

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UN EUBIÓTICO SOBRE LA FRECUENCIA DE
DIARREA NEONATAL Y EXCRECIÓN FECAL DE OOQUISTES EN TERNEROS
LECHEROS INFECTADOS NATURALMENTE CON CRYPTOSPORIDIUM SPP**

Por

Andrea GRAÑA DE AVILA y Juliana IBARRA ROSA

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias Orientación: Producción Animal

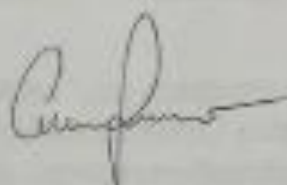
MODALIDAD: Ensayo Experimental

MONTEVIDEO
URUGUAY
2023

PAGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



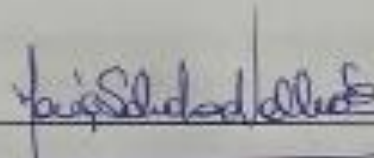
MV. Carlos Javier Garro MSc

Segundo miembro (Tutor):



Vet. Darío Caffarena MSc., PhD.

Tercer miembro

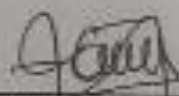


DMV. Maria Soledad Valledor MSc.

Fecha:

27/12/2023

Autores:



Br. Andrea Graña De Avila



Br. Juliana Ibarra Rosa

AGRADECIMIENTOS

A nuestro tutor Darío Caffarena por contribuir en nuestra formación académica, su apoyo en esta tesis y dejarnos ser parte de este proyecto.

Al propietario, encargado y personal del establecimiento “El Alba” por colaborar en esta tesis y brindarnos el apoyo durante toda la estadía en el transcurso de este proyecto y formar parte del equipo de trabajo y enriquecernos profesionalmente.

A Agrifirm Uruguay SA por financiar este proyecto.

A Lic. Bq. Martin Fraga MSc., PhD. y al personal del laboratorio de microbiología de la Plataforma de Salud Animal de INIA La Estanzuela por la realización de los cultivos bacterianos.

Al Vet. Joaquín Armendano MSc., MPH por realizar los modelos estadísticos y asistirnos en la interpretación de los mismos.

Al personal de Biblioteca por facilitarnos el acceso al material para la bibliografía utilizada que nos permitió el desarrollo de este trabajo.

A la Facultad de Veterinaria por abrirnos las puertas permitiendo nuestra formación académica y brindarnos las herramientas para formarnos como profesional.

A familiares y amigos por apoyarnos en el transcurso de nuestra carrera siendo un pilar fundamental.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURA.....	6
RESUMEN.....	7
SUMMARY	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Características generales del SDN	11
2.2. Historia – <i>Cryptosporidium</i> spp.	12
2.3. Etiología y epidemiología	13
2.3.1 Agente	13
2.3.2. Ciclo biológico:	14
2.3.3. Huésped.....	15
2.3.4. Ambiente	16
2.4. Patogenia	17
2.5. Signos Clínicos.....	17
2.6. Diagnóstico.....	18
2.7. Medidas de control y prevención	18
2.8. Tratamiento	19
3. HIPÓTESIS.....	20
4. OBJETIVOS	20
5. MATERIALES Y METODOS.....	21
5.1 Animales	21
5.2 Diseño experimental.....	22
5.3 Manejo parto y posparto temprano	22
5.4 Signos clínicos y tratamientos	23
5.5 Frecuencia de diarrea	25
5.6 Diagnóstico de enteropatógenos.....	25
5.7 Riesgo de excreción y recuento de ooquistes	26
5.8 Mortalidad	27
5.9 Análisis estadístico.....	27
6. RESULTADOS.....	28
6.1 Manejo posparto temprano	28

6.2 Signos clínicos y tratamientos	30
6.3 Frecuencia de diarrea y diagnóstico de enteropatógenos	30
6.4 Diagnóstico de enteropatógenos	32
6.5 Riesgo de eliminación y recuento de ooquistes	33
6.6 Mortalidad	35
7. DISCUSIÓN.....	36
8. CONCLUSIÓN	39
9. BIBLIOGRAFIA.....	40
10. ANEXO.....	51
10.1 Riesgo de eliminación de ooquistes (% de animales que liberan ooquistes) – Paso 1	52
10.2 Recuento de Ooquistes sólo considerando animales que eliminan ooquistes – Paso 2	52
10.3 Riesgo de diarrea	53

LISTA DE TABLAS Y FIGURA

TABLAS

Tabla 1. Genotipo y número de animales por tratamiento.....	21
Tabla 2. Parámetros clínicos evaluados.....	23
Tabla 3. Escala de materia fecal en base a su descripción y consistencia.....	24
Tabla 4. Cantidad de animales, litros, calidad de calostro y porcentaje de calostro con relación al peso al nacimiento.....	28
Tabla 5. Porcentaje de animales afectados por categoría del total de animales tratados	30
Tabla 6. Descripción de número de animales, días de vida al momento del diagnóstico de diarrea y días de vida al momento de la muerte.....	35
Tabla 7. Modelo de ajuste para mortalidad.....	35
Tabla 8. Modelo mixto generalizado para riesgo de eliminación de ooquistes..	52
Tabla 9. Modelo mixto generalizado para recuento de ooquistes.....	52
Tabla 10. Modelo mixto generalizado para riesgo de diarrea.....	53

FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	15
Figura 2. Pared de ooquistes de <i>C. parvum</i>	16
Figura 3. Metodología utilizada para la semicuantificación de ooquistes.....	26

RESUMEN

Cryptosporidium spp. es un parásito protozoario causante de diarrea en varias especies, incluidos los seres humanos, lo que lo convierte en una zoonosis. En los bovinos la principal categoría en la que produce signos clínicos es en los terneros. Es uno de los principales enteropatógenos causantes del síndrome de diarrea neonatal (SDN), principal causa de mortalidad en terneros neonatos a nivel mundial. A pesar de su impacto, en nuestro país, la disponibilidad de productos comerciales eficaces contra este patógeno es limitada. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de un eubiótico, compuesto por fitoquímicos y aceites esenciales, sobre la ocurrencia de diarrea y excreción fecal de ooquistes, en terneros lecheros expuestos naturalmente con *Cryptosporidium* spp. en un rodeo comercial. A su vez también evaluar la transferencia de inmunidad pasiva (TPI), parámetros clínicos y mortalidad. El estudio se realizó mediante un ensayo experimental aleatorio, doble ciego de dos tratamientos (tratado y placebo/control). Un total de 72 terneros fueron separados aleatoriamente en dos grupos de 36 animales, un grupo recibió un eubiótico (grupo tratado) y el segundo una solución de cloruro de sodio al 0,9% (ClNa 0,9%; grupo control). Ambos tratamientos fueron suministrados por vía oral, diariamente una vez al día, desde el primer día de vida hasta el desleche (9 semanas). Dentro de las 48 horas de vida de cada animal se tomó una muestra de suero para evaluar, de manera indirecta, la TPI mediante refractometría. Se recolectaron muestras fecales dos veces por semana durante las primeras 5 semanas de vida para evaluar la ocurrencia de diarrea y la excreción fecal de ooquistes. A su vez se analizaron 7 mezclas de materia fecal diarreica de los animales que presentaban score de materia fecal ≥ 2 de los diferentes corrales, para evaluar la presencia de Rotavirus Grupo A, Coronavirus bovino, *Escherichia coli* F5+ y *Cryptosporidium* spp. mediante un test rápido de inmunocromatografía lateral y *Salmonella* spp por cultivo. El único enteropatógeno detectado fue *Cryptosporidium* spp. Los resultados mostraron que, bajo las condiciones del presente ensayo, el eubiótico no tuvo un efecto significativo en la ocurrencia de diarrea, en la excreción de ooquistes ni en la mortalidad. Este estudio proporciona una base para futuras investigaciones y desarrollo de alternativas para el control de *Cryptosporidium* spp en nuestro país. Es fundamental que estas investigaciones se realicen en condiciones de campo, siguiendo rigurosos métodos científicos para generar información robusta y relevante que sea de utilidad para los usuarios.

SUMMARY

Cryptosporidium spp. is a protozoan parasite that causes diarrhea, including humans, which makes it a zoonosis. In cattle, the main affected category is calves. It is one of the main enteropathogens causing neonatal diarrhea syndrome (NDS), the main cause of mortality in neonatal calves worldwide. Despite its impact, the availability of effective commercial products against this pathogen in our country is limited. The aim of this study was to evaluate the effect of a eubiotic, composed of phytochemicals and essential oils, on the frequency of diarrhea and fecal oocyst shedding in naturally infected dairy calves with *Cryptosporidium* spp. in a commercial dairy farm. Additionally, we aimed to assess passive immunity transfer (PIT), clinical parameters, and mortality. The study was conducted through a randomized, double-blind experimental trial with two treatments (treated and placebo/control). A total of 72 calves were randomly divided into two groups of 36 animals each, where the first group received a eubiotic (treated group) and the second a 0,9% sodium chloride solution (NaCl 0,9%; control group). Both treatments were administered orally from the first day of life until weaning (9 weeks). Within 48 hours of birth, a serum sample was taken from each animal to indirectly assess PIT using refractometry. Biweekly fecal samples were collected during the first 5 weeks of life to evaluate the frequency of diarrhea and fecal oocyst shedding. Additionally, seven pools of diarrheic feces were analyzed to assess the presence of Rotavirus Group A, bovine Coronavirus, *Escherichia coli* F5+, and *Cryptosporidium* spp. using a lateral flow immunochromatography test, and *Salmonella* spp. by culture. The only enteropathogen detected was *Cryptosporidium* spp. The results showed that, under the conditions of the present trial, the eubiotic had no significant effect on the frequency of diarrhea, oocyst shedding or mortality. It is important to emphasize that this study provides a basis for future research and the development of alternatives for *Cryptosporidium* spp control in our country. It is essential that these investigations are conducted under field conditions and following rigorous scientific methods to generate solid and relevant information that will be useful for end-users.

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, Uruguay ha experimentado una intensificación de sus sistemas productivos lecheros. Esto se evidencia mediante el aumento de la producción láctea experimentada a nivel nacional con un stock lechero estable, el cual se concentra en una menor cantidad de establecimientos y, a su vez, en una menor superficie (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, MGAP, 2022).

La intensificación de los sistemas productivos trae aparejado una serie de desafíos, como ser los sanitarios. Particularmente, en los sistemas intensivos de crianza artificial (“guacheras”), uno de los problemas asociados con la intensificación productiva es el síndrome de diarrea neonatal (SDN) (Lean, Westwood y Playford, 2008, Stafford y Gregory, 2008).

El SDN es la principal causa de muerte en las guacheras, llegando a representar el 50% del total de las muertes (Urie et al., 2018). Es un síndrome multietiológico y multifactorial, en el cual interactúan diferentes variables relacionadas al patógeno, factores ambientales, de manejo y al estado inmunológico y nutricional del animal (Izzo et al, 2011; Smith, 2012).

Dentro de los agentes involucrados en el SND se encuentran, *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Salmonella* spp., *Cryptosporidium* spp., rotavirus y coronavirus (Foster y Smith, 2009); siendo *Cryptosporidium* spp. una de las principales causas de diarrea a nivel mundial y nacional en terneros menores a 3 semanas de vida (Adkins, 2022; Caffarena et al., 2021).

Cryptosporidium spp. es un parásito protozoario que afecta la porción distal de intestino delgado de varias especies, incluyendo los bovinos y los humanos, ocasionando cuadros diarreicos (De Graaf, Vanopdenboscha, Ortega-Mora, Hayet Abbassi y Peeters, 1999; Sima et al., 2019). Presenta un ciclo directo y monoxeno (un solo huésped), invadiendo y colonizando las células epiteliales del intestino con una localización intracelular extracitoplasmática (vacuola parasitófora). Esta localización es el motivo por el cual no logran ser exitosos los tratamientos con antimicrobianos (De Graaf et al., 1999).

Si bien la criptosporidiosis no genera altas tasas de mortalidad, sí se producen pérdidas económicas referidas a los costos de tratamientos, prácticas de higiene, así como también mermas en el crecimiento y el desarrollo del ternero (De Graaf et al., 1999; Shaw, Innes, Morrison, Katzer, y Wells (2020).

La resistencia a los antimicrobianos y el uso indiscriminado de zooterápicos es una de las grandes preocupaciones a nivel mundial; por lo que desde la industria se buscan nuevas alternativas que nos llevan a abordar la salud animal de una manera diferente (Barragry, 2020).

Con este fin es que se han probado aditivos alimentarios como ser probióticos, prebióticos, ácidos orgánicos, aceites esenciales y fitoquímicos, los cuales los podemos englobar dentro del término eubiótico. Esta palabra está relacionada con el término “eubiosis”, el cual hace referencia a la presencia de una microbiota la cual se encuentra en un equilibrio óptimo con el consecuente beneficio en la salud y performance (Ponziani, Zocco, D’Aversa, Pompili y Gasbarrini, 2017; Barragry, 2020).

En los últimos años se han realizado diversos estudios para evaluar la eficacia de diferentes productos contra *Cryptosporidium* spp. con resultados dispares. Uno de los pocos productos aprobados es el lactato de Halofuginona, un criptosporidiostático, el cual presenta evidencia científica de su impacto positivo sobre la disminución en la incidencia de diarrea, excreción de ooquistes y mortalidad (Brainard et al., 2021). Sin embargo, la ventana terapéutica que tiene este derivado de las quinozolinonas es relativamente estrecho pudiendo ocasionar cuadros de toxicidad (Villacorta, Peeters, Vanopdenbosch, Ares-Mazas y Theys, 1991); sumado a que está contraindicada su administración en animales que cursen con diarrea por más de 24 horas, así como también en animales deshidratados y/o débiles (European Medicines Agency, 2007; Brainard et al., 2021).

Con respecto a la prevención y tratamiento contra *Cryptosporidium* spp., existen trabajos realizados con eubióticos, tanto in vitro como in vivo que demuestran ser eficaces contra este parásito (Liu et al., 2020; Sima et al., 2019; Stratakis et al., 2017; Vélez et al., 2019). Sin embargo, muchos de los eubióticos disponibles en el mercado no han sido probados y no tienen literatura científica específica que los avale, lo que representa un problema tanto para veterinarios como productores a la hora de seleccionar una alternativa viable a los zooterápicos conocidos (Barragry, 2020).

