

El hecho que diversos estudios informen tasas de infección cercanas al 100% en el momento inmediato al destete, sugiere que *Cryptosporidium* es fácilmente transmitido entre los lechones. La transmisión, probablemente haya sido una resultante de los lechones susceptibles, que se ponían en contacto con materia fecal de lechones infectados en el momento en que los animales se mezclaban en los lotes de destete. Si bien, a medida que los animales avanzan en edad las prevalencias van disminuyendo, algunos estudios (Xiao y col., 2006) aseguran que las infecciones tempranas en los lechones, pueden persistir en cerdos mayores, o que los cerdos mayores pueden reinfectarse con la misma especie de *Cryptosporidium*.

Una posible explicación para la mayor incidencia de infecciones encontradas en los destetes podría ser que el estrés que causa. Se produce una depresión inmunitaria, que podría hacerlo mas susceptible a la infección por *Cryptosporidium* spp. Hamnes y col. (2007) sugirieron la posibilidad del efecto inmunosupresor que éstas prácticas podrían tener.

CARACTERÍSTICAS DE LA MATERIA FECAL: CONSISTENCIA Y COLOR

Otro aspecto para discutir es la característica tanto de consistencia como de color de la materia fecal de la población estudiada. En la Tabla 7 y en la Tabla 8 vimos los detalles de estas características tanto de todos los animales muestreados como el de los negativos.

En estas tabla pudimos apreciar que la consistencia más frecuente de observar, incluso en todas las edades evaluadas, es la consistencia pastosa. Mientras que el color mas frecuente está entre el amarronado y el gris.

En la Tabla 9 se mostró en detalle las características tanto de consistencia como color de los animales muestreados que resultaron positivos. Vimos que los animales que tuvieron materia fecal cremosa y líquida representaron el 89% del total de positivos. Mientras que el color que prevaleció fue el amarillento y el amarronado.

Si bien la coloración de la materia fecal es un aspecto que se encuentra muy influenciado por varios factores como alimentación, edad, e incluso la presencia de otros agentes biológicos, la bibliografía consultada no describe claramente el color de la materia fecal ante la presencia de *Cryptosporidium* spp. Particularmente Fayer (1997) hace una referencia al color amarillo, como una característica de especial presentación en los animales hallados con criptosporidiosis, coincidiendo esta descripción con nuestros hallazgos en las categorías menores (8 semanas de edad). Con estas observaciones podríamos arriesgar a aseverar que los animales con materia fecal cremosa y amarillenta tienen altas probabilidades de ser positivas a *Cryptosporidium*, entre otros agentes posibles.

En cuanto a la consistencia, si bien es difícil establecer cuales de las consistencias señaladas anteriormente la llamamos diarrea, el sentido común haría referencia a la materia fecal líquida. Al respecto, existen varias definiciones. Algunas hacen referencia a la frecuencia de deposiciones, otras al volumen, pero la mayoría tienen como común denominador a la disminución de la consistencia, refiriéndolas como heces líquidas o "sueltas" (Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU; Rodés y col., 2002).

El vocablo "diarrea" deriva del griego antigüo "*diarrhoia*" que significa "a través" o "corriente de flujo". Es una alteración de las heces en cuanto a volumen, frecuencia, pero

sobre todo, fluidez en comparación con las condiciones fisiológicas (Rodés y col., 2002). En nuestro caso, podemos decir que el 35% de los animales positivos presentó la materia fecal diarreica, ya que allí se encasillaron los animales con materia fecal líquida (IC=23,40-47,02), pero, lo que sí es muy importante remarcar es que el 89% de los animales positivos, mostró una clara tendencia a disminuir la consistencia de la materia fecal (consistencias cremosas y líquidas).

Con respecto a este aspecto, sobre *Cryptosporidium* y su relación con la presencia o no de diarrea, la bibliografía es muy dispar en sus hallazgos. Como consecuencia, no ha sido posible determinar adecuadamente la contribución de *Cryptosporidium* a la diarrea en los cerdos (Ryan y col., 2003).

La infección inducida experimentalmente puede producir signos clínicos, pero la infección natural en muchos casos es asintomática. En Canadá desde 1981 a 1985, 5,3% de 3491 cerdos pertenecientes a 133 granjas para diagnóstico histológico fueron positivos. De estos animales infectados el 26% tuvo diarrea (hecho que es muy coincidente con nuestros hallazgos) pero la mayoría albergaba otro agente primario productor de diarrea además de *Cryptosporidium*. En un predio de remate en California, sobre un período de tres meses se encontró que el 5% de 200 cerdos estaban infectados con *Cryptosporidium*. De estos, 7 parecían saludables y 3 tuvieron diarrea. Ningún otro patógeno ni viral ni bacteriano se detectó en estos animales así que la infección mixta fue desechada (Casemore y col., 1997).

En Trinidad y Tobago 19,6% (54 de 275) de los lechones muestreados estaban infectados con *Cryptosporidium* de los cuales aproximadamente el 50% presentaba diarrea (Casemore y col., 1997). Otro estudio de similares características también llevado a cabo en éste país, *Cryptosporidium* fue más frecuentemente detectado en cerdos diarreicos (21,1 %) que en cerdos no diarreicos (17,3 %), pero las diferencias no fueron

significativas. Estudios previos habían mostrado que *Cryptosporidium* es una causa de diarrea en cerdos neonatos experimentalmente infectados en la primera semana de edad pero no en lechones mayores de 15 días (Quílez y col., 1996b).Sobre dos granjas porcinas en Ohio, infecciones leves estuvieron confinadas a la maternidad y destete. La infección por *C. parvum* en cerdos aparece como común y tiene potencial como contaminante ambiental, pero las infecciones pueden no demostrarse debido a su naturaleza asintomática (Casemore y col., 1997).

La infección en cerdos está asociada generalmente a infecciones subclínicas sin asociación estadística entre la infección y los síntomas clínicos (Quílez y col., 1996b) y podría decirse que no es una causa seria de enteritis ya sea en neonatos como en el post destete. Esta ausencia de signología clínica evidente en la mayoría de las infecciones sugeriría una adaptación al huésped porcino. Sin embargo, un estudio en lechones lactantes naturalmente infectados han mostrado una prevalencia significativamente mayor entre los lechones diarreicos que entre los lechones con consistencia fecal normal (Suarez-Luengas y col., 2007).

Algunos reportes demostraron que no hubo asociación entre la ocurrencia de diarrea y la eliminación de ooquistes en cerdos (Guselle y col., 2003). Particularmente Vitovec y col. (2006) reportaron no haber encontrado correlación entre infección por *Cryptosporidium* y diarrea. En España, en un estudio de prevalencia en granjas porcinas observaron que la tasa de infección fue mayor en los no diarreicos que en los diarreicos (Quílez y col., 1996b).

En Noruega, Hamnes y otros (2007) en un estudio que involucró muestras de 639 lechones, encontraron que 171 muestras (26,8 %) fueron diarreicas, mientras que 468 muestras fueron de consistencia normal. De las muestras diarreicas, sólo 20 (11,7 %) fueron positivas a *Cryptosporidium*. De las muestras con consistencia normal, 30 (6,4 %)

fueron positivas a *Cryptosporidium*. Es decir, había una prevalencia significativamente mayor entre las muestras diarreicas que entre aquellas que presentaron consistencia normal. Los resultados de este estudio sugieren que hay una asociación entre diarrea y *Cryptosporidium* en lechones de maternidad en contraste a otros estudios en los que se afirma que *Cryptosporidium* spp. está relegado hasta después del destete (De Graaf y col., 1999; Zhang y col., 2013).

En el presente estudio, si bien no se buscaron otros patógenos, muchos autores afirman que cuando hay diarrea, existen otros enteropatógenos asociados a *Cryptosporidium* spp. En general, toda vez que hubo diarrea, se encontró asociación con otros enteropatógenos (Guselle y col., 2003).

