



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**ASPECTOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS DE LA  
DIARREA NEONATAL EN TERNEROS DE TAMBOS DE  
URUGUAY Y SU ASOCIACIÓN CON INFECCIÓN POR  
*Cryptosporidium* spp. y *Escherichia coli* F5 (K99)+**

**Rubén Darío Caffarena**

**TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL**

**URUGUAY**

**2017**





**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**ASPECTOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS DE LA  
DIARREA NEONATAL EN TERNEROS DE TAMBOS DE  
URUGUAY Y SU ASOCIACIÓN CON INFECCIÓN POR  
*Cryptosporidium* spp. y *Escherichia coli* F5 (K99)+**

**Rubén Darío Caffarena**

---

**Federico Giannitti**  
**Director de Tesis**

---

**Franklin Riet-Correa**  
**Co-director**

**2017**

# **INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE**

## **DEFENSA DE TESIS**

José M. Verdes; DVM, MSc., PhD. (presidente).

Facultad de Veterinaria.

Universidad de la República – Uruguay.

Andrés D. Gil; DVM, MSc., PhD.

Facultad de Veterinaria.

Universidad de la República – Uruguay.

Bárbara P. Brito; DVM, MPVM, PhD.

Agricultural Research Service (ARS).

United States Department of Agriculture (USDA) – Estados Unidos.

# ACTA DE DEFENSA DE TESIS



FACULTAD DE VETERINARIA  
Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS  
DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

“ASPECTOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS DE LA DIARREA  
NEONATAL EN TERNEROS DE TAMBOS DE URUGUAY Y SU  
ASOCIACIÓN CON INFECCIÓN POR *Cryptosporidium* spp. y  
*Escherichia coli* F5 (K99)+”

---

Por: Dr. Ruben Darío Caffarena

Director de Tesis: Dr. Federico Giannitti

Codirector de Tesis: Dr. Franklin Riet-Correa

## Tribunal

Presidente: Dr. José M. Verdes

Segundo Miembro: Dr. Andrés Gil

Tercer Miembro: Dra. Bárbara Brito

Fallo del Tribunal:

*Aprobada con Mención.*

Salón de Posgrados  
Martes 5 de setiembre de 2017

# Informe del Tribunal



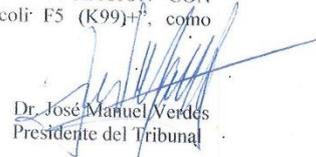
## UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA FACULTAD DE VETERINARIA Postgrados Académicos y Especializaciones

El Tribunal considera que el Maestrando Med. Vet. Rubén Darío Caffarena ha realizado un excelente trabajo de tesis sustentado en una redacción escrita y revisión bibliográfica muy adecuadas.

Los resultados obtenidos denotan un extenso trabajo de campo, reflejado en la cantidad de establecimientos visitados y animales muestreados para este trabajo, caracterizando aspectos clínicos y epidemiológicos del síndrome de diarrea neonatal (SDN) bovino y su asociación con la muerte y determinando frecuencias relativas de infección por *Cryptosporidium* spp. y *E. coli* F5+ en terneros en tambos comerciales de nuestro país. Las conclusiones son claras, planteando que *Cryptosporidium* spp. está ampliamente distribuido en los establecimientos estudiados, asociándolo con SDN, con la muerte de terneros. Es un trabajo fundamentalmente descriptivo de la situación nacional de estos dos agentes en tambos comerciales, así como de la incidencia en el SDN en terneros, siendo un aporte necesario para la actualización del conocimiento en este tema. Además, dejó puesta a punto la técnica de tinción con auramina-fenol, demostrando que es una técnica de laboratorio viable para la detección de *Cryptosporidium* spp. en materia fecal de terneros, teniendo una potencial aplicabilidad y transferencia a otros laboratorios de diagnóstico.

La Defensa oral fue clara, concisa y amena, respaldada por una presentación muy dinámica y adecuada, demostrando conocimiento y responsabilidad en el desarrollo del trabajo de Tesis. Destacamos la solvencia en el razonamiento llevado a cabo en las respuestas a las preguntas y sugerencias planteadas por el Tribunal, que denotan el grado de compromiso durante el proceso de formación.

Por lo anteriormente expresado, el Tribunal, por unanimidad, califica el trabajo de Tesis de Maestría en Salud Animal del Médico Veterinario Rubén Darío Caffarena "ASPECTOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS DE LA DIARREA NEONATAL EN TERNEROS DE TAMBOS DE URUGUAY Y SU ASOCIACIÓN CON INFECCIÓN POR *Cryptosporidium* spp. y *Escherichia coli* F5 (K99)+", como Aprobado con Mención.

  
Dr. José Manuel Verdes  
Presidente del Tribunal

## **Agradecimientos**

A mi tutor Federico Giannitti por su guía y apoyo incondicional durante todas las etapas de este proyecto.

A mi co-tutor Franklin Riet-Correa por todas las enseñanzas durante estos años.

Al equipo entero de la Plataforma de Investigación en Salud Animal de INIA La Estanzuela, sin su colaboración nada de esto hubiera sido posible.

A todos los veterinarios, propietarios, encargados, administradores y operarios quienes desinteresadamente abrieron las porteras de los establecimientos y nos dedicaron su valioso tiempo.

A INIA y ANII por darme la posibilidad de continuar con mi formación académica mediante sus sistemas de becas.

A mi padre, madre y hermano por estar siempre.

A los amigos (los de siempre, los nuevos y los que estuvieron de paso).

A mi amor incondicional, Mariana, por apoyarme siempre sabiendo de los esfuerzos inconmensurables que hemos hecho y al mayor fruto de nuestro amor, Fausto.

Gracias a todos.

## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	iv
SUMMARY .....	vi
INTRODUCCIÓN .....	1
<i>Cryptosporidium</i> spp.....	4
<i>Cryptosporidium</i> spp. como agente causal del síndrome de diarrea neonatal en bovinos .....	5
<i>Los bovinos como reservorios de especies zoonóticas de Cryptosporidium</i> .....	6
<i>Escherichia coli</i> F5 (K99)+.....	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS .....	9
HIPÓTESIS.....	9
OBJETIVOS .....	9
Objetivo general .....	9
Objetivos específicos .....	10
ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN .....	10
MATERIALES Y MÉTODOS .....	10
Tamaño de la muestra y criterios de inclusión.....	10
Trabajo de campo, examen clínico y muestreo .....	11
Análisis de laboratorio .....	13
Cuestionario .....	14
Análisis estadístico.....	14
RESULTADOS.....	16
Datos generales de los establecimientos .....	16
Datos generales de los establecimientos y caracterización general del manejo en el parto y la crianza .....	16
Análisis descriptivo de los animales, examen clínico y de la materia fecal .....	19

Resultados del ELISA para <i>Cryptosporidium</i> spp. y <i>E. coli</i> F5+ .....	23
Asociación entre la infección por <i>Cryptosporidium</i> spp., <i>E. coli</i> F5+ en todos los terneros, y <i>E. coli</i> F5+ en terneros <8 días de vida y la manifestación de diarrea. 25	
Asociaciones entre la manifestación de diarrea y otros parámetros clínicos evaluados.....	25
Asociaciones entre los parámetros clínicos evaluados, factores de manejo e infección con <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	27
Asociaciones entre los parámetros clínicos evaluados, factores de manejo e infección por <i>E. coli</i> F5+.....	29
Asociaciones entre distintas variables y la muerte.....	31
Asociación entre diarrea y transferencia de la inmunidad pasiva .....	33
Grado de concordancia e índice Kappa entre el ELISA y la tinción de auramina-fenol para <i>Cryptosporidium</i> spp.....	34
DISCUSIÓN .....	35
CONCLUSIONES .....	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
ANEXO I. Frotis de materia fecal y tinción de auramina-fenol para observación de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	62
ANEXO II. Protocolo ELISA de captura de antígeno “Pathasure® enteritis 4” .....	64
ANEXO III. Cuestionario sobre datos generales del establecimiento, datos relacionados a la crianza y datos sanitarios.....	68
ANEXO IV. Análisis bivariado. Tablas.....	70

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar aspectos clínicos y epidemiológicos, así como la posible asociación con la muerte, del síndrome de diarrea neonatal (SDN) bovino, y determinar la frecuencia relativa de infección por *Cryptosporidium* spp. y *E. coli* F5+ en terneros con y sin diarrea neonatal de tambos comerciales de Uruguay. Se revisaron clínicamente y se colectaron muestras de suero sanguíneo y materia fecal de 556 terneros con (n: 271) y sin (n: 285) diarrea, de hasta un mes de vida, provenientes de 30 establecimientos lecheros de 7 departamentos. Se realizó un cuestionario a los productores o personal de los tambos, sobre datos generales y de manejo para detectar posibles factores de riesgo y/o protección. Las muestras de materia fecal se analizaron mediante un ELISA de captura comercial para detección de *Cryptosporidium* spp. y *E. coli* F5+. En 97 animales <8 días de vida, se estimó la concentración de proteínas séricas totales mediante refractometría. *Cryptosporidium* spp. fue detectado en 100% de los establecimientos (30/30), mientras que *E. coli* F5+ en 16.7% (5/30). *Cryptosporidium* spp. se asoció a la presentación de cuadros diarreicos [odds ratio (OR) 6, intervalo de confianza (IC) 95% 4.16-8.67, P <0.01] en la 2° semana de vida (OR 9.09, IC 95% 5.70-14.50, P <0.001). No se observaron asociaciones entre diarrea y muerte e infección por *E. coli* F5+. La diarrea se asoció positivamente con parámetros clínicos generales al momento del examen (actitud anormal, dificultad en la incorporación, reflejo de succión débil, onfalitis, elevada temperatura rectal), con variables predictoras del grado de deshidratación corporal (duración del pliegue cutáneo y tiempo de llenado capilar) y a la edad (2° semana de vida) de los terneros (OR 3.66, IC 95% 2.39-5.62, P <0.001). Los terneros diarreicos tuvieron más chances de morir que los no diarreicos (OR 1.71, IC 95% 0.89-3.31, P 0.10). Factores de manejo asociados con *Cryptosporidium* spp. fueron la rotación de la guachera (OR 1.42, IC 95% 0.93-2.16, P 0.098) y el suministro de leche de descarte (OR 1.33, IC 95% 0.94-1.87, P 0.10). Con respecto a la muerte de los animales, esta se asoció con varios de los factores de manejo, tales como la no exclusividad en las actividades laborales del operario de la crianza (OR 3.87, IC 95% 1.80-8.34, P 0.001), los sistemas de crianza colectivos (OR 4.60, IC 95% 0.47-5.02, P 0.006) y los establecimientos con mayor número de vacas (OR 27.1, IC 95% 6.42-114.70, P <0.001), entre otros. Los animales con una transferencia exitosa de la inmunidad pasiva tuvieron menos chances de sufrir diarrea (OR 0.38, IC 95% 0.16-0.91, P 0.03). Los resultados de este estudio

permiten concluir que *Cryptosporidium* spp. está ampliamente distribuido en los establecimientos lecheros, que se asocia a SDN, y que ésta se asocia a su vez con muerte de terneros. El veterinario se puede valer del examen clínico para identificar y tratar precozmente a animales con diarrea en riesgo de morir. La prevención, con énfasis en el manejo, es fundamental para el control del SDN.

Palabras claves: Crianza – Examen clínico – Signos clínicos – Factores de riesgo – Producción lechera.

## SUMMARY

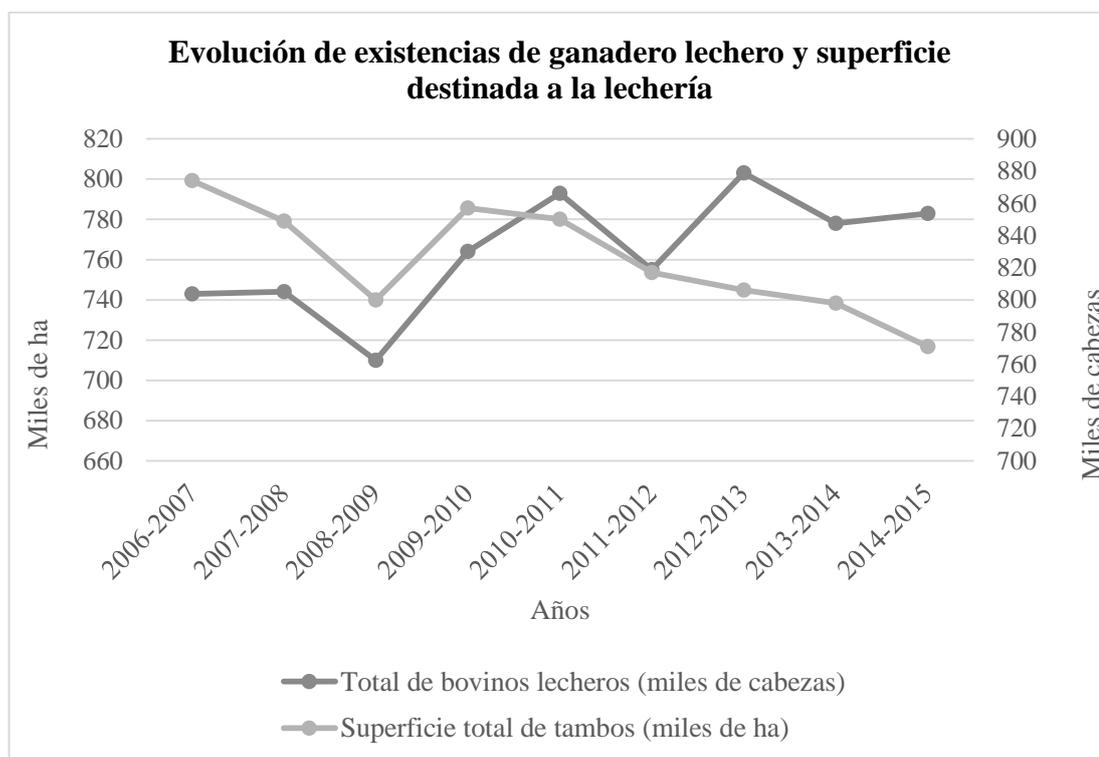
The objective of the present study was to characterize clinical and epidemiological aspects, as well as the possible association with death, of bovine neonatal diarrhea syndrome (NDS), and to determine the relative frequency of infection with *Cryptosporidium* spp. and *E. coli* F5+ in calves with and without NDS from commercial dairy farms in Uruguay. Clinical examination was performed and blood serum and fecal samples were collected from 556, 1- to 30-day-old calves with (n: 271) and without (n: 285) diarrhea, from 30 dairy farms in 7 Uruguayan departments. A questionnaire was distributed among the 30 farmers and/or farm staff to gather information on general farm data and management practices, to assess possible risk/protection factors. Fecal samples were analyzed by a commercial capture ELISA for the detection of *Cryptosporidium* spp. and *E. coli* F5+. In 97 calves <8 days of life, total serum proteins were estimated by refractometry. *Cryptosporidium* spp. was detected in 100% of the farms (30/30), while *E. coli* F5+ was detected in 16.7% (5/30). *Cryptosporidium* spp. was associated with diarrhea [odds ratio (OR) 6, 95% confidence interval (CI) 4.16-8.67, P <0.01] in the 2<sup>nd</sup> week of life (OR 9.09, 95% CI 5.70-14.50, P <0.001). No associations were observed between diarrhea, death and *E. coli* F5+ infection. Diarrhea was positively associated with clinical parameters at the time of examination (abnormal attitude, difficulty standing up, weak suction reflex, omphalitis, elevated rectal temperature), and with variables predictive of the degree of body dehydration (skin pinch test, capillary refill time) and the age of the calves (2<sup>nd</sup> week of life: OR 3.66, 95% CI 2.39-5.62, P <0.001). Diarrheic calves were more likely to die than non-diarrheic calves (OR 1.71, 95% CI 0.89-3.31, P 0.10). Management factors associated with *Cryptosporidium* spp. were: rotation of the areas where the calves were housed (OR 1.42, 95% CI 0.93-2.16, P 0.098), and feeding the calves with waste milk (OR 1.33, 95% CI 0.94-1.87, P 0.10). Calf mortality was associated with several management factors, such as non-exclusivity in the work activities of the calf caregiver (OR 3.87, 95% CI 1.80-8.34, P 0.001), and larger size of milking cow herd in the farms (OR 27.1, 95% CI 6.42-114.70, P <0.001), among other factors. Animals with a successful transfer of passive immunity were less likely to suffer from diarrhea (OR 0.38, 95% CI 0.16-0.91, P 0.03). We conclude that *Cryptosporidium* spp. is widely distributed in dairy farms in Uruguay, the agent is associated with NDS, and this syndrome is in turn associated with calf mortality. Clinical examination performed

by veterinarians allows for early identification and treatment of calves with NDS, which are crucial to reduce the risk for mortality. Prevention and management practices are key factors to control NDS.

Key words: Raising dairy calves – Clinical examination – Clinical signs – Risk factors – Dairy production.

## INTRODUCCIÓN

En la década 2006-2015 la lechería uruguaya experimentó un proceso de intensificación productiva. Según datos del Área de Estadísticas Agropecuarias (DIEA 2016) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), la superficie destinada a la producción lechera y la cantidad de establecimientos lecheros disminuyeron 13 y 18%, respectivamente, pero la producción total de leche y la cantidad de bovinos lecheros aumentó (Gráfico 1), una tendencia similar a la registrada a nivel mundial (Barkema et al. 2015). Como es de esperar, la concentración de una mayor cantidad de animales en una menor superficie de tierra, trae aparejada un aumento en la tasa de contacto entre ellos y, por lo tanto, un incremento en el riesgo de ocurrencia de algunas enfermedades, que son menos frecuentes en sistemas extensivos (von Keyserlingk et al. 2009).



**Gráfico 1.** Evolución del total de bovinos lecheros y la superficie destinada a la lechería en el periodo 2006-2007 a 2014-2015. Datos obtenidos del anuario estadístico agropecuario 2016 (DIEA).

Uno de los síndromes clínicos frecuentemente asociado a la intensificación de los sistemas productivos lecheros, es el síndrome de diarrea neonatal (SDN), que puede llegar a representar más del 50% de las causas de muerte en los primeros 30 días de

vida de los terneros (USDA Dairy 2007). El SDN es complejo y multifactorial, y puede ser causado por varios agentes infecciosos y parasitarios incluyendo virus (rotavirus, coronavirus, torovirus bovino), bacterias (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* tipo C) y protozoos (*Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp.), entre otros (de la Fuente et al. 1998, Uzal et al. 2015). Los terneros afectados pueden sufrir deshidratación y acidosis metabólica, que pueden culminar en la muerte (Foster & Smith 2009), lo cual ocasiona grandes pérdidas económicas en la producción pecuaria (Donovan et al. 1998).

El SDN está frecuentemente asociado a problemas nutricionales y/o inmunológicos, tales como fallas en la transferencia pasiva de la inmunidad, y a factores medioambientales y de manejo que favorecen la transmisión de los agentes contagiosos, determinando que, en algunas situaciones, el síndrome se manifieste en forma de brote (Izzo et al. 2011) con alta morbimortalidad. Las causas infecciosas/parasitarias más comunes del SDN en terneros menores de 30 días suelen ser rotavirus y *Cryptosporidium* spp. (Naciri et al. 1999; Izzo et al. 2011), y en animales menores de una semana de vida, además, *Escherichia coli* F5+ (Runnels et al. 1986; Blanchard 2012), aunque suele haber variaciones según las regiones geográficas, sistemas de producción, y épocas del año, entre otros factores.

El SDN ha sido asociado con menores ganancias de peso (Windeyer et al. 2014), e influye negativamente en la performance futura de los animales, por ejemplo, terneras que padecieron SDN pueden manifestar un incremento de la edad al 1° parto (Waltner-Toews et al. 1986a). El costo de criar una ternera para que llegue a vaquillona de reemplazo y pueda ser servida es alto (Tozer & Heinrichs 2001). Datos de la encuesta lechera de representatividad nacional realizada por el Instituto Nacional de la Leche (INALE 2014) indican que, en Uruguay, 30-55% de los productores lecheros no cuenta con suficientes vaquillonas de reemplazo. Esto resalta la importancia y el impacto que tienen la mortalidad y las enfermedades neonatales, en el corto y mediano plazo, en el desarrollo productivo de los animales y, por defecto, en el crecimiento de los tambos y del rodeo lechero nacional.

Para determinar la causa de la diarrea, hacer un correcto tratamiento y establecer medidas de control y prevención, es necesario realizar un examen clínico, el cual debe ser respaldado por pruebas de laboratorio que permitan identificar los agentes

infecciosos involucrados (Bartels et al. 2010, Uzal et al. 2015). El examen clínico deber ser sistemático, e incluir una examinación visual y física, realizada por personal capacitado para reconocer e interpretar parámetros clínicos (Sivula et al. 1996). La observación del animal permite recabar datos referidos a la actitud, la incorporación, el estado de la cobertura pilosa, la presencia de dolor, grado de hundimiento del globo ocular (que permite estimar el grado de deshidratación), la ubicación de las orejas, etc. Una vez finalizado el examen visual, se debe proceder al examen físico. En el caso particular de los terneros con diarrea, la estimación del porcentaje de deshidratación mediante el tiempo que tarda el pliegue cutáneo en volver a la normalidad luego de un pellizco, la intensidad del reflejo de succión, la condición de las articulaciones y el ombligo, las frecuencias cardíaca y respiratoria, el tiempo de llenado capilar, y la temperatura rectal, son algunos de los parámetros que permiten evaluar el estado general del ternero (House et al. 2015). Esto nos permite implementar un pronóstico correcto y un tratamiento precoz, y así reducir el riesgo de muerte y los costos terapéuticos.

Uno de los cambios metabólicos más importantes que ocurren en los animales diarreicos es la acidosis metabólica, la cual se debe a un aumento de los aniones en la circulación sistémica, debido a una pérdida de bicarbonato por las heces, y al aumento de compuestos derivados del ácido láctico. Particularmente el aumento de la forma dextrógira del ácido láctico (D-lactato), formado por la microbiota intestinal, y del L-lactato, derivado de la glicólisis anaeróbica secundaria a la deshidratación e hipoperfusión de los tejidos, es responsable de los signos neurológicos, tales como ataxia, somnolencia y coma, asociados a los cuadros diarreicos (Naylor 1987; Naylor 1989; Constable et al. 2001; Lorenz & Vogt 2006). El examen clínico permite estimar el porcentaje de deshidratación y así poder determinar la necesidad de rehidratación oral o parenteral (House et al. 2015), lo cual representa un factor clave en la terapia exitosa del SDN.