La posibilidad de disponer de otras alternativas con un mayor margen terapéutico, naturales, de baja toxicidad y efectivas, en contexto con las reglamentaciones que están ocurriendo en otros países y que tengan sustento científico, se presenta como una necesidad imperante a ser cubierta tanto a nivel nacional como internacional.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características generales del SDN

El SDN es la principal causa de morbi y mortalidad en terneros durante el primer mes de vida. Este síndrome genera costos económicos asociados a los tratamientos, asistencia profesional y un menor desarrollo y crecimiento de los animales, afectando de esta manera el número de reemplazos (Izzo et al., 2011).

Dentro del SDN intervienen factores, tanto infecciosos como no infecciosos. Dentro de los factores no infecciosos debemos tener en cuenta factores inmunitarios, ambientales, de manejo y nutricionales. Desde el punto de vista inmunitario, el calostro es la principal fuente de inmunoglobulinas y nutrientes en el ambiente extrauterino. Contiene compuestos bioactivos que promueven la maduración de los enterocitos inmaduros para una mejor digestión y absorción de nutrientes (Godden et al., 2012; Osorio, 2020), así como también favorece la colonización de la microbiota intestinal (Hang, Wredle y Dicksved, 2020). Estas características favorecen la protección contra patógenos oportunistas, representando una de las primeras barreras de defensa con las que cuentan los bovinos neonatos (Osorio, 2020). Se entiende por un correcto calostrado cuando los animales alcanzan niveles de inmunoglobulinas séricas maternas mayores a los 10 g/L; una opción alternativa y de fácil implementación en condiciones de campo es el utilizar refractómetros (ópticos o digitales) para hacer una estimación indirecta de las inmunoglobulinas (Godden et al., 2019).

Otros dos puntos importantes a tener en cuenta dentro de los factores no infecciosos son el manejo y el ambiente donde se realiza la crianza de los terneros, para lo que se recomienda protección de viento, lluvias y buena ventilación evitando corrientes de aire, además proveer de una buena cama y realizar limpieza de la misma periódicamente. En el manejo de crianza tanto individual como colectivo debe considerar un espacio de 1,5 a 2 m² por animal y en crianzas colectivas formar grupos de no más de 6 u 8 animales. En cuanto a la nutrición, la leche debe suministrarse a temperatura corporal de la vaca (38 ° C) y el alimento sólido debe ofrecerse desde los primeros días de vida a voluntad y de preferencia en forma de pellet con un nivel de 18-20% de proteína cruda en la materia seca (Lanuza, 2006).

Sumado al status sanitario e inmunitario de los terneros, prácticas de manejo e higiénicas que favorezcan situaciones estresantes, de hacinamiento, así como también dietas restrictivas, en lo que a capacidad de nutrientes respecta, son todas causas componentes que participan en que ocurra (o no) un brote de SDN (Smith, 2012).

Dentro de los factores infecciosos que intervienen en el SDN encontramos patógenos virales (rotavirus y coronavirus), bacterianos (*Escherichia coli* F5+ [K99] enterotoxigénica y *Salmonella* spp) y protozoarios (*Eimeria* spp, *Cryptosporidium* spp) (Izzo et al., 2011).

- ❖ Rotavirus: Se clasifica dentro de la familia Reovirus, presenta una doble cadena de ARN segmentada. Este virus afecta a terneros dentro de sus 3 a 15 días de edad pudiendo llegar a infectarlos hasta las 3 semanas de vida (Navarra, 2000). Genera una diarrea por mala absorción (García

et al., 2000). Junto con *Cryptosporidium* spp. son la causa más común de SDN en terneros menores a los 30 días de vida (Blanchard, 2012).

- ❖ **Coronavirus:** Se ubica dentro de la familia Coronaviridae, con ARN no segmentado (Khalili, Morshedi, Hemmatzadeh y Keyvanfar, 2006). Causa diarrea en terneros desde los 5 hasta los 30 días, esta diarrea se da por una mala absorción y mala digestión (Navarra, 2000).
- ❖ ***Escherichia coli*:** Pertenece a la familia Enterobacteraceae, es un bacilo, Gramnegativo, anaerobio facultativo. Si bien muchas de estas cepas son comensales de la microbiota del intestino delgado, algunas son causantes de enfermedades intestinales como la *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* verotoxigénica (VTEC), *E. coli* necrotoxigénica (NTEC) y extraintestinales. La ETEC específicamente es causante de diarrea acuosa y severa en terneros entre 1 a 7 días de vida (Blanchard, 2012; Mainil, 2013).
- ❖ ***Salmonella* spp.:** Es una bacteria gram negativa, perteneciente a la familia Enterobacteraceae anaerobia facultativa. Existen dos especies, *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori* dentro de las cuales hay más de 2500 serotipos. La salmonelosis bovina es causada predominantemente por *Salmonella entérica* subsp. entérica serotipos Dublin y Typhimurium, afectando esta última antes de los 30 días de vida (Costa, Paixão, Tsolis, Bäumler y Santos, 2012; Uzal, 2014).
- ❖ ***Eimeria* spp.:** Es un protozoo de la familia Eimeriidae. Las infecciones se pueden ver a partir de 2 a 3 semanas de vida, pero es más común de 3 a 6 meses (Uzal, 2014). Puede cursar de forma asintomática con diarrea transitoria hasta diarreas fétidas, secciones de mucosa, fibrina y sangre (Saravia, 2020).
- ❖ ***Cryptosporidium* spp.:** Es un protozoo que se asocia con las familias de protozoos Eimeria, Isospora, Sarcocystis y Toxoplasma (Hunt, 1995). Causa una diarrea de tipo de mala digestión y mala absorción. Como se mencionó previamente es una de las principales causas del SDN en bovinos neonatos que afecta sobre todo entre los 3 y 33 días de vida (Izzo et al. 2011; Blanchard, 2012).

2.2. Historia – *Cryptosporidium* spp.

Ernest Edward Tyzzer en 1907 realizó la primera descripción del género *Cryptosporidium* spp., al observarlo en las glándulas gástricas de ratones de laboratorio (*C. muris*) (Tyzzer, 1910). En 1912 se determina la existencia de otra especie dentro de este género en ratones de laboratorio, solo que en esta oportunidad localizado en la mucosa intestinal la cual se denominó *C. parvum* (Tyzzer, 1912). A pesar de que se descubrió en 1907, recién en 1971 se consideró un agente etiológico capaz de generar diarrea en terneros (Panciera, Tomasén y Garner, 1971).

2.3. Etiología y epidemiología

2.3.1 Agente

Cryptosporidium spp. es un parásito intestinal ubicuo (Adkins, 2022) que se encuentra clasificado dentro de los protozoarios en el Phylum Apicomplexa, Familia Cryptosporidiidae y Género *Cryptosporidium* (Fayer y Xiao, 2007).

Algunos autores lo asocian genéticamente con la clase Gregarina (Barta y Thompson, 2006; Carreño, Martin y Barta 1999), debido a que el ciclo biológico de *Cryptosporidium andersoni* presenta una etapa extracelular (Hijawi, Melonib, Ryana, Olson y Thompsona, 2002).

Dentro del género *Cryptosporidium* existen cerca de 40 especies (Adkins, 2022). Dentro de las cuales el *C. parvum* es la especie más frecuentemente asociada a cuadros diarreicos en terneros neonatos y se la considera una zoonosis a nivel mundial, siendo los niños, ancianos y personas inmunocomprometidas los individuos más afectados (Xiao y Feng, 2008).

Otras especies implicadas en la infección en bovinos son *C. bovis* y *C. ryanae*, sobre todo en terneros destetados, y *C. andersoni* en adultos (Adkins, 2022).

La vía de transmisión es fecal-oral mediante el contacto directo con animales infectados o de manera, indirecta por manipulación de alimentos, aguas y utensilios contaminados con ooquistes (Ryan, Fayer y Xiao, 2014).

Cryptosporidium spp. se ubica en el intestino delgado, teniendo una predilección por yeyuno e íleon; algunas veces se puede encontrar en intestino grueso sobre todo en ciego y colon, ocasionalmente puede llegar a parasitar todo el intestino (Cordero del Campillo, 1999). Los ooquistes son eliminados en grandes cantidades al medio ambiente (Martins-Vieira, Brito y Heller, 2009).

Un ternero infectado es capaz de eliminar hasta 6×10^6 ooquistes por gramo de heces (Fayer et al., 1998), generando una gran contaminación en el ambiente, pudiendo también contaminar el alimento y el agua (Martins-Vieira et al., 2009). Dándose las condiciones propicias para la supervivencia del ooquiste, como son temperatura y humedad, este puede perdurar durante meses en el ambiente (Fayer, Morgan y Upton, 2000).

En referencia a la frecuencia de detección de *Cryptosporidium* spp. en establecimientos lecheros a nivel mundial, ésta oscila entre 50,5 a 96% (Al Mawly, Grinberg, Prattley, Moffa, y French, 2015; Silverlås Emanuelson, de Verdier y Bjorkman, 2009; Smith, Clifton-Hadley, Cheney y Giles, 2014).

Se ha reportado en países como Nueva Zelanda, España, EE. UU., Francia, Irán y Canadá una prevalencia de *C. parvum* en terneros lecheros entre 16 a 52%; (Al Mawly et al., 2015; Delafosse et al., 2015) y en países de la región, como Argentina, se han reportado prevalencias de entre 16 a 25% (Garro, Morici, Utgés, Tomazic y Schnittger, 2016; Lombardelli, Tomazic, Schnittger y Tiranti, 2019), en Brasil varía entre un 3 a 64% (Cruvinel et al., 2020; Holsback et al., 2018) y en Uruguay, si bien no hay trabajos que especifiquen datos de prevalencia, existe un estudio reciente donde se evaluó un total de 27 establecimientos y se determinó que en el 100%, al menos un animal, fue diagnosticado con *Cryptosporidium* spp (Caffarena et al., 2021).

La tasa de morbilidad puede llegar al 100% en predios endémicos, en cambio la mortalidad suele ser baja pudiendo aumentar cuando existen infecciones concomitantes con otros enteropatógenos (De Graaf et al., 1999).

2.3.2. Ciclo biológico:

El ciclo de vida del parásito es monoxeno, es decir, no necesita de huésped intermediario para su transmisión (un solo huésped) (Chalmers y Davies, 2010).

El mismo ocurre en el tracto gastrointestinal (Figura 1); posteriormente a la ingestión de los ooquistes, por efecto del pH abomasal, enzimas digestivas y de las sales biliares, ocurre la exquistación con la consecuente liberación de cuatro esporozoítos infecciosos. Estos se fijan a la superficie de los enterocitos (específicamente a un receptor ubicado en las microvellosidades) encapsulándose en su interior, tomando una ubicación intracelular pero extracitoplasmática (vacuola parasitófora) (Chalmers y Davies, 2010).

Estos esporozoítos luego se diferencian en trofozoítos (Hunt, 1995). En este momento se da comienzo a la fase asexual del ciclo donde se producen dos generaciones de merontes, tipo I y II. Los de la primera generación liberan entre 6-8 merozoítos que van a infectar nuevas células epiteliales generando nuevos merozoítos o merontes tipo II, los cuales tienen 4 merozoítos y dan lugar a la formación de microgametos y macrogametos. Estos se transforman en microgametocitos y macrogametocitos, respectivamente, iniciando la fase sexual del ciclo (Smith, Caccio, Cocinero, Nichols y Tait, 2007).

El microgametocito fertiliza a macrogametocitos, los cuales permanecen fijados al epitelio produciendo el cigoto, el cual pasa por una fase de meiosis obteniendo cuatro esporozoítos. A diferencia de otras coccidias, el *Cryptosporidium* spp. realiza el proceso de esporulación en el huésped, liberando al ambiente los ooquistes en su forma infecciosa (Clode, Koh y Thompson, 2015).

Previo a la esporulación se da la formación de la pared del ooquiste, generando dos tipos de ooquistes, los de pared delgada (20%) responsables de la autoinfección al desenquistarse en la luz del intestino y los de pared gruesa (80%) que son eliminados al ambiente ya que presentan una mayor resistencia (Smith et al., 2007).

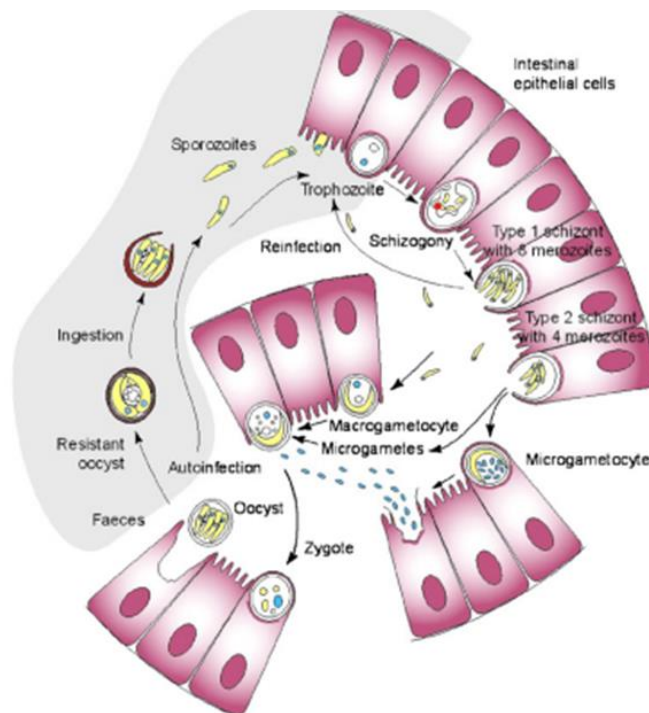


Figura 1. Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. (Smith et al., 2007).

2.3.3. Huésped

Varios estudios han informado que la susceptibilidad del ganado bovino a *Cryptosporidium* spp. varía según el rango de edad que presenten los animales.