Bilkey y col. (1995) encontraron en una unidad de producción porcina de Hungría, que tanto *Giradia* y *Cryptosporidium* parecen ser patógenos sólo en casos de infecciones concurrentes con *Brachyspyra hyodysenteriae* y *Lawsonia intracellularis*.

Otros estudios, tanto en establecimientos al aire libre como confinados confirmaron que la diarrea en lechones lactantes y destetados es usualmente un problema multifactorial donde infecciones mixtas entre *C. parvum* y *E. coli* o *Rotavirus* son frecuentes y que la presencia de otros patógenos podría realzar el desarrollo de criptosporidiosis clínica (Rossanigo y col., 1987; Quílez y col., 1996b; De Graff y col., 1999; Enemark y col., 2003-b).

Han y col. (1995) confirmaron estos hechos en un estudio en el cual grupos de lechones de 10 días de edad se les administraron *C. parvum*, *Rotavirus porcino* y ambos patógenos juntos. De acuerdo a estos resultados la diarrea fue más severa, el recuento de ooquistes más alto y las lesiones intestinales más pronunciadas en lechones con ambos patógenos, sugiriendo un efecto aditivo o sinérgico entre ambos patógenos. También sugiere que la virulencia de rotavirus en ausencia de otros patógenos puede llegar a ser

despreciable en lechones incluso aquellos infectados a muy temprana edad. Esto podría sugerir a *Cryptosporidium* como un importante copatógeno de etiología multifactorial. Aunque el parásito frecuentemente actúa solo, las pérdidas más pronunciadas se dan cuando enteropatógenos concurrentes están presentes (De Graaf y col., 1999; Guselle y col., 2003; Hamnes y col., 2007).

FRECUENCIA DE PRESENTACIÓN DE ANIMALES POSITIVOS Y SU RELACIÓN CON EL TIPO DE PISO UTILIZADO

En lo que respecta a los sistemas productivos, si bien este estudio se dirigió a sistemas intesivos confinados, existe mucha variabilidad en el diseño de las instalaciones, sobre todo en los diferentes tipos de piso utilizados para alojar a las distintas categorías de animales (Figura Nº 10, Figura Nº 11, Figura Nº 12, Figura Nº 13 y Figura Nº 14). Tal es así, que en los tres establecimientos que resultaron negativos, las subpoblaciones muestreadas, sobre todo las categorías de 8 semanas de edad (y en algunos casos los de 15 semanas de edad) se encontraban alojadas sobre pisos totalmente enrejillados y parcialmente enrejillados (entre 30%-50% de la superficie) (Tabla 6). Uno de estos establecimientos que resultó negativo, alojaba a la categoría de 15 semanas de edad sobre piso totalmente enrejillado, y adicionalmente en este mismo establecimiento, se implementaban medidas de higiene estrictas, ya que se encontraba en proceso de ser declarado libre de otra enfermedad. Estos hechos, sin duda, han sido muy influyentes en la negatividad encontrada en este establecimiento en relación a *Cryptosporidium*. La observación general fue que en la categoría de 8 semanas de edad, el 80% de los establecimientos que tienen pisos parcialmente enrejillados tienen 30% o más en cuanto a frecuencia de presentación del agente. Mientras que en la categoría de 15 semanas de edad, el 57% de los establecimientos que resultaron negativos a ésta categoría, tenían pisos enrejillados completos. Al respecto, Guselle y col. (2003) reportaron que granjas porcinas con buenas prácticas de manejo y buena higiene pueden reducir la

contaminación ambiental y de este modo retrasar las infecciones por *Cryptosporidium*. Por otro lado, tal como lo comentan Xiao y col. (1994), Ryan y col. (2003), Maddox-Hyttel y col. (2006) y Hammes y col. (2007) en sus trabajos, cuando el piso era sólido (cemento y/o concreto) se registraron los niveles mas altos de número de ooquistes eliminados por materia fecal. Estos mismos autores, observaron que disminuían con piso parcialmente o totalmente enrejillado.

Un trabajo interesante es el de Fayer y col. (1997) en donde en un muestreo realizado en California, 5% de 200 cerdos estaban eliminando ooquistes. En una granja de Ohio, no se encontraron ooquistes en 20 lechones de maternidad ni en sus madres pero 8 de 30 destetados excretaban ooquistes. En una segunda granja 7 de 24 lechones de maternidad y 6 de 32 destetes, pero no así sus madres, excretaban ooquistes. La primer granja mantenía a los animales sobre piso enrejillado, mientras que la segunda granja lo hacía sobre piso sólido de concreto poroso. Sin duda, esto tiene una relación directa con el grado de exposición a los ooquistes infectivos presentes en la materia fecal de algunos animales. En definitiva, el tipo de piso y la higiene cobran gran relevancia (Nguyen y col., 2012) ya que es sabido que el piso enrejillado deja pasar permanentemente la materia fecal evitándo su acumulación y en muchas granjas, a su vez, es lavada a diario. No obstante esto algunos de los establecimientos que resultaron positivos, también utilizan el mismo tipo de piso que los que resultaron negativos. Cabe destacar que el establecimiento que resultó con la presentación más alta de los 22 establecimientos relevados (26,66% de prevalencia) (Tabla 6-Establecimiento 4), particularmente presentaba serias deficiencias de higiene de las pistas de engorde, y los pisos de algunas de las categorías relevadas eran sólidos (cemento), y en algunos casos estaban anegados con agua y materia fecal (Figura Nº 13 y Figura Nº 14).

NIVEL DE OOQUISTES ELIMINADOS Y SU RELACIÓN CON LA CONSISTENCIA DE LA MATERIA FECAL

En cuanto al nivel de excreción de ooquistes y su relación con la consistencia de la materia fecal, si analizamos la situación de todos los positivos en su conjunto (sin discriminar edad-Tabla 11), vemos claramente que la mayor cantidad de animales se corresponden con materia fecal cremosa y vemos una distribución muy equitativa de ellos por encima y por debajo de la mediana de ooquistes por gramo que eliminaban estos animales. Pero si observamos a los animales que presentaron materia fecal líquida, que representan el 35,2% (25/71) del total de animales positivos, hay casi un 100% más de animales con materia fecal líquida que está eliminando ooquistes por encima de la mediana de opg (17/25 versus 8/25).

Pero como se mencionó antes, el asunto está en determinar a qué llamamos materia fecal diarreica. De la clasificación que hicimos nosotros de materia fecales en pastosa, cremosa y líquida, si consideramos por ejemplo que materia fecal diarreica es solamente cuando es líquida, podemos decir, que el 35,2% (25/71) de los animales positivos presentaron este tipo de consistencia en sus materias fecales y que el 68% (17/25) de los animales que tenían este tipo de consistencia eliminaban mas de 550 opg (estaban por sobre la mediana) (Tabla 11).

Si consideramos diarrea, a la materia fecal que disminuye la consistencia a menor consistencia que la pastosa (que fue la que nos indicó, en nuestro caso, la materia fecal normal), significa que las materias fecales cremosas y líquidas podrían considerarse diarreicas. Por lo que el 89% (63/71) de los animales positivos tendrían materia fecal diarreica y además el 49% (35/71) eliminan por sobre la mediana de 550 ooquistes por gramo de materia fecal (Tabla 11).

Ahora, si vemos los animales positivos pero de 8 semanas de edad (Tabla 12) y analizamos que asociación hay con el nivel de excreción de ooquistes y la consistencia de

la materia fecal, vemos que se agudiza mas aún, la tendencia a disminuir la consistencia de la materia fecal y los animales que se encuentran por encima de la mediana de opg. De los 49 animales positivos de 8 semanas de edad, vemos que el 92% (45/49) de los animales se distribuyeron entre las materias fecales cremosas y líquidas (menor consistencia que la pastosa, que habíamos definido como normal), y de ellos, el 67% (30/45) está eliminando mas de 550 opg.