Generalmente los brotes de diarrea son ocasionados por más de un agente etiológico, y estos pueden variar en el tiempo dependiendo de múltiples factores (Hall et al. 1988, Blanchard 2012, Uzal et al. 2015). Para lograr éxito en la identificación causal durante la investigación diagnóstica, se deben analizar muestras de múltiples animales, idealmente en estadios iniciales de la enfermedad, y realizar un panel de pruebas

microbiológicas para la identificación de los patógenos involucrados a nivel de rodeo (McGuirk 2008, Uzal et al. 2015). Cuando los terneros son expuestos a un escenario donde se enfrentarán con niveles altos de exposición a microorganismos patógenos, es de esperar que más del 20% de los animales muestreados estén eliminando alguno de los enteropatógenos más comunes. Por lo tanto, si, por ejemplo, se muestrean 6 animales y 2 o más de ellos son positivos a alguno de los virus patógenos entéricos o a *C. parvum*, o si un ternero es positivo a *Salmonella* spp., se considera que la exposición es anormalmente alta (McGuirk 2008). Una vez identificada la causa de la diarrea se debe trabajar en la prevención, ya sea con medidas de manejo y/o aplicación de inmunógenos que ayuden a prevenir el SDN (McGuirk 2008).

Realizada esta breve introducción al SDN se abordarán resumidamente las características generales de los 2 agentes de interés.

### ***Cryptosporidium* spp.**

*Cryptosporidium* es un parásito protozoario del filum Apicomplexa, zoonótico, de distribución mundial, transmitido principalmente por vía fecal-oral a través de agua y alimentos, siendo una de las principales causas de diarrea en personas y animales (Ryan et al. 2014). El parásito se encuentra en el agua, alimentos, suelo y objetos contaminados con heces. Los individuos infectados pueden eliminar millones de ooquistes esporulados (formas infectivas), que en el caso de los terneros puede ser de más de  $10^6$  ooquistes/g de materia fecal (MF) (Fayer et al. 1998). Esta eliminación puede durar semanas (Castro-Hermida 2002b), lo que genera una alta contaminación del ambiente. Los ooquistes esporulados son muy resistentes en el medioambiente y tienen extrema resistencia a los desinfectantes comunes, incluyendo la desinfección por cloración (Carpenter et al. 1999; Shields et al. 2008), lo cual hace extremadamente engorroso su control.

Numerosos brotes de criptosporidiosis humana han ocurrido mundialmente por consumo de agua de red y alimentos contaminados (CDC 2009; Helmy et al. 2014; Widerström et al. 2014), por exposición a aguas recreacionales (piscinas, etc), o por contacto directo con animales infectados (Smith et al. 2004; CDC 2009; Hancock-Allen et al. 2017). En Uruguay, *Cryptosporidium* spp. fue identificado por primera vez

como causante de diarrea aguda infantil en 1986 (Zanetta et al. 1987), y luego se estimó que era responsable del 11% de los casos de diarrea aguda en esta población de riesgo (Schelotto et al. 1991). Posteriormente, *Cryptosporidium* spp. fue identificado en 19 de 224 (8.5%) niños de 1-20 meses de edad con diarrea admitidos en un hospital pediátrico de Montevideo entre 1990 y 1994 (Torres et al. 2001). La criptosporidiosis representa entonces una enfermedad de importancia para la salud pública y veterinaria, que merece ser mejor estudiada en el país.

*Cryptosporidium* spp. como agente causal del síndrome de diarrea neonatal en bovinos  
Varias especies de *Cryptosporidium*, incluyendo *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* y *C. andersoni* se han reportado en bovinos, aunque *C. parvum* es el más relevante clínicamente (Meireles et al. 2011). En EEUU, *C. parvum* fue la especie más prevalente en terneros de hasta 30 días de vida, y la única especie encontrada en terneros menores a 3 semanas de vida (Santin et al. 2004). Numerosos trabajos reportan a *Cryptosporidium* spp. como uno de los patógenos más frecuentemente detectados en terneros diarreicos, mayormente entre los 3 y 33 días de edad (Naciri et al. 1999; Izzo et al. 2011; Blanchard 2012).

Los terneros adquieren la infección poco tiempo después del nacimiento, con las mayores frecuencias reportadas entre las 1<sup>o</sup> y 3<sup>o</sup> semanas de vida (Castro-Hermida et al. 2002b; Santin et al. 2004). La excreción de ooquistes dura, en promedio, 12 días, mientras que la diarrea tiene una duración promedio de 8 días (Castro-Hermida et al., 2002b). La morbilidad suele ser variable y la mortalidad baja (Naciri et al. 1999), aunque ante determinadas circunstancias como bajos niveles de selenio, una nutrición inadecuada, coinfecciones con otros patógenos y algunas prácticas puntuales de manejo, las mismas puede ser altas (Olson et al. 2004).

*Cryptosporidium parvum* afecta principalmente la última porción del intestino delgado, aunque también se pueden encontrar lesiones en el ciego y el colon (de Graaf et al. 1999). Los terneros mayoritariamente presentan diarrea como único signo clínico, aunque también puede haber dolor abdominal, depresión, deshidratación y anorexia (Naciri et al. 1999). La diarrea por mala absorción es resultado de la colonización del borde apical de los enterocitos (microvellosidades) en el intestino por

parte del parásito, ocasionando una destrucción epitelial que culmina en una atrofia y acortamiento de las vellosidades (de Graaf et al. 1999; Foster & Smith 2009).

Con respecto al diagnóstico, los métodos de detección de antígeno de *Cryptosporidium* spp. (ELISA, inmunofluorescencia, inmunocromatografía) detectan un amplio espectro de especies sin diferenciarlas entre sí (Santin et al. 2004; Blanchard 2012). Lo mismo ocurre con la visualización de los ooquistes mediante flotación fecal, y el examen microscópico de frotis coloreados con los métodos de Kinyoun o auramina-fenol, ya que la morfología y el tamaño son similares entre algunas especies, y este no representa un método confiable para identificación a nivel de especies (Fall et al. 2003). Al examen histopatológico, se puede observar en secciones de intestino delgado en excelente estado de preservación postmortem, a *Cryptosporidium* spp. adherido a los enterocitos superficiales (Blanchard 2012), y si bien este examen permite observar al parásito y eventualmente el daño ocasionado por el mismo, tampoco permite la identificación a nivel de especie. Técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y secuenciación, han sido usados para distinguir especies de *Cryptosporidium* y subtipos de *C. parvum* (Silverlas et al. 2010; Meireles et al. 2011).

La criptosporidiosis es una entidad que produce grandes pérdidas económicas en la ganadería (de Graaf et al. 1999; Fayer et al. 2007; Silverlas et al. 2010). Debido a que no se cuenta con vacunas ni tratamientos efectivos disponibles para los bovinos (Ryan et al. 2014), y a que el microorganismo es muy resistente a las condiciones ambientales, los esfuerzos de controlar la enfermedad deben enfocarse en prevenir la transmisión. Aunque en Uruguay recientemente se han publicado algunos casos aislados de criptosporidiosis bovina (Caffarena et al. 2016; Aráoz et al. 2017), diagnosticados en paralelo a este trabajo de tesis, se desconoce la prevalencia y el impacto económico de *Cryptosporidium* spp. para la ganadería.

#### *Los bovinos como reservorios de especies zoonóticas de Cryptosporidium*

Los bovinos son los principales reservorios de *Cryptosporidium* spp., siendo algunos subtipos genéticos de *C. parvum* de especial interés por su potencial zoonótico (Amer et al. 2013; Ryan et al. 2014). Los subtipos IIa son los que se han reportado en humanos

y bovinos (Fayer & Xiao 2007). Dentro de estos, los más frecuentes a nivel mundial son el IIA15G2R1 y IIA18G3R1 (Fayer & Xiao 2007). En un brote masivo de criptosporidiosis que involucró aproximadamente ~403.000 personas, ocurrido en 1993 en Wisconsin por consumo de agua de red contaminada, se especuló que una posible fuente del microorganismo fue el ganado bovino (Mac Kenzie et al. 1994). Más recientemente se han confirmado varios brotes de criptosporidiosis en humanos ocurridos por contacto con bovinos infectados (Smith et al. 2004; CDC 2009; Hancock-Allen et al. 2017).

A pesar de que la ganadería lechera ocupa en Uruguay grandes extensiones de tierra (aproximadamente 4.3% del territorio nacional en 2016), se desconoce el rol que los bovinos lecheros pudieran tener como reservorios de *Cryptosporidium* spp. en el país.

### ***Escherichia coli* F5 (K99)+**

*Escherichia coli* es un bacilo, Gram-negativo, anaerobio facultativo, de la familia *Enterobacteriaceae*. Si bien la mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas y forman parte de la microbiota intestinal normal, algunas cepas son patógenas debido a la expresión de diversos factores de virulencia. Estas pueden ser patógenos intestinales y/o extraintestinales, las primeras asociadas a diarrea y colitis hemorrágica, y las segundas asociadas a septicemia, meningitis e infecciones urinarias.

Según sus factores de virulencia las cepas de *E. coli* pueden clasificarse en varios patotipos. Los patotipos de mayor importancia en animales son *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* verotoxigénica (VTEC), *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC) y *E. coli* necrotoxigénica (NTEC) (Mainil 2013). Las cepas enterohemorrágicas de *E. coli* (EHEC) representan un subgrupo de las VTEC (Gyles & Fairbrother 2010).

Las ETEC son capaces de elaborar toxinas termolábiles (LT) o termoestables (ST), expresan fimbrias de colonización, que constituyen sus principales factores de virulencia (Gyles & Fairbrother 2010) y producen diarrea acuosa y severa en bovinos neonatos y otras especies. Las cepas bovinas presentan fimbrias de adhesión F5 (K99) y F41 (Gyles & Fairbrother 2010), aunque algunas cepas también presentan F17. En un estudio retrospectivo el rango de edad en el cual *E. coli* F5+ fue considerada como

causa de diarrea en terneros, fue de 1-7 días de vida (Blanchard 2012). Las coinfecciones entre *E. coli* F5+, *Cryptosporidium* spp., rotavirus y/o coronavirus son frecuentes en terneros diarreicos (de la Fuente et al. 1998).

La principal vía de infección por *E. coli* es la fecal-oral a través de agua, alimento y superficies contaminadas (Nataro & Kaper 1998). La mayoría de las cepas ETEC que afectan a los terneros poseen el antígeno fimbrial F5 (K99), que les permite colonizar y proliferar en las porciones distales del intestino delgado. La colonización comienza en el íleon, lo cual podría estar relacionado con el pH requerido para la expresión de la fimbria, que es superior a 6.5, o por la presencia de receptores específicos en los enterocitos superficiales de este segmento intestinal (Foster & Smith 2009). Una vez establecidas en la mucosa intestinal, las ETEC comienzan a secretar la toxina termoestable STa, la cual también es pH dependiente. La enterotoxina es la causante de la secreción de líquido desde la circulación sistémica al lumen intestinal resultando en grados variables de diarrea, deshidratación, desbalance hidroelectrolítico, acidosis, falla circulatoria, shock y muerte, mayormente mediada por la deshidratación e hiperpotasemia, que generan falla cardíaca (House et al. 2015).

Si bien *E. coli* F5+ no produce cambios histopatológicos evidentes en los enterocitos, la bacteria puede observarse microscópicamente colonizando la superficie apical (microvellosidades) en muestras de intestino bien preservadas fijadas en formalina. Como *E. coli* es parte de la microbiota normal del intestino, su aislamiento de materia fecal no tiene significancia diagnóstica, excepto que se demuestre la presencia de factores de virulencia. En terneros que sucumben a la infección por *E. coli* F5+, la observación microscópica de grandes cantidades de bacilos cortos Gram-negativos colonizando la superficie de los enterocitos en el íleon, conjuntamente con la detección del antígeno F5 en contenido intestinal/heces, o cepas de *E. coli* aisladas, permiten confirmar el diagnóstico (Blanchard 2012). *Escherichia coli* F5+ puede detectarse mediante aislamiento y genotipificación (PCR) (Franck et al. 1998; Fukushima et al. 2003) o por métodos de detección directa del antígeno, tales como ELISA, aglutinación en látex, o inmunocromatografía (Cho et al. 2012).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

La producción láctea en Uruguay tiene gran importancia económica y sociocultural. Como se mencionó anteriormente, las estadísticas agropecuarias muestran que el sector ha sufrido un proceso de intensificación productiva. Uno de los principales factores que causa importantes pérdidas económicas y limita el crecimiento de los tambos a nivel mundial, es el elevado porcentaje de mortalidad en las terneras de reposición. Datos aún no publicados (Carlos Schild, tesis de maestría en salud animal, UDELAR, comunicación personal 2017) indican que el porcentaje de mortalidad perinatal y durante el periodo de crianza ronda aproximadamente el 15% a nivel nacional, limitando la reposición y, por ende, atentando contra el crecimiento de los rodeos lecheros.

Es importante resaltar que, además de representar un problema sanitario en bovinos neonatos, algunas subtipos de *Cryptosporidium* (tales como *C. parvum*) que infectan a los bovinos, pueden ser transmisibles a los seres humanos y viceversa (anfixenosis). Sin embargo, a pesar de que hay registros de criptosporidiosis infantil en Uruguay, el posible rol de los bovinos como reservorios y/o transmisores del agente en el país no ha sido aún evaluado, así como tampoco la asociación que el parásito pudiera tener con el SDN bovino.

### HIPÓTESIS

*Cryptosporidium* spp. y *E. coli* F5+ se asocian a enfermedad neonatal en rodeos de bovinos lecheros de Uruguay.

### OBJETIVOS

#### Objetivo general

Caracterizar aspectos clínicos y epidemiológicos del síndrome de diarrea neonatal en terneros de tambos comerciales de Uruguay, determinar la frecuencia de infección por *Cryptosporidium* spp. y *E. coli* F5+ en terneros con y sin diarrea neonatal, y su posible asociación con la muerte de terneros en el año 2016.

## **Objetivos específicos**

- 1)- Determinar la frecuencia de infección entérica por *Cryptosporidium* spp. y *E. coli* F5+ en terneros neonatos con y sin diarrea de tambos de Uruguay y sus posibles asociaciones con manifestaciones clínicas.
- 2)- Comparar parámetros clínicos, epidemiológicos y mortalidad en terneros de tambos con y sin diarrea neonatal.
- 3)- Identificar factores de riesgo asociados a infecciones con *Cryptosporidium* spp. y *E. coli* F5+ y a la ocurrencia de diarreas neonatales.

## **ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN**

Esta tesis se realizó mediante un estudio transversal, observacional, descriptivo, no experimental. Se realizó un muestreo de terneros neonatos de tambos comerciales de Uruguay, de 1 a 30 días de vida, que estaban experimentando brotes espontáneos de diarrea neonatal en 2016. Las muestras obtenidas y los resultados expuestos corresponden a *Cryptosporidium* spp. y *E. coli* F5+, y son parte de un proyecto interinstitucional de mayor escala sobre diagnóstico de causas infecciosas y no infecciosas de muerte en terneros.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Tamaño de la muestra y criterios de inclusión**

El tamaño de la muestra se calculó en base a un estudio de casos y controles, considerando un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$  (valor  $p \leq 0.05$  para un valor significativo de OR) y un poder de 0.8, con una prevalencia de exposición en los controles de 5% y un OR=2.5. El cálculo se realizó utilizando un calculador de acceso libre (<http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=case-controlSS>). Los resultados arrojaron un total de 269 animales por grupo (269 casos con diarrea y 269 controles sin diarrea, total: 538 terneros). Basados en esta estimación se decidió muestrear 30 establecimientos que tuvieran brotes espontáneos de diarrea neonatal, que contaran contemporáneamente con terneros con y sin diarrea, de 1-30 días de edad, los cuales representaron los criterios de inclusión en el estudio. Los brotes de diarrea

eran incluidos durante el transcurso del estudio a medida que eran notificados telefónicamente por los asesores veterinarios de cada tambo. Se muestreó un mínimo de 4 y un máximo de 29 animales por establecimiento, incluyendo aproximadamente 50% de terneros con diarrea y 50% de terneros sin diarrea de similar edad (mínimo 0 y máximo 14 días de diferencia) en cada tambo. Al finalizar el estudio, se habían muestreado 556 terneros en total, 271 (48.7%) de ellos presentaban diarrea, mientras que 285 (51.3%) no presentaban diarrea al momento del muestreo ni tenían historia de haber presentado diarrea antes del mismo. Dieciocho establecimientos se visitaron más de una vez, ya que al momento del muestreo algunos casos no tenían su respectivo control o viceversa.

### **Trabajo de campo, examen clínico y muestreo**

Las visitas a los establecimientos fueron realizadas entre marzo y noviembre de 2016 por 3 veterinarios. Para cada ternero se registró la edad al muestreo/examen clínico, el sexo y la paridad de su madre (primípara versus múltípara). La materia fecal de cada caso y cada control se clasificó según su fluidez en 4 grados (adaptado de McGuirk 2008), siendo considerados controles (sin diarrea) los terneros con los grados 0 y 1, y casos (con diarrea) aquellos con los grados 2 y 3, como se expresa en la Tabla I.

Además, se realizó una revisión clínica individual completa, registrándose los siguientes parámetros: actitud general, capacidad de incorporación, reflejo de succión, estado del ombligo (diámetro, presencia/ausencia de exudados y dolor a la palpación), y presencia de secreciones nasal y ocular, basándose en metodologías descritas por otros autores (McGuirk 2008; Amaral-Phillips 2012; Cramer & Stanton 2015). Estos parámetros se clasificaron en grados del 0 al 3, siendo el grado 0 considerado normal y los valores 1 a 3, grados crecientes de anormalidad clínica, como se muestra en la Tabla I. Para realizar una aproximación general al porcentaje de deshidratación corporal y el estado de volemia del animal, se evaluó la duración del retorno a la normalidad del pellizco/pliegue cutáneo realizado en la parrilla costal (Naylor 1989; Walker et al. 1998; Smith 2009) y el tiempo de llenado capilar luego de realizar presión digital en la encía inferior del animal (House et al. 2015), ambos parámetros medidos en segundos (Tabla II). La temperatura rectal fue evaluada con un termómetro digital (Deltatrack) y expresada en grados Celsius (°C). Las frecuencias cardíaca y respiratoria se tomaron mediante auscultación de las regiones cardíacas y costales con

un estetoscopio durante un período de 15 segundos, el valor obtenido fue multiplicado por 4 para expresar los resultados en latidos por minuto y movimientos respiratorios por minuto, respectivamente.

**Tabla I.** Escala en grados de parámetros clínicos evaluados en terneros con y sin diarrea.

<b>Grado</b>	<b>Incorporación</b>	<b>Actitud</b>	<b>Reflejo de succión</b>	<b>Descarga nasal</b>	<b>Descarga ocular</b>	<b>Estado del ombligo</b>	<b>Materia Fecal</b>
<b>0</b>	Normal: se para solo sin dificultad	Normal: vigoroso, alerta	Presente, fuerte	Normal, acuosa, mínima	Normal, acuosa, mínima	≤1.5 cm, sin dolor	Sólida
<b>1</b>	Se para solo, con lentitud o dificultad	Lento en responder/moverse	Presente, moderado	Pequeña cantidad, opaca	Pequeña cantidad	>1.5 cm, sin dolor	Semisólida o pastosa
<b>2</b>	No se para solo, necesita ayuda	Depresivo	Presente, débil	Opaca o mucosa excesiva	Cantidad moderada	>1.5 cm, con dolor	Semilíquida
<b>3</b>	No se para, inclusive al ser ayudado	Postrado, coma	Ausente	Mucopurulenta, copiosa	Descarga ocular severa	> 1.5 cm, con dolor y supuración	Líquida

*Adaptado de McGuirk (2008), Amaral-Phillips (2012) y Cramer & Stanton (2015).*

**Tabla II.** Aproximación al porcentaje de deshidratación de los terneros.

<b>Deshidratación (%)</b>	<b>Signos clínicos</b>
<b>5-6</b>	Diarrea, sin otros signos clínicos, el reflejo de succión está presente y es fuerte.
<b>&gt;6-8</b>	Depresión moderada, el pliegue cutáneo y el tiempo de llenado capilar son de 2-6 segundos, el reflejo de succión está presente, ojos hundidos, debilidad.

---

>8-10	Depresivo, no se para, el pliegue cutáneo y el tiempo de llenado capilar son >6 segundos, mucosas secas.
>10-14	Estado comatoso, extremidades frías, el pliegue cutáneo no retorna a la normalidad.
>14	Muerte.

---

*Adaptado de Naylor (1989).*

Muestras de sangre fueron colectadas mediante punción de la vena yugular, y fraccionadas en dos tubos secos (6 ml/tubo) para obtención de suero. Durante todo el procedimiento (examen clínico y toma de muestras) se utilizaron agujas hipodérmicas estériles, jeringas y guantes de látex descartables, tubos y recipientes plásticos estériles individualmente por cada animal examinado. Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio de la Plataforma de Investigación en Salud Animal de INIA La Estanzuela.

### **Análisis de laboratorio**

Cada muestra de materia fecal fue fotografiada, se registró su color, si presentaba mucus, sangre y/o fibrina, y se realizó un frotis en portaobjeto (Anexo I). Los frotis fueron teñidos con coloración de auramina-fenol para la observación microscópica de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., según la metodología descrita por Fayer & Xiao (2007) (Anexo I). Se observaron 20 campos microscópicos a 500X y 1000X (aceite de inmersión) bajo microscopio de epifluorescencia (Axio Lab.A1, Carl Zeiss, Alemania), con filtro FITC (“fluorescein isothiocyanate”, excitación de 490 nm y emisión de 510 nm), equipado con un micrómetro ocular. Mediante esta técnica, los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se observan con una forma circular o levemente ovoide, de 4-6 µm de diámetro, de color verde manzana con fuerte fluorescencia, sobre un fondo oscuro (Fayer & Xiao 2007).

Una alícuota de 0.5 gramos de materia fecal se analizó mediante un kit comercial de ELISA de captura cualitativo (Pathasure® Enteritis 4, Biovet Inc., St-Hyacinthe, Canadá) para detección de antígenos de *Cryptosporidium* spp. y *E. coli* F5+, según las especificaciones del fabricante (Anexo II). La materia fecal restante se fraccionó en 5 tubos eppendorf de 1,5 ml, los cuales se rotularon y se congelaron a -20°C.

Los tubos secos con sangre se dejaron desuerar en posición vertical a temperatura ambiente durante 12-18 h. Una vez separado el suero del coágulo, se tomaron 4 alícuotas  $\geq 1$  ml y se colocaron en 4 tubos eppendorf de 1,5 ml cada uno (cuadruplicado), que fueron rotulados con número de caso, fecha, establecimiento y caravana identificadora del animal y almacenados en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En 97 terneros que tenían entre 1 y 7 días de vida, tanto diarreicos (42) como no diarreicos (55), se estimó la concentración de proteínas totales en suero mediante el uso de un refractómetro óptico (ATAGO PAL-1, ATAGO CO., Tokio, Japón) para evaluar de manera indirecta la existencia de fallas en la transferencia de la inmunidad pasiva (Tyler et al. 1998).