Como se mencionó previamente, la especie con mayor prevalencia en bovinos es *Cryptosporidium parvum*, afectando principalmente a terneros menores de un mes de vida (Alves, Xiao, Antunes y Matos, 2006; Coklin et al. 2009; Dixon et al., 2011). En la etapa de posdestete aumenta la prevalencia de otras especies de *Cryptosporidium* spp., como *C. bovis* y *C. ryanae* y, en animales mayores de 12 meses, se observa un aumento de infección por *C. andersoni*, el cual afecta principalmente al abomaso (Castro-Hermida et al., 2007; Fayer, Santín, Trout y Greiner, 2006; Fayer, Santín y Trout, 2007; Fayer, Santín y Dargatz, 2010). Aunque esta distribución de especies según la edad de los animales no está del todo comprendida (Díaz et al., 2021), sí se sabe que la mayor susceptibilidad que presentan los neonatos a presentar criptosporidiosis clínica, es debido a la inmadurez de su sistema inmune (Fayer et al., 2007).

Por el tipo de placentación que tienen los rumiantes (sinepiteliocorial) no hay pasaje de inmunoglobulinas de la madre al feto in útero (Godden, Lombard y Woolums, 2019) por lo que dependen exclusivamente de la ingestión de calostro para lograr una transferencia de inmunidad pasiva exitosa lo cual está asociado con una menor morbi-mortalidad (Uribe et al., 2018).

Hasta el 2023 no existían vacunas comerciales para *Cryptosporidium* spp.; en dicho año, en Europa, se autorizó la primer vacuna, con base en la glicoproteína Gp40, para inmunizar a vacas preñadas contra la criptosporidiosis (Bovilis Cryptium, MSD Animal Health) (European Medicine Agency, 2023; Diario Veterinario, 2023). Los animales inoculados con este inmunógeno presentaron mayores niveles de anticuerpos tanto séricos como calostrales sin embargo no se evaluó el impacto sobre la excreción de ooquistes ni en la ocurrencia de diarrea en sus crías o en animales neonatos los cuales hayan consumido el calostro de esos animales (Hubers, Gevers, Timmermans, Vertenten, y Roosmalen, 2023). Independientemente del uso de una vacuna específica, se ha reportado que animales que consumen calostro en tiempo, calidad y cantidad, presentan signos de criptosporidiosis más leves, así como también una mejor respuesta inmune a nivel local (Gamsjäger et al., 2023; Lefkaditis et al., 2020).

2.3.4. Ambiente

El medio ambiente es un factor de suma importancia ya que el ooquiste tiene la capacidad de sobrevivir a diversas condiciones ambientales (Merry, Mawdsley, Brooks y Davies, 1997) por ejemplo, teniendo en cuenta las condiciones climáticas en Uruguay, podría suponerse una sobrevida en la materia fecal de entre 14 (a 35°C) a 90 días (a 15°C) (Li, Atwill, Dunbar y Tate, 2010) y de 3 a 6 meses en el ambiente, agua, madera/plástico (Robertson Campbell y Smith, 1992; King, Keegan, Monis y Saint, 2005; Piva et al., 2016). Esta capacidad de supervivencia puede estar explicada por la química compleja de las capas que componen la pared del ooquiste. El ooquiste presenta una estructura de cuatro capas: 1- una capa densa, externa e irregular (glucocálix), 2- una capa delgada, intermedia y translúcida en electrones (lípidos), 3- una capa delgada y densa en electrones que presenta las principales proteínas estructurales de la pared y, por último, 4- una capa densa en electrones formada por polisacáridos (Figura 2).

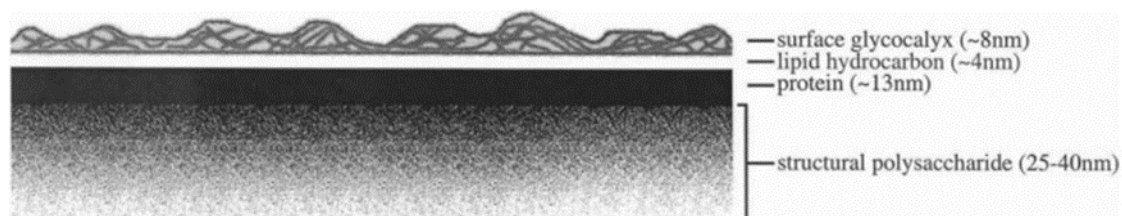


Figura 2. Pared de ooquiste de *C. parvum* (Jenkins et al., 2010).

Una alteración en la capa externa del glucocálix por cambios ambientales, tanto naturales como artificiales, afectará su transporte hidrológico y su propiedad de inmunogenicidad disminuyendo la patogenicidad del ooquiste (Jenkins et al., 2010). Esta cubierta exterior que presentan les permite una alta supervivencia frente a los desinfectantes comúnmente usados y una resistencia elevada a cloración del agua (Merry et al., 1997), aunque pueden llegar a ser inactivados por desinfectantes físicos y químicos como radiación ultravioleta, ozono, amoníaco, altas temperaturas, la desecación, la congelación y medios ácidos y alcalinos extremos (Jenkins et al., 2010).

Se ha demostrado que los ooquistes son resistentes a varias temperaturas ambientales que pueden ir desde 22 °C a 60 °C (Casemore, 1990; Fujino et al., 2002) y cuando estas temperaturas disminuyen a menos de 15 °C, los ooquistes siguen

siendo infectivos por algunos años y a temperaturas altas se da una inactivación de los ooquistes a los 21 días con 30 °C y a las 72 horas con 37 °C (Adkins, 2022).

2.4. Patogenia

Argenzio, Tzipori y Heine citados por Foster y Smith (2009), describen que cuando ocurre la infección por *C. parvum* en terneros, existe una pérdida de los enterocitos con la consecuente atrofia de las vellosidades causando una hiperplasia de las criptas y aumento de la permeabilidad intestinal (Foster y Smith, 2009).

Debido a la pérdida del área de superficie epitelial se produce una diarrea por malabsorción, variando su gravedad según la carga infectiva que presente el animal y si hay coinfecciones (Argenzio et al., 1990; Gookin, Nordone y Argenzio, 2002; O'Handley y Olson, 2006).

Otros estudios afirman que se encuentran altas concentraciones de prostaglandinas PGE2 y PGI2 en el tejido infectado por *C. parvum*, las cuales activan la secreción de aniones como Cl^- y HCO_3^- inhiben la absorción de NaCl alterando el transporte de electrolitos y, por ende, agravando el cuadro de diarrea por mal absorción. Parece que la probable fuente de estas prostaglandinas es por macrófagos que invaden la lámina propia como respuesta a la infección (Argenzio, Lecce y Powell, 1993; Gookin et al., 2002).

2.5. Signos Clínicos

La criptosporidiosis presenta una variedad de signos clínicos los cuales van a depender, entre otras cosas, de la especie de *Cryptosporidium* spp. con el cual se infecten los animales, la dosis infectiva y la inmunidad que presenten los terneros (do Couto, de Freitas Lima y do Bérnago, 2014).

Algunos animales suelen ser asintomáticos (do Couto et al., 2014) pero en general, aquellos que son infectados, presentan una diarrea acuosa profusa, inapetencia, letargia, deshidratación y, en ocasiones, la muerte (Thomson et al., 2017). Los terneros con infecciones severas, que no mueren, llegan a presentar signos clínicos durante 3 a 4 semanas. (Lombardelli et al., 2019).

La diarrea puede comenzar a los 3 a 4 días luego de la ingestión de los ooquistes infectivos y se extiende por 1 a 2 semanas (Thomson et al., 2017). La presencia de este signo clínico es variable, se habla que puede ir desde un 15% hasta un 100% en terneros que se encuentren liberando ooquistes (Garro et al., 2016). La excreción de ooquistes se da entre 4 a 12 días luego de la infección (Thomson et al., 2017).

Además de los signos clínicos, podemos decir que terneros que padecieron diarrea tienden a tener una menor productividad cuando son adultos, esto se debe a que presentan una menor ganancia de peso vivo. A su vez estos animales suelen tener una mayor edad al primer parto llevando a, un menor rendimiento reproductivo. Todo esto resulta en grandes pérdidas económicas que se suman a los costos por los tratamientos y la mano de obra (Garro et al., 2021).

2.6. Diagnóstico

Existen diversos métodos diagnósticos para detección de *Cryptosporidium* spp. Uno de los más utilizados, tanto por su bajo costo como por no requerir la necesidad de equipamiento costoso, es la visualización microscópica de frotis fecales teñidos mediante la técnica de Ziehl-Neelsen modificado o de auramina- fenol (Díaz-Lee et al., 2015).

Mediante estas técnicas se identifican los ooquistes, los cuales son de estructura esférica u ovoide y miden entre 4 a 6 μm . En la tinción de Ziehl- neelsen modificado los ooquistes se tiñen de color, tienen forma esférica, bajo un fondo verde pálido. Al usar la tinción de auramina- fenol los ooquistes se observan en forma de anillo, mostrando una fluorescencia verde brillante en un fondo oscuro (Fayer et al., 2000). Con esta última tinción los ooquistes pueden visualizarse bajo un objetivo de baja potencia (10 o 20x) en un microscopio de epifluorescencia y deben confirmarse a mayor aumento (Fayer et al., 2000).

Debemos tener en cuenta que a pesar de que la microscopía sea un método económico y simple de realizar, puede verse afectada por la interpretación del técnico y la consistencia de la muestra de materia fecal.

Al igual que las tinciones, otros métodos como ser la flotación fecal y los métodos de detección de antígenos como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por su sigla en inglés), la inmunofluorescencia y la inmunocromatografía, no diferencian entre especies de *Cryptosporidium* spp (Blanchard, 2012).

Por esto es que se han desarrollado técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este método posee una mayor sensibilidad comparado con los métodos convencionales e inmunológicos. Puede procesar varias muestras de forma rápida, con un costo bajo y a diferencia de los demás métodos, es capaz de diferenciar entre especies. Su desventaja es que debe contar con personal capacitado (Díaz-Lee et al., 2015).

Como otras alternativas diagnósticas tenemos la histopatología, donde se puede observar la unión del *Cryptosporidium* spp. a los enterocitos, así como también la atrofia y apelmazamiento de las vellosidades intestinales (Blanchard, 2012).

2.7. Medidas de control y prevención

Es importante mantener una correcta higiene en el ambiente y buenas medidas de manejo para disminuir el riesgo de infección de *Cryptosporidium* spp. en los terneros, ya que se contrae por la ingestión de ooquistes en materiales que se encuentren en el medio ambiente o alimentos y aguas contaminadas.

Los ooquistes presentan una resistencia elevada a los desinfectantes comunes a dosis habituales. Los desinfectantes que presentan mayor efectividad son el amoníaco entre 5-50%, el peróxido de hidrógeno al 3%, formol al 10% (Paraud y Chartier, 2012), fenol 5%, ozono, luz ultravioleta y nanopartículas de plata (Hassan et al., 2019).

Con respecto al manejo de los animales, como medidas de prevención se debería realizar un correcto calostroado, administración de vacunas a las madres para prevenir

diarreas causadas por otros agentes y elegir un ambiente limpio para la crianza de los terneros en sus primeras semanas de vida (Sánchez, Romero y Rossanigo, 2013).

Para disminuir la transmisión entre los animales susceptibles se debería aislar los animales enfermos de los sanos y aplicar tratamientos por separado para ambos. Para el personal se recomienda el uso de desinfectantes en la indumentaria que utilizan para el manejo con los animales (Sánchez et al., 2013).

2.8. Tratamiento

El punto principal de un tratamiento para un ternero con diarrea es la fluidoterapia con el fin de reponer el déficit de líquidos, electrolitos y restaurar el equilibrio ácido - base (Renaud, Kelton, Weese, Noble, y Duffield, 2019).

En cuanto a la administración de antimicrobianos, se considera que utilizarlos de forma indiscriminada promueve la resistencia de los patógenos y generan cepas resistentes, por eso estos deben utilizarse de forma responsable y tratando de disminuir los efectos adversos. Solo se deberían de administrar cuando el animal presenta signos sistémicos (Inapetencia, deshidratación, letargo o pirexia) y/o cuando se observa una cantidad considerable de sangre o algunos fragmentos de mucosa en la materia fecal, lo que presenta un riesgo de bacteriemia (Constable, 2009).

La diarrea suele ir acompañada de dolor abdominal agudo (cólico) por lo que se recomienda el uso de analgésicos como el flunixin de meglumine o el meloxicam (Constable, 2009; Renaud et al., 2019).

Si bien existen pocos tratamientos específicos contra *Cryptosporidium* spp. se ha demostrado que fármacos como el lactato de halofuginona y la paromomicina son eficaces contra la criptosporidiosis, siendo el primero el único aprobado para su uso en terneros, reduciendo la eliminación de ooquistes y la duración de la diarrea (Thomson et al., 2017). Otras sustancias que se están investigando para poder ser utilizadas como terapia de apoyo para terneros que presentan diarrea por *Cryptosporidium* spp. son eubióticos orales ya que estos aplicados a las dosis correctas pueden generar efectos positivos en la salud del animal. Hoy en día es poca la evidencia que respalde el uso de estas sustancias para la prevención o tratamiento de terneros con diarrea (Renaud et al., 2019; Weyl-Feinstein et al., 2014).

Debido a la resistencia que presenta *Cryptosporidium* spp. a las condiciones ambientales, a los desinfectantes más comunes de uso diario en los establecimientos y a la baja disponibilidad de productos eficaces, es que se recomienda un abordaje integral (correcto calostroado, higiene, separación de animales enfermos, entre otras) para lograr un control eficaz (Shahiduzzaman y Dauschies, 2012).

3. HIPÓTESIS

La administración de un eubiótico disminuye la frecuencia de diarrea neonatal y la excreción fecal de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en terneros lecheros expuestos naturalmente.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar en condiciones de campo, el impacto de un eubiótico sobre la frecuencia de diarrea neonatal y la eliminación fecal de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. mediante la comparación con un grupo control, en terneros lactantes de una crianza artificial colectiva expuestos bajo condiciones de campo.