En el caso de los animales positivos de 15 semanas de edad (Tabla 13), son sólo 22 animales, igualmente el mayor porcentaje de animales se distribuye entre las materias fecales cremosas y líquidas, representando el 86% (19/22), teniendo una mayor prevalencia la materia fecal cremosa con el 59% (13/22) de presentación. Aunque en este caso hubo mas animales que eliminaban ooquistes por debajo de la mediana de opg. Aquí, pudo jugar un rol importante, factores inmunológicos, que hagan disminuir la cantidad de ooquistes por gramo de materia fecal eliminados por estos animales que resultaron positivos, a diferencia de los animales de 8 semanas de edad donde vemos que el 92% de los animales que presentaron diarrea, el 46% estaban eliminando ooquistes por encima de la mediana de opg.

Al respecto Singh B. y col. (2006) en un estudio hecho en terneros de tambo, demostró que los terneros positivos a *Cryptosporidium* spp. que presentaban diarrea eran particularmente los que más tasa de eliminación de ooquistes por gramo de materia fecal tenían, demostrando una asociación positiva de estos hechos. Si bien en la bibliografía consultada no hay antecedentes que estos hallazgos hayan sido demostrados en cerdos, en nuestro trabajo hay indicadores de que algo similar podría estar sucediendo.

CONCLUSIONES

-*Cryptosporidium* spp. es un agente con alta frecuencia de presentación en granjas porcinas intensivas de la República Argentina.

-Si bien no se midió su presencia en animales previo al destete, podemos afirmar que tiene una alta frecuencia de presentación en animales de 8 semanas de edad y de 15 semanas de edad (aunque en menor medida). Parece no ser un patógeno presente en categorías de 22 semanas de edad y mayores.

-La materia fecal de animales con infección por *Cryptosporidium* spp. la podemos caracterizar como de color amarronada (hasta amarillenta) y consistencia cremosa (hasta líquida).

-El 89% de los animales que resultaron positivos mostró una clara disminución en la consistencia de sus materias fecales (materias fecales desde cremosas a líquidas).

-Existe una relación directa entre el nivel de eliminación de ooquistes por gramo de materia fecal y la consistencia cremosa y/o líquida de la materia fecal.

-Existiría una probable asociación entre el tipo de piso (enrejilladototal/enrejillado parcial/sólido) y el nivel de presentación de diarreas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbassi H., Wyers M, Cabaret J., Naciri M. 2000. Rapid detection and quantification of *Cryptosporidium baileyi* oocystsin feces and organs of chickens using a microscopic slide flotation method. Parasitol Res 86:179-187

2. Abe N., Iseki M. 2003. Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from ferrets in Japan. Parasitology Research vol. 89, nr. 5, p. 422-424.

3. Abe N., Sawano Y., Yamada K., Kimata I., Iseki M. 2002. *Cryptosporidium* infection in dogs in Osaka, Japan. Vet. Parasitol. 108:185–193.

4. Adjei A., Armah H., Rodrigues O., Renner L., Borketey P., Ayeh-Kumi P., Adiku T,, Sifa E., Lartey M. 2004. *Cryptosporidium* spp., a frecuent cause of diarrea among children at the Korle-Bu teaching hospital, Accra, Ghana. Jpn. J. Infect. Dis. 57:216-219.

5. Aguirre J., Petruccelli M., Armocida A., Moredo F., Risso M., Venturini L., Idiart J., Perfumo C. 2000. Diarrea en lechones lactantes y posdestete de cuatro criaderos intensivos de la provincia de Buenos Aires, Argentina: identificación e índice de detección de partículas virales en materia fecal por microscopía electrónica. Analecta Veterinaria 20, 2:16-21.

6. Akiyoshi D., Mor S., Tzipori S. 2003. Rapid Displacement of *Cryptosporidium parvum* Type I by Type 2 in mixed infections in piglets. Infection and Immunity Oct., p. 5765–5771.

7. Allen A., Ridley D. 1970. Further observations on the formol-ether concentration technique for faecal parasites. J. Clin. Pathol. 23: 545-546.

8. Anderson B. 1986. Effect of drying on the infectivity of cryptosporidialaden calf feces for 3 to 7-day old mice. Am J Vet Res 47:2272-2273.

9. Andrew Thompson R. 2002. Presidential address: rediscovering parasites using molecular tools towards revising the taxonomy of *Echinococcus, Giardia* and *Cryptosporidium*. Int J for Parasitology 32:493–496.

10. Argenzio R., Armstrong M., Rhoads J. 1996. Role of the enteric nervous system in piglet cryptosporidiosis. J Pharmacol Exp Ther. Dec 279(3):1109-15.

11. Argenzio R., Lecce A., Powell D. 1993. Prostanoids inhibit intestinal NaCl absorption in experimental porcine cryptosporidiosis. Gastroenterology 104:440–447.

12. Argenzio R., Liacos J., Levy M., Meuten D., Lecce J., Powell D. 1990. Villous atrophy, crypt hyperplasia, cellular., infiltration, and impaired glucose-Na absorption in enteric cryptosporidiosis of pigs. Gastroenterology May 98(5 Pt 1):1129-40.

13. Arnault I., Reperant J., Naciri M. 1994. Humoral antibody response and oocyst shedding after experimental infection of histocompatible newborn and weaned piglets with *Cryptosporidium parvum*. Vet Res. 25(4):371-83.

14. Arrowood M. 1997. Diagnosis en *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Ed. Ronald Fayer. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida. Pp. 43-64.

15. Atwill E., Sweitzer R., Grac M., Pereira A., Gardner I., Van Vuren D., Boyce W. 1997. Prevalence of and associated risk factors for shedding *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia* cysts within feral pig populations in California. Applied and Environmental Microbiology, Oct., p. 3946–3949.

16. Barta J., Andrew Thompson R. 2006. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. Trends Parasitol. Oct; 22(10):463-8. Epub 2006 Aug 14.

17. Baumgartner A., Marder H., Munzinger J., Siegrist H. 2000. Frequency of *Cryptosporidium* spp. as cause of human gastrointestinal disease in Switzerland and possible sources of infection. Schweiz Med Wochenschr 130:1252–1258.

18. Becher K., Robertson I., Fraser D., Palmer D., Thompson R. 2004. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in western Australia. Vet. Parasitol. 123:1–9.

19. Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU. Definicion de "diarrea". Disponible en http://www.nlm.nih.gov/

20. Bilic H., Bilkei G. 2006. *Balantidium, Cryptosporidium* and *Giardia* species infections in indoor and outdoor pig production units in Croatian. Vet. Rec. 158:61.

21. Bilkei G., Biro O., Bölcskei A., Clavadetscher E., Orban P., Waller C. 1995. Practice related management strategies on post-weaning *E. coli* problems in the intensive pig production. Proc. 8th. in between Symposium of the international Society for Animal Hygiene. In Hungarian Veterinary Journal 10:776-777.

22. Biswas K., Craik S., Smith D., Belosevic M. 2005. Synergistic inactivation of *Cryptosporidium parvum* using ozone followed by monochloramine in two natural waters. Water Res. Sep;39(14):3167-3176.

23. Blagburn B., Soave R. 1997. Prophylaxis and chemotherapy: human and animal. in *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Ed. Ronald Fayer. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida. Pp. 111-128.

24. Boxell A., Hijjawi N., Monis P., Ryan U. 2008. Comparison of various staining methods for the detection of *Cryptosporidium* in cell-free culture. Experimental Parasitology 120:67–72.

25. Brooks W. 2005. *Cryptosporidium*: a particularly nasty type of coccidia. Veterinary Partner.com. http://www.veterinarypartner.com/Content.plx?P=A&C=15&A=1927&S=0

26. Budu-Amoako E., Greenwood S., Dixond B., Barkema H., Hurnik D., Estey C., McClure J. 2012. Occurrence of Giardia and *Cryptosporidium* in pigs on Prince Edward Island, Canada. Vet. Par 184:18–24.