### **Cuestionario**

Al final del muestreo o posteriormente, por vía telefónica o correo electrónico, se realizó un cuestionario a los productores o personal de cada establecimiento para recopilar datos generales, tales como la cantidad total de vacas, la cantidad de vacas en ordeño, el tipo de parto (individual/colectivo), el tiempo transcurrido entre el nacimiento del ternero y la separación de la madre (tiempo al desmadre), el método de suministro del calostro (natural/artificial), la cantidad de calostro administrada durante las primeras 24 h de vida, si el operario de la crianza trabajaba exclusivamente en la misma o si realizaba otras tareas laborales dentro del tambo, el tipo de sistema de crianza utilizado (individual, colectivo o mixto), si se realizaba rotación del área destinada a la crianza, si se suministraba leche no comercial (“leche de descarte”) o sustituto lácteo a los terneros, si se separaban/aislaban los terneros enfermos de los sanos, el porcentaje de mortalidad en 2016, y si se aplicaban vacunas contra la diarrea neonatal en el parto (Anexo III).

### **Análisis estadístico**

Todos los datos clínicos y resultados de análisis de laboratorio registrados individualmente en cada animal fueron ingresados a una base de datos realizada en Microsoft Excel 2013 y luego transferidos al software Stata (Stata, versión 14; StataCorp, College Station, Texas) para la realización de los cálculos estadísticos.

Los establecimientos muestreados se estratificaron según la cantidad de vacas en ordeño (VO) en pequeños (31 a 99 VO), medianos (100 a 299 VO) y grandes ( $\geq 300$  VO) (adaptado de USDA Dairy 2007). Se procedió de similar manera con el dato de mortalidad, agrupándolos en 3 grados hipotéticos (adaptado de DCHA 2012): baja ( $\leq 5\%$ ), media (6 al 12%) y alta mortalidad ( $>12\%$ ). A su vez, se reagruparon algunas variables, ya sea por la escasa cantidad de observaciones en alguno de sus niveles, o para lograr una mejor interpretación en los análisis estadísticos. El tiempo en que el ternero era separado de la madre se dividió en 2,  $<12$  h y  $\geq 12$  h, ya que la cantidad de establecimientos que separaban a las madres después de las 24 h de vida del ternero eran relativamente pocos (n: 5). La variable continua temperatura rectal se dicotomizó en normo e hipertermia, considerando un punto de corte de  $39.5^{\circ}\text{C}$  (Constable et al. 2017a). El color de la materia fecal se categorizó en 3 (adaptado de Larson et al. 1977): 1) blanuzco– amarillento, 2) marrón, y 3) verde. La duración del pliegue cutáneo y el tiempo de llenado capilar se categorizaron en 2 ( $\leq 5$  segundos y  $>5$  segundos), este punto de corte se basó en que a partir de los 5 segundos de duración hay una correlación con el grado de deshidratación corporal en donde comienza a ser nocivo para la salud de los animales (House et al. 2015). Al ser poca la cantidad de observaciones de los grados de actitud 2 (n: 12) y 3 (n: 5), se optó por fusionarlos con el grado 1 y diferenciar entre actitud normal (grado 0) y anormal (grados 1, 2 y 3). Con respecto a los grados del estado del ombligo, esta variable se agrupó en cuadro normal (grados 0 y 1) y anormal (onfalitis, grados 2 y 3) de manera similar a lo realizado por Cramer & Stanton (2015). La frecuencia cardíaca y respiratoria también fueron categorizadas, se tomó un punto de corte de 130 latidos cardíacos/minuto y 26 movimientos respiratorios/minuto, en base a los parámetros fisiológicos normales descritos por Amaral-Phillips (2012). El modelo estadístico se basó, en todos los casos, en el resultado dicotómico (diarrea o no diarrea – presencia o ausencia de *Cryptosporidium* spp. – presencia o ausencia de *E. coli* F5+ – no muerte o muerte), por lo que se realizó en cada caso una regresión logística para estimar las oportunidades relativas (OR= “odds ratio”) con el fin de cuantificar las asociaciones (análisis bivariado). La variable “resultado” (dependiente) fue el resultado dicotómico, y las variables predictivas (independientes) fueron los parámetros clínicos, factores de manejo del establecimiento y la infección por *Cryptosporidium* spp. y/o *E. coli* F5+ determinada por el resultado del ELISA.

Para determinar si hubo diferencia significativa en los niveles estimados de proteínas séricas totales, entre animales diarreicos y no diarreicos, se utilizó la prueba t de Student, comparando las medias entre grupos. A su vez, esta variable se categorizó en 3 (transferencia pasiva de inmunidad exitosa, moderada o fallida) utilizando puntos de corte  $<5.2$ ,  $5.2-5.5$ , y  $\geq 5.6$  g/dl descriptos en la bibliografía (Tyler et al. 1998) y se analizó mediante un test de Chi cuadrado. Al no cumplir con uno de los supuestos del test de Chi cuadrado, se realizó el test de Fisher y una regresión logística en donde la variable respuesta fue el estado de diarreico – no diarreico y la variable independiente la categorización de la transferencia pasiva (exitosa, moderada o fallida) de acuerdo a la concentración de proteínas totales.

Por último, para evaluar la concordancia entre el resultado del ELISA para detección de antígeno de *Cryptosporidium* spp. y el resultado de la observación microscópica de ooquistes en los frotis coloreados con auramina – fenol, se calculó el coeficiente Kappa. Este se expresa en un rango de 0 a 1, donde 0 indica una concordancia pobre, 0.01 a 0.2 concordancia leve, 0.21 a 0.4 concordancia aceptable, 0.41 a 0.6 concordancia moderada, 0.61 a 0.8 considerable concordancia, y  $>0.8$  concordancia casi perfecta (Landis & Koch 1977).

## **RESULTADOS**

### **Datos generales de los establecimientos**

Se incluyeron en el estudio y visitaron un total de 30 establecimientos lecheros que sufrieron focos de diarrea neonatal. Se colectaron y analizaron un total de 556 muestras individuales de materia fecal de terneros con (271) y sin (285) diarrea, de hasta un mes de vida. El mínimo de terneros muestreados por establecimiento fue de 4 y el máximo de 29, con una media de  $20.10 \pm 3.73$  animales.

### **Datos generales de los establecimientos y caracterización general del manejo en el parto y la crianza**

La distribución departamental y la caracterización de los establecimientos muestreados se muestra en las Tablas III y IV.

**Tabla III.** Distribución de los establecimientos muestreados según los departamentos.

Departamento	Cantidad de establecimientos muestreados	% del total
Canelones	1	3.33
Flores	1	3.33
Florida	1	3.33
Soriano	1	3.33
Colonia	6	20
Río Negro	7	23.34
San José	13	43.34
Total	30	100

**Tabla IV.** Caracterización de los establecimientos muestreados según la cantidad de vacas.

Tamaño	Pequeño		Mediano		Grande		Total	
n	1		12		11		24	
	VO	VM	VO	VM	VO	VM	VO	VM
Media	70	100	188	217.16	573	692.36	359.37	430.08
Mediana	70	100	181	205	435	580	275	340
DE	-	-	67.96	93.18	309.5	353.45	290.86	346.06
Mínimo	70	100	100	40	332	405	70	40
Máximo	70	100	280	340	1260	1500	1260	1500

*VO: vacas en ordeño, VM: vaca masa, DE: desvío estándar.*

Los resultados del cuestionario de caracterización general del manejo en el parto y la crianza se resumen en el Tabla V.

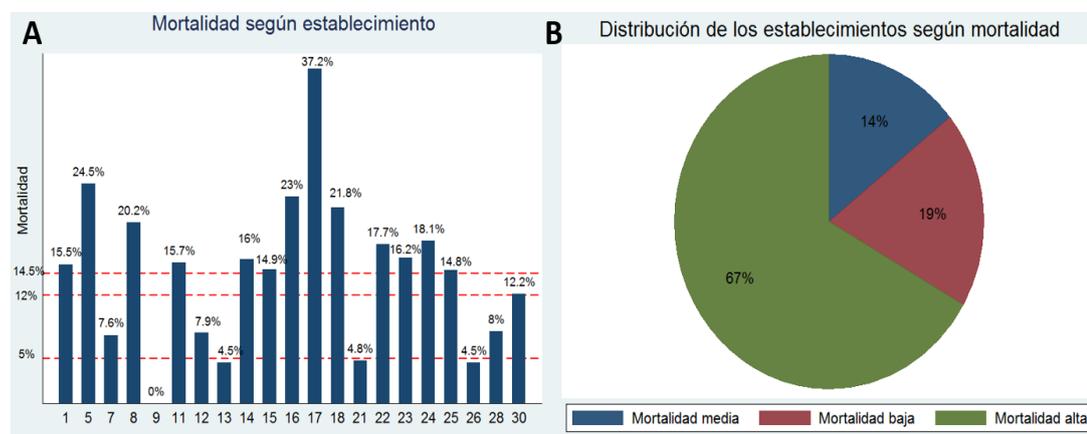
**Tabla V.** Datos generales de manejo del parto y crianza en los establecimientos muestreados.

Variable	Observaciones	%
----------	---------------	---

Preparto	Individual	1	3.70
	Colectivo	26	96.3
	Total establecimientos	27	100
Tiempo al desmadre	< 12 h	11	40.74
	≥ 12 h	16	59.26
	Total establecimientos	27	100
Tipo de calostrado	Natural	14	51.85
	Artificial	13	48.15
	Total establecimientos	27	100
Cantidad de calostro ingerido en las 1° 24 h de vida	Desconoce	10	40
	≤ 4 lts	12	48
	> 4 lts	3	12
	Total establecimientos	25	100
Operario de la crianza	Exclusivo	14	48.28
	Realiza otras tareas	15	51.72
	Total establecimientos	29	100
Sistema utilizado en la crianza	Individual	7	24.14
	Colectivo	14	48.27
	Mixto	8	27.59
	Total establecimientos	29	100
Rotación de la guachera	No	23	79.31
	Si	6	20.69
	Total establecimientos	29	100
Alimenta a los terneros con leche de descarte	No	12	41.4
	Si	17	58.6
	Total establecimientos	29	100
Alimenta a los terneros con sustituto lácteo	No	17	58.6
	Si	12	41.4
	Total establecimientos	29	100

Uso de vacunas contra SDN en el parto	No	16	57.14
	Si	12	42.86
	Total establecimientos	28	100
Aparta los terneros enfermos de los sanos	No	16	55.17
	Si	13	44.83
	Total establecimientos	29	100

Se obtuvo el dato de la tasa de mortalidad anual durante el 2016 (año calendario), de 21 de las 30 crianzas muestreadas. La mortalidad promedio registrada fue de  $14.53 \pm 8.5\%$  con un mínimo de 0 y un máximo de 37.24%. Según la categorización de la tasa de mortalidad [baja ( $\leq 5\%$ ), media (6 al 12%) y alta ( $>12\%$ )], el 67% de los establecimientos tuvieron mortalidades altas (Gráfico 2).



**Gráfico 2. A-** Tasas de mortalidad individual en 21 establecimientos muestreados (cada número en el eje X corresponde a un establecimiento). **B-** Distribución de los establecimientos muestreados según la mortalidad.

### Análisis descriptivo de los animales, examen clínico y de la materia fecal

Del total de 556 muestras, 285 (51.3%) correspondían a terneros no diarreicos y 271 (48.7%) a terneros diarreicos. Al momento del muestreo, los animales examinados y muestreados tenían en promedio  $11.78 \pm 6.67$  días de vida, con un rango de 29 días

(min.: 1; máx.: 30). Según la condición de no diarreico o diarreico, la edad promedio al muestreo fue  $12.63 \pm 7.78$  días y  $10.9 \pm 5.12$  días, respectivamente. Se obtuvo el sexo de los animales muestreados en 486 observaciones, siendo 387 hembras y 99 machos. Además, se registró si los terneros eran hijos de vacas primíparas o multíparas en 229 observaciones, siendo 172 de los terneros muestreados hijos de vacas multíparas, y 57 hijos de vacas primíparas.

Los resultados de los parámetros clínicos evaluados, así como de los grados registrados para cada parámetro, se listan en las Tablas VI y VII.

**Tabla VI.** Parámetros clínicos evaluados en los terneros muestreados.

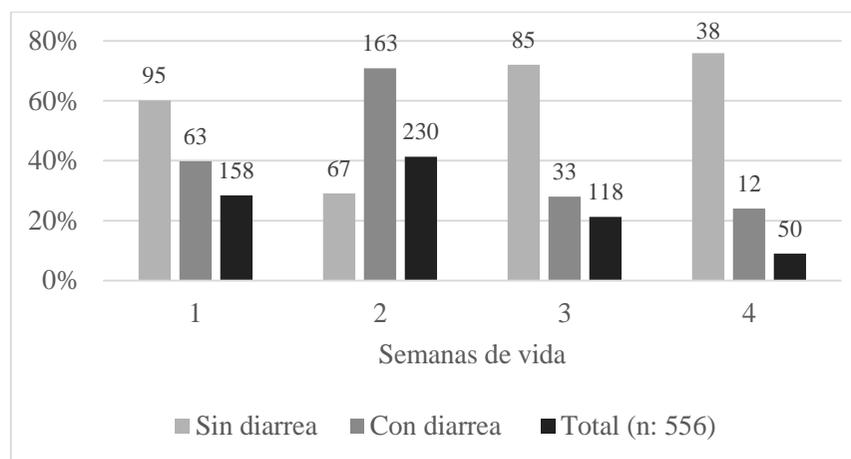
<b>Variable</b>	<b>Obs.</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>	<b>IC 95%</b>	<b>Min.</b>	<b>Max.</b>
<b>TR (°C)</b>	545	39.1	0.659	39.05-39.16	36.2	41.6
Sin diarrea	280	39.04	0.556	38.98-39.11	37	41.3
Con diarrea	265	39.18	0.747	39.09-39.27	36.2	41.6
<b>Pliegue cutáneo (segundos)</b>	545	3.87	1.63	3.74-4.01	0	12
Sin diarrea	283	3.41	1.30	3.26-3.56	0	8
Con diarrea	262	4.38	1.80	4.16-4.6	0	12
<b>Llenado capilar (segundos)</b>	549	4.26	1.45	4.14-4.38	2	12
Sin diarrea	284	3.96	1.09	3.83-4.09	2	10
Con diarrea	265	4.58	1.69	4.38-4.78	2	12
<b>FC (latidos/min)</b>	551	124	30	121.12-126.19	40	220
Sin diarrea	284	126	33	122.3-130.06	40	220
Con diarrea	267	121	27	117.77-124.17	44	216
<b>FR (movimientos respiratorios/min)</b>	502	37	21	35.17-38.83	20	160
Sin diarrea	264	37	18	34.4-38.8	20	128
Con diarrea	238	37	23	34.4-40.4	20	160

*DE: desvío estándar, IC: intervalo de confianza, TR: temperatura rectal, FC: frecuencia cardíaca, FR: frecuencia respiratoria.*

La distribución etaria de los terneros muestreados, según la semana de vida, fue del 28.4% (158/556), 41.4% (230/556), 21.2% (118/556) y 9% (50/556) para la 1°, 2°, 3° y 4° semana de vida, respectivamente. Del total de animales que se encontraba en cada uno de los 4 estratos (semanas), la proporción de animales diarreicos fue del 40% (63/158), 71% (163/230), 28% (33/118) y 24% (12/50), de la primera a la cuarta semana respectivamente, como se muestra en el Gráfico 4. La mayor proporción de animales diarreicos se presentó en la 2° semana.

**Tabla VII.** Distribución de los grados para actitud, incorporación, reflejo de succión, estado del ombligo, descarga ocular y nasal, y materia fecal.

Grados	Actitud		Incorporación		Ref. de succión		Ombligo		Descarga Nasal		Descarga Ocular		Materia fecal	
	(n)	%	(n)	%	(n)	%	(n)	%	(n)	%	(n)	%	(n)	%
<b>0</b>	474	85.7	471	85.2	422	76.6	277	50.5	429	78.6	425	77.7	53	9.5
<b>1</b>	62	11.2	60	10.8	76	13.8	221	40.3	80	14.7%	89	16.3	232	41.7
<b>2</b>	12	2.2	15	2.7	49	8.9	38	6.9	33	6.0	27	4.9	171	30.8
<b>3</b>	5	0.9	7	1.3	4	0.7	13	2.4	4	0.7	6	1.1	100	18.0
<b>Total</b>	553	100	553	100	551	100	549	100	546	100	547	100	556	100



**Gráfico 3.** Distribución etaria de todos los terneros (con y sin diarrea - total) según semanas de vida. Los números sobre las barras corresponden a la cantidad de observaciones por categoría.

El color de la materia fecal se obtuvo de 515 muestras, siendo la distribución la siguiente: 1) blancuzco-amarillento: 25.2% (n: 130), 2) marrón: 49.7% (n: 256), y 3) verde: 25.1% (n: 129). La distribución según la condición de diarreico o no diarreico se muestra en la Tabla VIII.

**Tabla VIII.** Color de la materia fecal según condición de no diarreico – diarreico.

Color	Sin diarrea	%	Con diarrea	%	Total	%
Blancuzco-amarillento	32	12	98	39.2	130	25.2
Marrón	164	61.2	92	36.8	256	49.7
Verde	72	26.8	57	22.8	129	25.1
Total	268		247		515	

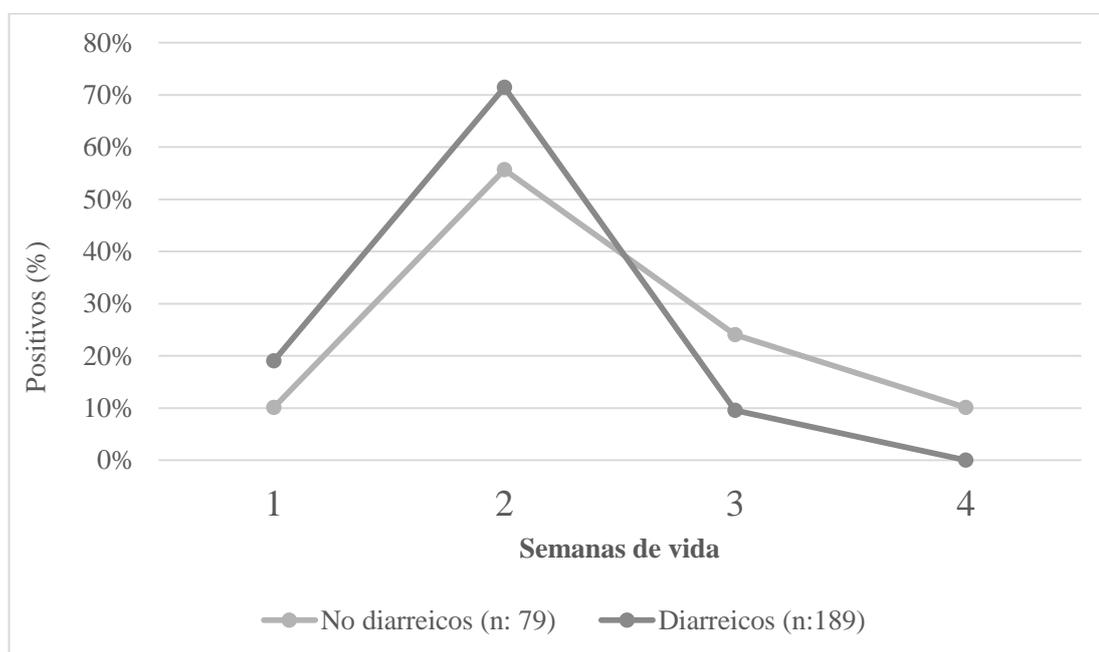
Hubo diferencias significativas en el color de la materia fecal entre animales diarreicos y no diarreicos ( $P < 0.001$ ); estando el color blancuzco-amarillento asociado estadísticamente con diarrea. Las materias fecales de color marrón (OR 0.18, IC 95% 0.11-0.29  $P < 0.001$ ) o verde (OR 0.25, IC 95% 0.15-0.43,  $P < 0.001$ ) se asociaron con MF de grados 0 y 1, es decir sin diarrea. Con respecto a la presencia de mucus en la MF, se detectó en 221 muestras (40.5%, 221/545), de estas 95 (43%) eran MF de terneros sin diarrea y 126 (57%) de terneros con diarrea, estableciéndose una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de mucus en la MF y la manifestación de diarrea (OR 1.76; IC 95% 1.24-2.49;  $P < 0.001$ ). Cuando se analizó la presencia de sangre en la MF (12.5%, 67/537 muestras, 35 eran normales y 32 diarreicas), no hubo diferencias significativas ( $P > 0.8$ ). Se observó fibrina en 30 muestras (5.5%, 30/545), el 76.6% de ellas eran diarreicas (23/30), siendo esta diferencia estadísticamente significativa (OR 3.53; IC 95% 1.48-8.41;  $P < 0.004$ ).

#### **Resultados del ELISA para *Cryptosporidium* spp. y *E. coli* F5+**

Al menos un animal positivo a *Cryptosporidium* spp. fue detectado en el 100% de los establecimientos muestreados (30/30), mientras que *E. coli* F5+ fue detectada en el

16.7% (5/30) de los mismos. El total de animales positivos a *Cryptosporidium* spp. fue 268 (48.2% de 556), mientras que 11 animales fueron positivos a *E. coli* F5 (1,97% de 556). Si sólo consideramos para *E. coli* F5+ los animales menores a 8 días de edad, que representa el grupo considerado de mayor riesgo o susceptibilidad para *E. coli* enterotoxigénica, 9 animales fueron positivos de un total de 158 terneros (5.69%) en esta franja etaria. Se encontraron coinfecciones entre ambos agentes en 3 terneros, sólo uno de los cuales pertenecía al grupo de terneros diarreicos.

De los 268 animales positivos a *Cryptosporidium* spp., 70.5% (189) pertenecía al grupo de terneros diarreicos y 29.5% (79) al grupo de terneros no diarreicos, habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $P < 0.001$ ). La distribución de los animales positivos según la semana de vida fue la siguiente: 16% (44/268), 67% (179/268), 14% (37/268) y 3% (8/268) para la 1°, 2°, 3° y 4° semana, respectivamente. En el Gráfico 5 se puede observar la distribución de los animales positivos a *Cryptosporidium* spp. discriminados por su edad en semanas, de acuerdo a su condición de no diarreicos y diarreicos.



**Gráfico 4.** Distribución de los terneros positivos a *Cryptosporidium* spp. según la semana de vida y su condición de diarreicos o no diarreicos.

De los 11 animales positivos a *E. coli* F5, 6 eran diarreicos y 5 no diarreicos (P 0.7). Teniendo en cuenta solamente los 9 positivos en el grupo de terneros <8 días de vida, 5 eran diarreicos y 4 no diarreicos (P 0.32).