Objetivos específicos

- 1- Comparar la frecuencia de ocurrencia del síndrome de diarrea neonatal entre grupos (tratamiento y control).
- 2- Comparar la excreción fecal de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. mediante semicuantificación coproparasitológica.
- 3- Comparar la mortalidad entre grupos.

5. MATERIALES Y METODOS

Los protocolos de investigación, bajo el aval CEUA de la Facultad de Veterinaria (Nº de expediente 1243), se llevaron a cabo en un establecimiento lechero ubicado en la localidad de Campana, departamento de Colonia en el período comprendido entre marzo a junio del 2022.

El mismo presentaba un histórico de elevadas mortalidades anuales debidas a diarrea por *Cryptosporidium* spp. confirmado por laboratorio y descartados otros enteropatógenos.

5.1 Animales

El total de los animales utilizados en este ensayo fueron 72 hembras de raza Holstein, Jersey y su cruce (Holstein x Jersey) (Tabla 1) en etapa de crianza artificial desde el nacimiento hasta la novena semana de vida, las cuales fueron identificadas individualmente con un número de identificación interno.

Tabla 1. Genotipos y número de animales por tratamiento.

Tratamientos	Genotipos	Animales (cantidades)
A	H	16
	K	18
	J	2
B	H	14
	K	21
	J	1
Total		72

H: Holando; K: Cruza; J: Jersey.

5.2 Diseño experimental

Se realizó un ensayo experimental, doble ciego de dos tratamientos (tratamiento A eubiótico - y tratamiento B - placebo/control). Cada tratamiento estuvo compuesto por 36 animales, los cuales fueron asignados al azar mediante un generador de números aleatorios (Research Randomizer V 4.0, Urbaniak y Plous, 2013), divididos en 6 corrales de 12 animales cada uno (3 por tratamiento). El tamaño de la muestra se calculó en base a los resultados obtenidos por Vélez et al. (2019), con un poder de 80% y un error tipo I de 0,05 para detectar una diferencia de medias en la excreción de ooquistes entre grupos.

Al tratamiento A se le administró un eubiótico (mezcla de ácidos orgánicos [ácido láctico y cítrico] y extractos de plantas [extracto de cítricos, extracto de semilla de uva y extracto de orégano]), y al tratamiento B solución fisiológica (CINa 0,9%).

La vía de administración fue la oral, mediante una jeringa automática con una cánula bucal apoyándola en la base de la lengua del animal, a razón de 25 mL/animal/día durante los primeros 3 días de vida, y 10 mL/animal/día, desde el día 4 hasta la novena semana de vida, administrando un total de 4319 dosis vía oral. Los tratamientos se realizaron una hora posterior a la administración de la toma de leche de la mañana (9:30 AM). Las jeringas utilizadas eran idénticas; los envases no tenían etiqueta y su contenido no era visible por lo que no se sabía que era lo que se estaba suministrando.

Al momento de realizar la semicuantificación de ooquistes en cada una de las muestras, la persona encargada de realizarlo también desconocía a que grupo pertenecía.

5.3 Manejo preparto y posparto temprano

Se aplicaron vacunas contra enfermedades causantes del SDN y complejo respiratorio bovino a las madres en el período de secado y revacunación en el período de preparto, desinfección de corrales con Dicloro -M -Xilenol (al ingreso y salida de animales).

Los materiales utilizados para la administración de la leche a los terneros eran desinfectados diariamente utilizando una solución de hipoclorito de Na al 0,5%.

Durante el posparto inmediato, los animales fueron identificados con un número de identificación interno, se les realizó antisepsia umbilical, desparasitación y calostroado artificial mediante sonda bucoesofágica (dentro de las 6 horas de nacido). La calidad del calostro suministrado (evaluación indirecta de la cantidad de inmunoglobulinas) se determinó mediante un refractómetro de mano de grados Brix (°B) (ATAGO PAL-1, Tokyo, Japón). Una vez realizadas estas maniobras eran trasladados a sus respectivos corrales en el sitio en donde se realizaba la crianza.

Dentro de los primeros 5 días de vida se tomaron muestras de sangre a través de venopunción yugular, con agujas y jeringas descartables y estériles, y se colocaron en tubos secos con el rotulado correspondiente para la obtención de suero (BD Vacutainer, Franklin, NJ).

A partir de las muestras de suero se evaluó de manera indirecta la transferencia de inmunidad pasiva (TIP) con un refractómetro digital de grados Brix (ATAGO PAL-1,

Tokyo, Japón) (Godden et al., 2019; Lombard et al., 2020), utilizando una escala de 4 categorías: Excelente: $\geq 9,4$ °B; Bueno: 8,9- 9,3 °B; Bajo: 8,1- 8,8 °B; Falla: $< 8,1$ °B.

Se implementó esta metodología ya que los animales con falla en la TPI tienen mayores chances de presentar comorbilidades (incluida la diarrea) (Lombard et al. 2020). De esta manera, buscamos poder controlar esta variable, dentro de las limitaciones que implica un ensayo a campo en un establecimiento comercial, mediante el fin de que no haya diferencias para la misma entre tratamientos. En caso de existir diferencia, la misma será utilizada como covariable durante el proceso de ajuste del modelo estadístico.

5.4 Signos clínicos y tratamientos

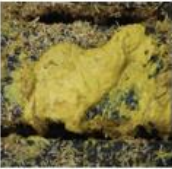
Cada animal con sospecha de presentar diarrea era examinado y evaluado según la determinación de ciertos parámetros como ser: el sensorio (actitud), el consumo de leche, el reflejo de succión, la temperatura rectal y el grado de deshidratación (Tabla 2) y score de materia fecal (Tabla 3). Con base a estos parámetros, los animales eran clasificados en categorías como se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros clínicos evaluados.

Categoría	Actitud	Consumo de leche	Reflejo de succión	T° rectal (°C)	TLLC y PC
Normal	Alerta	Normal	Presente, fuerte	37,8-38,2	<2''
Leve	Parado, normal o ligeramente lento a estímulos	Normal o disminuido	Presente, moderado	38,3–38,8	2-6 ''
Moderado	Depresivo	Disminuido	Presente, débil	38,9–39,3	6-8 ''
Grave	Coma	Ausente	Ausente	$\geq 39,4$	>8 ''

T°: temperatura; TLLC: Tiempo de llenado capilar; PC: Pliegue cutáneo. Adaptado de Amaral Philips (2012), Cramer y Stanton (2015), Naylor (1989).

Tabla 3. Escala de materia fecal en base a su descripción y consistencia

Escala	Consistencia	Descripción	Foto	Interpretación
0	Normal	Firme		No diarrea
1	Pastosa/blanda	Se "amontona" pero mantiene la forma.		
2	Líquida con partículas	Se desparrama fácilmente, pero tiene partículas sólidas.		Diarrea
3	Acuosa	Bien líquida, escurre.		

Adaptado de Renaud, Buss, Wilms y Steele (2020).

Luego de evaluados los parámetros mencionados en la Tabla 2 y Tabla 3, y según la gravedad que presentaran los animales, se instauraban los siguientes tratamientos:

- Normal: No recibía ningún tratamiento.
- Leve: Administración de dos litros de SRO (Sales rehidratantes orales) al día, 2 horas posteriores a la toma de leche, hasta que la materia fecal se normalice (score 0 o 1).
- Moderado: Lo mismo que en leve más Administración de Sulfaprim S® (Trimetoprim-Sulfadiazina; Fatro Fedagro, Uruguay) a una dosis de 25mg/kg Sulfadiazina y 5 mg/kg Trimetoprim, vía IM, durante 5 días. Aplicación de Alivios® (Flunixin meglumina Fatro Fedagro, Uruguay) a una dosis de 1,1 mg/kg, vía IM, durante 3 días. Si al tercer día de tratamiento no había mejoría (continuaba con score 2 o 3), se utilizaba de antimicrobiano (Ceftiozur, Ceftiofur clorhidrato 5%; Weizur, Laboratorio Weizur, Argentina) a una dosis de 2,2 mg/kg, vía IM, durante 5 días.
- Grave: Lo mismo que en Moderado más rehidratación endovenosa.

5.5 Frecuencia de diarrea

Para evaluar la ocurrencia de diarrea (frecuencia e intensidad) se realizaron 2 muestreos semanales de materia fecal, de manera individual, al total de los animales. Las muestras fueron colectadas directamente del recto, independientemente si presentaban diarrea (score de materia fecal ≥ 2), hasta completar 10 muestreos por animal (quinta semana de vida).

Las mismas fueron colectadas en frascos estériles rotulados con fecha de extracción, número de muestreo, caravana y número de corral y al mismo tiempo se las clasificaba en un score de 0 a 3, según Renaud et al (2020), como se describe en la Tabla 3. Luego se refrigeraron a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

Para estimar la proporción de animales diarreicos por grupo, en cada muestreo, se contabilizó la cantidad total de animales muestreados por tratamiento que presentaban un score de MF ≥ 2 (diarreicos) y se dividió por la cantidad de animales muestreados por tratamiento (diarreicos y no diarreicos).

Al no haber contabilizado la cantidad de días que los animales estuvieron con diarrea y con el objetivo de ahondar en si existían diferencias en la duración de la diarrea entre tratamientos, se realizó una aproximación a través de un cálculo estimativo. Para ello se utilizaron los siguientes supuestos: 1) que el animal tenga al menos 2 muestreos consecutivos con un score fecal ≥ 2 , 2) si el animal tenía 2 muestreos consecutivos con un score fecal ≥ 2 , luego un muestreo de 0 o 1 y, nuevamente, 2 muestreos consecutivos con un score fecal ≥ 2 fueron considerados como 2 episodios independientes y solo se consideró el primero y 3) animales que comenzaban con un episodio diarreico y morían durante el mismo no fueron considerados.

Para realizar el cálculo se utilizó la siguiente fórmula:

Duración de la diarrea (días) =

$$\text{Días de vida score MF final } (\leq 1) - \text{Días de vida score MF inicial } (\geq 2)$$

En donde se consideró los días de vida que el animal presentaba al momento en que tuvo su primer score de MF ≥ 2 y los días de vida en que el score de MF retornó a ≤ 1 .

5.6 Diagnóstico de enteropatógenos

Durante los muestreos semanales, además se realizó por una única vez un pool de materia fecal de cada corral en la segunda semana de vida con todo animal que presentó diarrea (score fecal ≥ 2) y se les realizó una prueba de inmunocromatografía lateral rápida a campo (Rainbow Calf Scour 4, Bio-X Diagnostics, Jemelle, Bélgica) para detección de coproantígenos contra rotavirus, Coronavirus bovino, *E. coli* F5 (K99) y *Cryptosporidium* spp (Abuelo, Havrlant, Wood, y Hernandez-Jover, 2019), según las indicaciones del fabricante.

Para el diagnóstico de *Salmonella entérica* se cultivaron los mismos pools de materia fecal diarreicas, de manera aeróbica, en caldo de tetracionato (Oxoid, código CM0671)

durante 24 – 48 horas a 37°C (caldo de enriquecimiento selectivo) y luego se colocaron 100 µl de caldo en agar xilosalisina-desoxicolato (XLD) (Oxoid, código CM0469). En caso de que ocurriera crecimiento de colonias sospechosas, se realizaron pruebas bioquímicas para su identificación según lo descrito por Octavia y Lan (2014).

Ante eventos de mortalidad, para lograr llegar a un diagnóstico, se evaluaban los signos clínicos que presentaban los animales y se realizaba un examen postmortem (autopsia) (Lombard et al., 2019; McConnel et al., 2019).

5.7 Riesgo de excreción y recuento de ooquistes

Para determinar la dinámica e intensidad de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se realizaron frotis fecales individuales teñidos con auramina-fenol y se observaron 20 campos microscópicos al azar, bajo aumento de 100x, mediante un microscopio de epifluorescencia (Axio Lab.A1, Carl Zeiss, Alemania), con filtro FITC (“fluorescein isothiocyanate”, excitación de 490 nm y emisión de 510 nm) para poder realizar la semicuantificación (Castro-Hermida, González-Losada, Mezo-Menéndez y Ares-Mazás, 2002; Fayer y Xiao, 2007). El valor reportado corresponde al promedio del conteo ooquistes de los 20 campos observados por cada una de las muestras de materia fecal de cada animal (Figura 3).

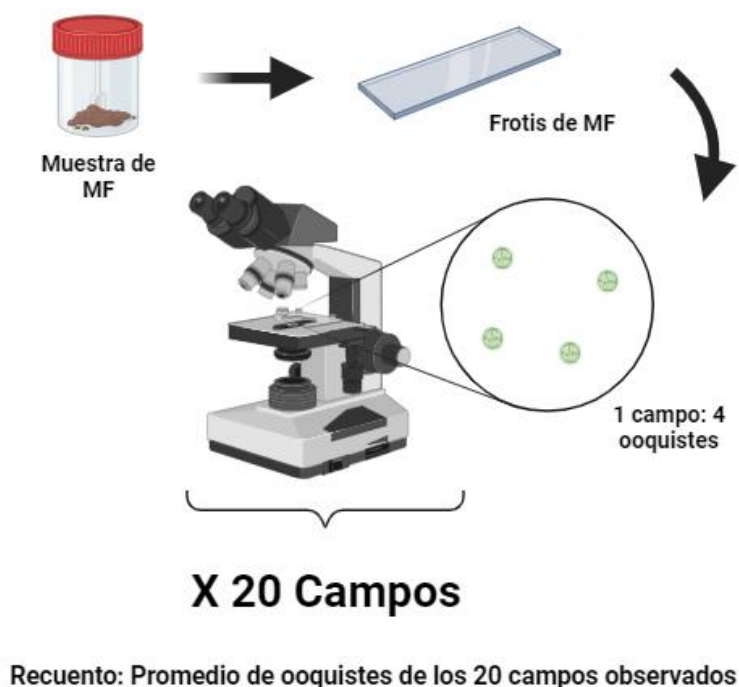


Figura 3. Metodología utilizada para la semicuantificación de ooquistes. (BioRender).