27. Bukhari Z., Marshall M., Korich D., Fricker C., Smith H., Rosen J., Clancy J. 2000. Comparison of *Cryptosporidium parvum* viability and infectivity assays following ozone treatment of oocysts. Appl. Environ. Microbiol. 66:2972–2980.

28. Bull S., Chalmers R., Sturdee A., Curray A., Kennaugh J. 1998. Cross-reaction of an anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody with sporocysts of *Monocystis* species. Vet. Parasitol. 77:195–197.

29. Cacció S., Andrew Thompson R., McLauchlin J. Smith H. 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. Trends in Parasitology Vol.21 No.9.

30. Carreño R., Martin D., Barta J. 1999. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. Parasitol. Res. 85:899–904.

31. Casemore D., Wright S., Coop R. 1997. Cryptosporidiosis: Human and animal epidemiology en *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Ed. Ronald Fayer. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida. Pp. 65-92.

32. Castro-Hermida J., Pors I., Méndez-Hermida F., Ares-Mazas E., Chartier C. 2006. Evaluation of two commercial disinfectants on the viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. The Veterinary Journal 171:340–345.

33. Chalmers R., Katzer F. 2013. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. Trends in Parasitology, May, Vol. 29, No. 5.

34. Chen F., Huang K. 2007. Prevalence and Phylogenetic Analysis of *Cryptosporidium* in Pigs in Eastern China. Zoonoses Public Health. 54: 393–400.

35. Chen Z., Mi R., Yu H., Shi Y., Huang Y., Chen Y., Zhou P., Cai Y., Lin J. 2011. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in pigs in Shanghai, China. Vet. Parasitol. 181:113–119.

36. Current W.L., Garcia L.S. Cryptosporidiosis. Clinc Microbiol Rev 1991;4:325-58.

37. Da Silva C.,C. de Freitas J., Müller E. 1994. El diagnóstico de *E. coli, Rotavirus* y *Cryptosporidium* en un caso de diarrea. II Congreso Nacional de Producción Porcina. VIII Jornadas de Actualización Porcina. P. S18. Rosario. Argentina.

38. Darnault C., Steenhuis T., Garnier P., Kim Y., Jenkins M., Ghiorse W., Baveye P., Parlange J. 2004. Preferential flow and transport of *Cryptosporidium parvum* oocysts through the vadose zone: Experiments and modeling. Vadose Zone Journal 3:262–270.

39. Davies C., Kaucner C., Deere D., Ashbolt N. 2003. Recovery and enumeration of *Cryptosporidium parvum* from animal fecal matrices. Applied and Environmental Microbiology p. 2842–2847.

40. De Graaf D., Vanopdenbosch E., Ortega-Mora L., Abbassi H., Peeters J. 1999. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. Int. J. Parasitol. 29(8):1269-87.

41. Dillingham R., Lima A., Guerrant A. 2002. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. Microbes and Infection 4:1059-1066.

42. Duffy G. 1999. *Cryptosporidium parvum*: an emerging pathogen in the water and food industry. Teagasc, the national food centre, dunsinea, castleknock, dublin 15. The society of food hygiene technology. Disponible en: http://www.sofht.co.uk/isfht/irish_99_parvum.htm

43. Ebeid M., Mathis A., Pospischil A., Deplazes P. 2003. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* genotype I in conventionally reared piglets and lambs. Parasitol. Res. Jun;90(3):232-235.

44. Egyed Z., Sréter T., Széll Z., Varga I. 2003. Characterization of *Cryptosporidium* spp.—recent developments and future needs. Veterinary Parasitology 111:103–114.

45. Enemark H., Ahrens P., Bille-Hansen V., Heegaard P., Vigre H., Thamsborg S., Lind P. 2003a. *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the porcine genotype. Parasitology. May;126(Pt 5):407-16.

46. Enemark H., Bille-Hansen V., Lind P., Heegaard P., Vigre H., Ahrens P., Thamsborg S. 2003b. Pathogenicity of *Cryptosporidium parvum*. Evaluation of an animal infection model. Vet. Parasitol. 113:35-57.

47. Fayer R. 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. Vet. Parasitol. 126:37–56.

48. Fayer R. 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. Exp. Par. 124: 90–97.

49. Fayer R., Morgan U., Upton S. 2000b. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. International Journal for Parasitology 30:1305-1322.

50. Fayer R., Speer C., Dubey J. 1997. The general biology of *Cryptosporidium* in *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Ed. Ronald Fayer. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida. Pp. 1-41.

51. Fayer R., Trout J., Graczyk T., Lewis E. 2000a. Prevalence of *Cryptosporidium, Giardia* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on three Maryland farms. Vet. Parasitol. 93:103–112.

52. Fayer R., Trout J., Jenkins M. 1998. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. J Parasitol 84:1165-1169.

53. Fleta J., Sanchez-Acedo C., Clavel A., Quílez J. 1995. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extra-intestinal tissues of sheep and pigs. Vet Parasitol. Oct;59(3-4):201-205.

54. Forslund A., Markussen B., Toenner-Klank L., Bech T., Jacobsen O., Dalsgaard A. 2011. Leaching of *Cryptosporidium parvum* Oocysts, Escherichia coli, and a Salmonella enterica serovar Typhimurium bacteriophage through intact soil cores following surface application and injection of slurry. Applied and Environmental Microbiology, Nov., p. 8129–8138.

55. Galván A., Magnet A., Izquierdo F., Fernández Vadillo C., Peralta R., Angulo S., Fenoy S., del Aguila C. 2014. A year-long study of *Cryptosporidium* species and subtypes in recreational, drinking and wastewater from the central area of Spain. Science of the Total Environment 468–469. 368–375.

56. García-Presedo I., Pedraza-Díaz S., González-Warleta M., Mezo M., Gómez-Bautista M., Ortega-Mora L., Castro-Hermida J. 2013. Presence of *Cryptosporidium scrofarum*, C. suis and C. parvum subtypes IIaA16G2R1 and IIaA13G1R1 in Eurasian wild boars (Sus scrofa). Vet. Parasitol. 196:497-502.

57. Gasser R., O'Donoghue P.,. 1999. Isolation, propagation and characterisation of *Cryptosporidium*. International Journal for Parasitology 29:1379-1413.

58. Girouard D., Gallant J., Akiyoshi D., Nunnari J., Tzipori S. 2006. Failure to propagate *Cryptosporidium* spp. in cell-free culture. Journal of Parasitology 92:399–400.

59. GITEP-Grupo de Intercambio Tecnológico de Explotaciones Porcinas. 2003. Anuario del sector porcino. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, Argentina.

60. Goodgame R. 1996. Understanding intestinal spore-forming protozoa: cryptosporidia, microsporidia, isospora, and cyclospora. Ann Intern Med, Feb 15; 124 (4): 429-41.

61. Gookin J., Allen J., Chiang S., Duckett L., Armstrong M. 2005. Local peroxynitrite formation contributes to early control of *Cryptosporidium parvum* infection. Infection and Immunity, July p. 3929–3936.

62. Gookin J., Chiang S., Allen J., Armstrong M., Stauffer S., Finnegan C., Murtaugh M. 2006. NF-B-mediated expression of iNOS promotes epithelial defense against infection by *Cryptosporidium parvum* in neonatal piglets. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 290:G164–G174.

63. Gookin J., Duckett L., Armstrong M., Stauffer S., Finnegan C., Murtaugh M., Argenzio R. 2004. Nitric oxide synthase stimulates prostaglandin synthesis and barrier function in C. parvum-infected porcine ileum. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 287:G571–G581.