Doscientas ochenta muestras fueron negativas para ambos agentes, 203 correspondían a muestras de terneros sin diarrea y 77 a terneros con diarrea. En 28.4% del total de muestras diarreicas no se detectó ninguno de los dos agentes estudiados.

### **Asociación entre la infección por *Cryptosporidium* spp., *E. coli* F5+ en todos los terneros, y *E. coli* F5+ en terneros <8 días de vida y la manifestación de diarrea**

La infección con *Cryptosporidium* spp. estuvo asociada significativamente con la manifestación de diarrea, los animales infectados tuvieron 6 veces más chances de tener diarrea que los no infectados (OR 6.1, P <0.001). Por otro lado *E. coli* F5+ no estuvo asociada al cuadro diarreico (OR 1.26, P 0.70), incluso cuando fue considerada la población en riesgo (*E. coli* F5+ en terneros <8 días de vida, OR 1.96, P 0.33).

### **Asociaciones entre la manifestación de diarrea y otros parámetros clínicos evaluados**

Durante el análisis bivariado se observó asociación con algunas de las variables relacionadas con el examen físico del animal, así como con la estimación de la concentración sérica de proteínas totales (Tabla VII).

**Tabla IX.** Asociación entre la presentación de diarrea y otros parámetros clínicos.

Variable	Obs.	P Chi <sup>2</sup>	pR <sup>2</sup>	OR	IC 95%	valor P	
Edad al examen	556	0.002	0.0123	<b>0.96</b>	0.93-0.98	<b>0.002</b>	
Semana de vida	556	<0.001	0.1109	Semana 1	Ref		
				Semana 2	<b>3.66</b>	2.39-5.62	<b>&lt;0.001</b>
				Semana 3	<b>0.58</b>	0.35-0.97	<b>&lt; 0.05</b>
				Semana 4	<b>0.47</b>	0.23-0.98	<b>&lt; 0.05</b>
Actitud	553	<0.01	0.0329	Normal	Ref		

				Anormal	<b>5.64</b>	3.12-10.19	<b>&lt;0.001</b>
	553	<0.001	0.0389	Grado 0	Ref		
Incorporación				Grado 1	<b>2.52</b>	1.43-4.45	<b>0.001</b>
				Grado 2	<b>12.6</b>	2.92-54.71	<b>0.001</b>
	551	<0.001	0.0215	Grado 0	Ref		
Reflejo de succión				Grado 1	1.29	0.79-2.11	0.29
				Grado 2	<b>3.43</b>	1.81-6.51	<b>&lt;0.001</b>
	549	0.06	0.0045	No	Ref		
Onfalitis				Si	<b>1.73</b>	0.96-3.12	<b>0.067</b>
	545	<0.01	0.0374	No	Ref		
Pliegue cutáneo >5 segundos				Si	<b>2.77</b>	1.88-4.07	<b>&lt;0.01</b>
	549	<0.001	0.0284	No	Ref		
Tiempo de llenado capilar >5 segundos				Si	<b>3.26</b>	1.93-5.51	<b>&lt;0.01</b>
	545	<0.01	0.0289	Normotermia	Ref		
Temperatura rectal				Hipertermia	<b>2.50</b>	1.69-3.72	<b>&lt;0.01</b>
	96	<0.02	0.044		<b>0.55</b>	0.33-0.91	<b>&lt;0.03</b>
Proteínas séricas totales				Ausencia	Ref		
	537	0.001	0.0139	Presencia	<b>1.76</b>	1.24-2.49	<b>0.001</b>
Mucus en MF				Ausencia	Ref		
	545	0.001	0.0135	Presencia	<b>3.64</b>	1.53-8.65	<b>0.003</b>
Fibrina en MF				Blancuzco o amarillento	Ref		
	518	<0.01	0.0826	Marrón	<b>0.17</b>	0.11-0.28	<b>&lt;0.001</b>
Color MF				Verde	<b>0.25</b>	0.14-0.4	<b>&lt;0.001</b>

Resumidamente, hubo una asociación estadísticamente significativa entre la semana de vida, la actitud, la incorporación, el reflejo de succión, el tiempo de retorno del pliegue cutáneo y el tiempo de llenado capilar >5 segundos, la concentración de proteínas séricas totales, la presencia de mucus y fibrina en la MF, y el color blancuzco-amarillento de la MF con la manifestación de diarrea. Aunque no fue estadísticamente significativo, hubo una tendencia en los animales con onfalitis a tener mayores chances de presentar diarrea.

Cuando se analizaron los datos recopilados del cuestionario, solo hubo una tendencia en los establecimientos con prepartos colectivos a estar asociados con diarrea (OR 3.23, IC 95% 0.88-11.91, P 0.077). El resto de las variables evaluadas no fueron estadísticamente significativas.

#### **Asociaciones entre los parámetros clínicos evaluados, factores de manejo e infección con *Cryptosporidium* spp.**

Durante el análisis bivariado se observó una asociación estadística entre la infección por *Cryptosporidium* spp. y los días de vida que tenían los animales al momento del examen clínico (OR 0.97, IC 95% 0.94-0.99, P <0.04), la actitud anormal (OR 1.71, IC 95% 1.05-2.77, P 0.03), la semana de vida (semana 2: OR 9.09, IC 95% 5.70-14.50, P <0.001), la duración del pliegue cutáneo >5 segundos (OR 2.05, IC 95% 1.40-2.98, P <0.01), el tiempo de llenado capilar >5 segundos (OR 3.09, IC 95% 1.84-5.19, P <0.01), la frecuencia cardiaca elevada (OR 0.73, IC 95% 0.51-1.07, P 0.083), la elevada frecuencia respiratoria (OR 0.61, IC 95% 0.41-0.88, P 0.009), la temperatura rectal >39.5°C (OR 1.63, IC 95% 1.11-2.39, P <0.02), el grado de la MF (grado 2: OR 8.5, IC 95% 4.06-17.79, P <0.01; grado 3: OR 9.34, IC 95% 4.23-20.63, P <0.01), la diarrea (OR 6, IC 95% 4.16-8.67, P <0.01) y al color blancuzco-amarillento de la MF (Marrón: OR 0.52, P 0.03; Verde: OR 0.59, P <0.04).

Con respecto al manejo que se realizaba en los establecimientos, hubo una tendencia positiva en los establecimientos en donde la guachera se rotaba, así como en donde se suministraba leche de descarte a los terneros. La administración de sustituto lácteo se comportó como un factor de protección para la infección por *Cryptosporidium* spp. (Tabla X).

**Tabla X.** Asociaciones entre factores de manejo e infección con *Cryptosporidium* spp.

Variable	Obs.	P Chi <sup>2</sup>	pR <sup>2</sup>		OR	IC 95%	valor P
Rotación de la guachera	536	0.097	0.0037	No	Ref		
				Si	<b>1.42</b>	0.93-2.16	<b>0.098</b>
Suministro de leche de descarte	536	0.102	0.0036	No	Ref		
				Si	<b>1.33</b>	0.94-1.87	<b>0.10</b>
Suministro de sustituto lácteo	536	0.10	0.0036	No	Ref		
				Si	<b>0.75</b>	0.53-1.05	<b>0.10</b>

Se corrieron regresiones lineales simples por cada establecimiento en particular para ver la asociación entre diarrea y la presencia de animales positivos a *Cryptosporidium* spp., encontrándose asociaciones estadísticamente significativas en 12 de ellos, como muestra la Tabla XI.

**Tabla XI.** Asociación entre la presentación de diarrea y *Cryptosporidium* spp. por establecimiento.

Establecimiento	Obs.	P Chi <sup>2</sup>	pR <sup>2</sup>	Diarrea	OR	IC 95%	valor P
Establecimiento 1	29	0.0376	0.1076	No	Ref		
				Si	<b>4.99</b>	1.03-27.27	<b>0.046</b>
Establecimiento 2	20	0.0001	0.5310	No	Ref		
				Si	<b>81</b>	4.36-1504.4	<b>0.003</b>
Establecimiento 3	20	0.0213	0.1912	No	Ref		
				Si	<b>9.33</b>	1.19-72.99	<b>0.033</b>
Establecimiento 5	22	0.0082	0.2307	No	Ref		
				Si	<b>12</b>	1.58-91.08	<b>0.016</b>
Establecimiento 7	20	0.0148	0.2141	No	Ref		
				Si	<b>13.5</b>	1.19-152.21	<b>0.035</b>
Establecimiento 9	20	0.0042	0.2958	No	Ref		

				Si	<b>21</b>	1.77-248.10	<b>0.016</b>
Establecimiento 11	21	0.0082	0.2404	No	Ref		
				Si	<b>15.75</b>	1.42-174.24	<b>0.025</b>
Establecimiento 13	20	0.0042	0.2958	No	Ref		
				Si	<b>21</b>	1.77-248.10	<b>0.016</b>
Establecimiento 14	20	0.0437	0.1468	No	Ref		
				Si	<b>9</b>	0.80-100.13	<b>0.074</b>
Establecimiento 20	20	0.006	0.2746	No	Ref		
				Si	<b>15.75</b>	1.75-141.40	<b>0.014</b>
Establecimiento 23	20	0.0213	0.1912	No	Ref		
				Si	<b>9.33</b>	1.19-72.99	<b>0.033</b>
Establecimiento 29	20	0.0213	0.1912	No	Ref		
				Si	<b>9.33</b>	1.19-72.99	<b>0.033</b>

### Asociaciones entre los parámetros clínicos evaluados, factores de manejo e infección por *E. coli* F5+

Con respecto a *E. coli* F5+, se analizaron las mismas variables que para *Cryptosporidium* spp. La infección por *E. coli* F5+ sólo se asoció significativamente con los días de vida al momento del examen clínico (OR 0.74, IC 95% 0.62-0.89, P 0.01). Respecto de la semana de vida, los animales en la 2° (OR 0.07, IC 95% 0.01-0.55, P <0.02) y 3° (OR 0.14, IC 95% 0.01-1.13, P 0.06) semanas tuvieron 93% y 86% menos chances de ser positivos, respectivamente.

Cuando se realizó el análisis bivariado con los factores de manejo, se observó una asociación con el tipo de calostrado, resultando que los animales que eran calostrados artificialmente tenían más chances de estar infectados con *E. coli* F5+ (OR 9.09, IC 95% 1.15-71.59, P <0.04). Otra variable que se asoció estadísticamente con la infección fue el uso de vacunas contra el SDN en el parto (OR 11.76, IC 95% 1.49-92.60, P <0.02) y el aparte de animales enfermos (OR 5.55, IC 95% 1.18-25.95, P <0.03). Con respecto a la administración de menos de 4 litros de calostro en la 1° toma (OR 6.67, IC 95% 0.83-53.23, P 0.07) y el uso de sustituto lácteo en la dieta (OR 3.69, IC 95% 0.96-14.09, P 0.055), hubo una tendencia hacia la asociación con la infección

por *E. coli* F5+. La estrategia de permitir que los terneros permanezcan con sus madres por más de 12 h (OR 0.18, IC 95% 0.04-0.87, P <0.04) y la administración de leche de descarte (OR 0.27, IC 95% 0.07-1.03, P 0.055) se asociaron con protección ante esta infección, aunque este último no fue estadísticamente significativo (Anexo IV). La variable “tamaño del rodeo” (cantidad de vacas) se re-categorizó en dos: pequeño-mediano (n: 13) y grande (n: 11), debido a las pocas observaciones que tenía la categoría “pequeño” (n: 1). Con esta nueva variable, los establecimientos grandes tuvieron 10.5 veces más chances de tener animales positivos a *E. coli* F5+ (OR 10.5, IC 95% 1.33-82.83, P <0.03).

### ***E. coli* F5+ en terneros <8 días de vida**

A partir de la variable *E. coli* se generó la variable “*E. coli* F5+ en terneros <8 días de vida”, la cual, como su nombre lo indica, nuclea sólo los terneros de esa edad, que se consideran población en riesgo para este agente. Se repitieron los mismos análisis que los realizados con la variable *E. coli* F5+ original en todos los animales muestreados. En el análisis bivariado sólo hubo una asociación con los días de vida que tenía el animal al momento del examen (OR 0.62, IC 95% 0.41-0.93, P <0.03), cuanto más grande era el animal en edad al momento del muestreo, tenía menos chances de ser positivo a este agente.

Cuando se realizó el análisis bivariado buscando asociaciones con los datos generales del establecimiento, se observaron tendencias con respecto a la dieta láctea. Los terneros tenían mayores chances de ser positivos para este patógeno (OR 4.2, IC 95% 0.84-20.91, P 0.08) cuando se suministraba sustituto lácteo, en cambio la administración de leche de descarte se portó como un factor de protección (Tabla XII).

**Tabla XII.** Asociación entre infección por *E. coli* F5+ en terneros <8 días de vida y el suministro de leche de descarte o sustituto lácteo.

Variable	Obs.	P Chi <sup>2</sup>	pR <sup>2</sup>		OR	IC 95%	valor P
Leche de descarte	152	0.0543	0.0542	No	Ref.		
				Si	<b>0.23</b>	0.05-1.18	<b>0.08</b>

Sustituto lácteo	152	0.0543	0.0542	No	Ref.		
				Si	<b>4.2</b>	0.084-20.91	<b>0.08</b>

### Asociaciones entre distintas variables y la muerte

Se obtuvo el dato de la muerte durante el periodo de crianza de 42 terneros de un total de 398, lo que corresponde al dato fehaciente de 20 establecimientos que completaron esa sección del cuestionario. El promedio de edad a la muerte fue de  $16 \pm 8.3$  días, con un mínimo de 2 y un máximo de 37 días. Cuando se discriminó por el estado de no diarreico o diarreico, el promedio de días a la muerte fue de 17 y 16, respectivamente. Del total de muertos, el 62% (26/42) había presentado diarrea durante el muestreo, habiendo una tendencia cuando se analizó entre diarreicos y no diarreicos (P 0.1). En el análisis bivariado se observó que los animales que habían presentado una actitud anormal, dificultades en la incorporación y reflejo de succión débil, tenían mayores chances de morir. El tiempo de llenado capilar >5 segundos, la frecuencia respiratoria y la temperatura rectal elevada también se asociaron positivamente con la muerte. Los resultados se muestran en la Tabla XIII.

**Tabla XIII.** Asociaciones entre las distintas variables clínicas y la muerte.

Variable	Obs.	P Chi <sup>2</sup>	pR <sup>2</sup>	OR	IC 95%	valor P	
Edad al examen	398	<0.05	0.0151	<b>0.95</b>	0.90-1.00	<b>0.054</b>	
Actitud	395	<0.002	0.0373	Normal	Ref		
				Anormal	<b>3.50</b>	1.68-7.29	<b>0.001</b>
Incorporación	395	<0.01	0.0351	Grado 0	Ref		
				Grado 1	<b>2.75</b>	1.43-4.45	<b>0.022</b>
				Grado 2	<b>4.45</b>	1.46-13.52	<b>0.008</b>
Reflejo de succión	393	0.052	0.0225	Grado 0	Ref		
				Grado 1	2.07	0.88-4.88	0.095
				Grado 2	<b>2.82</b>	1.12-7.10	<b>0.03</b>
Tiempo de llenado capilar >5 segundos	392	0.086	0.0112	No	Ref		
				Si	<b>2.03</b>	0.93-4.42	<b>0.07</b>
Frecuencia respiratoria	357	<0.001	0.058	Normal	Ref		
				Alta	<b>4.93</b>	1.88-12.91	<b>0.003</b>

Temperatura rectal	393	0.004	0.0311	Normotermia	Ref		
				Hipertermia	<b>2.75</b>	1.40-5.40	<b>0.003</b>
Diarrea	398	0.10	0.01	Ausencia	Ref		
				Presencia	<b>1.71</b>	0.89-3.31	<b>0.10</b>

Se procedió de la misma manera para evaluar la existencia de posibles asociaciones entre la muerte de los animales y los factores de manejo, como así también los resultados del ELISA para *Cryptosporidium* spp. y *E. coli* F5+. Con respecto a los factores de manejo, los resultados del análisis bivariado se resumen en la Tabla XIV.

**Tabla XIV.** Asociación entre la muerte de los animales y los factores de manejo.

Variable	Obs.	P Chi <sup>2</sup>	pR <sup>2</sup>		OR	IC 95%	valor P
Tiempo al desmadre	358	<0.001	0.0553	<12 h	Ref		
				≥12 h	<b>0.27</b>	0.13-0.55	<b>&lt;0.001</b>
Tipo de calostrado	358	<0.01	0.0313	Natural	Ref		
				Artificial	<b>2.66</b>	1.31-5.38	<b>0.006</b>
Operario de crianza	398	<0.001	0.0536	Exclusivo	Ref		
				Otras tareas	<b>3.87</b>	1.80-8.34	<b>0.001</b>
Tipo de sistema de crianza utilizado	398	<0.001	0.0530	Individual	Ref		
				Colectivo	<b>4.60</b>	0.47-5.02	<b>0.006</b>
				Mixto	1.55	0.47-5.02	0.46
Rota la guachera	398	<0.001	0.0685	No	Ref		
				Si	<b>0.06</b>	0.01-0.46	<b>0.007</b>
Suministro de leche de descarte	398	<0.001	0.0925	No	Ref		
				Si	<b>0.17</b>	0.08-0.37	<b>&lt;0.001</b>
	398	<0.001	0.0925	No	Ref		

Suministro de sustituto lácteo				Si	<b>5.79</b>	2.68-12.47	<b>&lt;0.001</b>
Uso de vacunas contra el SDN en el parto	378	<0.001	0.0977	No	Ref		
				Si	<b>5.71</b>	2.76-11.78	<b>&lt;0.001</b>
Score de mortalidad	398	<0.001	0.0532	Baja-Media	Ref		
				Alta	<b>5.33</b>	1.86-15.28	<b>0.002</b>
Tamaño del rodeo	359	<0.001	0.1962	Pequeño-mediano	Ref		
				Grande	<b>27.14</b>	6.42-114.70	<b>&lt;0.001</b>

Las variables que se asociaron con un mayor riesgo de muerte fueron: el calostrado artificial, que el guachero realice múltiples tareas laborales, el tipo de sistema de crianza colectivo, el uso de sustituto lácteo, la vacunación de las madres en el parto contra el SDN, los establecimientos con alta tasa de mortalidad y el tamaño del rodeo grande (número de vacas). El separar al ternero después de las 12 h de vida, el rotar la guachera, y el suministro de leche de descarte se comportaron como factores de protección. Con respecto a la asociación entre los enteropatógenos y la muerte, hubo una tendencia con *Cryptosporidium* spp. (Tabla XV).

**Tabla XV.** Asociación entre la muerte de los animales y los enteropatógenos.

Variable	Obs.	P Chi <sup>2</sup>	pR <sup>2</sup>		OR	IC 95%	valor P
<i>Cryptosporidium</i> spp.	398	0.16	0.0074	No	Ref		
				Si	<b>1.59</b>	0.83-3.04	<b>0.162</b>
<i>E. coli</i> F5+	398	0.94	0.00	No	Ref		
				Si	0.94	0.11-7.61	0.95
<i>E. coli</i> F5+ en terneros <8 días de vida	106	0.95	0.00	No	Ref		
				Si	0.93	0.10-8.22	0.95

### Asociación entre diarrea y transferencia de la inmunidad pasiva

Mediante una prueba t de Student se evaluó la variable proteínas séricas totales en 97 animales menores a los 8 días de vida con (n: 42) y sin diarrea (n: 55), y hubo una diferencia estadísticamente significativa entre animales diarreicos y no diarreicos (5.39 vs 5.83 mg/dl, P 0.015). Se categorizó a las proteínas totales séricas en 3 niveles, correspondientes con transferencia pasiva exitosa, moderada o fallida. Al no cumplir con uno de los supuestos del test de  $\chi^2$  (sólo 20% de las frecuencias esperadas < a 5), se procedió a realizar el test de Fisher, no encontrándose diferencias significativas, aunque sí una tendencia (Fisher, F 0.085). Se realizó una regresión logística con la variable resultado diarrea-no diarrea y la variable de proteínas totales categorizada, a pesar de no ser significativo el valor P del modelo (P 0.089), sí se observó una tendencia y los coeficientes expresados eran significativos para una transferencia exitosa de la inmunidad pasiva (OR 0.38, IC 95% 0.16-0.91, P 0.03). Los terneros que no tenían un nivel de proteínas séricas totales indicativo de transferencia exitosa de la inmunidad pasiva, tuvieron 62% más chances de presentar diarrea.

#### **Grado de concordancia e índice Kappa entre el ELISA y la tinción de auramina-fenol para *Cryptosporidium* spp.**

Se analizaron por ambas técnicas un total de 281 muestras, los resultados se expresan en la Tabla XVI.

**Tabla XVI.** Tabla de contingencia entre el ELISA y la tinción de auramina-fenol para *Cryptosporidium* spp.

		ELISA <i>Cryptosporidium</i> spp.		
		Negativo	Positivo	Total
Auramina-fenol	Negativo	117	9	126
	Positivo	31	124	155
	Total	148	133	281

Ambas técnicas acordaron en el 85.77% y 71.7% (Kappa 0.72) de las muestras en acuerdo aleatorio y perfecto, respectivamente. El acuerdo esperado fue del 49.7%, que

es el valor que podemos esperar de acuerdo entre ambas pruebas (que coincidan el 50% de las veces). El índice Kappa de 0.72 indica una buena concordancia, que es significativamente distinta de la esperada por el azar ( $P < 0.01$ ).

## DISCUSIÓN

El SDN es un síndrome multifactorial de alta relevancia para la ganadería a nivel mundial. Entre los principales agentes infecciosos/parasitarios involucrados desde el punto de vista etiológico, se encuentran bacterias (*E. coli* enterotoxigénica y enteropatógena, *Salmonella* spp.), virus (rotavirus grupo A, coronavirus bovino, entre otros) y protozoos (*Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp.) (de la Fuente et al. 1998; Uzal et al. 2015). Dada la importancia socio-económica de la actividad lechera en Uruguay (MGAP 2016), y de la alta frecuencia relativa de diarrea y mortalidad en bovinos lecheros neonatos (Carlos Schild, tesis de maestría en salud animal, UDELAR, comunicación personal 2017), este estudio se enfocó en dos de los agentes etiológicos del SDN, *Cryptosporidium* spp. y *E. coli* F5+, en rodeos comerciales lecheros del país.