5.8 Mortalidad

Para obtener el porcentaje de mortalidad se utilizó la siguiente formula:

$$\textbf{Mortalidad} (\%) = \frac{\textit{Animales muertos en el tratamiento}}{\textit{Total animales en el tratamiento}} \times 100$$

5.9 Análisis estadístico

Todos los registros se recopilaron en papel para luego ingresarse en una base de datos en formato Excel (Excel, Microsoft Corp., Redmond, WA) la cual se utilizó como plantilla para el programa SAS Studio (SAS Institute, Cary, NC). La estadística descriptiva se presenta mediante proporciones, medias y sus desviaciones estándar (DE, para los datos con distribución normal) y mediana y el rango intercuartílico (IQR, para los datos que no se distribuyan normalmente).

Para variables categóricas las diferencias entre proporciones se evaluaron mediante Chi cuadrado o Test exacto de Fisher según la frecuencia de proporciones observadas en cada cuadrante de la tabla 2x2. Para variables cuantitativas continuas la diferencia entre medias se realizó mediante t student para dos grupos y ANOVA para comparar 3 o más grupos o la prueba de Mann-Whitney cuando la variable cuantitativa continua no seguía una distribución normal en el caso de ser dos los grupos o la de Kruskal-Wallis cuando eran más de dos.

Para evaluar el efecto del tratamiento sobre la eliminación de ooquistes, frecuencia de diarrea y mortalidad, se utilizaron modelos mixtos generalizados ajustados con splines cúbicos penalizados para el suavizado de los datos. Previamente se hizo un análisis de medias estandarizadas absolutas de las covariables (balance de las covariables) para evaluar el grado de distribución de las mismas entre tratamientos con el objetivo de optimizar y evaluar la calidad de los emparejamientos evidenciando de que el efecto estimado es cercano al verdadero efecto. Al realizar el modelaje del efecto tratamiento sobre la excreción de ooquistes y la frecuencia de diarrea, los grupos estuvieron compuestos por 33 animales cada uno, esto es así porque no se incluyeron 5 animales que murieron y 1 que tuvo datos faltantes. Los valores de $P < 0,05$ y $P < 0,10$ se tomaron como significativos y tendencias, respectivamente.

Con respecto a la excreción de ooquistes como variable respuesta se realizó un análisis de dos pasos: 1) primero se modeló el riesgo que un animal excretará ooquistes y luego 2) si había una diferencia en el recuento de ooquistes entre tratamientos.

6. RESULTADOS

6.1 Manejo posparto temprano

El total de los animales nació en el período comprendido entre el 01/04/2021 al 01/05/2021. A excepción de 2 animales que fueron asistidos durante su parto (uno correspondiente al tratamiento A y otro al B) el resto tuvo un parto eutócico.

Tal como se indica en la Tabla 4, los animales recibieron unos 3 litros de calostro con una calidad de 23, 4° Brix (° B).

Tabla 4. Cantidad de animales, peso al nacimiento (media $\pm$ desvío estándar), litros de calostro suministrado [mediana (IQR)], calidad del calostro [mediana (IQR)] y porcentaje de calostro suministrado con relación al peso al nacimiento [mediana (IQR)].

Trat	Animales	PN (Kg)	Cantidad (L)	Calidad (° B)	% PV
A	36	29,6 $\pm$ 4,9	3 (2,75-3)	23,4 (20,5-24,9)	9,4 (8,7-10,2)
B	36	31,1 $\pm$ 5,3	3 (2,5-3)	23,4 (20,7-25,1)	8,7 (7,8-9,8)
Total	72	30,4$\pm$5,3	3 (2,5-3)	23,4 (20,6-25)	9,3 (8-10,2)

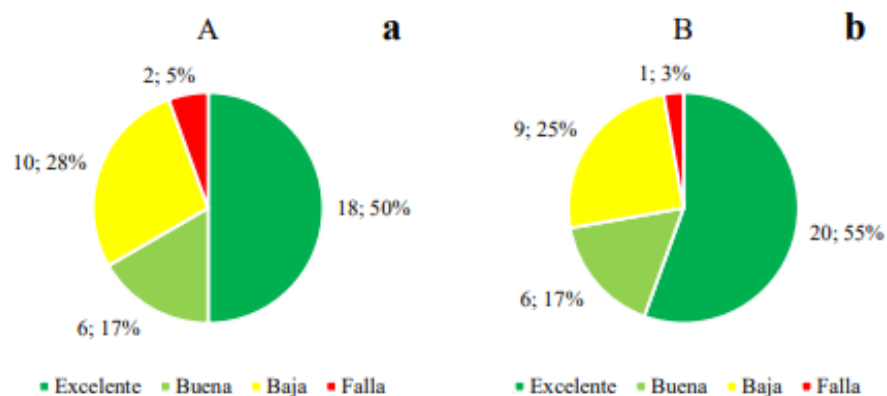
Trat: tratamiento; PN: Peso al nacimiento; % PV: porcentaje del peso vivo.

Aunque hubo leves diferencias en la media de los pesos al nacimiento, estas no fueron significativas ($P = 0,594$); tampoco hubo diferencias significativas en la cantidad ($P = 0,804$) y calidad de calostro suministrada ($P = 0,680$). Se observó una tendencia con respecto al % del PV del calostro suministrado entre tratamientos ($P = 0,06$).

Con respecto a la TIP, la mediana fue de 9,45 °B (8,7-10,6). En el tratamiento A fue de 9,35 (8,6-10,5) y en el B de 9,65 (8,8-10,7), no habiendo diferencias entre tratamientos ($P=0,536$).

Del total de las muestras el 53% (38/72) fueron categorizadas como excelente, el 17% (12/72) se categorizó como bueno, el 26% (19/72) como bajo y un 4 % (3/72) como falla en la TIP. En el Gráfico 1 se detallan las categorías de TIP por tratamiento, siendo muy similares en ambos.

Gráfico 1. a y b. Proporciones de transferencia de inmunidad pasiva según tratamiento.



Como se mencionó previamente, los animales fueron alojados en 6 corrales de 12 animales cada uno (3 por tratamiento) (Foto 1). Los corrales colectivos se iban completando según el número aleatorio asignado a uno u otro tratamiento hasta completar los 12.



Foto 1. Corrales de crianza colectiva.

6.2 Signos clínicos y tratamientos

El 29,2% (21/72) del total de terneros recibieron algún tipo de tratamiento (tuvieron condición leve, moderada o grave). Si comparamos el total animales tratados por tratamiento, el 36,1% (13/36) de los animales del tratamiento A fueron tratados y el 22,2% (8/36) del tratamiento B, no habiendo diferencias significativas ($P = 0,29$).

Según la categoría, el 47,6% (10/21) de los animales fueron categorizados como leves, un 33,3% (7/21) como moderados y un 19,1% (4/21) como graves.

No se observaron diferencias en la gravedad de los cuadros diarreicos entre los tratamientos, como se observa en la Tabla 5.

Tabla 5. Porcentaje de animales afectados por categoría del total de animales tratados por tratamiento.

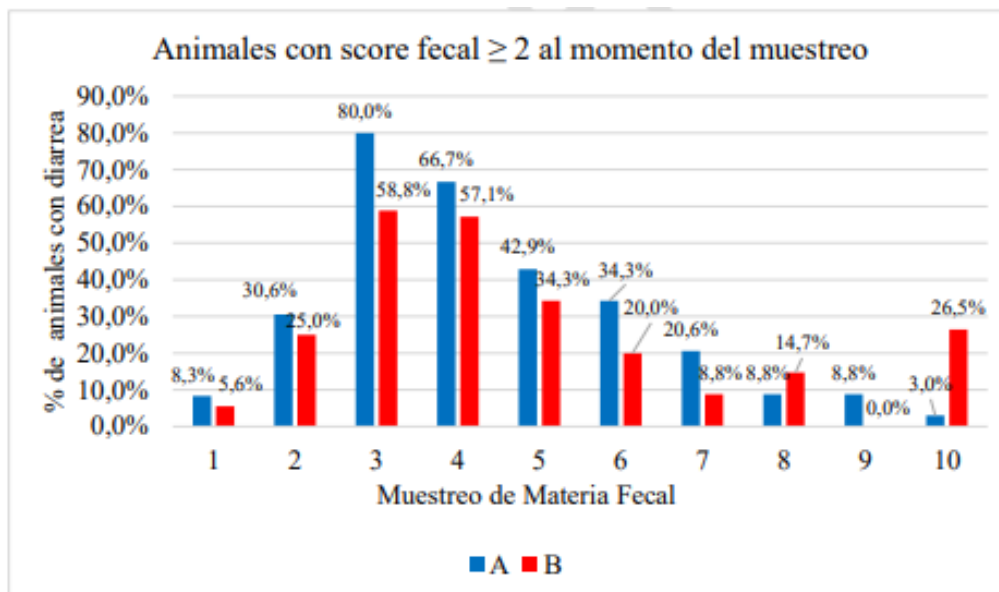
Categoría	Tratamiento		Valor P
	A	B	
Leve	31% (4/13)	75% (6/8)	0,13
Moderado	46% (6/13)	12,5 (1/8)	0,27
Grave	23% (3/13)	12,5 (1/8)	0,97

6.3 Frecuencia de diarrea y diagnóstico de enteropatógenos

Como se mencionó previamente, se realizaron 2 muestreos semanales hasta completar los 10 muestreos/animal. En promedio ($\pm$ DE), cada uno de los muestreos fue a los 2,4 ($\pm$ 1,47), 5,5 ($\pm$ 1,42), 9,4 ($\pm$ 1,48), 12,5 ($\pm$ 1,43), 16,4 ($\pm$ 1,48), 19,6 ($\pm$ 1,42), 23,4 ($\pm$ 1,47), 26,6 ($\pm$ 1,5), 30,5 ($\pm$ 1,46) y 33,7 ($\pm$ 1,35) días de vida, respectivamente.

En el gráfico 2 se presenta la proporción de animales con diarrea, según tratamiento, en cada uno de los muestreos realizados.

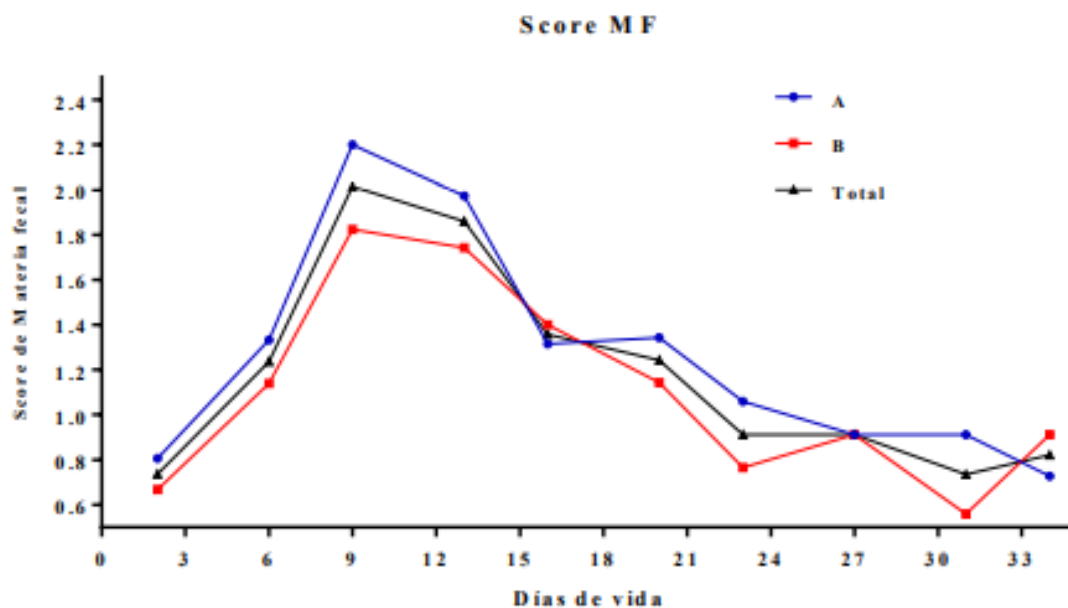
Gráfico 2. Proporción de animales con diarrea por muestreo según cada tratamiento.



Como se puede observar, en la mayoría de los muestreos hubo casos de diarrea (score de MF ≥ 2). Numéricamente se observó una mayor frecuencia de diarrea en los muestreos del tratamiento A con respecto al B, aunque esta diferencia no fue significativa ($P = 0,348$). En el tercer y cuarto muestreo se evidenció un pico en la frecuencia de diarreas en ambos tratamientos.

En el gráfico 3 se muestran los promedios de score de MF obtenidos durante los muestreos sobre los días de vida de los animales.

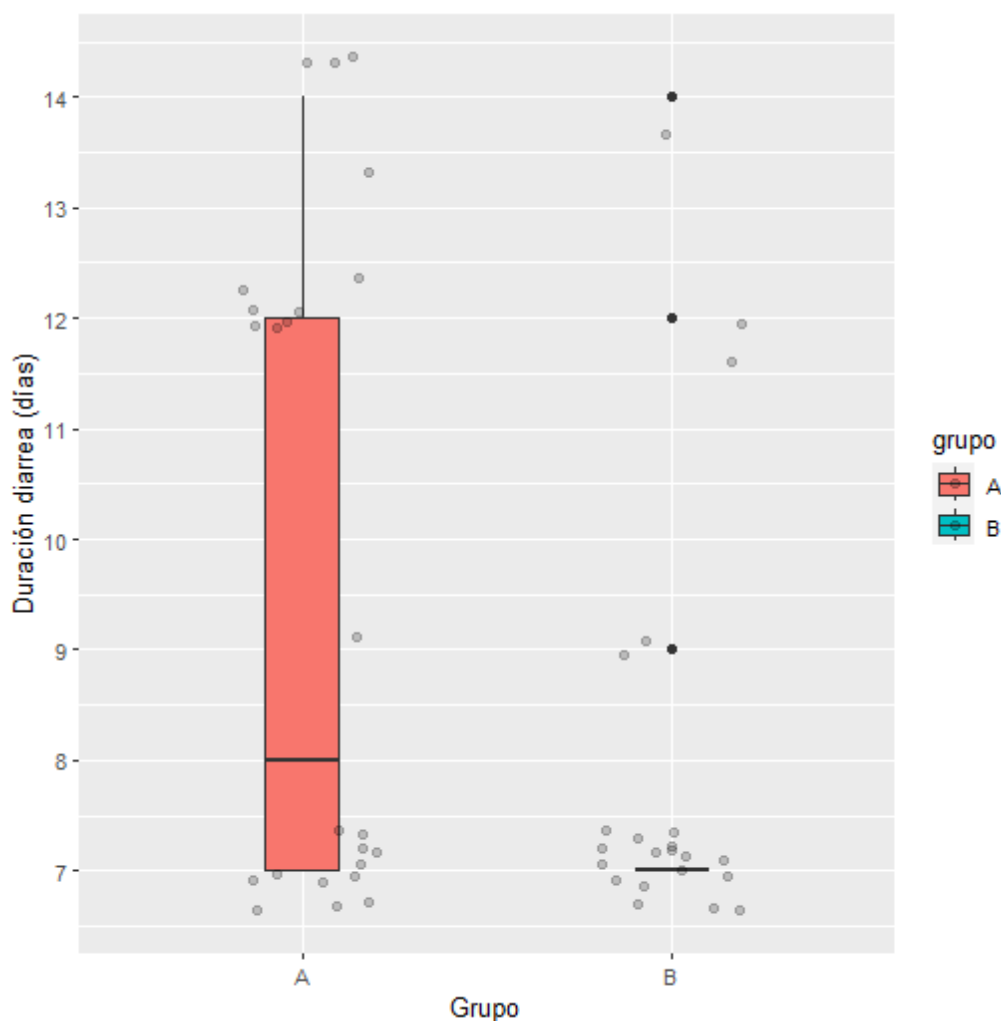
Gráfico 3. Promedios de score de materia fecal (tratamientos y total) a través del tiempo.