64. Gookin J., Nordone S., Perryman L., Argenzio R. 2002b. Lymphocytes mediate IFN_-independent ileal enterocyte iNOS expression in murine cryptosporidiosis (Abstract). Gastroenterology 122:A531.

65. Gookin J., Rhoads J., Argenzio R. 2002a. Inducible nitric oxide synthase mediates early epithelial repair of porcine ileum. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 283:G157–G168.

66. Gow S., Waldner C. 2006. An examination of the prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in cows and calves from western Canadian cow–calf herds. Vet. Parasitol. 137:50–61.

67. Graczyk T., Fayer R., Cranfield M. 1997. Zoonotic transmission of *Cryptosporidium parvum*: implications for water, borne cryptosporidiosis. Parasitology Today vol 13. no. 9.

68. Guan T., Holley R. 2003. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness—A review. J. Environ. Qual. 32:383–392.

69. Guselle N., Appelbee A., Olson M. 2003. Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs: from weaning to market. Vet Parasitol 113:7-18.

70. Hamnes I., Gjerde B., Forberg T., Robertson L. 2007. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in suckling piglets in Norway. Vet Parasitol. Mar 31:144 (3-4):222-233.

71. Han D., Kang U., Park N., Wee S. 1995. Pathogenesis of enteritis induced by *Cryptosporidium parvum* alone and combined with porcine rotavirus in piglets. Korean J. Vet. Res. 35:149-158.

72. Hannahs G. 1999. *Cryptosporidium parvum*: an emerging pathogen. Kenyon College. Disponible en: http://biology.kenyon.edu/slonc/bio38/hannahs/crypto.htm

73. Heine J. 1982. A simple technic for the demonstration of cryptosporidia in feces *Cryptospridium* infections in domestic animals. Zentralbl Veterinarmed B. May;29(4):324-327.

74. Heitman, T., Frederick L., Viste L., Guselle N., Morgan U., Thompson R., Olson M. 2002. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. Canadian Journal of Microbiology, Volume 48, N° 6, pp. 530-541(12).

75. Helmy Y., Krücken J., Nöckler K., Von Samson-Himmelstjern G., Zessin K. 2013. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in livestock animals and humans in the Ismailia province of Egypt. Veterinary Parasitology 193:15–24.

76. Henriksen S., Pohlenz J. 1981. Staining of criptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. Acta Vet. Scand. 22:594-596.

77. Hijjawi N., Meloni B., Morgan U., Thompson R. 2001. Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. Int. J. 31:1048–55.

78. Hijjawi N., Meloni B., Nganzo M., Ryan U., Olson M., Cox P., Monis P., Thompson R. 2004. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. International Journal for Parasitology 34:769–777.

79. Hijjawi N., Meloni B., Ryan U., Olson M., Thompson R. 2002. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. International Journal for Parasitology 32:1719–1726.

80. Hunt E., Fu Q., Armstrong M., Rennix D., Webster D., Galanko J., Chen W., Weaver E., Argenzio R., Rhoads J. 2002. Oral bovine serum concentrate improves cryptosporidial enteritis in calves. Pediatric Research, Vol. 51, No. 3.

81. Hunter P., Thompson R. 2005. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. International Journal for Parasitology 35:1181–1190.

82. Izumiyama S., Furukawa I., Kuroki T., Yamai S., Sugiyama H., Yagita K., Endo T. 2001. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infections in weaned piglets and fattening porkers in Kanagawa Prefecture, Japan. Jpn. J. Infect. Dis. Feb;54(1):23-6.

83. Jellison K., Hemond H., Schauer D. 2002. Sources and species of *Cryptosporidium* oocysts in the wachusett reservoir watershed. Applied and Environmental Microbiology, Feb., p. 569–575.

84. Jenikova M., Nemejc K., Sakc B., Kvetonova D., Kvác M. 2011. New view on the age-specificity of pig *Cryptosporidium* by species-specific primers for distinguishing *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II. Vet. Parasitol. 176:120–125.

85. Johnson J., Buddle R., Reid S., Armson A., Ryan U. 2008. Prevalence of *Cryptosporidium* genotypes in pre and post-weaned pigs in Australia. Experimental Parasitology 119:418–421.

86. Kaplan M. 2002. *Cryptosporidium*: Health Threat to Humans and Reptiles. Disponible en: http://www.veterinarypartner.com/Content.plx?P=A&S=0&C=0&A=1272.

87. Katsuda K., Kohmoto M., Kawashima K., Tsunemitsu H. 2006. Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. J Vet Diagn Invest. Jul;18(4):350-354.

88. Keusch G., Hamer D., Joe A., Kelley M., Griffiths J., Ward H. 1995. Cryptosporidia--who is at risk?. Schweiz Med Wochenschr, May 6; 125 (18): 899-908.

89. Koudela B., Vitovec J., Sterba J., Milacek P. 1989. An unusual localization of developmental stages of *Cryptosporidium parvum* Tyzzer, 1912 in the cells of small intestine of a gnotobiotic piglet. Folia Parasitol (Praha). 36(3):219-22.

90. Kuczynska E., Shelton D. 1999. Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures, and soils. Applied and Environmental Microbiology, July, p. 2820–2826.

91. Kuczynska E., Shelton D., Pachepsky Y. 2005. Effect of bovine manure on *Cryptosporidium parvum* oocyst attachment to soil. Appl. Environ. Microbiol. Oct;71(10):6394-6397.

92. Kvác M., Hanzlíková D., Sak B., Květoňová D. 2009b. Prevalence and age-related infection of *Cryptosporidium suis, C. Muris* and *Cryptosporidium pig* genotype II in pigs on a farm complex in the Czech Republic. Vet Parasitol. March. Volume 160, Issues 3-4, 23, pp. 319-322.

93. Kvác M., Kestranova M., Pinkova M., Květoňová M., Kalinova J., Wagnerová P., Kotkova M., Vitovec J., Ditrich O., McEvoy J., Stenger B., Sak B. 2013. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). Vet. Parasitol. 191:218–227.

94. Kvác M., Sak B., Hanzlíková D., Kotilová J., Květoňová D. 2009a. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs at slaughterhouses in South Bohemia, Czech Republic. Parasitol Res 104:425–428.

95. Langer R., Schaefer D., Riggs M. 2001. Characterization of an intestinal epithelial cell receptor recognized by the *Cryptosporidium parvum* sporozoite ligand CSL, Infect. Immun. 69:1661–1670.

96. Li X., Atwill E., Dunbar L., Jones T., Hook J., Tate K. 2005. Seasonal temperature fluctuations induces rapid inactivation of *Cryptosporidium parvum*. Environ Sci Technol. Jun 15;39(12):4484-9.

97. Lindsay D., Blagburn B. 1991. *Cryptosporidium parvum* infections of swine. The Comp Food Animal. May, vol.13, No 5.

98. Maddox-Hyttel C., Langkjær R., Enemark H., Vigre H. 2006. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs—Occurrence and management associated risk factors. Veterinary Parasitology 141:48–59.

99. Magi B., Canocchi V., Tordini G., Cellesi C., Barberi A. 2006. *Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques. Parasitol Res. Jan;98(2):150-152.

100. Marshall J., Thomas A., Marshall R., Robinson G. 2005. Comparison between the modified ziehl neelsen and fluorescent antibody tests for the detection of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in faeces. The 20 International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. 16-20 October 2005, Christchurch, New Zealand.

101. Mathison B., Ditrich O. 1999. The fate of *Cryptosporidium parvum* oocysts ingested by dung beetles and their possible role in the dissemination of cryptosporidiosis. J Parasitol. 85:678-681.

102. McDonald A., Mac Kenzie W., Addiss D., Gradus M., Linke G., Zembrowski E., Hurd M., Arrowood M., Lammie P., Priest J. 2001. *Cryptosporidium parvum*–specific antibody

responses among children residing in Milwaukee during the 1993 waterborne outbreak. The Journal of Infectious Diseases;183:1373–1379.