La relevancia de estos dos agentes radica en que se han asociado con importantes pérdidas económicas, tanto directas como indirectas, para la ganadería (de Graaf et al. 1999; Naciri et al. 1999; Bartels et al. 2010), y, además, en el caso de *Cryptosporidium* spp., con su potencial zoonótico (Amer et al. 2013; Ryan et al. 2014). Hasta el momento de ejecución de este proyecto, no había en Uruguay antecedentes bibliográficos de criptosporidiosis bovina, aunque sí escasas descripciones de criptosporidiosis humana (Schelotto et al. 1991; Torres et al. 2001), ni tampoco de infección por *E. coli* enterotoxigénica en terneros. Durante el desarrollo del mismo, se publicó un estudio de genotipificación de cepas de *E. coli* obtenidas de terneros con diarrea neonatal, incluyendo *E. coli* F5+ (Umpiérrez et al. 2016).

Pudimos determinar que en 100% de los 30 establecimientos muestreados había, por lo menos, un animal positivo a *Cryptosporidium* spp. Esto indica que el agente es endémico en bovinos de Uruguay, con una amplia distribución en, al menos, 7 departamentos del país, en concordancia con otros trabajos que han reportado a este agente como un enteropatógeno común entre los terneros de guachera en otras latitudes

(de la Fuente et al. 1999; Trotz-Williams et al. 2005; Garro et al. 2016). El 48.2% de los 556 terneros en nuestro estudio fueron positivos a *Cryptosporidium* spp. Este valor es similar al observado en otros países como España (47.9%) y Suecia (44.9%) (Castro-Hermida et al. 2002a; Silverlas et al. 2010), pero mayor que el reportado en Argentina (16.3-17.1%) (Del Coco et al. 2008; Garro et al. 2016). Por otra parte, en Brasil, se han encontrado prevalencias que van desde el 0.6 al 72.13% (Meireles 2010). Nuestros resultados indican, no sólo que la infección es endémica en Uruguay, sino que la frecuencia de infección en bovinos neonatos es relativamente alta, al menos en la población que fue objeto de estudio en esta tesis.

La frecuencia de detección de *E. coli* F5+ fue relativamente baja (1.97%), aunque un poco mayor a la observada por Umpiérrez et al. (2016) en Uruguay. En ese estudio se examinaron 86 muestras de materia fecal de terneros (70 diarreicos y 16 no diarreicos) y se aislaron 298 cepas de *E. coli*, de las cuales, por PCR, sólo 2 (0.7%) fueron positivas para el gen *f5*. Sin embargo, ya que los terneros son susceptibles al agente y lo eliminan principalmente durante los primeros días de vida (Foster & Smith 2009), la frecuencia relativa de *E. coli* F5+ podría estar subestimada si se consideran terneros de mayor edad. Por ejemplo, en nuestro estudio, si sólo consideramos la población en riesgo (158 terneros en sus primeros 8 días de vida), el porcentaje de terneros infectados con este agente asciende a 5.69%.

Debido a que en este estudio estimamos las frecuencias aparentes de infección, cabe hacer un comentario respecto de la sensibilidad y especificidad de las pruebas usadas. En el prospecto del kit de ELISA no están indicadas la sensibilidad ni especificidad de la prueba para ambos patógenos. Sin embargo, durante el proceso de validación del kit comercial, el fabricante realizó una comparación entre los resultados obtenidos con esta técnica sobre 21 muestras de terneros diarreicos, con aquellos obtenidos con técnicas de alta sensibilidad y especificidad, como el PCR para cada uno de los agentes, sobre las mismas muestras. En el caso de *Cryptosporidium* spp. la concordancia entre ELISA y PCR fue de 85.71%, mientras que para el caso de *E. coli* F5+, la misma fue de 90.48% (André Broes, Biovet Inc., Canadá, comunicación personal 2014). En otro estudio, Cho et al. (2012), evaluaron un kit diagnóstico que utiliza una tecnología similar producido por el mismo fabricante (Bovine Entericheck, Biovet, Inc.) en comparación con un PCR multiplex para varios agentes causales de

diarrea neonatal bovina. Sobre 100 muestras analizadas, determinaron una concordancia entre el ELISA y el PCR multiplex de 84% para *Cryptosporidium* spp. y de 82.3% para *E. coli* F5+. Asimismo, en el mismo estudio reportaron una sensibilidad de 81.5% y 71.4% y una especificidad de 100% y 98.6% para *Cryptosporidium* spp. y *E. coli* F5+, respectivamente, y concluyeron que la prueba de ELISA es de utilidad para detectar en forma rápida estos agentes en terneros con diarrea. Por otro lado, Larsson (2013) estimó la sensibilidad y especificidad para *Cryptosporidium* spp. utilizando el mismo kit de ELISA que fue usado en este estudio, siendo estas de 82% y 100%, respectivamente.

Si tenemos en cuenta estos valores de sensibilidad de la prueba, es probable que en nuestro estudio las frecuencias aparentes de infección hayan sido subestimadas para ambos agentes. Respecto de *Cryptosporidium* spp., en paralelo con el ELISA, se realizó la coloración de auramina-fenol para detección de ooquistes en frotis de materia fecal (ver más abajo). Para el caso de *E. coli* F5+, algunas de las muestras de materia fecal que resultaron positivas a este antígeno por ELISA, fueron cultivadas en el laboratorio de bacteriología de INIA La Estanzuela, y las cepas de *E. coli* aisladas se derivaron para genotipificación al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (datos no mostrados). Allí, las cepas fueron analizadas por PCR en busca del gen *f5* siguiendo la metodología descrita por Umpiérrez et al. (2016), siendo positivas (Ana Umpiérrez, comunicación personal 2017). Por lo tanto, debido a que la especificidad de la prueba es alta en ambos casos, es poco probable que se hayan computado un gran número de falsos positivos.

En nuestro estudio, los terneros positivos a *Cryptosporidium* spp. tuvieron 6 veces más chances de presentar diarrea que los no diarreicos, principalmente en la 2° semana de vida. En trabajos anteriores, varios autores han obtenido resultados similares, tanto en la asociación con diarrea, como en la franja etaria (Naciri et al. 1999; Trotz-Williams et al. 2005; Trotz-Williams et al. 2007). Aunque esta asociación era de sospecharse, nuestros resultados confirman la presencia del parásito y su asociación con la diarrea en los establecimientos muestreados.

En 12 de los 30 focos de SDN en este estudio hubo una asociación estadística entre los animales infectados por *Cryptosporidium* spp. y la manifestación de diarrea, por lo que podemos atribuirlo como causa importante de brotes de diarrea en establecimientos

lecheros uruguayos. Los terneros con criptosporidiosis mayoritariamente presentan diarrea como único signo clínico, aunque también puede haber dolor abdominal, depresión, deshidratación y anorexia (Naciri et al. 1999). La diarrea es resultado de la colonización del intestino (borde apical de los enterocitos) por parte del parásito, el daño epitelial resulta en una atrofia de las vellosidades, con destrucción de las microvellosidades (de Graaf et al. 1999). El daño de la mucosa intestinal y la atrofia de las vellosidades culmina en una diarrea por mala digestión/absorción, la cual puede variar en severidad (Foster & Smith 2009).

Algunas de las variables clínicas que fueron significativas para *Cryptosporidium* spp. también lo fueron para la diarrea, resultado esperable teniendo en cuenta su asociación. Estas incluyeron las relacionadas con el porcentaje de deshidratación de los animales, tales como la duración del pliegue cutáneo y el tiempo de llenado capilar >5 segundos, y la actitud anormal de los terneros. La temperatura rectal elevada, también fue estadísticamente significativa en ambas variables (infección por *Cryptosporidium* spp. y manifestación de diarrea). La hipertermia es una respuesta fisiológica del organismo ante diferentes condiciones (infecciosas, inflamatorias, inmunológicas, neoplásicas o injuriosas), siendo las causas infecciosas las de mayor frecuencia en rumiantes (Fecteau & White 2015).

Se ha descrito que la materia fecal de los terneros con diarrea por *Cryptosporidium* spp. es de color blanco amarillenta con mucus (Olson et al. 2004). Esto coincide en parte con lo encontrado en este trabajo, en el que *Cryptosporidium* spp. se asoció significativamente al color blancuzco-amarillento de la materia fecal, pero no así con la presencia de mucus. Sí se observó una asociación significativa entre el cuadro diarreico y la presencia de mucus y/o fibrina en la materia fecal, independientemente del color. La presencia de mucus y fibrina es común en procesos inflamatorios del intestino (House et al. 2015). Ante injurias, la hipersecreción de mucus es una barrera de defensa, impidiendo la adhesión de patógenos y el daño de toxinas (Gelberg et al. 2016). Con respecto al color, los terneros se comportan como monogástricos durante las primeras semanas de vida, siendo la dieta líquida (leche – sustituto lácteo) su principal fuente de nutrientes. El daño de la mucosa intestinal genera un trastorno en la digestión, por lo que alimento sin digerir llega a porciones distales del tracto

gastrointestinal (Smith 1962) conservando su color original y un mayor porcentaje de agua que la materia fecal normal, siendo esta una posible explicación de su color.

Pese a que durante el análisis general y de los establecimientos en particular *Cryptosporidium* spp. se asoció con la diarrea, no hubo asociación, aunque sí una tendencia, con la muerte de los animales. Según Naciri et al. (1999) la morbilidad suele ser variable y la mortalidad baja, aunque ante determinadas circunstancias coexistentes, como bajos niveles de selenio, una nutrición inadecuada, coinfecciones con otros patógenos y algunas prácticas puntuales de manejo, puede ser alta (Olson et al. 2004). Otros estudios indican que la eliminación fecal de *Cryptosporidium* spp. está asociada con mayor riesgo de mortalidad en terneros neonatos (Delafosse et al. 2015). Dependiendo de la intensidad de la diarrea, ésta trae aparejada un desmejoramiento general en la actitud y estado de los animales, por lo que los terneros afectados son más susceptibles para hacer frente a cualquier evento adverso, ya sea de índole infeccioso, nutricional y/o climático.

Cuando se analizaron las variables relacionadas al manejo, un resultado llamativo fue que en los establecimientos donde el sitio de la guachera era cambiado de lugar (rotación) los animales tuvieron más chances de ser positivos a *Cryptosporidium* spp. Una posible explicación a este resultado podría ser que la rotación de las guacheras es una medida de manejo adoptada en establecimientos donde hay problemas instaurados de diarrea neonatal (Trotz-Williams et al. 2008), o que debido a la resistencia que tiene la forma infectiva del parásito, tanto al ambiente como a los desinfectantes comúnmente utilizados, quede una carga infectiva remanente para la próxima cohorte de terneros, ya que estos son grandes eliminadores de ooquistes (Fayer et al. 1998) y que la dosis infectiva puede ser tan baja como 10 ooquistes (Zambrisky et al. 2013).

El sustituto lácteo tiene poco riesgo de estar contaminado cuando se lo almacena y prepara de manera correcta, y se lo suministra con equipos adecuadamente limpios (McGuirk 2008). En este estudio, los terneros que eran alimentados con este tipo de alimento tuvieron 25% menos chances de ser positivos a *Cryptosporidium* spp. que los alimentados con leche de descarte. Esto se ha observado también en otros estudios, estando asociado con una menor eliminación de ooquistes (Mohammed et al. 1999), aunque en otros trabajos no se vieron diferencias significativas entre la administración de sustituto lácteo y la eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (Trotz-

William et al. 2008). Esto permite especular que la alimentación con sustituto lácteo podría ser una medida a tomar para reducir las chances de infección con *Cryptosporidium* spp. en guacheras comerciales.

Al igual que lo observado por otros autores (Naciri et al. 1999; Garro et al. 2016), en este estudio un animal de 3 días de vida fue positivo a *Cryptosporidium* spp., lo que sugiere que la infección puede ocurrir inmediatamente luego del nacimiento y concuerda con el período prepatente del parásito de 3 a 6 días (Fayer et al. 1998; de Graaf et al. 1999). Castro-Hermida et al. (2002b) detectaron vacas eliminando ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en el periparto, lo que sugiere que las vacas podrían ser fuente de infección para los terneros. Sin embargo, existe evidencia que indica que los bovinos adultos se ven predominantemente infectados con especies distintas de *Cryptosporidium* spp. que las que infectan a los terneros neonatos (principalmente *C. parvum*), por lo tanto, el rol de los bovinos adultos como fuente de infección para los terneros merece ser mejor estudiado, considerando la identificación molecular a nivel de subtipo (Faubert & Litvinsky 2000; Amer et al. 2013). Por esto, retirar a los terneros de sus madres inmediatamente luego del parto (desmadre), evita el contacto directo con la materia fecal y los patógenos por ella transmitida. Pese a que en nuestro estudio no se encontraron diferencias entre aquellos establecimientos donde el tiempo al desmadre era menor a las 12 h de vida, el desmadre temprano es una práctica altamente recomendada para prevenir el SDN.

La interpretación de los resultados para *E. coli* F5+ deben ser realizada con recaudo por varios motivos: 1) la frecuencia de detección del patógeno fue baja, 2) sólo se detectó en 5/30 establecimientos, en los cuales el manejo difería poco, y 3) el 63.6% (7/11) de los casos correspondieron a un solo establecimiento (Anexo IV). La infección por *E. coli* F5+ sólo se asoció con la edad del ternero, a mayor edad menos chances de ser positivo. Los animales mayores a los 7 días de vida tuvieron menos riesgo de infectarse, lo que se condice con la bibliografía (Blanchard 2012), aunque esta condición no es excluyente y se pueden encontrar animales infectados de mayor edad (Bartels et al. 2010), generalmente en coinfección con otros patógenos. Con respecto al manejo que se realizaba en los establecimientos, el calostro artificial, la cantidad de calostro suministrada en las primeras 24 h de vida, el aparte de animales enfermos, y el uso de vacunas para prevenir el SDN en las vacas gestantes, se asociaron

con un mayor riesgo de infección por *E. coli* F5+. Estas son prácticas de manejo adoptadas frecuentemente en establecimientos con problemas instaurados de diarrea neonatal (Abuelo 2016), por lo que queda la duda de si esta asociación es primaria o secundaria a la implementación de las mismas.

Al contrario de lo que ocurría con *Cryptosporidium* spp., la administración de sustituto lácteo se comportó como un factor de riesgo para la infección por *E. coli* F5+, esto podría ser debido a: 1) una menor composición nutricional del sustituto lácteo (fallas en la preparación, calidad de la fuente de proteína, etc.) lo que predispondría a una mayor susceptibilidad a diferentes enfermedades debido a subnutrición; 2) contaminación del sustituto lácteo o agua usada para disolverlo por *E. coli*, y/o 3) un aumento del pH abomasal lo que permitiría que estos patógenos sorteen esta primera barrera de defensa, lleguen al intestino y colonicen los enterocitos, lo que representa una condición necesaria para la patogenia (Constable et al. 2005). La utilización de leche de descarte para alimentar a los terneros se comportó como un factor de protección ante la infección por *E. coli* F5+. Al Mawly et al. (2015) observaron que los animales alimentados con leche de descarte tuvieron menores probabilidades de desarrollar diarrea. Los sustitutos lácteos no tienen un valor nutricional tan alto como el de la leche. Aunque la leche de descarte puede variar en su composición nutricional con respecto a la leche que se remite a las plantas de procesamiento lácteo (Moore et al. 2009), generalmente en los manejos en que se utiliza leche de descarte para alimentar terneros, ésta suele representar solo una fracción del total de la dieta líquida, el volumen restante se suele completar con leche de buena calidad. En nuestro estudio, no contemplamos qué porcentaje de la dieta correspondía a leche de descarte.

La tendencia de que los terneros calostrados artificialmente tuvieran más chances de infección por *E. coli* F5+ podría deberse a que el 91% de los 11 casos positivos correspondían a establecimientos en donde se practicaba calostrado artificial rutinariamente, además de la baja cantidad de animales positivos a este patógeno. También podría deberse a contaminación bacteriana del calostro durante su recolección, manipuleo, almacenamiento y administración, o de los utensilios realizados para hacerlo (sondas, mamaderas, recipientes, etc). Algo similar ocurre con el tamaño de los establecimientos (establecido por el número de vacas del rodeo); ninguno de los casos positivos a este agente se presentó en establecimientos pequeños

(1 caso en un establecimiento mediano y 10 casos en 4 establecimientos grandes). Los establecimientos de mayor tamaño se comportaron como un factor de riesgo para este agente. Lance et al. (1992) observaron que en establecimientos grandes se perdía la atención individual de los terneros por parte del guachero, relacionándolo con las altas mortandades debido a diarrea y deshidratación. Probablemente al tener otras tareas que atender se pierda el foco en la higiene, detección, aislamiento y tratamiento temprano de animales enfermos.

Cuando se analizó la población en mayor riesgo para *E. coli* F5+ (animales menores a los 8 días de vida), sólo hubo una tendencia a que los animales alimentados con sustituto lácteo tuvieran mayor riesgo de ser positivos y los alimentados con leche de descarte menor chance, similar a lo observado cuando se incluyeron los terneros de todas las edades en el análisis. Nuevamente queremos resaltar que estos análisis deben interpretarse con cautela, dadas los motivos antes expuestos.

La diarrea neonatal ocasiona deshidratación y acidosis metabólica, que, de no corregirse, pueden culminar en muerte (Foster & Smith 2009). La deshidratación en terneros con diarrea se genera principalmente por la pérdida de líquido y electrolitos a través de la materia fecal, y una manera de hacer una aproximación clínica es mediante el examen físico. El tiempo que tarda el pliegue cutáneo en volver a la normalidad y, en menor medida, el tiempo de llenado capilar, son algunos parámetros ampliamente usados, tanto en humanos como en animales, para realizar una aproximación al grado de deshidratación (Steiner et al. 2004; Smith & Berchtold 2014). En nuestro estudio se encontraron diferencias en los parámetros relacionados con el grado de hidratación entre los animales diarreicos y no diarreicos, encontrándose diferencias estadísticamente significativas para el tiempo de retorno a la normalidad del pliegue cutáneo y un tiempo de llenado capilar >5 segundos. Este tiempo de retorno del pliegue cutáneo es indicativo de deshidratación moderada, y se condice con pérdidas mayores al 6% del peso vivo (Naylor 1989), indicando que los terneros diarreicos en este estudio no sólo tenían grados más elevados de fluidez de las heces al momento del muestreo, sino que además presentaban concomitante deshidratación.

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, el aumento del D-lactato en la circulación sanguínea de terneros diarreicos con acidosis metabólica se asocia con signos neurológicos (Naylor 1987; Naylor 1989; Constable et al. 2001; Lorenz & Vogt

2006). En nuestro estudio, aunque no se estimó la concentración sanguínea de este metabolito, sí se pudo observar una asociación con las variables que indirectamente se asocian a acidosis metabólica, tales como reducción de la actitud, capacidad o velocidad de incorporación o el reflejo de succión, entre animales diarreicos y no diarreicos (Lorenz 2004). En resumen, el examen físico permitió determinar que los terneros con diarrea en este estudio tenían parámetros clínicos indicativos de deshidratación y acidosis metabólica, lo que resalta la importancia de la rehidratación y corrección de la acidosis, como terapia de soporte para la diarrea neonatal (Constable et al. 2001).

Un hallazgo anecdótico fue la asociación entre la onfalitis y la diarrea. Del total de terneros examinados, 51 presentaron onfalitis (9.3% de 549). La onfalitis se suele presentar en 5-15% de los terneros (Mee 2008), generalmente es causada por infecciones bacterianas, y suele estar asociada a factores de manejo e inmunitarios, así como con posteriores signos como diarrea o poliartritis, secundarios a un proceso septicémico que pueden culminar con la muerte de los animales (Constable et al. 2017b). Revisando la bibliografía nacional no se encontraron datos referidos a esta patología, pero su frecuencia no es llamativa, teniendo en cuenta que un gran porcentaje de los partos de tambos de Uruguay no cuenta con una adecuada higiene y que la adopción de la práctica de desinfección del ombligo del neonato es baja entre productores (Carlos Schild, tesis de maestría en salud animal UDELAR, comunicación personal 2017).

Con respecto a la semana de vida de los terneros, en nuestro estudio, los animales tuvieron una mayor frecuencia de diarrea en las primeras 3 semanas de vida, siendo ésta mayor en la 2<sup>o</sup> semana que en la 1<sup>o</sup> (60.15% y 23.25%, respectivamente), lo cual concuerda con lo observado por Bartels et al. (2010). En los terneros en la 3<sup>o</sup> y 4<sup>o</sup> semana de vida, las chances de manifestar diarrea fueron 42 y 53% menores, respectivamente.

Otro resultado sumamente interesante fue que la concentración de proteínas séricas totales tuvo diferencia estadísticamente significativa entre animales diarreicos y no diarreicos, teniendo los animales con una exitosa transferencia pasiva de la inmunidad menos chances de presentar diarrea, resultado similar al reportado por House et al. (2015). Debido a la naturaleza de la placenta de los rumiantes, las inmunoglobulinas

maternas no traspasan la barrera materno-fetal, por lo que la ingesta de calostro dentro de las primeras 12 h de vida constituye la principal fuente de anticuerpos para el ternero neonato (Donovan et al. 1998). Los terneros que no tienen una adecuada concentración de inmunoglobulinas circulantes tienen mayores chances de enfermarse y morir (Donovan et al. 1998; Tyler et al. 1998), por lo que una manera práctica y sencilla de estimar la transferencia pasiva de la inmunidad, indirectamente, es mediante la determinación de proteínas séricas totales con un refractómetro (Tyler et al. 1998). Se desprende de los enunciados anteriores, que las medidas para prevenir la diarrea neonatal deben extremarse durante las primeras horas de vida, asegurando un correcto calostrado que permita un nivel de inmunoglobulinas circulantes capaces de proteger al ternero ante eventuales infecciones y, también, en la primera semana de vida, creando un escenario de bajo riesgo.

Aunque no fue estadísticamente significativa, se vio una asociación entre los partos colectivos y la diarrea en los terneros, similar a lo observado por Trotz-Williams et al. (2007). Sin embargo, este resultado tiene un poder cuestionable, ya que había un solo establecimiento con parto individual en nuestro estudio. Los partos individuales, en general, se relacionan con un manejo más focalizado y puntual de la vaca recién parida, con un mayor énfasis en varios aspectos, incluido la higiene, lo que disminuirá las chances de contacto del recién nacido con una posible fuente de infección, como la materia fecal de la madre u otros terneros.

Cuando se estudiaron los parámetros clínicos asociados a la muerte, estos fueron similares a los que se asociaron a la diarrea en el análisis bivariado, excepto por la semana de vida de los animales, la presencia de onfalitis, las proteínas séricas totales y las características de la materia fecal. La única variable que no se asoció con la diarrea, pero sí con la muerte, fue la frecuencia respiratoria elevada, lo que se podría correlacionar con la respuesta fisiológica frente a una posible acidosis metabólica de los terneros diarreicos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la manipulación de los animales para su examen es una situación estresante, la cual se puede manifestar, entre otras cosas, con un aumento de las frecuencias cardíaca y respiratoria.