Se puede observar que en la segunda semana de vida de los animales hay un aumento de los scores de MF, en concordancia con los muestreos 3 y 4 del gráfico 2, como se mencionó previamente.

Se obtuvo un valor estimativo de la duración de días de diarrea según cada tratamiento. El mismo [mediana (IQR)] fue de 9 (7-12) días para el tratamiento A y de 7 (7-7) días para el tratamiento B (Gráfico 4), siendo esta diferencia significativa ($P = 0,02$).

Gráfico 4. Boxplot de duración de la diarrea según tratamiento.



6.4 Diagnóstico de enteropatógenos

Con respecto al diagnóstico de enteropatógenos, se realizaron 7 test inmunocromatografía lateral rápida a campo y 7 cultivos para *Salmonella entérica* en 7 pools de materia fecal diarreica. El único enteropatógeno detectado en todos los tests fue *Cryptosporidium* spp. y no hubo crecimiento de *Salmonella entérica* a partir de la siembra y cultivo de los pools.

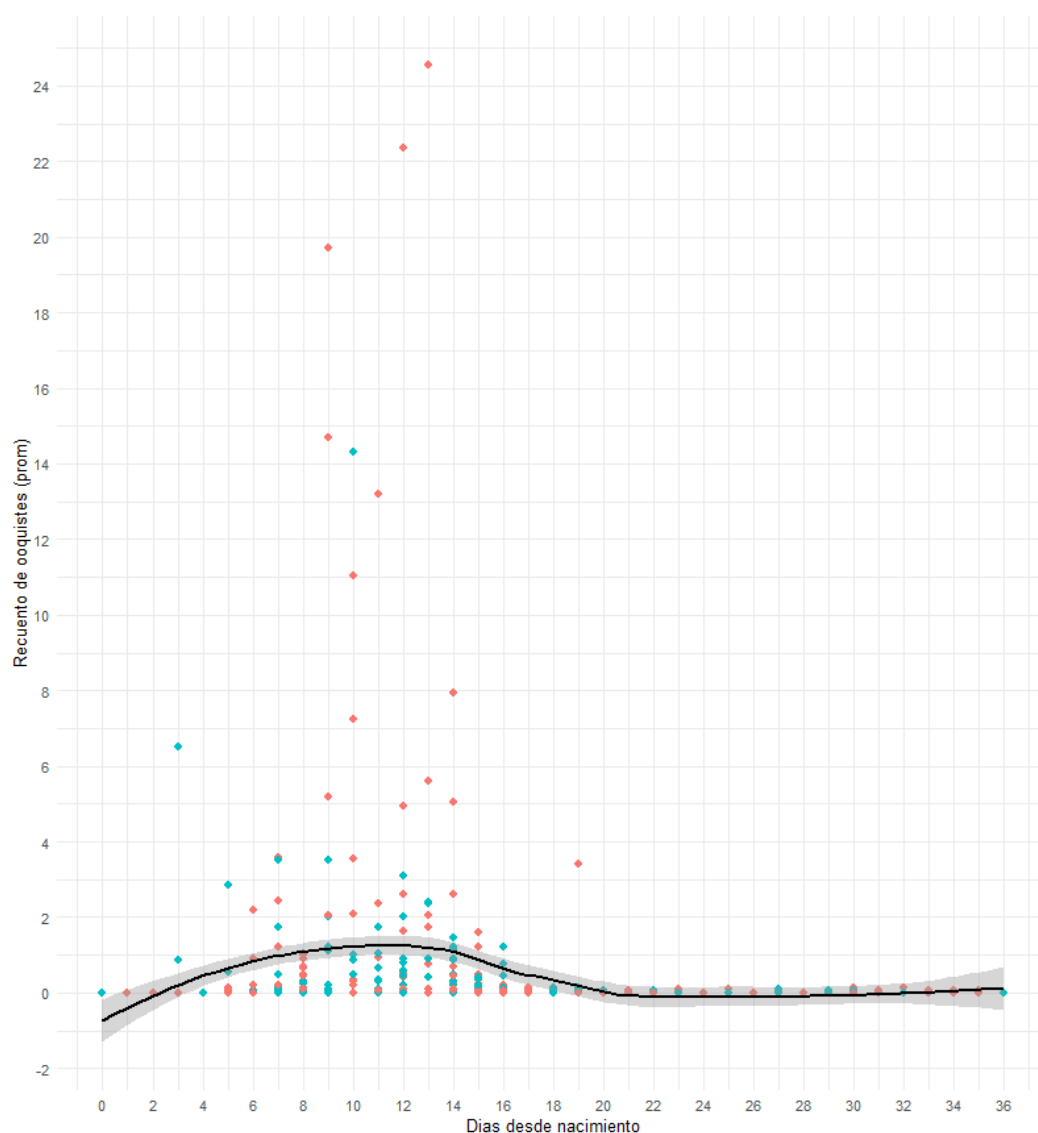
6.5 Riesgo de eliminación y recuento de ooquistes

El 97,2% (70/72) de los terneros fueron positivos a *Cryptosporidium* spp. a través de coprología en, al menos, un muestreo. Los 2 animales en los cuales no se observaron estructuras compatibles con ooquistes de *Cryptosporidium* spp., pertenecían uno a cada tratamiento.

Los animales del tratamiento A tuvieron un promedio ($\pm$ DE) de excreción de ooquistes de $0,56 \pm 2,52$ y los del tratamiento B de $0,22 \pm 0,96$, observándose una tendencia entre tratamientos ($P= 0,085$) que sugiero que aquellos terneros tratados excretaron más ooquistes que los terneros controles.

En los gráficos 5 y 6 se puede observar la dinámica de eliminación de los ooquistes total y por cada tratamiento de manera individual.

Gráfico 5. Dinámica de eliminación total de ooquistes según días de vida.

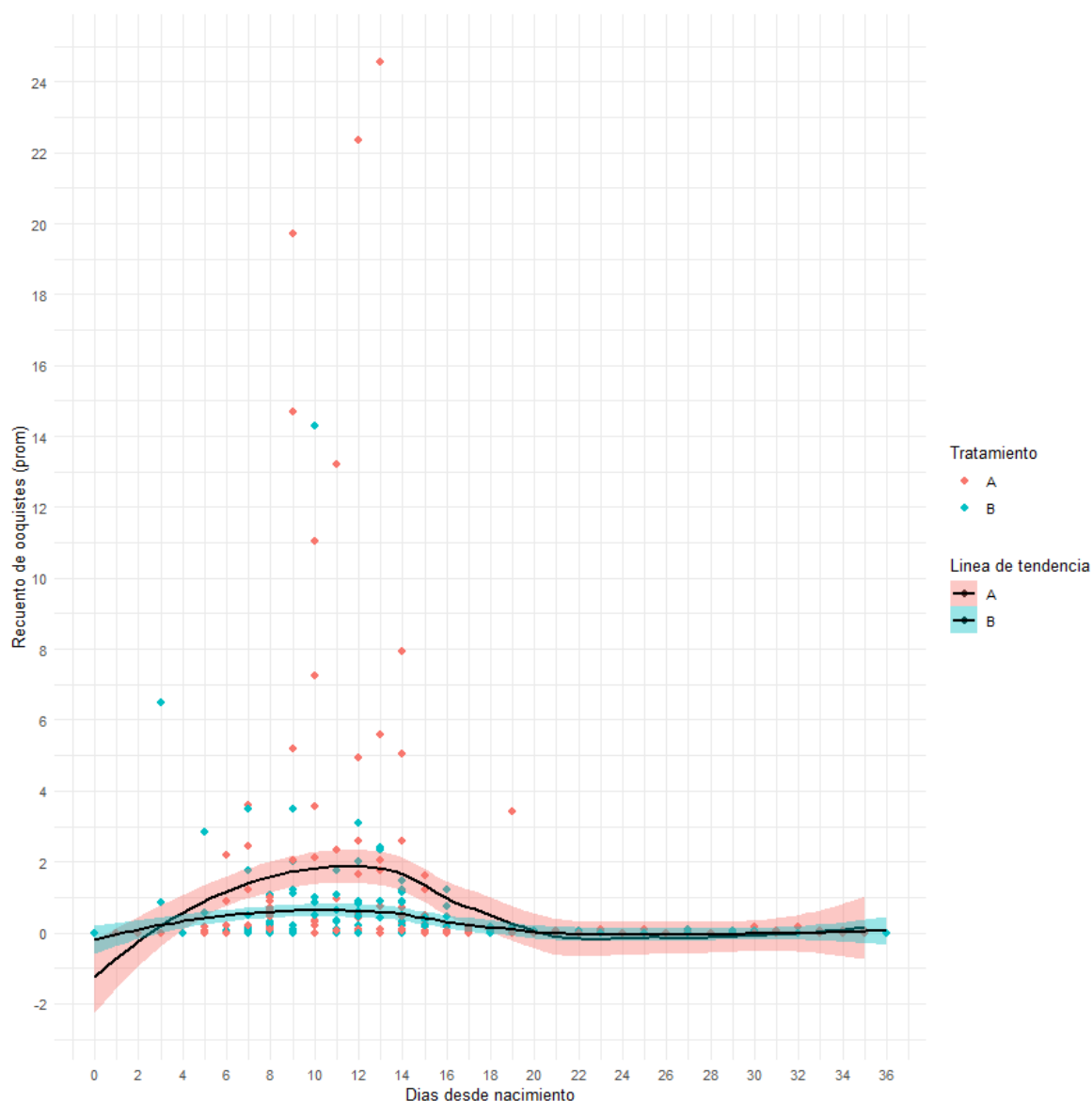


La excreción comienza principalmente a partir del día 4 y se mantiene hasta el día 20. Al igual que lo ocurrido con la frecuencia de diarrea, se puede observar que el pico de

excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. ocurre durante la segunda semana de vida.

Cuando observamos la dinámica de excreción por grupo, se puede ver que el tratamiento A tiene una línea de tendencia más elevada que el B (Gráfico 6).

Gráfico 6. Dinámica de eliminación total de ooquistes según días de vida por tratamiento.



Sin embargo, si ponemos como punto de corte una semicuantificación de 5 con base a lo reportado por Castro-Hermida et al (2002) y al histograma de frecuencia de la semicuantificación de ooquistes (Gráfico 7, ANEXO) hay un 1,9% de los conteos (13/ 695) que corresponden a 11 animales con conteos superiores a 5. De esos 11, 9 corresponden al tratamiento A y 2 al B. Si excluimos estas 13 observaciones, el promedio ($\pm$ DE) de eliminación de ooquistes del tratamiento A es de 0,17 ($\pm$ 0,58) y en el tratamiento B de 0,16 ($\pm$ 0,48) desapareciendo la tendencia que existía previamente ($P = 0,32$).

Al realizar el modelo mixto generalizado no hubo diferencias significativas entre tratamientos, tanto para el riesgo de eliminación ($P = 0,1899$) como para el recuento de ooquistes ($P = 0,8324$), (Tabla 8 y 9, ANEXO).

6.6 Mortalidad

En el transcurso del ensayo murieron 5 animales; en la Tabla 6 se detallan algunas características de los mismos.

Tabla 6. Descripción de número de animales, días de vida al momento del diagnóstico de diarrea y días de vida al momento de la muerte.

Tratamiento	RP	Diarrea (días)	Muerte (días)	Categoría
A	7296	21	22	Grave
	7314	12	12	Grave
	7315	7	34	Grave
	Promedio	13,3	22,7	
B	7273	19	21	Grave
	7319	5	6	Moderado
	Promedio	12	13,5	

La mortalidad total fue del 6,9% (5/72). Por tratamiento fue del 8,3% (3/36) para el tratamiento A y de 5,6% (2/36) para el B.

Para llegar a un diagnóstico nos basábamos en los hallazgos de autopsia como congestión en las mucosas, intestino con gas, sumado a los datos obtenidos en la clínica, en todos, el diagnóstico fue la diarrea. Cabe mencionar que las lesiones de varios de los enteropatógenos causantes del SDN, incluido *Cryptosporidium* spp, son inespecíficos (como los mencionados previamente).

Como se muestra en la Tabla 7, no hubo diferencias entre tratamientos con respecto a la mortalidad.

Tabla 7. Modelo de ajuste para mortalidad.

Mortalidad — %, Media MC (EE)		Diferencia A vs. B Media (IC _{95%})	Valor P
Tratamiento A (n=36)	Tratamiento B (n=36)		
8,3 (6,8)	5,6 (2,3)	2,8 (-9,2; 14,8)	0,6450

Media MC: Media de mínimos cuadrados. EE: Error estándar. IC_{95%}: Intervalo de confianza al 95%.
Nota: Modelo aditivo (Modelo con distribución normal, función de ligadura de identidad y estimadores robustos de la varianza; efecto expresado de manera absoluta - 'risk difference').