103. Mekaru S., Marks S., Felley A., Chouicha N., Kass P. 2007. Comparison of direct immunofluorescence, immunoassays, and fecal flotation for detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in naturally exposed cats in 4 Northern California animal shelters. J Vet Intern Med. Sep-Oct;21(5):959-965.

104. Mohammed H., Wade S., Schaaf S. 1999. Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in dairy cattle in southeastern New York State. Vet. Parasitol. 83:1–13.

105. Monis P., Thompson R. 2003. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction?. Infection, Genetics and Evolution 3:233–244.

106. Moon H., Woodmansee D. 1986. Cryptosporidiosis. National Animal Disease Center, Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, Ames, IA 50010.

107. Moon H., Woodmansee D., Harp J., Abel S., Ungar B. 1988. Lacteal immunity to enteric cryptosporidiosis in mice: immune dams do not protect their suckling. Infect Immun. Mar;56(3):649-653.

108. Moore D., Waters W., Wannemuehler M., Harp J. 2001. Treatment with agmatine inhibits *Cryptosporidium parvum* infection in infant mice. J Parasitol. Feb;87(1):211-213.

109. Moore J., Cherie Millar B., Lowery C., Dooley J., Xiao L. 2003. Research & *Cryptosporidium*: future challenges. Int. J. Parasitol. 38(11):1239-1255.

110. Moore R., Tzipori S., Griffiths J., Johnson K., De Montigny L., Lomakina I. 1995. Temporal changes in permeability and structure of piglet ileum after site-specific infection by *Cryptosporidium parvum*. Gastroenterology. Apr;108(4):1030-9.

111. Morgan U., Buddle J., Armson A., Elliot A., Thompson R. 1999a. Molecular and biological characterisation of *Cryptosporidium* in pigs. Aust Vet J Vol 77, No 1, January.

112. Morgan U., Xiao L., Fayer R., Lal A., Andrew Thompson R. 1999b. Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. International Journal for Parasitology 29:1733-1751.

113. Morgan U., Xiao L., Hill B., O'Donoghue P., Limor J., Lal A., Thompson R. 2001. Detection of the *Cryptosporidium parvum* 'human' genotype in a dugong (Dugong dugon). J. Parasitol. 86, 1352–1354.

114. Morgan-Ryan U., Fall A., Ward L., Hijawi N., Sulaiman I., Fayer R., Thompson R., Olson M., Lal A., Xiao L. 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo sapiens. J. Eukaryot. Microbiol. 49:433–440.

115. Nemejc K., Sak B., Kvetonova D., Hanzal V., Jeníková M., Kvác M. 2012. The first report on *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II in Eurasian wild boars (Sus scrofa) (Czech Republic). Vet. Parasitol. 184:122– 125.

116. Němejc K., Sak B., Květoňová D., Kernerová N., Rost M., Cama V., Kváč M. 2013. Occurrence of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* on commercial swine farms in the Czech Republic and its associations with age and husbandry practices. Parasitol Res. 112:1143–1154.

117. Nesterenko M., Woods K., Upton J. 1999. Receptor/ligand interactions between *Cryptosporidium parvum* and the surface of the host cell. Biochim Biophys Acta. Jul 7;1454(2):165-173.

118. Neumann N., Gyürek L., Finch G., Belosevic M. 2000. Intact *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated after in vitro excystation are infectious to neonatal mice. FEMS Microbiol. Lett. 183:331–336.

119. Neumayerova H., Koudela B. 2008. Effects of low and high temperatures on infectivity of *Cryptosporidium muris* oocysts suspended in water. Veterinary Parasitology 153:197–202.

120. Nguyen S., Fukuda Y., Tada C., Sato R., Huynh V., Nguyen D., Nakai Y. 2010. Molecular characterization of *Cryptosporidium* in pigs in central Vietnam. Parasitol Res 112:187–192.

121. Nguyen S., Honma H., Geurden T., Ikarash M., Fukuda Y., Huynh V., Nguyen D., Nakai Y. 2012. Prevalence and risk factors associated with *Cryptosporidium* oocysts shedding in pigs in Central Vietnam. Res. in Vet. Sc 93:848–852.

122. Noordeen F., Rajapakse R., Faizal A., Horadagoda N., Arulkanthan A. 2000. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in goats in selected locations in three agroclimatic zones of Sri Lanka. Vet. Parasitol. Nov. 10;93(2):95-101.

123. Núñez A., McNeilly F., Perea A., Sanchez-Cordón P., Huerta B., Allan G., Carrasco L. 2003. Coinfection by *Cryptosporidium parvum* and Porcine *Circovirus* Type 2 in weaned pigs. J. Vet. Med B 50, 255-258.

124. O'Handley R., Cockwill C., McAllister T., Jelinski M., Morck D., Olson M. 1999. Duration of naturally acquired giardiosis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. J. Am. Vet. Med. Assoc. 214, 391-396.

125. Okhuysen P., Chappell C. 2002. *Cryptosporidium* virulence determinants—are we there yet?. Int. J. Parasitol. 32:517–525.

126. Okhuysen P., Chappell C., Marshall M., Widmer G., Tzipori S. 2002. Infectivity of a *Cryptosporidium parvum* isolate of cervine origin for healthy adults and gamma interferon knockout mice. J. Infect. Dis. 185:1320–1325.

127. Olson M., Gho J., Phillips M., Guselle N., McAllister T. 1999. *Giardia* cyst and *Cryptosporidium* oocyst survival in water, soil and cattle feces. J. Environ. Qual. 28:1991-1996.

128. Olson M., Guselle N. 2000. Are Pig Parasites a Human Health Risk?. Advances in Pork Production. Volume 11, pg. 153.

129. Patel S., Pedraza-Díaz S., McLaughlin L. 1999. The identification of *Cryptosporidium* species and *Cryptosporidium parvum* directly from whole faeces by analysis of a multiplex PCR of the 18S rRNA gene and by PCR/RFLP of the *Cryptosporidium* outer wall protein (COWP) gene. International Journal for Parasitology. 29:1241-1247.

130. Pereira S., Ramirez J., Xiao L. 2002. Pathogenesis of Human and Bovine *Cryptosporidium parvum* in Gnotobiotic Pigs. The Journal of Infectious Diseases 186:715–718.

131. Pereira S., Ramirez N., Xiao L., Ward L. 2002. Pathogenesis of human and bovine *Cryptosporidium parvum* in gnotobiotic piglets. J. Infect. Dis. 186:715–718.

132. Perz J., Le Blancq S. 2001. *Cryptosporidium parvum* infection involving novel genotypes in wildlife from Lower New York State. Appl. Environ. Microbiol. 67:1154–1162.

133. Petry F., Harris J. 1999. Ultrastructure, fractionation and biochemical analysis of *Cryptosporidium parvum* sporozoites. Int. J. Parasitol. Aug;29(8):1249-1260.

134. Pieniazek N., Bornay-Llinares F., Slemenda S., da Silva A., Moura I., Arrowood M., Ditrich O., Addiss D. 1999. New *Cryptosporidium* Genotypes in HIV-Infected Persons. Emerging Infectious Diseases. May-June Vol. 5, No. 3.

135. Quílez J., Sánchez-Acedo C. Clavel A., del Cacho E., López-Bemad F. 1996a.Comparison of an acid-fast stain and a monoclonal antibody-based immunofluorescence reagent for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faecal specimens from cattle and pigs. Vet. Parasitol. 67:75-81.

136. Quílez J., Sánchez-Acedo C., Clavel A., del Cacho E., López-Bernard F. 1996b. Prevalence of *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragón (northeastern Spain). Vet. Parasitol. 67:83-88.