Un hallazgo sumamente importante fue la relación entre la diarrea y la muerte de los animales (aunque no fue estadísticamente significativa, sí se observó una tendencia), que se respalda por lo observado por algunos autores a nivel internacional (Sivula et

al. 1996; Svensson et al. 2006; USDA Dairy 2007; Torsein et al. 2011), y, particularmente, afianza lo observado por Carlos Schild en su estudio (tesis de maestría en salud animal, UDELAR, comunicación personal 2017), en donde el 95.2% de 209 establecimientos lecheros encuestados a nivel nacional en Uruguay expresó que la diarrea era uno de los principales signos clínicos manifestados por los terneros, asociado a la muerte durante el periodo de crianza.

Con respecto a las variables de manejo en relación a la muerte, se observaron algunos resultados similares y otros disímiles a los expuestos previamente. La relación con las múltiples actividades laborales que realiza el guachero, el sistema de alojamiento colectivo y el suministro de sustituto lácteo, se asociaron con mayores chances de muerte de los animales. Por otro lado, la rotación del sitio de la guachera, el suministro de leche de descarte y el aparte de animales enfermos, fueron factores de protección, siendo todos resultados esperables y fundamentados con los enunciados previamente expuestos. Un resultado llamativo fue la asociación positiva entre la mortalidad y el uso de vacunas contra la diarrea neonatal, aunque otros autores tuvieron resultados similares (Waltner-Toews et al. 1986b; Frank & Kaneene 1993). En establecimientos con problemas de diarrea y muertes, es común, dentro de las medidas de manejo adoptadas, la inmunización de las madres con vacunas contra enteropatógenos, por lo que una hipótesis es que esta asociación no sea debida a una relación directa de la utilización de inmunógenos, sino más bien una asociación secundaria a una medida sanitaria adoptada ante un problema sanitario ya instaurado.

Otro factor a tener en cuenta es que no todas las vacunas protegen contra todos los agentes causales del SDN. Por ejemplo, en el caso de *Cryptosporidium* spp., no existen vacunas disponibles comercialmente. También puede haber diferencias entre las cepas que contiene las vacunas y las que están circulando en los establecimientos (Al Mawly et al. 2015), lo que puede resultar en falla en la protección vacunal. Aunque no fue estadísticamente significativo, se observó una tendencia a la asociación entre los establecimientos con altas tasas de mortalidad y la variable muerte. Tanto los sistemas de alojamiento mixtos como los colectivos se asocian con mayores frecuencias de enfermedades y, por ende, de muertes (Marcé et al. 2010; Curtis et al. 2016). El cambiar la guachera de lugar (rotación) fue un factor de protección ante la muerte, esta medida, junto con el aparte de los animales enfermos (la cual no tuvo asociación),

están ampliamente difundidas ante cualquier enfermedad independientemente del sistema y/o categoría animal.

Aunque lo ideal es separar a la madre del ternero lo antes posible luego del parto para cortar el ciclo de transmisión de la mayoría de los agentes causantes de la diarrea neonatal (transmisión fecal-oral), en nuestro estudio los terneros que permanecieron con sus madres por más de 12 h tuvieron menos chances de morir. Hay que considerar que la muerte/sobrevida de los terneros depende de muchos factores, la mayoría de los cuales no se contemplaron en el presente trabajo. Aunque Klein-Jöbstl et al. (2014) no vieron diferencias significativas con respecto al tiempo de desmadre, la bibliografía indica que cuanto mayor es el tiempo de permanencia con la madre, mayores son las probabilidades de que los terneros presenten diarrea, ya que tienen más probabilidades de infectarse (Trotz-Williams et al. 2007) y morir (Wells et al. 1996).

En lo referido al análisis de laboratorio para detección de *Cryptosporidium* spp., el acuerdo entre las pruebas testeadas (ELISA y coloración de auramina-fenol) fue muy bueno, basándonos en la escala propuesta por Landis & Koch (1977). Trabajos recientes muestran la alta sensibilidad y especificidad de la tinción de auramina-fenol para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* (Jafari et al. 2015; Le Govic et al. 2016). En nuestro caso, al igual que Jafari et al. (2015), utilizamos al ELISA como prueba de referencia. Por lo que sería una opción viable en laboratorios donde no se cuente con el kit de ELISA, ya sea por costos u otras razones.

A modo de enmarcar todos los resultados obtenidos, podemos decir que *Cryptosporidium* spp. está ampliamente distribuido, en términos relativos, y se asocia al SDN en terneros neonatos de Uruguay. Al no haber vacunas ni tratamientos efectivos disponibles comercialmente hasta el momento en el país, el foco se debe realizar en la prevención y en la toma de medidas de manejo que apunten a disminuir la carga parasitaria en el huésped, la contaminación y sobrevivencia ambiental y la transmisión del agente. Además, el correcto calostrado (cantidad y calidad del calostro, momento de la ingesta) es fundamental para mitigar el impacto del agente en la manifestación de diarrea. Respecto de este parásito, Fayer et al. (1989) observaron que la administración de calostro hiperinmune se relacionó con menores tiempos de excreción de ooquistes y de duración de la diarrea. Otro estudio sugiere, además, que la severidad de la diarrea asociada a *Cryptosporidium* spp. es menor en terneros que

tienen concentraciones más altas de IgG en suero, es decir cuanto mejor es el calostrado (Weber et al. 2016). A nivel experimental, el uso de vacunas recombinantes con la proteína P23 de *Cryptosporidium parvum* administrada en vacas gestantes, ha mostrado resultados promisorios en la prevención de criptosporidiosis en los terneros, mediante transferencia pasiva de inmunidad a los neonatos (Askari et al. 2016).

La interrupción del ciclo de contagio remite a la separación, lo antes posible, de la madre y a la toma de extremos recaudos en la higiene, tanto en el periparto inmediato, como en la guachera. La higiene debe ser tenida en cuenta a todos los niveles, tanto en las locaciones y utensilios de alimentación, como durante el manejo, evitando la contaminación de categorías susceptibles (animales de menor edad) (McGuirk 2008). Lamentablemente cuando *Cryptosporidium* spp. está presente en un establecimiento, su erradicación puede ser frustrante y, en la mayoría de los casos, impracticable (Shahiduzzaman & Dauschies 2012). La inactivación física de los ooquistes mediante calor (Fayer et al. 1994) y desecación (King & Monis 2007) son formas efectivas contra *Cryptosporidium* spp. en condiciones de laboratorio, sin embargo, los tiempos y temperaturas que se requieren para la inactivación hacen que su implementación a campo sea más difícil de practicar. Por la naturaleza de su pared (pared lipídica externa y glicoprotéica interna), *Cryptosporidium* spp. es extremadamente resistente a la penetración de los desinfectantes. Desinfectantes con formaldehído o peróxido de hidrogeno en su composición han mostrado resultados promisorios en cuanto a eficacia (Castro-Hermida et al. 2006), pero los tiempos de exposición, al igual que lo sucedido con los métodos de inactivación física, hace que su uso sea poco práctico en situaciones de campo. Independientemente del efecto sobre los ooquistes, la sola implementación de medidas de higiene rutinarias tiene efectos favorables en general, asociándose con una menor contaminación del ambiente.

Los resultados obtenidos del uso de drogas con actividad anti *Cryptosporidium* spp. son variados y contradictorios, se ha probado la paramomicina, el lactato de halofuginona, el decoquinato, la azitromicina y la nitaxozamida, entre otras. Shahiduzzaman & Dauschies (2012) en una revisión, compararon los resultados de la bibliografía y concluyeron, en base a ventajas, desventajas y resultados obtenidos, que la paramomicina y el lactato de halofuginona serían las drogas recomendadas para el tratamiento de la criptosporidiosis animal, cabe mencionar que ninguna de estas

drogas está disponible actualmente en Uruguay. La azitromicina también es efectiva (Nasir et al. 2013), pero es costosa para su uso en grandes animales. Limitados estudios con resultados contradictorios han evaluado el uso de probióticos conteniendo *Lactobacillus* spp. (Alak et al. 1999; Guitard et al. 2006) o *Enterococcus faecalis* (Del Coco et al. 2016) para el tratamiento de la criptosporidiosis en modelos roedores, aunque no hay estudios al respecto en bovinos.

Dados los resultados obtenidos en este estudio, consideramos que es necesario realizar estudios de transmisión de *Cryptosporidium* spp. entre e intra establecimientos, lo que podría proveer información necesaria como insumo para desarrollar estrategias que permitan cortar el ciclo de transmisión del agente. Teniendo en cuenta que *Cryptosporidium* spp. es fácilmente transmisible por agua, futuras investigaciones deberían evaluar el posible rol de las fuentes de agua en su vehiculización, como se ha realizado recientemente en Uruguay con otros agentes causales del SDN, como rotavirus grupo A (Castells et al. 2016).

Como se expresó anteriormente, algunas especies y subtipos de *Cryptosporidium* son zoonóticos. En nuestro estudio, las técnicas de detección de *Cryptosporidium* spp. utilizadas no permitieron la identificación a nivel de especie/subtipo, sin embargo, nuestros hallazgos alientan a futuras investigaciones basadas en estudios moleculares (PCR, secuenciación) para determinar si los bovinos de Uruguay son reservorios potenciales de especies/subtipos que puedan tener potencial zoonótico.

Antes de concluir, queremos volver a resaltar que en el presente estudio se analizaron solo 2 agentes de varios que pueden intervenir en el SDN, y merece mencionarse que en el 28.4% de las muestras de terneros diarreicos, no se encontró ninguno de los 2 agentes analizados. Esto indica que es altamente probable que participen otras causas, además de las aquí expuestas, tanto en las diarreas como en la muerte de terneros neonatos. Por ejemplo, Caffarena et al. (2016) reportaron 2 brotes de diarrea neonatal bovina asociados a *Cryptosporidium* spp. junto con rotavirus y *Salmonella* Typhimurium. Posteriormente, ésta y otras serovares de *Salmonella enterica* fueron identificadas en terneros con diarrea neonatal y septicemia en el país (Casaux et al. 2017). Recientemente, Aráoz et al. (2017) identificaron un caso de diarrea neonatal bovina atribuida a *E. coli* enteropatógena y *Cryptosporidium* spp. con circulación de rotavirus grupo A en el rodeo. Castells et al. (2016) analizaron 136 muestras de agua

de bebida de guacheras de establecimientos lecheros uruguayos en busca de rotavirus, encontrando que el 38.4% tenían copias genómicas virales, postulando al agua de bebida como un posible vehículo para la transmisión de este agente. Costa et al. 2016 registraron episodios de septicemia y mortandad en terneros de tambos asociados a *Salmonella* Dublin. Por último y más recientemente, se han identificado mediante estudios patológicos y virológicos, casos de enterocolitis asociada a infección por coronavirus bovino en terneros neonatos de tambos (Federico Giannitti y Matías Castells, datos no publicados, comunicación personal 2017) y casos de infección por el virus de la diarrea viral bovina en terneros de tambos (Leticia Maya, datos no publicados, comunicación personal 2017). Estos reportes indican que hay otros agentes conocidos involucrados en brotes de diarrea y muerte en terneros de tambos en Uruguay, y es posible que haya otros aún no diagnosticados. Investigaciones más amplias son necesarias para evaluar otras causas del SDN y muerte de terneros en el país.

## CONCLUSIONES

- *Cryptosporidium* spp. fue detectado en el 100% de los 30 tambos estudiados, es frecuente a nivel individual en terneros lecheros neonatos, y se asocia a cuadros diarreicos en las primeras semanas de vida. En este trabajo, el rotar el sitio de la guachera y la administración de leche de descarte se comportaron como posibles factores de riesgo para la infección de los animales, y el uso de sustituto lácteo como un posible factor de protección.
- *Escherichia coli* F5+ se encontró en baja proporción en este estudio y no se asoció con diarrea. Aunque hubo relación con diversas variables, el bajo número de terneros positivos limitó el análisis y la posibilidad de sacar conclusiones sólidas. En base a los resultados obtenidos, incentivamos el desarrollo de futuras líneas de investigación con diseños muestrales que tengan en cuenta la baja frecuencia del patógeno.
- Hubo una tendencia a que los animales infectados por *Cryptosporidium* spp. tengan más chances de morir, aunque la asociación no fue estadísticamente significativa,

lo que sugiere que posiblemente otros factores y agentes estén asociados a mortalidad en terneros del país.

- Los terneros con diarrea y parámetros clínicos asociados a ella sugestivos de deshidratación y acidosis metabólica, tuvieron más chances de morir. Esto resalta la importancia que tiene la instauración temprana de terapias de soporte a los terneros con diarrea, que permitan reducir las muertes asociadas al SDN.
- La falta de exclusividad de actividad laboral del guachero, los sistemas de crianza colectiva, el uso de sustituto lácteo y establecimientos con gran cantidad de vacas, pueden ser promisorios factores de riesgo en lo que a la mortalidad respecta.
- Los animales con exitosa transferencia pasiva de la inmunidad tuvieron menos chances de desarrollar cuadros diarreicos. Esto resalta la importancia de implementar planes de calostrado adecuados para prevenir el SDN y reducir las muertes asociadas.
- La tinción con auramina-fenol se presenta como una técnica de laboratorio viable para la detección de *Cryptosporidium* spp. en materia fecal de terneros.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abuelo A. (2016). Investigation of an outbreak of neonatal calf diarrhea in a dairy herd. *Vet Rec Case Rep.* 2(4):1-7.
2. Alak JI, Wolf BW, Mdurvwa EG, Pimentel-Smith GE, Kolavala S, Abdelrahman H, Suppiramaniam V. (1999). Supplementation with *Lactobacillus reuteri* or *L. acidophilus* reduced intestinal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocyst in immunodeficient C57BL/6 mice. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 45(6):855-863.
3. Al Mawly J, Grinberg A, Prattley D, Moffat J, Marshall J, French N. (2015). Risk factors for neonatal calf diarrhoea and enteropathogen shedding in New Zealand dairy farms. *Vet J.* 203(2):155-160.
4. Amaral-Phillips DM. (2012). Early identification of sick dairy calves important to their survival and future milk production. Disponible en: <http://articles.extension.org/pages/65519/early-identification-of-sick-dairy-calves-important-to-their-survival-and-future-milk-production>

5. Amer S, Zidan S, Adamu H, Ye J, Roellig D, Xiao L, Feng Y. (2013). Prevalence and characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Nile River delta provinces, Egypt. *Exp. Parasitol.* 135(3):518-23.
6. Aráoz V, Umpierrez A, Fraga M, Casaux ML, Caffarena RD, Castells M, Fernández M, García N, Colina R, Zunino P, Riet-Correa F, Giannitti F. (2017). Enteropatía por *Escherichia coli* enteropatógena y *Cryptosporidium* spp. en una ternera de un rodeo lechero con circulación de rotavirus grupo A en Uruguay. Congreso Nacional de Biociencias, 12-14 de mayo, Montevideo, Uruguay.
7. Askari N, Shayan P, Mokhber-Dezfouli MR, Ebrahimzadeh E, Lotfollahzadeh S, Rostami A, Amininia N, Ragh MJ. (2016). Evaluation of recombinant P23 protein as a vaccine for passive immunization of newborn calves against *Cryptosporidium parvum*. *Parasite Immunol.* 35(5):282-289.
8. Barkema HW, von Keyserlingk MA, Kastelic JP, Lam TJ, Luby C, Roy JP, LeBlanc SJ, Keefe GP, Kelton DF. (2015). Invited review: Changes in the dairy industry affecting dairy cattle health and welfare. *J Dairy Sci.* 98(11):7426-7445.
9. Bartels CJ, Holzhauser M, Jorritsma R, Swart WA, Lam TJ. (2010). Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Prev Vet Med.* 93(2-3):162-169
10. Blanchard PC. (2012). Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 28(3):443-464.
11. Caffarena RD, Fraga M, Castells M, Colina R, Schild CO, Riet-Correa F, Giannitti F. (2016). Detección de agentes causales de diarrea neonatal bovina en 2 tambos de Colonia, Uruguay. 44° Jornadas Uruguayas de Buiatría, 9-10 de junio, Paysandú, Uruguay.
12. Carpenter C, Fayer R, Trout J, Beach MJ. (1999). Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*. *Emerg. Infect. Dis.* 5(4):579-584.
13. Casaux ML, Schild CO, Caffarena RD, Giannitti F, Riet-Correa F, Fraga M. (2017). Presencia de genes de virulencia en *Salmonella enterica* aisladas de casos de diarrea y mortalidad en terneros de tambos de Uruguay. Congreso Nacional de Biociencias, 12-14 de mayo, Montevideo, Uruguay.

14. Castells M, Schild C, Caffarena D, Giannitti F, Fraga M, Riet-Correa F, Victoria M, Colina R. (2016). Drinking water: a potential vehicle for rotavirus transmission in neonate calves. 3° Latin American Symposium of Environmental Virology, 1-3 de junio, Salta, Argentina.
15. Castro-Hermida JA, González-Losada YA, Ares-Mazás E. (2002a). Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). *Vet Parasitol.* 106(1):11-17.
16. Castro-Hermida JA, González-Losada YA, Mezo-Menéndez M, Ares-Mazás E. (2002b). A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. *Vet Parasitol.* 106(1):11-17.
17. Castro-Hermida JA, Pors I, Méndez-Hermida F, Ares-Mazás E, Chartier C. (2006). Evaluation of two commercial disinfectants on the viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocyst. *Vet J.* 171(2):340-345.
18. CDC. Cryptosporidiosis outbreak at a summer camp – North Carolina. (2009). *Morbidity and Mortality Weekly Report* (July 15, 2011 / 60(27):918-922). Disponible en: [www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6027a3.htm?s\\_cid=mm6027a3\\_e](http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6027a3.htm?s_cid=mm6027a3_e)
19. Cho YI, Sun D, Cooper V, Dewell G, Schwartz K, Yoon KJ. (2012). Evaluation of a commercial rapid test kit for detecting bovine enteric pathogens in feces. *J Vet Diagn Invest.* 24(3):559-562.
20. Constable PD, Ahmed AF, Misk NA. (2005). Effect of suckling cow's milk or milk replacer on abomasal luminal pH in dairy calves. *J Vet Intern Med.* 19(1):97-102.
21. Constable PD, Thomas E, Boisrame B. (2001). Comparison of two oral electrolyte for the treatment of dehydrated calves with experimentally-induced diarrhoea. *Vet J.* 162(2):129-141.
22. Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Grünberg W. (2017a). General Systemic States. En: Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Grünberg W. (2017). *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats.* Vol. 1. ELSEVIER, 11° Ed., China, Chap. 4, pp. 54-57.

23. Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Grünberg W. (2017b). Perinatal Diseases. En: Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Grünberg W. (2017). *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. Vol. 2. ELSEVIER, 11° Ed., China, Chap. 19, pp. 1830-1903.
24. Costa RA, Caffarena RD, Schild CO, Casaux L, Fraga M, Riet-Correa F, Martínez A, Mirazo S, Arbiza J, Gallinares P, Giannitti F. (2016). Urocistitis en terneros Holstein con septicemia por *Salmonella* Dublin. X Reunión Argentina de Patología Veterinaria (RAPAVE), 24-26 de agosto, Esperanza, Santa Fé, Argentina.
25. Cramer MC, Stanton AL. (2015). Associations between health status and the probability of approaching a novel object or stationary human in preweaned group-housed dairy calves. *J Dairy Sci.* 98(10):7298-7308.
26. Curtis GC, Argo CM, Jones D, Grove-White DH. (2016). Impact of feeding and housing systems on disease incidence in dairy calves. *Vet Rec.* 179(20):512.
27. Dairy Calf and Heifer Association (DCHA). (2012). Gold Standards I. Production and performance standards established for Holstein calves, from birth to 6 months of age, across the United States. Disponible en: [http://www.progressivedairy.com/downloads/2009/15/1509\\_DCHA\\_standards.pdf](http://www.progressivedairy.com/downloads/2009/15/1509_DCHA_standards.pdf)
28. de Graaf DC, Vanopdenbosch E, Ortega-Mora LM, Abbassi H, Peeters JE. (1999). A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasitol.* 29(8):1269-1287.
29. Delafosse A, Chartier C, Dupuy MC, Dumoulin M, Pors I, Paraud C. (2015). *Cryptosporidium parvum* infection and associated risk factors in dairy calves in western France. *Prev Vet Med.* 118(4):406-412.
30. de la Fuente R, Garcia A, Ruiz-Santa-Quiteria J, Luzon M, Cid D, Garcia S, Orden JA, Gomez-Bautista M. (1998). Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. *Prev Vet Med.* 36(2):145-152.
31. Del Coco VF, Córdoba MA, Basualdo JA. (2008). *Cryptosporidium* infection in calves from a rural area of Buenos Aires, Argentina. *Vet Parasitol.* 158:31-35.

32. Del Coco VF, Sparo MD, Sidoti A, Santín M, Basualdo JA, Córdoba MA. (2016). Effects of *Enterococcus faecalis* CECT 7121 on *Cryptosporidium parvum* infection in mice. *Parasitol Res.* 115(8):3239-3244.
33. Donovan GA, Dohoo IR, Montgomery DM, Bennett FL. (1998). Calf and disease factors affecting growth in female Holstein calves in Florida, USA. *Prev Vet Med.* 33(1-4):1-10.
34. Fall A, Thompsom A, Hobbs RP, Morgan-Ryan U. (2003). Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. *J Parasitol.* 89(2):399-402.
35. Fayer R, Andrews C, Ungar BLP, Blagburn B. (1989). Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves. *The Journal of Parasitology.* 75(3):393-397.
36. Faubert GM, Litvinsky Y. (2000). Natural transmission of *Cryptosporidium parvum* between dams and calves on a dairy farm. *J Parasitol.* 86(3):495-500.
37. Fayer R. (1994). Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocyst in water. *Appl Environ Microbiol.* 60(8):2732-2735.
38. Fayer R, Gasbarre L, Pasquali P, Canals A, Almeria S, Zarlenga D. (1998). *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *Inter J Parasitol.* 28(1):49-56.
39. Fayer R, Santin M, Trout JM. (2007). Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. *Vet Parasitol.* 145(3-4):260-266.
40. Fayer R, Xiao L. (2007). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Ed. Taylor and Francis Group, 2<sup>o</sup> ed., Boca Raton, Florida, USA.
41. Fecteau ME, White SL. (2015). Alterations in body temperature. En: Smith B (2015). *Large animal internal medicine.* ELSEVIER, 5<sup>th</sup> ed. St. Louis, Missouri, USA.
42. Foster DM, Smith GW. (2009). Pathophysiology of diarrhea in calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 25(1):13-36.