7. DISCUSIÓN

La principal causa de muerte en crías artificiales es el SDN (Schild et al., 2020) donde los principales agentes involucrados son *Cryptosporidium* spp., rotavirus y su coinfección (Caffarena et al., 2021). Ante un brote de diarrea en muchos establecimientos se realizan tratamientos sin tener un diagnóstico confirmado, incluso llegando a utilizar tratamientos preventivos en animales sanos lo que puede ocasionar un desbalance en la microbiota, causando cuadros de disbiosis y resistencia antimicrobiana (Schild et al., 2020).

En referencia a esto último, nos orientamos a la búsqueda de alternativas de tratamientos naturales para evaluar su impacto en la frecuencia de diarrea y eliminación fecal de ooquistes, en terneros lecheros infectados naturalmente con *Cryptosporidium* spp., donde se optó por el uso de un eubiótico.

La mayoría (96%) de los animales presentaron una buena TPI teniendo en cuenta los parámetros propuestos por Godden et al (2019) y Lombard et al (2020). Esto era esperable teniendo en cuenta el tiempo posparto en el que se dio, la cantidad y calidad del calostro suministrado (Godden et al., 2019). Aunque no fue significativo, se observó una tendencia en los animales del tratamiento B en el consumo de menor cantidad de calostro expresado como % del PV. Esto fue así debido a, que por el tipo de animal presente en el establecimiento (Holstein Friesian, Jersey y su cruce), tienen estandarizado el aporte de 3L de calostro asumiendo un peso al nacimiento de 30 kg (lo que equivaldría al 10% del PV). Sin embargo, la cantidad de terneros con falla en la TPI no difirió entre tratamientos. Conneely et al (2014) observaron, en animales de similar genotipo al del presente ensayo, que el suministro de 8,5% del PV (3,2 L) de un calostro de excelente calidad (>30 °B) era suficiente para alcanzar valores de IgG circulantes compatibles con una exitosa TPI. Teniendo en cuenta que en el presente ensayo se suministraron 3L de calostro de una calidad de 23,4 °B (compatible con 77 g de IgG/L) podemos estimar que en total se ofrecieron 231 g IgG totales a cada animal, lo cual entra dentro del rango sugerido por la bibliografía (McGuirk y Collins, 2004).

No observamos diferencias en el total de animales tratados por signología clínica entre tratamientos, así tampoco entre categorías de gravedad de la signología clínica entre tratamientos. El porcentaje de animales tratados fue similar a lo observado en otros trabajos en donde se evaluó también el uso de fitoquímico sobre parámetros de salud y performance (Heisler et al., 2020). La cantidad de IgG circulantes en los terneros tiene un impacto en la morbi-mortalidad de los mismos. Lombard et al (2020) observaron diferencias de 18,5% y 6,1% para morbilidad y mortalidad, respectivamente, entre terneros con excelente TPI vs terneros con falla. La mayoría de los terneros de nuestro ensayo tuvo una adecuada TPI, lo que en parte podría explicar esta falta de diferencia entre tratamientos. Igualmente, esta situación estaba contemplada, sabiendo del impacto de la TPI sobre la morbilidad, es que buscábamos controlar esta variable mediante un buen calostrado.

En casi todos los muestreos hubo un animal con score de MF ≥ 2 con un incremento en la segunda semana de vida. Este hallazgo es esperable teniendo en cuenta el enteropatógeno en cuestión (*Cryptosporidium* spp), los periodos de incubación de la mayoría de los enteropatógenos involucrados en el SDN y la baja inmunitaria que ocurre durante la segunda semana de vida de los animales (Osorio, 2020).

Con respecto a la frecuencia de diarreas, Sima et al (2019) realizaron un estudio donde evaluaron la eficacia de un eubiótico contra *Cryptosporidium* spp. Los autores observaron que la frecuencia y el número de días con diarrea fue significativamente menor en el grupo tratado comparado con el control, siendo de una duración 4,8 y 7,2 días, respectivamente. Weyl-Feinstein et al (2014), quienes evaluaron un eubiótico con base de extracto de granada, observaron también una menor intensidad de la diarrea en grupo tratado versus el grupo control. En contraste con nuestro trabajo, no se evidenciaron cambios relevantes en la frecuencia de diarrea entre animales tratados y no tratados. Sí observamos una diferencia en los días con diarrea entre tratamientos, paradójicamente siendo de mayor duración los del tratamiento A (9 vs 7 días). No hallamos fundamentos que puedan explicar este resultado más allá de situaciones inherentes al establecimiento, las cuales son difíciles de controlar en ensayos a nivel de campo (Möller, 2022) así como también que nuestro abordaje fue una inferencia de los días que un animal tuvo diarrea con base a los scores fecales obtenidos en los muestreos y no los días reales que el animal estuvo con diarrea.

Cabe destacar que en el trabajo de Sima et al (2019), en el cual utilizaron un eubiótico con una composición similar al nuestro, no queda claro la cantidad de animales utilizados, ya que en materiales y métodos se menciona que se utiliza un número de animales infectados artificialmente y luego, en la parte de resultados, además del grupo ya mencionado, se describe a otro grupo el cual es con una mayor cantidad de animales los cuales estaban infectados naturalmente. Estas inconsistencias provocan que sea difícil hacer comparaciones entre uno y otro trabajo.

Otros autores como Santos et al (2015), Selvi y Tapki (2019) y Heisler et al (2020), también evaluaron el efecto de diferentes eubióticos sobre los scores de materia fecal y los días de duración de la diarrea, no observando diferencias significativas entre tratamientos. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio donde no encontramos diferencias significativas en la frecuencia de diarrea entre animales tratados con el control.

Los diferentes resultados entre trabajos podrían deberse a las diferentes composiciones de los eubióticos, a diferentes vías/vehículos de administración, los tiempos durante el cual fueron suministrados, los sistemas de crianza utilizados, así como también a los diferentes tamaños muestrales. Cabe mencionar que la mayoría de los trabajos no especifican la metodología utilizada para calcular el tamaño muestral lo cual es sumamente importante ya que del tamaño muestral dependerá el poder estadístico (probabilidad de encontrar un efecto significativo cuando el efecto es real).

El único enteropatógeno diagnosticado fue *Cryptosporidium* spp. lo cual era una de las premisas del presente ensayo. Aunque no se analizaron muestras para *Eimeria* spp., podemos descartar que este enteropatógeno haya sido la causa de las diarreas por dos motivos: 1) Por el histórico del establecimiento, en donde otros años se habían remitido muestras para cuantificación de ooquistes de *Eimeria* spp. siendo los resultados negativos (Darío Caffarena, comunicación personal) y 2) que teniendo en cuenta el período de prepatencia de este protozoo, es de esperar que las diarreas tengan una aparición a partir de la finalización de la segunda semana de vida en adelante (Bangoura y Bradsley, 2020) y no en la segunda semana como en nuestro caso.

Con respecto a la eliminación de ooquistes, en un primer momento observamos una tendencia con una mayor eliminación en el tratamiento A con respecto al B. Sin embargo, al ahondar un poco más observamos que solo 11 animales generaban un aumento del 69,7% en los conteos del tratamiento A y de un 27,3% en el B. Hay que tener en cuenta que esos valores involucraban al total de muestreos de cada tratamiento durante todo el período por lo que no sería correcto sacar conjeturas al respecto. Igualmente, como mencionamos previamente, profundizamos sobre los datos. Esos animales podrían considerarse “super eliminadores” (Lass et al., 2013), teniendo en cuenta la baja dosis infectiva (Zambriski et al., 2013) y la resistencia de los ooquistes en el ambiente y a los desinfectantes, podría explicar en parte la mayor frecuencia de diarrea que observamos de manera numérica en el tratamiento A.

A diferencia de nuestros resultados, Weyl-Feinstein et al (2014) observaron valores significativamente menores en la eliminación de ooquistes en animales tratados comparados con los del grupo control. Una diferencia entre el trabajo de estos autores y el nuestro, es que utilizaron otro tipo de fitoquímico compuesto por un extracto concentrado de granada. Al igual que el presente ensayo, Vélez et al (2019) no observaron diferencias en la eliminación de ooquistes entre el eubiótico utilizado y el grupo control.

Si bien estos estudios comparten y/o difieren de los resultados de nuestra tesis, se debe considerar que se utilizaron otros productos con diferente composición; además de no mencionar como se realizó el cálculo del tamaño de muestra y la metodología utilizada en cada trabajo variaba.

Con respecto a los resultados de mortalidad de nuestra tesis no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. Este dato concuerda con lo observado por Vélez et al. (2019). Sin embargo, en el trabajo de Sima et al (2019), no observaron muertes en el grupo tratado (58 animales) versus el grupo control, en donde murieron 4 de 61 animales. Sin embargo, no hay una diferencia estadística; aunque en Velez et al (2019) tampoco había diferencia en la mortalidad ($P = 0,14$).

Con respecto a las limitantes que se nos presentaron en nuestro trabajo, al ser un establecimiento comercial tuvimos que adaptarnos al manejo de los animales, protocolos de tratamientos utilizados y a la forma de trabajo del personal. Pero consideramos que fue una ventaja ya que, al ser un establecimiento comercial, estuvimos bajo las condiciones de crianza artificial más cercanas a la realidad de los tambos de nuestro país. También estamos en conocimiento que por la escala del ensayo (1 solo establecimiento) los resultados obtenidos no son extrapolables; sin embargo, el presente ensayo presenta un sólido diseño experimental, trabajo de campo, recolección y análisis de muestras, recopilación y análisis de los datos, lo cual hace a la robustez de los resultados y conclusiones obtenidas.

Finalmente, podríamos decir que a pesar de que no obtuvimos resultados que comprobaran la eficacia de este producto contra *Cryptosporidium* spp., sería interesante seguir avanzando en la investigación de eubióticos y otros productos naturales como alternativas para prevención y tratamientos de *Cryptosporidium* spp., además, profundizar en métodos de administración, dosis óptimas, duración de tratamientos y cantidad de animales por ensayo. Insistimos en la investigación y en el avance de este tipo de productos (prebióticos, probióticos, fitoquímicos, aceites esenciales) ya que hay estudios, con algunos de ellos, que demuestran su eficacia con resultados satisfactorios.

Además, existe un mayor interés en usar sustancias de origen natural para diferentes patógenos y disminuir el uso de antimicrobianos; por lo que los eubióticos podrían ser una alternativa natural viable ante esta demanda. Para lograr esto, además del desarrollo de nuevos productos, los mismos deben ser testeados tanto a nivel de laboratorio como en condiciones de campo al momento de evaluar su eficacia.

Aunque no fue parte de la presente tesis, sería valioso explorar si el presente eubiótico tiene efecto sobre parámetros referidos a la performance de los animales (ganancia de peso, perímetro torácico, altura a la cadera, etc).

Por ende, podemos decir que es un área que está en crecimiento y en la cual hay que continuar investigando para la generación de información sólida, desde un punto de vista científico, que permita a los productores la disponibilidad de productos que tengan una eficacia validada.

8. CONCLUSIÓN

1. El uso de un eubiótico, bajo las condiciones del presente experimento, no evidenció un efecto en la frecuencia de diarrea entre el grupo tratado en comparación con el grupo control.
2. No hubo efecto en cuanto a la excreción de ooquistes entre ambos tratamientos.
3. No se encontraron diferencias de mortalidad entre ambos tratamientos.

9. BIBLIOGRAFIA

- Abuelo, A., Havrlant, P., Wood, N., y Hernandez-Jover, M. (2019). An investigation of dairy calf management practices, colostrum quality, failure of transfer of passive immunity, and occurrence of enteropathogens among Australian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 102(9), 8352-8366.
- Adkins. P. (2022). Criptosporidiosis. *Raising Commercial Dairy Calves*, 38(1), 121-131.
- Al Mawly, J., Grinberg, A., Prattley, D., Moffat, J., y French, N. (2015). Prevalence of endemic enteropathogens of calves in New Zealand dairy farms. *New Zealand Veterinary Journal*, 63(3), 147-152.
- Alves, M., Xiao, L., Antunes, F., y Matos, O. (2006). Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. *Parasitology Research*, 99(3), 287-292.
- Amaral-Phillips, D. M. (2012). *Early identification of sick dairy calves important to their survival and future milk production*. Recuperado de https://afs.ca.uky.edu/files/early_identification_of_sick_dairy_calves_important_to_their_survival_and_future_milk_production.pdf
- Argenzio, R. A., Lecce, J., y Powell, D. W. (1993). Prostanoids inhibit intestinal NaCl absorption in experimental porcine cryptosporidiosis. *Gastroenterology*, 104(2), 440-447.
- Argenzio, R. A., Liacos, J. A., Levy, M. L., Meuten, D. J., Lecce, J. G., y Powell, D. W. (1990). Villous atrophy, crypt hyperplasia, cellular infiltration, and impaired glucose-Na absorption in enteric cryptosporidiosis of pigs. *Gastroenterology*, 98(5), 1129-1140.
- Bangoura, B., y Bardsley, K. D. (2020). Ruminant Coccidiosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 36(1), 187–203. doi:10.1016/j.cvfa.2019.12.006
- Barragry. T (2020). Alternatives to antibiotics? Eubiotics, the microbiome and immunity. *Veterinary Ireland Journal*, 10(6), 316- 321.
- Barta, J.R., y Thompson, A.R.C. (2006). What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends in Parasitology*, 22(10), 463-468.
- Blanchard, P.C. (2012). Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 28(3), 443-464.
- BioRender. Scientific Image and Illustration Software. Recuperado de: <https://www.biorender.com/>.