137. Quílez J., Vergara-Castiblanco C., Ares-Mazas M., Sanchez-Acedo C., del Cacho E., Freire-Santos F. 2002. Serum antibody response and *Cryptosporidium parvum* oocyst antigens recognized by sera from naturally infected sheep. Vet Parasitol. Mar 20;104(3):187-97.

138. Quintero-Betancourt W., Gennaccaro A., Scott T., Rose J. 2003. Assessment of Methods for Detection of Infectious *Cryptosporidium* Oocysts and Giardia Cysts in Reclaimed Effluents. Applied And Environmental Microbiology, Sept., p. 5380–5388.

139. Quiroz E., Bern C., MacArthur J., Xiao L., Fletcher M., Arrowood M., Shay D., Levy M., Glass R., Lal A. 2000. An outbreak of cryptosporidiosis linked to a foodhandler. J Infect Dis. Feb;181(2):695-700.

140. Reinoso R, Becares E., Smith H. 2007. Effect of various environmental factors on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. J Appl Microbiol. 170:620–628.

141. Riggs M. 1997. Immunolgy: Host response and development of passive immunotherapy and vaccines en *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Ed. Ronald Fayer. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida. Pp. 129-162.

142. Riggs M. 2002. Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response. Microbes and Infection 4, 1067-1080.

143. Riggs M., Stone A., Yount P., Langer R., Arrowood M., Bentley D. 1997. Protective monoclonal antibody defines a circumsporozoite-like glycoprotein exoantigen of *Cryptosporidium parvum* sporozoites and merozoites. J. Immunol. 158:1787–1795.

144. Rimhanen-Finne R. 2006. *Cryptosporidium* and *Giardia*: detection in environmental and faecal samples. Academic Dissertation, to be publicly discussed with the permission of the Faculty of Veterinary Medicine in the Small Hall, abianinkatu 33, on January 14, Helsinki, Finland.

145. Robinson G., Thomas A., Daniel R., Hadfield S., Elwin K., Chalmers R. 2006. Sample prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium andersoni* within a dairy herd in the United Kingdom. Vet Parasitol. Nov 30;142(1-2):163-7.

146. Rochelle P., Marshall M., Mead J., Johnson A., Korich D., Rosen J., De Leon R. 2002. Comparison of in vitro cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium parvum*. Appl. Environ. Microbiol. 68:3809–3817.

147. Rodés J., Carné X., Trilla A. 2002. (en español). Manual de terapéutica médica. Elsevier España. pp. 329. ISBN 8445811487.

148. Rodríguez J., Royo G. 2005. *Cryptosporidium* y criptosporidiosis. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario de Elche. Universidad Miguel Hernández. Elche (Alicante).

149. Roepstorff A. 2005. Pig production and parasites – the danish perspective. The 20 International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. 16-20 October 2005, Christchurch, New Zealand.

150. Roos D. 2005. Themes and Variations in Apicomplexan Parasite Biology. Science vol. July, (1) 309.

151. Rosales M., Cordon G., Moreno M., Sanchez C. 2005. Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. Acta. Trop. Jul; 95(1):74-8.

152. Rossanigo C. 1986. Técnicas de diagnóstico de la cryptosporidiosis en la diarrea neonatal. Vet. Arg. Vol. III, Nº 28.

153. Rossanigo C., Gialletti L., Grelloni V., Floroni A., Rivero V. 1987. Diagnosi di criptosporidiosi in alcuni allevamentidell'Italia centrale. Riv. Zoot. Vet., vol. 15, n. 1, 9-15.

154. Rossle N., Latif B. 2013. Cryptosporidiosis as threatening health problem: A review. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 3(11): 916-924.

155. Roy S., Sarkar S., Batabyal S., Pramanik A., Das P. 2006. Observations on the epidemiology of bovine cryptosporidiosis in India. Vet Parasitol. Nov 5;141(3-4):330-333.

156. Ruecker N., Matsune J., Wilkes G., Lapen D., Topp E., Edge T., Sensen C., Xiao L., Neumann N. 2012. Molecular and phylogenetic approaches for assessing sources of *Cryptosporidium* contamination in water. Water. Research 46:5135-5150.

157. Ryan U., Monis P., Enemark H., Sulaiman I., Samarasinghe B., Read C., Buddle R., Robertson I., Zhou L., Thompson R., Xiao L. 2004. *Cryptosporidium suis* N. Sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). Journal for Parasitology 90(4), 769-773.

158. Ryan U., Samarasinghe B., Read C., Buddle J., Robertson I., Thompson R. 2003. Identification of a novel *Cryptosporidium* genotype in pigs. Applied and Environmental Microbiology vol. 69, Nº 7, 3970-3974.

159. Ryan U., Xiao L. 2005. Molecular epidemiology of emerging protozoan diseases: selection of molecular targets for delimiting species versus those used for epidemiological studies. The 20th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, pag. 114. 16-20 October 2005, Christchurch, New Zealand.

160. Santín M., Trout J., Cortés Vecino J., Dubey J., Fayer R. 2006. *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in cats from Bogota (Colombia) and genotyping of isolates. Vet Parasitol. Nov 5;141(3-4):334-339.

161. Schets F., Engels G., During M., de Roda Husman A. 2005. Detection of infectious *Cryptosporidium* oocysts by cell culture immunofluorescence assay: applicability to environmental samples. Applied and Environmental Microbiology, Nov., p. 6793–6798.

162. Shahiduzzaman Md., Daugschies A. 2012. Therapy and prevention of cryptosporidiosis in animals. Vet. Parasitol. 188:203–214.

163. Singh B., Sharma R., Kumar H., Banga H., Aulakh R., Singh Gill J., Sharma J. 2006. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in Punjab (India) and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. Vet. Parasitol. 140:162–165.

164. Šlapeta J. 2013. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: A thirty colour rainbow?. Int. Jour. for Par. 43:957–970.

165. Smith H., Nichols R. 2010. Cryptosporidium: Detection in water and food. Experimental Parasitology 124:61–79.

166. Smith H., Nichols R., Grimason A. 2005. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. Trends Parasitol; 21: 133-142.

167. Sobestiansky J., Barcellos D., Moreno A., Sobestiansky A., Poleze E. 2005. Suínos: Coleta e remessa de materiais para laboratorios para fins de diagnóstico. Goiânia, Brasil, p.13-69

168. Spano F., Putignani L., Naitza S., Puri C., Wright S., Crisanti A. 1998. Molecular cloning and expression analysis of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a new member of the thrombospondin family, Mol. Biochem. Parasitol. 92:147–162.

169. Sreter T., Varga I. 2000. Cryptosporidiosis in birds--a review. Vet. Parasitol. Feb 1;87(4):261-279.

170. Suarez-Luengas L., Clavel A., Quílez J., Goñi-Cepero M., Torres E., Sánchez-Acedo C., del Cacho E. 2007. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain). Vet. Parasitol. 148:231–235.

171. Sulaiman I., Xiao L., Yang C., Escalante L., Moore A., Beard C., Arrowood M., Lal A. 1998. Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. Emerg Infect Dis. Oct-Dec;4(4):681-685.

172. Tenter A., Bartab J., Beveridgec I., Duszynskid D., Mehlhorne H., Morrison D., Andrew Thompson C., Conrad P. 2002. The conceptual basis for a new classification of the coccidian. International Journal for Parasitology 32:595–616.

173. Thatcher G., Friendship R. 2003. Prevalence of Giardia duodenalis and *Cryptosporidium* spp. infection on 77 Ontario hog farms. Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Swines Veterinarians. Orlando, USA, 8-11 March, pp. 31-32.

174. Theodos C. 1998. Innate and cell mediated immune responses to *Cryptosporidium parvum*, Adv. Parasitol. 40:88–119.

175. Theodos C., Griffiths J., D'onfro J., Fairfield A., Tzipori S. 1998. Efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in cell culture and in animal models. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Aug., p. 1959–1965.