43. Frank NA, Kaneene JB. (1993). Management risk factors associated with calf diarrhea in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci.* 76(5):1313-1323.
44. Franck SM, Bosworth BT, Moon HW. (1998). Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *J Clin Microbiol.* 36(6):1795-1797.
45. Fukushima H, Tsunomori Y, Seki R. (2003). Duplex real-time SYBR Green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools. *J Clin Microbiol.* 41(11):5134-5146.
46. Garro CJ, Morici GE, Utgés ME, Tomazic ML, Schnittger L. (2016). Prevalence and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. oocyst in dairy calves of Buenos Aires Province, Argentina. *Parasite Epidemiology and Control.* 1(2):36-41.
47. Gerlberg HB. (2016). Alimentary system and the peritoneum, omentum, mesentery, and peritoneal cavity. En: Zachary JF. (2016). *Pathology basis of veterinary disease.* ELSEVIER, 6<sup>th</sup> Ed. St. Louis, Missouri, USA.
48. Guitard J, Menotti J, Desveaux A, Alimardani P, Porcher R, Derouin F, Kapel N. (2006). Experimental study of the effects of probiotics on *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal rats. *Parasitol Res.* 99(5):522-527.
49. Gyles CL, Fairbrother JM. (2010). *Escherichia coli*. En: *Pathogenesis of bacterial infections in animals.* Ed. Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO. Wiley-Blackwell, 4th Ed. Ames, Iowa, USA. Cap. 15, pp. 267-307.
50. Hall GA, Reynolds DJ, Parsons KR. (1988). Pathology of calves with diarrhoea in southern Britain. *Res Vet Sci.* 45(2):240-250.
51. Hancock-Allen J, Alden NB, Cronquist AB. (2017). Cryptosporidiosis outbreak at an academic animal research laboratory-Colorado, 2014. *Am J Ind Med.* 60(2):208-214.
52. Helmy YA, Von Samson-Himmelstjerna G, Nöckler K, Zessin KH. (2014). Frequencies and spatial distributions of *Cryptosporidium* in livestock animals and children in the Ismailia province of Egypt. *Epidemiol. Infect.* 143(6):1208-1218.

53. House JK, Smith GW, McGuirk SM, Gunn AA, Izzo M. (2015). Manifestations and management of disease in neonatal ruminants. En: Smith B (2015). Large animal internal medicine. ELSEVIER, 5<sup>th</sup> Ed. St. Louis, Missouri, USA.
54. Instituto Nacional de la Leche. (2014). Primeros resultados de la Encuesta Lechera INALE 2014. Disponible en: <http://www.inale.org/innovaportal/v/4086/4/innova.front/primeros-resultados-de-la-encuesta-lechera-inale-2014.html>.
55. Izzo MM, Kirkland PD, Mohler VL. (2011). Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhea. *Aust Vet J.* 89(5):167–173.
56. Jafari J, Maghsood AH, Safari M, Latifi M, Fallah M. (2015). Comparison of fecal antigen detection using enzyme linked immunosorbent assay with the auramine phenol staining method for diagnosis of human cryptosporidiosis. *Jundishapur J Microbiol.* 8(2):1-5.
57. King BJ, Monis PT. (2007). Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment. *Parasitology.* 134(Pt 3):309-323.
58. Klein-Jöbstl D, Iwersen M, Drillich M. (2014). Farm characteristics and calf management practices on dairy farms with and without diarrhea: A case-control study to investigate risk factors for calf diarrhea. *J Dairy Sci.* 97(8):5110-5119.
59. Landis JR, Koch GG. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 33(1):159-174.
60. Larson LL, Owen FG, Albright JL, Appleman RD, Lamb RC, Muller LD. (1977). Guidelines toward more uniformity in measuring and reporting calf experimental data. *J Dairy Sci.* 60(6):989-991.
61. Larsson L. (2013). Evaluation of rapid tests to identify *Cryptosporidium* spp. in calves. Tesis de grado, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, USL, Uppsala, Suecia. Artículo en Sueco.
62. Le Govic Y, Guyot K, Certad G, Deschildre A, Novo R, Mary C, Sendid B, Viscogliosi E, Favennec L, Deis-Cas E, Fréal E, Dutoit E. (2016). Assessment of microscopic and follow-up of cryptosporidiosis in patients at risk. *Eur J Clin Infect Dis.* 35(1):137-148.

63. Lorenz I. (2004). Investigations on the influences of serum D-lactate levels on clinical signs in calves with metabolic acidosis. *Vet J.* 168(3):323-327.
64. Lorenz I, Vogt S. (2006). Investigations on the association of D-lactate blood concentrations with the outcome of therapy of acidosis, and with posture and demeanour in young calves with diarrhoea. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 53(9):490-494.
65. Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox KR, Rose JB, Davis JP. (1994). A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med.* 331(3):161-167.
66. Marcé C, Guatteo R, Bareille N, Fourichon C. (2010). Dairy calf housing systems across Europe and risk for calf infectious diseases. *Animal.* 4(9):1588-1596.
67. Mainil J. (2013). *Escherichia coli* virulence factors. *Vet Immunol Immunopathol.* 152(1-2):2-12.
68. McGuirk SM. (2008). Disease management of dairy calves and heifers. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 24(1):139-153.
69. Mee JF. (2008). Newborn dairy calf management. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 24(1):1-17.
70. Meireles MV. (2010). *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. *Rev Bras Parasitol Vet.* 19(4):197-204.
71. Meireles MV, de Oliveira FP, Teixeira WF, Coelho WM, Mendes LC. (2011). Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from the state of São Paulo, Brazil. *Parasitol Res.* 109(3):949-951.
72. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca – Área de estadísticas Agropecuarias. (2016). Anuario estadístico agropecuario 2016. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario2016>.
73. Mohammed HO, Wade SE, Schaaf S. (1999). Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in southeastern New York State. *Vet Parasitol.* 83(1):1-13.

74. Moore DA, Taylor J, Hartman ML, Sisco WM. (2009). Quality assessments of waste milk at a calf ranch. *J Dairy Sci.* 7(92):3503-3509.
75. Naciri M, Lefay MP, Mancassola R, Poirier P, Chermette R. (1999). Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France. *Vet Parasitol.* 85(4):245-257.
76. Nasir A, Avais M, Khan MS, Khan JA, Hameed S, Reichel MP. (2013). Treating *Cryptosporidium parvum* infection in calves. *J Parasitol.* 99(4):715-717.
77. Nataro JP, Kaper JB. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11(1):142-201.
78. Naylor JM. (1987). Severity and nature of acidosis in diarrheic calves over and under one week of age. *Can Vet J.* 28(4):168-173.
79. Naylor JM. (1989). A retrospective study of the relationship between clinical signs and severity of acidosis in diarrheic calves. *Can Vet J.* 30(7):577-580.
80. OIE. (2008). Criptosporidiosis. En: Manual de la OIE sobre animales terrestres. Disponible en: [http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es\\_2008/2.09.04.%20Criptosporidiosis.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.04.%20Criptosporidiosis.pdf)
81. Olson ME, O'Handley RM, Ralston BJ, McAllister TA, Andrew Thompson RC. (2004). Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends Parasitol.* 20(4):185-191.
82. Runnels PL, Moon HW, Matthews PJ, Whipp SC, Woode GN. (1986). Effects of microbial and host variables on the interaction of rotavirus and *Escherichia coli* infections in gnotobiotic calves. *Am J Vet Res.* 47(7):1542-1550.
83. Ryan U, Fayer R, Xiao L. (2014). *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology.* 141(13):1667-1685.
84. Santin M, Trout JM, Xiao L, Zhou L, Greiner E, Fayer R. (2004). Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet Parasitol.* 122(2):103-117.
85. Shahiduzzaman M, Dauschies A. (2012). Therapy and prevention of cryptosporidiosis in animals. *Vet Parasitol.* 188(3-4):203-214.

86. Shields JM, Hill VR, Arrowood MJ, Beach MJ. (2008). Inactivation of *Cryptosporidium parvum* under chlorinated recreational water conditions. *J Water Health*. 6(4):513-520.
87. Silverlås C, Näslund K, Björkman C, Mattsson JG. (2010). Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from Swedish dairy cattle in relation to age, diarrhoea and region. *Vet Parasitol*. 169(3-4):289-295.
88. Sivula NJ, Ames TR, Marsh WE, Werdin RE. (1996). Descriptive epidemiology of morbidity and mortality in Minnesota dairy heifer calves. *Prev Vet Med*. 27(3-4):155-171.
89. Smith GW. (2009). Treatment of calf diarrhea: oral fluid therapy. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 25(1):55-72.
90. Smith GW, Berchtold J. (2014). Fluid therapy in calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 30(2):409-427.
91. Smith KE, Stenzel SA, Bender JB, Wagstrom E, Soderlund D, Leano FT, Taylor CM, Belle-Isle PA, Danila R. (2004). Outbreaks of enteric infections caused by multiple pathogens associated with calves at farm day camp. *Pediatr Infect Dis. J*. 23(12):1098-1104.
92. Smith WW. (1962). Observations on the aetiology of neonatal diarrhoea (scours) in calves. *J Pathol.*, 84(1): 147–168.
93. Steiner MJ, DeWalt DA, Byerley JS. (2004). Is this child dehydrated?. *JAMA*. 291(22):2746-2754.
94. Svensson C, Linder A, Olsson SO. (2006). Mortality in Swedish dairy calves and replacement heifers. *J Dairy Sci*. 89(12):4769-4777.
95. Torres ME, Pirez MC, Schelotto F, Varela G, Parodi V, Alende F, Falconi E, Dell'Acqua L, Gaione P, Mendez MV, Ferrari AM, Montano A, Zanetta E, Acuña AM, Chiparelli H, Ingold E. J. (2001). Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogens and unusual isolates. *J Clin Microbiol*. 39(6):2134-2139.

96. Torsein M, Lindberg A, Sandgren CH, Waller KP, Törnquist M, Svensson C. (2011). Risk factors for calf mortality in large Swedish dairy herds. *Prev Vet Med.* 99(2-4):136-147.
97. Tozer PR, Heinrichs AJ. (2001). What affects the cost of raising replacement dairy heifers: a multiple-component analysis. *J Dairy Sci.* 84(8):1836-1844.
98. Trotz-Williams LA, Jarvie BD, Martin SW, Leslie KE, Peregrine AS. (2005). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in southwestern Ontario and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Can Vet J.* 46(4):349-351.
99. Trotz-Williams LA, Martin SW, Leslie KE, Duffield T, Nydam DV, Peregrine AS. (2007). Calf-level risk factors for neonatal diarrhea and shedding of *Cryptosporidium parvum* in Ontario dairy calves. *Prev Vet Med.* 82(1-2):12-28.
100. Tyler JW, Hancock DD, Wiksie SE, Holler SL, Gay JM, Gay CC. (1998). Use of serum protein concentration to predict mortality in mixed-source dairy replacement heifers. *J Vet Intern Med.* 12(2):79-83.
101. Umpierrez A, Acquistapace S, Fernández S, Oliver M, Acuña P, Reolón E, Zunino P. (2016). Prevalence of *Escherichia coli* adhesion-related genes in neonatal calf diarrhea in Uruguay. *J infect Dev Ctries.* 10(5):472-477.
102. Uzal FA, Plattner BL, Hostetter JM. (2016). Alimentary System. En: Jubb, Kennedy & Palmer's. *Pathology of Domestic Animals*, Ed. Maxie MG, ELSEVIER, 6<sup>th</sup> ed. St. Louis, Missouri, USA, Vol. 2, Cap. 1, pp. 112-113.
103. USDA. Dairy. (2007) Part II: Changes in the U.S. Dairy Cattle industry, 1991-2007. Fort Collins: USDA-APHIS-VS, CEAH; 2008. pp. 57-61.
104. von Keyserlingk MA, Rushen J, de Passillé AM, Weary DM. (2009). The welfare of dairy cattle—key concepts and the role of science. *J Dairy Sci.* 92(9):4101-4111.
105. Walker PG, Constable PD, Morin DE, Drackley JK, Foreman JH, Thurmon JC. (1998). A reliable, practical, and economical protocol for inducing diarrhea and severedehydration in the neonatal calf. *Can J Vet Res.* 62(3):205-213.
106. Waltner-Toews D, Martin SW, Meek AH. (1986a). The effect of early calfhood health status on survivorship and age at first calving. *Can J Vet Res.* 50(3):314-317

107. Waltner-Toews D, Martin SW, Meek AH. (1986b). Dairy calf management, morbidity and mortality in Ontario Holstein herds. III. Association of management with morbidity. *Prev Vet Med.* 2(4):137-158.
108. Weber SE, Lippuner C, Corti S, Deplazes P, Hässig M. (2016). Clinical epidemiology of cryptosporidiosis in calves. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 158(5):341-350. Artículo en alemán.
109. Wells SJ, Dargatz DA, Ott SL. (1996). Factors associated with mortality to 21 days of life in dairy heifers in the United States. *Prev Vet Med.* 29(1):9-19.
110. Widerström M, Schönning C, Lilja M, Lebbad M, Ljung T, Allestam G, Ferm M, Björkholm B, Hansen A, Hiltula J, Långmark J, Löfdahl M, Omberg M, Reuterwall C, Samuelsson E, Widgren K, Wallensten A, Lindh J. (2014). Large outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection transmitted through the public water supply, Sweden. *Emerg Infect Dis.* 20(4):581-590
111. Windeyer MC, Leslie KE, Godden SM, Hodgins DC, Lissemore KD, LeBlanc SJ. (2014). Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. *Prev Vet Med.* 113(2):231-240.
112. Zambriski JA, Nydam DV, Wilcox ZJ, Bowman DD, Mohammed HO, Liotta JL. (2013). *Cryptosporidium parvum*: determination of ID<sub>50</sub> and the dose-response relationship in experimentally challenged dairy calves. *Vet Parasitol.* 197(1-2):104-112.
113. Zanetta E, Bonifacino R, Carmona C, Acuña A, Guerrero J. (1987). Primeros hallazgos en Uruguay de un nuevo agente de diarrea aguda infantil: *Cryptosporidium* sp. *Arch Pediatr Urug.* 58(1):37-45.

## **ANEXO I. Frotis de materia fecal y tinción de auramina-fenol para observación de *Cryptosporidium* spp.**

### **Preparación de los reactivos para la coloración (OIE, 2008):**

- Auramina-fenol: Disolver 3 g de fenol (Phenol GR for analysis ACS, Reag. Ph Eur, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en 100 ml de agua desionizada y añadir lentamente 0.3 g de Auramina O (Auramine O - C.I. 41000 - for microscopy; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Filtrar con papel de filtro Whatman N° 1 y pasar a una botella de reactivo stock. Marcar el nombre y la fecha de preparación del reactivo en el recipiente. Guardar a temperatura ambiente en una botella de vidrio protegida de la luz con un tapón hermético.
- 3% de metanol ácido (alcohol ácido 3%): Añadir con cuidado 60 ml de ácido clorhídrico (GPR/SLR) a 1940 ml de metanol absoluto y mezclar. Pasar a un frasco de reactivo stock, y marcar la fecha de preparación.
- 0.1% de permanganato potásico: Añadir 0.5 g de permanganato potásico (Potassium permanganate ACS, Reag. Ph Eur., Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) a 499.5 ml de agua desionizada y mezclar con un agitador magnético. Filtrar con papel filtro Whatman N° 1, pasar a un frasco de reactivo stock y rotular con la fecha de preparación.

### **Procedimiento para realizar el frotis de materia fecal:**

Materiales: túnica de laboratorio, guantes descartables, portaobjetos de vidrio, solución buffer fosfato (PBS), ansa estéril de 10 µl, muestra de materia fecal.

- Tomar un portaobjetos limpio e identificarlo con el número de caso y animal.
- Sumergir el ansa de 10 µl en PBS estéril y colocar la gota en el centro del portaobjetos.
- Con el mismo ansa, tomar una muestra de materia fecal, colocarla en la gota de PBS y realizar un extendido delgado.
- Dejar secar al aire.

- Fijar por inmersión en metanol por 3 minutos.

Se debe utilizar un portaobjetos y ansa por muestra. Los frotis secados al aire y fijados en metanol se pueden guardar por períodos mayores a los 6 meses antes de ser coloreados. El grosor ideal del frotis es aquel que al ser colocado sobre una hoja escrita, permite ver la escritura.

### **Tinción de los frotis con auramina-fenol:**

Materiales: túnica de laboratorio, guantes descartables, frotis de materia fecal fijados en metanol, reactivos de auramina-fenol, alcohol-ácido 3%, permanganato potásico al 0.1%, agua corriente, microscopio de epifluorescencia equipado con filtro FITC (excitación de 490 nm; emisión de 510 nm) y micrómetro ocular.

- Sumergir el frotis en auramina fenol durante 10 minutos.
- Lavar con agua corriente para eliminar el exceso de colorante.
- Decolorar con alcohol ácido 3% durante 5 minutos.
- Lavar con agua corriente.
- Sumergir en permanganato potásico al 0.1% durante 30 segundos (tinción de contraste).
- Lavar con agua corriente.
- Dejar secar y observar la presencia de ooquistes en el microscopio de epifluorescencia con filtro FITC con lente objetivo de 20, 50 o 100x y ocular de 10x.
- Identificar *Cryptosporidium* spp. midiendo con el micrómetro ocular el diámetro de los cuerpos esféricos o levemente ovoides de 4-6  $\mu\text{m}$  que evidencien color verde manzana y fuerte fluorescencia, sobre un fondo oscuro.

La observación en el microscopio debe de hacerse de manera sistemática, comenzando del menor objetivo al mayor. Si no se logran visualizar características morfológicas con los objetivos superiores (secos), debe usarse el objetivo de inmersión (100x).

## ANEXO II. Protocolo ELISA de captura de antígeno “Pathasure® enteritis 4”

### Principios del test:

Muestras de materia fecal (MF) son diluidas e incubadas en pocillos revestidos con 4 anticuerpos específicos contra rotavirus grupo A, coronavirus bovino, *E. coli* F5 y *Cryptosporidium* spp. Si alguno de estos agentes se encuentra en la muestra, se unirá específicamente al anticuerpo específico. Luego de múltiples lavados para eliminar todo material que no se haya unido, se añade un anticuerpo conjugado con una enzima, dirigido a rotavirus, coronavirus, *E. coli* F5 y *Cryptosporidium* spp. Después de la incubación, el exceso de este conjugado se elimina mediante un segundo lavado y su fijación al patógeno específico se revela con un sustrato cromógeno. Después de esta incubación, la enzima, si está presente, reacciona con el sustrato y se desarrolla un color azul. La intensidad del color permite la determinación del tipo de muestra probada. Una muestra negativa dará una reacción débil (incolora, azul pálido), mientras que una muestra positiva mostrará una reacción más fuerte que la del control negativo, que se mantiene incoloro o azul pálido.

Nota importante: el test permite la detección de 1, 2, 3 o los 4 agentes arriba mencionados en cada muestra de materia fecal. Sólo resultados de detección de *Cryptosporidium* spp. y *E. coli* F5 fueron usados para esta tesis, a pesar de que se provee el procedimiento para detección de los 4 agentes según especificación del fabricante.

Materiales no provistos por el kit: Ropa protectora, guantes descartables, pipetas, micropipetas, frascos cubicados, tubos Falcon de 50 ml, agua destilada, bandeja para desechar reactivos, estufa de incubación.

Materiales provistos por el kit:

Componente	Cantidad
Tiras de 8 pocillos recubiertas con una mezcla de 4 anticuerpos específicos de rotavirus, coronavirus, <i>E. coli</i> F5 y <i>Cryptosporidium</i> spp.	12
Control positivo listo para usar (amarillo oscuro)	2 ml
Control negativo listo para usar (amarillo claro)	2 ml
Solución de lavado concentrada (10x)*	120 ml

Conjugado anti-rotavirus listo para usar (rojo)	7 ml
Conjugado anti-coronavirus listo para usar (azul)	7 ml
Conjugado anti- <i>E. coli</i> F5 listo para usar (verde)	7 ml
Conjugado anti- <i>Cryptosporidium</i> spp. listo para usar (violeta)	7 ml
Sustrato**	15 ml
Pipetas de 3 ml	1
Pipetas de 1 ml	30

*Mantener todos los reactivos a 2-7 °C, antes de su uso dejarlos a temperatura ambiente.*

*\* Cuando la solución se mantiene a 2-7 °C se pueden formar cristales. Esto no afecta la eficiencia del producto, pero previo a su utilización hay que dejarla a temperatura ambiente hasta que se disuelvan.*

*\*\* No exponer a la luz solar o agentes oxidantes.*

### **Preparación de la solución de lavado:**

Después de homogeneizar la solución de lavado concentrada, diluirla en 1/10 con agua destilada (ej. 3 ml de solución de lavado concentrada en 27 ml de agua destilada).

### **Preparación de las muestras:**

Diluir, en 1/10, la MF en la solución de lavado ya preparada \*\*\* (ej. 0.5 ml de materia fecal en 4.5 ml de solución de lavado preparada).

### **Procedimiento:**

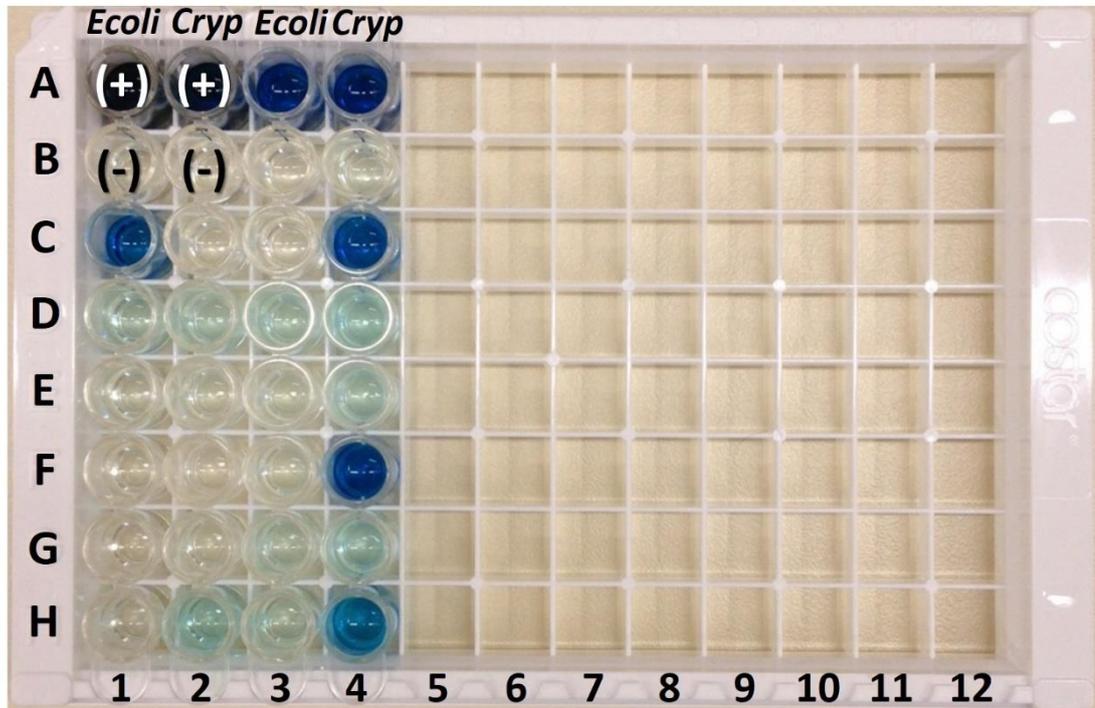
1. Colocar 2 gotas de control positivo en los pocillos A de las columnas 1 a 4, con especial cuidado que no toque las paredes de los mismos.
2. Colocar 2 gotas de control negativo en los pocillos B de las columnas 1 a 4, con especial cuidado que no toque las paredes de los mismos.