176. Thompson R. 2005. *Cryptosporidium* and *Giardia*–from genotype to phenotype. The 20 International Conference of the World Association for the Advancement of Vet. Parasitol. 16-20 October 2005, Christchurch, New Zealand.

177. Thompson R., Armson A., Ryan U. 2003. Basic biology of *Cryptosporidium*. (Parasitology Lab., Division of Biology, Kansas State University).

178. Thompson R., Smith A. 2011. Zoonotic enteric protozoa. Vet. Parasitol. 182:70– 78.

179. Thrusfield, M. Epidemiología Veterinaria. 1990. Ed. Acribia, Zaragoza, España.

180. Tilley M., Upton S. 1997. Biochemistry of *Cryptosporidium* en *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Ed. Ronald Fayer. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida. Pp. 163-180.

181. Tomley F., Soldati S. 2001. Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites, Trends Parasitol. 17:81–88.

182. Tzipori S., Rand W., Griffiths J., Widmer G., Crabb J. 1994. Evaluation of an animal model system for cryptosporidiosis: therapeutic efficacy of paromomycin and hyperimmune bovine colostrum-immunoglobulin. Clin. Diagn. Lab. Immunol. Jul. 1(4):450-63.

183. Tzipori S., Smith M., Makin T., Halpin C. 1982. Enterocolitis in piglets caused by *Cryptosporidium* spp. purified from from calf faeces. Vet. Parasitol. 11:121-126.

184. Tzipori S., Ward H. 2002. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. Microbes and Infection 4:1047-1058.

185. Uehlinger F., Barkema H., Dixon B., Coklin T., O'Handley R. 2006. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. In a veterinary college bovine teaching herd. Vet Parasitol. Dec 20;142(3-4):231-237.

186. Umemiya R., Fukuda M., Fujisaki K., Matsui T. 2005. Electron microscopic observation of the invasion process of *Cryptosporidium parvum* in severe combined immunodeficiency mice. J. Parasitol. Oct;91(5):1034-9.

187. Upton S. 2004. Taxonomic chronology of *Cryptosporidium*. Some historical milestones (good or bad). Disponible en http://www.k-state.edu/parasitology/taxonomy.

188. Venturini L., Aguirre J., Armocida A., Risso M., Machuca M., Perfumo C. 1996. Diarrea post destete en cerdos: *Cryptosporidium parvum* y otros protozoarios. IV Congreso Nacional y pre-latino de Producción Porcina. IX Jornadas de Actualización Porcina. p. S15, Paraná, Argentina.

189. Vitovec J., Hamadejova K., Landova L., Kvác M., Kvetonova D., Sak B. 2006. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre and post weaned pigs. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. Jun;53(5):239-243.

190. Vitovec J., Koudela B. 2002. Pathogenesis of intestinal cryptosporidiosis in conventional and gnotobiotic piglets. Vet Parasitol. Jun;43(1-2):25-36.

191. Wang R., Qiu S., Jian F., Zhang S., Shen Y., Zhang L., Ning C., Cao J., Qi M., Xiao L. 2010. Prevalence and molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in pigs in Henan, China. Parasitol Res 107:1489–1494.

192. Ward H., Cevallos A. 1998. *Cryptosporidium*: molecular basis of host–parasite interaction, Adv. Parasitol. 40:151–185.

193. Watanabe Y., Yang C., Ooi H. 2005. *Cryptosporidium* infection in livestock and first identification of *Cryptosporidium parvum* genotype in cattle feces in Taiwan. Parasitol Res. Oct;97(3):238-41.

194. Webster K., Smith H., Giles M., Dawson L., Robertson L. 1996. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in faeces: comparison of conventional coproscopical methods and the polymerase chain reaction. Vet. Parasitol. Jan;61(1-2):5-13.

195. Weng Y., Hu Y., Li Y., Li Y., Lin R., Xie D., Gasser R., Zhu X. 2005. Survey of intestinal parasites in pigs from intensive farms in Guangdong Province, People's Republic of China. Vet. Parasitol. 127:333–336

196. Widmer G., Akiyoshi D., Buckholt M., Feng X., Rich S., Deary K., Bowman C., Xu P., Wang Y., Wang X., Buck G., Tzipori S. 2000. Animal propagation and genomic survey of a genotype I isolate of *Cryptosporidium parvum*. Mol Biochem Parasitol. May;108(2):187-97.

197. Wieler L., Ilieff A., Herbst W., Bauer C., Vieler E., Bauerfeind R., Failing K., Klos H., Baljer G., Zahner H. 2001. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany. J. Vet. Med. 48, 151-159.

198. Xiao L. 2005a. Zoonotic cryptosporidiosis. The 20th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. 16-20 October 2005, Christchurch, New Zealand.

199. Xiao L. 2005b. Molecular epidemiology of emerging protozoan diseases: zoonotic cryptosporidiosis. The 20th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, pag. 114. 16-20 October 2005, Christchurch, New Zealand.

200. Xiao L. 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. Exp. Par. 124:80–89.

201. Xiao L., Herd R., Bowman G. 1994. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections on two Ohio pig farms with different management systems. Vet Parasitol. Apr;52(3-4):331-6.

202. Xiao L., Moore J., Ukoh U., Gatei W., Lowery J., Murphy T., Dooley J., Millar B., Rooney P., Rao J. 2006. Prevalence and identity of *Cryptosporidium* spp. in pig slurry. Applied and Environmental Microbiology June, p. 4461–4463.

203. Xiao L., Morgan U., Limor J., Escalante A., Arrowood M., Shulaw W., Thompson C., Fayer R., Lal A. 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. Applied And Environmental Microbiology Aug., p. 3386–3391.

204. Xiao L., Sulaiman I., Fayer R., Lal A. 1998. Species and strain-specific typing of *Cryptosporidium* parasites in clinical and environmental samples. Mem Inst Osw Cruz. 93:687-691.

205. Yin J., Yuan Z., Cai H., Shen Y., Jiang Y., Zhang J., Wang Y., Cao J. 2013. Age-related Infection with *Cryptosporidium* Species and Genotype in Pigs in China. Biomed Environ Sci. 26(6): 492-495.

206. Yu J., Lee J., Seo M., Kim S., Sohn W., Huh S., Choi H., Kim T. 2004. Prevalence of cryptosporidiosis among the villagers and domestic animals in several rural areas of Korea. Korean Journal Parasitology vol. 42, Nº 1, 1-5.

207. Yu J., Seo M. 2004. Infection status of pigs with *Cryptosporidium parvum*. The Korean Journal of Parasitology Vol. 42, No. 1. 45-47.

208. Zadrozny L., Stauffer S., Armstrong M., Jones S., Gookin J. 2006. Neutrophils do not mediate the pathophysiological sequelae of *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal piglets. Infection and Immunity. Oct., p. 5497–5505.

209. Zanaro N., Garbossa G. 2008. *Cryptosporidium*: cien años después.Acta Bioquím. Clín Latinoam 42 (2): 195-201.

210. Zhang W., Yang F., Liu A., Wang R., Zhang L., Shen Y., Cao J., Ling H. 2013. Prevalence and genetic characterizations of *Cryptosporidium* spp. In pre-weaned and post-weaned piglets in Heilongjiang province, China. PLOS ONE July. Vol. 8. Iss. 7.

211. Zhou L., Fayer R., Trout J., Ryan U., Schaefer F., Xiao L. 2004. Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting fur-bearing mammals differ from those of species infecting humans. Appl Environ Microbiol. December; 70(12): 7574–7577.

212. Zhu G., Keithly J., Philippe H. 2000. What is the phylogenetic position of *Cryptosporidium*?. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50:1673–1681.

213. Zintl A., Neville D., Maguire D., Fanning S., Mulcahy G., Smith H., De Waal T. 2007. Prevalence of *Cryptosporidium* species in intensively farmed pigs in Ireland. Parasitology 134:1575-1582 Cambridge University Press.