3. Colocar 2 gotas (100  $\mu$ l) de MF diluida por caso en los pocillos C, D, E, F, G, H de las columnas 1 a 12 o en los pocillos A y B de las columnas 5 a 12, con especial cuidado que no toque las paredes de los mismos (Figura 1).
4. Incubar en estufa a  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos.
5. Vaciar todos los pocillos en bandeja para descarte de material biológico.
6. Lavar cada pocillo 5 veces con solución de lavado preparada (llenarlo hasta el límite con cuidado de que no rebalse) y descartar el exceso de fluido. Luego del último lavado secar la gradilla mediante golpes secos sobre papel absorbente.
7. Colocar 2 gotas de conjugado anti-rotavirus en los pocillos de la columna 1, con especial cuidado que no toque las paredes.
8. Colocar 2 gotas de conjugado anti-coronavirus bovino en los pocillos de la columna 2, con especial cuidado que no toque las paredes.
9. Colocar 2 gotas de conjugado anti-*E. coli* F5 en los pocillos de la columna 3, con especial cuidado que no toque las paredes.
10. Colocar 2 gotas de conjugado anti-*Cryptosporidium* spp. (conjugado) en los pocillos de la columna 4, con especial cuidado que no toque las paredes.
11. Incubaren estufa a  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos.
12. Repetir el paso 6.
13. Colocar 3 gotas de sustrato por pocillo, con especial cuidado que no toque las paredes del mismo.
14. Incubar en estufa en lugar oscuro, a  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos.
15. Leer los resultados a simple vista (presencia o ausencia de coloración azul en los pocillos, Figura 2).

**Interpretación:**

- Si el color azul es más oscuro del obtenido en el control negativo correspondiente la muestra se considera positiva.

\*\*\* Las muestras de materia fecal se pueden mantener refrigeradas hasta 72 h antes de ser diluidas, una vez diluidas se pueden refrigerar durante 36 h antes de realizarles el ELISA.



**Figura 1.** Placa de ELISA al momento de la lectura. Los pocillos A 1-2 (azul) representan los controles positivos para *E. coli* F5+ y *Cryptosporidium* spp., respectivamente. Los pocillos B 1-2 (incoloros) representan los respectivos controles negativos. Los pocillos C 1-2 a H 1-2 y A 3-4 a H 3-4 representan muestras de materia fecal de 14 terneros. El animal 1 fue positivo a *E. coli* F5+ (C1), el animal 7 fue positivo a *E. coli* F5+ y *Cryptosporidium* spp. (A3 y A4); y los animales 9, 12 y 14 fueron positivos a *Cryptosporidium* spp. (C4, F4 y H4). Las celdas incoloras o celeste tenue indican que no se detectaron los respectivos agentes.

### **ANEXO III. Cuestionario sobre datos generales del establecimiento, datos relacionados a la crianza y datos sanitarios.**

#### **Procedimiento:**

Se confeccionó una hoja de cálculo en Microsoft Excel 2013 con las siguientes preguntas:

#### *Datos generales*

- Cantidad total de vacas.
- Cantidad de vacas en ordeño.
- Tipo de parto
  - Individual
  - Colectivo
- Tiempo entre el nacimiento y la separación de la madre.
  - Menos de 12 h
  - De 12 a 24 h
  - Más de 24 h
- Tipo de calostrado:
  - Calostrado natural (de la madre).
  - Calostrado artificial (mamadera – sonda bucoesofágica).
- Litros de calostro administrados las primeras 24 h de vida.
  - Sin definir
  - Menor o igual a 4 lts.
  - Más de 4 lts.

#### *Datos relacionados a la crianza de los terneros*

- Personal destinado a la guachera.
  - Exclusivo de la guachera.

- Además de la guachera realiza otras tareas dentro del tambo.
- Tipo de sistema de crianza utilizado.
  - Individual (estaca, corredera, corral individual, etc).
  - Colectivo (corral colectivo, etc).
  - Mixto (sistema individual en los primeros días/semanas de vida, y transición posterior a sistema colectivo).
- Rotación del sitio de la guachera.
  - No.
  - Si.
- Suministro de leche de descarte a las terneras.
  - No.
  - Si.
- Suministro de sustituto lácteo a las terneras.
  - No.
  - Si.

*Datos de manejo sanitario*

- Uso de vacunas contra la diarrea neonatal en el parto.
  - No.
  - Si.
- Aparta los terneros enfermos de los sanos.
  - No.
  - Si.
- Cantidad de animales entrados a la guachera en el año.
- Cantidad de animales muertos en la guachera en el año.
- Tasa de mortalidad estimada en el periodo de crianza (%).

## ANEXO IV. Análisis bivariado. Tablas.

### Asociaciones entre la manifestación de diarrea, parámetros clínicos evaluados y factores de manejo.

**Tabla Anexo I.** Asociación entre la presentación de diarrea y otros parámetros clínicos.

Variable	Obs.	P Chi <sup>2</sup>	pR <sup>2</sup>		OR	IC 95%	valor P
Edad al examen	556	0.002	0.0123		<b>0.96</b>	0.93-0.98	<b>0.002</b>
Semana de vida	556	<0.001	0.1109	Semana 1	Ref		
				Semana 2	<b>3.66</b>	2.39-5.62	<b>&lt;0.001</b>
				Semana 3	<b>0.58</b>	0.35-0.97	<b>&lt; 0.05</b>
				Semana 4	<b>0.47</b>	0.23-0.98	<b>&lt; 0.05</b>
Actitud	553	<0.01	0.0329	Normal	Ref		
				Anormal	<b>5.64</b>	3.12-10.19	<b>&lt;0.001</b>
Incorporación	553	<0.001	0.0389	Grado 0	Ref		
				Grado 1	<b>2.52</b>	1.43-4.45	<b>0.001</b>
				Grado 2	<b>12.64</b>	2.92-54.71	<b>0.001</b>
Reflejo de succión	551	<0.001	0.0215	Grado 0	Ref		
				Grado 1	1.29	0.79-2.11	0.29
				Grado 2	<b>3.43</b>	1.81-6.51	<b>&lt;0.001</b>
Onfalitis	549	0.06	0.0045	No	Ref		
				Si	<b>1.73</b>	0.96-3.12	<b>0.067</b>
Pliegue cutáneo > 5 segundos	545	<0.01	0.0374	No	Ref		
				Si	<b>2.77</b>	1.88-4.07	<b>&lt;0.01</b>
Tiempo de llenado capilar >5 segundos	549	<0.001	0.0284	No	Ref		
				Si	<b>3.26</b>	1.93-5.51	<b>&lt;0.01</b>
Temperatura rectal	545	<0.01	0.0289	Normotermia	Ref		
				Hipertermia	<b>2.50</b>	1.69-3.72	<b>&lt;0.01</b>

Proteínas séricas totales	96	<0.02	0.044		<b>0.55</b>	0.33-0.91	<b>&lt;0.03</b>
Mucus en MF	537	0.001	0.0139	Ausencia	Ref		
				Presencia	<b>1.76</b>	1.24-2.49	<b>0.001</b>
Fibrina en MF	545	0.001	0.0135	Ausencia	Ref		
				Presencia	<b>3.64</b>	1.53-8.65	<b>0.003</b>
Color MF	518	<0.01	0.0826	Blancuzco-amarillento	Ref		
				Marrón	<b>0.17</b>	0.11-0.28	<b>&lt;0.001</b>
				Verde	<b>0.25</b>	0.14-0.4	<b>&lt;0.001</b>

**Tabla Anexo II.** Asociación entre la presentación de diarrea y factores de manejo de los establecimientos.

Variable	Obs.	P	Chi <sup>2</sup>	pR <sup>2</sup>	OR	IC 95%	valor P
Preparto	496	0.06	0.0054		Individual	Ref	
					Colectivo	<b>3.23</b>	0.88-11.91

**Asociación entre infección por *Cryptosporidium* spp., *E. coli* F5, *E. coli* F5+ en terneros <8 días de vida y manifestación de diarrea.**

**Tabla Anexo III.** Análisis bivariado. Asociación entre enteropatógenos y manifestación de diarrea.

Variable	Obs.	P	Chi <sup>2</sup>	pR <sup>2</sup>	OR	IC 95%	valor P
<i>Cryptosporidium</i> spp.	556	<0.01	0.1315		No	Ref	
					Si	<b>6.01</b>	4.16-8.67
<i>E. coli</i>	556	0.70	0.0002		No	Ref	
					Si	1.26	0.38-4.20
<i>E. coli</i> F5+ en terneros <8 días de vida	158	0.32	0.0045		No	Ref	
					Si	1.96	0.50-7.60

**Asociaciones entre los parámetros clínicos evaluados, factores de manejo e infección con *Cryptosporidium* spp.**

**Tabla Anexo IV.** Asociaciones entre los parámetros clínicos evaluados e infección con *Cryptosporidium* spp.

Variable	Obs.	P Chi <sup>2</sup>	pR <sup>2</sup>		OR	IC 95%	valor P
Edad al examen	556	<0.04	0.0057		<b>0.97</b>	0.94-0.99	<b>&lt;0.04</b>
Semana de vida	556	<0.01	0.1935	Semana 1	Ref		
				Semana 2	<b>9.09</b>	5.70-14.50	<b>&lt;0.001</b>
				Semana 3	1.18	0.70-1.99	0.52
				Semana 4	<b>0.49</b>	0.21-1.13	<b>0.09</b>
Actitud	553	0.03	0.0063	Normal	Ref		
				Anormal	<b>1.71</b>	1.05-2.77	<b>0.03</b>
Pliegue cutáneo > 5 segundos	545	<0.01	0.019	No	Ref		
				Si	<b>2.05</b>	1.40-2.98	<b>&lt;0.01</b>
Tiempo de llenado capilar >5 segundos	549	<0.001	0.0262	No	Ref		
				Si	<b>3.09</b>	1.84-5.19	<b>&lt;0.001</b>
FC	551	0.082	0.0039	Normal	Ref		
				Elevada	<b>0.73</b>	0.51-1.07	<b>0.083</b>
FR	502	0.0087	0.0099	Normal	Ref		
				Elevada	<b>0.61</b>	0.41-0.88	<b>0.009</b>
Temperatura rectal	545	<0.02	0.0085	Normotermia	Ref		

				Hipertermia	<b>1.63</b>	1.11- 2.39	<b>&lt;0.02</b>
	556	<0.01	0.1339	Grado 0	Ref		
				Grado 1	1.58	0.76- 3.25	0.21
Materia fecal				Grado 2	<b>8.50</b>	4.06- 17.79	<b>&lt;0.01</b>
				Grado 3	<b>9.34</b>	4.23- 20.63	<b>&lt;0.01</b>
	556	<0.01	0.1316	No	Ref.		
Diarrea				Si	<b>6.01</b>	4.16- 8.67	<b>&lt;0.01</b>
	518	<0.001	0.0129	Blancuzco-amarillento	Ref		
				Marrón	<b>0.52</b>	0.34- 0.80	<b>0.003</b>
Color de la MF				Verde	<b>0.59</b>	0.36- 0.97	<b>&lt;0.04</b>

**Tabla Anexo V.** Asociaciones entre factores de manejo e infección con *Cryptosporidium* spp.

Variable	Obs.	P Chi <sup>2</sup>	pR <sup>2</sup>		OR	IC 95%	valor P
Rotación de la guachera	536	0.097	0.0037	No	Ref		
				Si	<b>1.42</b>	0.93-2.16	<b>0.098</b>
Suministro de leche de descarte	536	0.102	0.0036	No	Ref		
				Si	<b>1.33</b>	0.94-1.87	<b>0.10</b>
Suministro de leche de sustituto lácteo	536	0.10	0.0036	No	Ref		
				Si	<b>0.75</b>	0.53-1.05	<b>0.10</b>

**Tabla Anexo VI.** Asociación entre la presentación de diarrea y *Cryptosporidium* spp. por establecimiento.

<b>Establecimiento</b>	<b>Obs.</b>	<b>P Chi<sup>2</sup></b>	<b>pR<sup>2</sup></b>		<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>valor P</b>
Establecimiento 1	29	0.0376	0.1076	No	Ref		
				Si	<b>4.99</b>	1.03-27.27	<b>0.046</b>
Establecimiento 2	20	0.0001	0.5310	No	Ref		
				Si	<b>81</b>	4.36-1504.4	<b>0.003</b>
Establecimiento 3	20	0.0213	0.1912	No	Ref		
				Si	<b>9.33</b>	1.19-72.99	<b>0.033</b>
Establecimiento 5	22	0.0082	0.2307	No	Ref		
				Si	<b>12</b>	1.58-91.08	<b>0.016</b>
Establecimiento 7	20	0.0148	0.2141	No	Ref		
				Si	<b>13.5</b>	1.19-152.21	<b>0.035</b>
Establecimiento 9	20	0.0042	0.2958	No	Ref		
				Si	<b>21</b>	1.77-248.10	<b>0.016</b>
Establecimiento 11	21	0.0082	0.2404	No	Ref		
				Si	<b>15.75</b>	1.42-174.24	<b>0.025</b>
Establecimiento 13	20	0.0042	0.2958	No	Ref		
				Si	<b>21</b>	1.77-248.10	<b>0.016</b>
Establecimiento 14	20	0.0437	0.1468	No	Ref		
				Si	<b>9</b>	0.80-100.13	<b>0.074</b>
Establecimiento 20	20	0.006	0.2746	No	Ref		
				Si	<b>15.75</b>	1.75-141.40	<b>0.014</b>
Establecimiento 23	20	0.0213	0.1912	No	Ref		
				Si	<b>9.33</b>	1.19-72.99	<b>0.033</b>
Establecimiento 29	20	0.0213	0.1912	No	Ref		
				Si	<b>9.33</b>	1.19-72.99	<b>0.033</b>

**Asociaciones entre los parámetros clínicos evaluados, factores de manejo e infección por *E. coli* F5**

**Tabla Anexo VII.** Asociaciones entre los parámetros clínicos evaluados e infección con *E. coli* F5.

Variable	Obs.	P Chi <sup>2</sup>	pR <sup>2</sup>		OR	IC 95%	valor P
Edad al examen	556	<0.01	0.1571		<b>0.74</b>	0.62-0.89	<b>&lt;0.01</b>
	556	<0.01	0.1182	Semana 1	Ref		
				Semana 2	<b>0.07</b>	0.01-0.557	<b>&lt;0.02</b>
Semana de vida				Semana 3	<b>0.14</b>	0.01-1.13	0.06
				Semana 4	1	(Empty)	

**Tabla Anexo VIII.** Asociaciones entre factores de manejo e infección con *E. coli* F5.

Variable	Obs.	P Chi <sup>2</sup>	pR <sup>2</sup>		OR	IC 95%	valor P
Tipo de Calostrado	496	0.006	0.071	Natural	Ref		
				Artificial	<b>9.09</b>	1.15-71.59	<b>&lt;0.04</b>
Cantidad de calostro en las 1 <sup>o</sup> 24 h de vida	455	0.072	0.0508	Desconoce	Ref		
				≤ 4 l	<b>6.67</b>	0.83-53.23	<b>0.073</b>
				> 4 l	2.77	0.17-45.15	0.472
Administra leche de descarte	536	<0.05	0.0391	No	Ref		
				Si	<b>0.27</b>	0.07-1.03	<b>0.055</b>
Administra sustituto lácteo	536	<0.05	0.0391	No	Ref		
				Si	<b>3.69</b>	0.96-14.09	<b>0.055</b>
Aparta los animales enfermos	536	<0.02	0.0586	No	Ref		
				Si	<b>5.55</b>	1.18-25.95	<b>&lt;0.03</b>
Uso de vacunas para SDN	516	<0.01	0.093	No	Ref		
				Si	<b>11.76</b>	1.49-92.60	<b>&lt;0.02</b>
Tamaño tambo	450	0.003	0.0853	Pequeño-mediano	Ref		
				Grande	<b>10.51</b>	1.33-82.83	<b>0.025</b>

**Tabla Anexo IX.** Tabla de contingencia de casos positivos a *E. coli* F5+ según tamaño del establecimiento y por establecimiento.

Establecimiento	Tamaño establecimiento		Total
	Pequeño-mediano	Grande	
6	-	1	1
15	-	7	7
21	-	1	1
23	1	0	1
26	-	1	1
Total	1	10	11

***E. coli* F5+ en terneros <8 días de vida.**

**Tabla Anexo X.** Asociaciones entre los parámetros clínicos evaluados e infección con *E. coli* F5+ en terneros <8 días de vida.

Variable	Obs.	P Chi <sup>2</sup>	pR <sup>2</sup>	OR	IC 95%	valor P
Edad al examen	158	<0.02	0.0839	0.62	0.41-0.93	<0.03

**Tabla Anexo XI.** Asociaciones entre dieta láctea e infección con *E. coli* F5+ en terneros <8 días de vida.

Variable	Obs.	P Chi <sup>2</sup>	pR <sup>2</sup>		OR	IC 95%	valor P
Leche de descarte	152	0.0543	0.0542	No	Ref.		
				Si	<b>0.23</b>	0.05-1.18	<b>0.08</b>
Sustituto lácteo	152	0.0543	0.0542	No	Ref.		
				Si	<b>4.2</b>	0.084-20.91	<b>0.08</b>

**Asociaciones entre distintas variables y la muerte**

**Tabla Anexo XII.** Asociaciones entre los parámetros clínicos evaluados y la muerte de los animales.

Variable	Obs.	P Chi <sup>2</sup>	pR <sup>2</sup>		OR	IC 95%	valor P
Edad al examen	398	<0.05	0.0151		<b>0.95</b>	0.90-1.00	<b>0.054</b>
Actitud	395	<0.002	0.0373	Normal	Ref		
				Anormal	<b>3.50</b>	1.68-7.29	<b>0.001</b>
Incorporación	395	<0.01	0.0351	Grado 0	Ref		
				Grado 1	<b>2.75</b>	1.43-4.45	<b>0.022</b>
				Grado 2	<b>4.45</b>	1.46-13.52	<b>0.008</b>
Reflejo de succión	393	0.052	0.0225	Grado 0	Ref		
				Grado 1	2.07	0.88-4.88	0.095
				Grado 2	<b>2.82</b>	1.12-7.10	<b>0.03</b>
Tiempo de llenado capilar > 5 segundos	392	0.086	0.0112	No	Ref		
				Si	<b>2.03</b>	0.93-4.42	<b>0.07</b>
Frecuencia respiratoria	357	<0.001	0.058	Normal	Ref		
				Alta	<b>4.93</b>	1.88-12.91	<b>0.003</b>
Temperatura rectal	393	0.004	0.0311	Normotermia	Ref		
				Hipertermia	<b>2.75</b>	1.40-5.40	<b>0.003</b>
Diarrea	398	0.10	0.01	Ausencia	Ref		
				Presencia	<b>1.71</b>	0.89-3.31	<b>0.10</b>

**Tabla Anexo XIII.** Asociación entre la muerte de los animales y los factores de manejo.

Variable	Obs.	P Chi <sup>2</sup>	pR <sup>2</sup>		OR	IC 95%	valor P
Tiempo al desmadre	358	<0.001	0.0553	<12 h	Ref		
				≥12 h	<b>0.27</b>	0.13-0.55	<b>&lt;0.001</b>

Tipo de calostrado	358	<0.01	0.0313	Natural	Ref		
				Artificial	<b>2.66</b>	1.31-5.38	<b>0.006</b>
Operario de crianza	398	<0.001	0.0536	Exclusivo	Ref		
				Otras tareas	<b>3.87</b>	1.80-8.34	<b>0.001</b>
Tipo de sistema de crianza utilizado	398	<0.001	0.0530	Individual	Ref		
				Colectivo	<b>4.60</b>	0.47-5.02	<b>0.006</b>
				Mixto	1.55	0.47-5.02	0.46
Rota la guachera	398	<0.001	0.0685	No	Ref		
				Si	<b>0.06</b>	0.01-0.46	<b>0.007</b>
Suministro de leche de descarte	398	<0.001	0.0925	No	Ref		
				Si	<b>0.17</b>	0.08-0.37	<b>&lt;0.001</b>
Suministro de sustituto lácteo	398	<0.001	0.0925	No	Ref		
				Si	<b>5.79</b>	2.68-12.47	<b>&lt;0.001</b>
Uso de vacunas contra el SDN en el parto	378	<0.001	0.0977	No	Ref		
				Si	<b>5.71</b>	2.76-11.78	<b>&lt;0.001</b>
Score de mortalidad	398	<0.001	0.0532	Baja-Media	Ref		
				Alta	<b>5.33</b>	1.86-15.28	<b>0.002</b>
Tamaño del rodeo	359	<0.001	0.1962	Pequeño-mediano	Ref		
				Grande	<b>27.14</b>	6.42-114.70	<b>&lt;0.001</b>

**Tabla Anexo XIV.** Asociación entre enteropatógenos y la muerte de los animales.

Variable	Obs.	P Chi <sup>2</sup>	pR <sup>2</sup>		OR	IC 95%	valor P
<i>Cryptosporidium</i> spp.	398	0.16	0.0074	No	Ref		
				Si	<b>1.59</b>	0.83-3.04	<b>0.162</b>
<i>E. coli</i>	398	0.94	0.00	No	Ref		
				Si	0.94	0.11-7.61	0.95
<i>E. coli</i> F5+ en terneros <8 días de vida	106	0.95	0.00	No	Ref		
				Si	0.93	0.10-8.22	0.95

**Grado de concordancia e índice Kappa entre el ELISA y la tinción de auramina-fenol**

**Tabla Anexo XV.** Tabla de contingencia entre el ELISA y la tinción de auramina-fenol.

		ELISA <i>Cryptosporidium</i> spp.		
		Negativo	Positivo	Total
Auramina-fenol	Negativo	117	9	126
	Positivo	31	124	155
	Total	148	133	281

**Tabla Anexo XVI.** Resultados de concordancia.

Acuerdo	Acuerdo esperado	Kappa	Error Standard	Z	Prob>Z
85.77%	49.72%	0.72	0.06	12.17	0.00