- Brainard, J., Hammer, C. C., Hunter, P. R., Katzer, F., Hurle, G., y Tyler, K. (2021). Efficacy of halofuginone products to prevent or treat cryptosporidiosis in bovine calves: a systematic review and meta-analyses. *Parasitology*, 148(4), 408-419.
- Caffarena, R. D., Casaux, M. L., Schild, C. O., Fraga, M., Castells, M., Colina, R., y Giannitti, F. (2021). Causes of neonatal calf diarrhea and mortality in pasture-based dairy herds in Uruguay: a farm-matched case-control study. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(2), 977-988.
- Casemore, D. P. (1990). Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis. *Epidemiology y Infection*, 104(1), 1-28.
- Castro-Hermida, J.A., Almeida, A., González-Warleta, M., Costa, J.M.C., Rumbo Lorenzo, C., y Mezo, M., (2007). Occurrence of *Cryptosporidium* parvum and Giardia duodenalis in healthy adult domestic ruminants. *Parasitology Research*, 101, 1443-1448.
- Castro-Hermida, J. A., González-Losada, Y. A., Mezo-Menéndez, M., y Ares-Mazás, E. (2002). A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. *Veterinary Parasitology*, 106(1), 11-17.
- Carreño, R. A., Matrin, D. S., y Barta, J. R. (1999). *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research*, 85(11), 899-904.
- Chalmers, R. M., y Davies, A. P. (2010). Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology*, 124(1), 138-146.
- Clode, P.L., Koh, W.H., y Thompson, A.R.C. (2015). Life without a Host Cell: What is *Cryptosporidium*?. *Trends in Parasitology*, 3(12), 614-624.
- Coklin, T., Uehlinger, F. D., Farber, J. M., Barkema, H. W., O'Handley, R. M., y Dixon, B. R. (2009). Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from 11 farms in Prince Edward Island, Canada. *Veterinary Parasitology*, 160(3-4), 323-326.
- Conneely, M., Berry, DP, Murphy, JP, Lorenz, I., Doherty, ML y Kennedy, E. (2014). Efecto de la alimentación con calostro en diferentes volúmenes y el número posterior de tomas de leche de transición sobre la concentración sérica de inmunoglobulina G y el estado de salud de los terneros lecheros. *Revista de ciencia láctea*, 97(11), 6991-7000.
- Constable, P. D. (2009). Treatment of calf diarrhea: antimicrobial and ancillary treatments. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 25(1), 101-120.

- Costa, L. F., Paixão, T. A., Tsois, R. M., Bäumlér, A. J., y Santos, R. L. (2012). Salmonellosis in cattle: advantages of being an experimental model. *Research in Veterinary Science*, 93(1), 1-6.
- Cordero del Campillo, M., Rojo Vázquez, F.A., Martínez Fernández, A.R., Sánchez Acedo, M.C., Hernández Rodríguez, S., Navarrete López-Cozar, I.S., ... Carvalho Varela, M. (1999). *Parasitología veterinaria*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Cramer, M. C., y Stanton, A. L. (2015). Associations between health status and the probability of approaching a novel object or stationary human in preweaned group-housed dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 98(10), 7298-7308.
- Cruvinel, L. B., Ayres, H., Zapa, D. M. B., Nicaretta, J. E., Couto, L. F. M., Heller, L. M., ... Lopes, W. D. Z. (2020). Prevalence and risk factors for agents causing diarrhea (Coronavirus, Rotavirus, *Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp., and nematodes helminthes) according to age in dairy calves from Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 52, 777-791.
- De Graaf D.C., Vanopdenboscha. E., Ortega-Mora. L.M., Hayet Abbassi, J. y Peeters, E. (1999). A review of the importance of cryptosporidiosis on the farm animals. *International Journal of Parasitology*, 29(8), 1269-1287.
- Delafosse, A., Chartier, C., Dupuy, M. C., Dumoulin, M., Pors, I., y Paraud, C. (2015). *Cryptosporidium* parvum infection and associated risk factors in dairy calves in western France. *Preventive Veterinary Medicine*, 118(4), 406-412.
- Diario veterinario (2023). *Europa autoriza la primera vacuna que protege contra Cryptosporidium parvum en terneros*. Recuperado de: <https://www.diarioveterinario.com/t/4633907/europa-autoriza-primer-vacuna-protege-contra-cryptosporidium-parvum-terneros>
- Díaz-Lee, A., Molina, R., Dougnac, C., Mercado, R., Retamal, P., y Fredes, F. (2015). Sensibilidad analítica de técnicas de tinción tradicionales y una técnica molecular para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. aislados de bovinos en muestras de agua: estudio preliminar. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 47(1), 91-96.
- Dixon, B., Parrington, L., Cook, A., Pintar, K., Pollari, F., Kelton, D., y Farber, J. (2011). The potential for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from beef and dairy cattle in Ontario, Canada. *Veterinary Parasitology*, 175(1-2), 20-26.
- do Couto, M. C. M., de Freitas Lima, M., y do Bomfim, T. C. B. (2014). New *Cryptosporidium* parvum subtypes of Ila subfamily in dairy calves from Brazil. *Acta Tropica*, 130, 117-122.

- European Medicines Agency. (2007). *Halocur: EPAR Summary for the Public (EMA/V/C040)*. Recuperado de <https://imedi.co.uk/halocur/summary>.
- European Medicines Agency. (2023). *Bovilis Cryptium. Summary of opinion (EMA/CVMP/41656)*. Recuperado de https://www.ema.europa.eu/en/documents/smop-initial/cvmp-summary-positive-opinion-bovilis-cryptium_en.pdf
- Fayer, R., Gasbarre, L., Pasquali, P., Canals, A., Almeria, S., y Zarlenga, D. (1998). *Cryptosporidium* parvum infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *International Journal for Parasitology*, 28(1), 49-56.
- Fayer, R., Morgan, U., y Upton, S. J. (2000). Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 30(12-13), 1305-1322.
- Fayer, R., Santín, M., y Dargatz, D. (2010). Species of *Cryptosporidium* detected in weaned cattle on cow–calf operations in the United States. *Veterinary Parasitology*, 170(3-4), 187-192.
- Fayer, R., Santin, M., y Trout, J. M. (2007). Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. *Veterinary Parasitology*, 145(3-4), 260-266.
- Fayer, R., Santín, M., Trout, J. M., y Greiner, E. (2006). Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1–2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Veterinary Parasitology*, 135(2), 105-112.
- Fayer, R., y Xiao, L. (Eds.). (2007). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. Boca Ratón: CRC.
- Foster, D. M., y Smith, G. W. (2009). Pathophysiology of diarrhea in calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 25(1), 13-36.
- Fujino, T., Matsui, T., Kobayashi, F., Haruki, K., Yoshino, Y., Kajima, J., y Tsuji, M. (2002). The effect of heating against *Cryptosporidium* oocysts. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64(3), 199-200.
- Gamsjäger, L., Cirone, K. M., Schluessel, S., Campsall, M., Herik, A., Lahiri, P., ... Cobo, E. R. (2023). Host innate immune responses and microbiome profile of neonatal calves challenged with *Cryptosporidium* parvum and the effect of bovine colostrum supplementation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1165312.
- García, A., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., Orden, J. A., Cid, D., Sanz, R., Gómez-Bautista, M., y De La Fuente, R. (2000). Rotavirus and concurrent

- infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 23(3), 175-183.
- Garro, C. J., Morici, G. E., Tomazic, M. L., Vilte, D., Encinas, M., Vega, C., ... Schnittger, L. (2021). Occurrence of *Cryptosporidium* and other enteropathogens and their association with diarrhea in dairy calves of Buenos Aires province, Argentina. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 24, 100567.
- Garro, C. J., Morici, G. E., Utgés, M. E., Tomazic, M. L., y Schnittger, L. (2016). Prevalence and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. oocysts in dairy calves of Buenos Aires Province, Argentina. *Parasite Epidemiology and Control*, 1(2), 36-41.
- Godden, M., Lombard, J., y Woolums, A. (2019). Colostrum Management for Dairy Calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 35(3), 535-556.
- Godden, S. M., Smolenski, D. J., Donahue, M., Oakes, J. M., Bey, R., Wells, S., ... Fetrow, J. (2012). Heat-treated colostrum and reduced morbidity in preweaned dairy calves: Results of a randomized trial and examination of mechanisms of effectiveness. *Journal of Dairy Science*, 95(7), 4029-4040.
- Gookin, J. L., Nordone, S. K., y Argenzio, R. A. (2002). Host responses to *Cryptosporidium* infection. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(1), 12-21.
- Hang, B. P. T., Wredle, E., y Dicksved, J. (2020). Analysis of the developing gut microbiota in young dairy calves—impact of colostrum microbiota and gut disturbances. *Tropical Animal Health and Production*, 53, 1-8.
- Heisler, G., Fischer, V., de Paris, M., Veber Angelo, I. D., Panazzolo, D. M., y Zanela, M. B. (2020). Effect of green tea and oregano extracts fed to pre-weaned Jersey calves on behavior and health status. *Journal of Veterinary Behavior*, 37, 36-40. doi:10.1016/j.jveb.2020.03.002
- Hijawi, N. S., Meloni, B. P., Ryan, U. M., Olson, M. E., y Thompson, R. C. A. (2002). Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology*, 32(14), 1719-1726.
- Hubers W., Gevers K., Timmermans M., Vertenten G., y Roosmalen M. (2023). *Bovine anti-gp40 antibodies neutralize Cryptosporidium infections in-vitro and are reactive with different Cryptosporidium stadia*. Recuperado de https://www.vetline.de/system/files/frei/DPT_1-2024_Hubers-Poster1.pdf

- Hunt, E. (1995). *Diarrea del ternero*. Buenos Aires: Inter-Médica.
- Holsback, L., Lima, H. E., Vidotto, O., Silva, M. A. D., Patelli, T. H. C., Martins, F. D. C., y Seixas, M. D. (2018). *Cryptosporidium* occurrence in ruminants from the North Pioneer mesoregion of Paraná, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 27, 248-253.
- Izzo, M. M., Kirkland, P. D., Mohler, V. L., Perkins, N. R., Gunn, A. A., y House, J. K. (2011). Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. *Australian Veterinary Journal*, 89(5), 167-173.
- Jenkins, M. B., Eaglesham, B. S., Anthony, L. C., Kachlany, S. C., Bowman, D. D., y Ghiorse, W. C. (2010). Significance of wall structure, macromolecular composition, and surface polymers to the survival and transport of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(6), 1926-1934.
- Khalili, M., Morshedi, A., Keyvanfar, H., y Hemmatzadeh, F. (2006). Detection of bovine coronavirus by RT-PCR in a field study. *Veterinarski Arhiv*, 76(4), 291-296.
- King, BJ, Keegan, AR, Monis, PT y Saint, CP (2005). La temperatura ambiental controla la tasa metabólica de los oocistos de *Cryptosporidium* y la retención asociada de infectividad. *Microbiología aplicada y ambiental* , 71 (7), 3848-3857.
- Lean, I. J., Westwood, C. T., y Playford, M. C. (2008). Livestock disease threats associated with intensification of pastoral dairy farming. *New Zealand Veterinary Journal*, 56(6), 261-269.
- Lefkaditis, M., Mpairamoglou, R., Sossidou, A., Spanoudis, K., Tsakiroglou, M., y Györke, A. (2020). Importance of colostrum IgG antibodies level for prevention of infection with *Cryptosporidium parvum* in neonatal dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 176, 104904
- Lanuza, F. (2006). Crianza de terneros y reemplazos de lechería. *Boletín INIA*, (148), 109-128. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/7087>
- Lass, S., Hudson, PJ, Thakar, J., Saric, J., Harvill, E., Albert, R., y Perkins, S.E. (2012). Generating super-shedders: co-infection increases bacterial load and egg production of a gastrointestinal helminth. *Journal of the Royal Society Interface*, 10(80), 20120588-20120588. doi:10.1098/rsif.2012.0588
- Li, X., Atwill, ER, Dunbar, LA y Tate, KW (2010). Efecto de la fluctuación diaria de la temperatura durante la estación fría sobre la infectividad de *Cryptosporidium parvum*. *Microbiología aplicada y ambiental*, 76 (4), 989-993.

- Liu, T., Chen, H., Bai, Y., Wu, J., Cheng, S., He, B., y Casper, D. P. (2020). Calf starter containing a blend of essential oils and prebiotics affects the growth performance of Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, 103(3), 2315-2323.
- Lombard, J. E., Garry, F. B., Urie, N. J., McGuirk, S. M., Godden, S. M., Sterner, K., ... Maas, J. (2019). Proposed dairy calf birth certificate data and death loss categorization scheme. *Journal of Dairy Science*, 102(5), 4704-4712.
- Lombard, J., Urie, N., Garry, F., Godden, S., Quigley, J., Earleywine, T., ... Sterner, K. (2020). Consensus recommendations on calf-and herd-level passive immunity in dairy calves in the United States. *Journal of Dairy Science*, 103(8), 7611-7624.
- Lombardelli, J. A., Tomazic, M. L., Schnittger, L., y Tiranti, K. I. (2019). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* in dairy calves and GP60 subtyping of diarrheic calves in central Argentina. *Parasitology Research*, 118, 2079-2086.
- Mainil, J. (2013). *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152(1-2), 2-12.
- Martins-Vieira, M. B. C., Brito, L. A. L., y Heller, L. (2009). Oocistos de *Cryptosporidium parvum* em fezes de bezerro infectado experimentalmente. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61, 1454-1458.
- McConnel, C. S., Nelson, D. D., Burbick, C. R., Buhrig, S. M., Wilson, E. A., Klatt, C. T., y Moore, D. A. (2019). Clarifying dairy calf mortality phenotypes through postmortem analysis. *Journal of dairy science*, 102(5), 4415-4426.
- McGuirk, S. M., y Collins, M. (2004). Managing the production, storage, and delivery of colostrum. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 20(3), 593-603.
- Merry, R. J., Mawdsley, J. L., Brooks, A. E., y Davies, D. R. (1997). Viability of *Cryptosporidium parvum* during ensilage of perennial ryegrass. *Journal of Applied Microbiology*, 82(1), 115-120.
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. (2022). *Anuario Estadísticos Agropecuario 2022*. Montevideo: DIEA. Recuperado de <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2022/ANUARIO2022.pdf>.
- Möller, H. J. (2022). Effectiveness studies: advantages and disadvantages. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 13(2), 199-207.
- Navarra, C. (2000). Differentiation of gastrointestinal diseases of calves. *North American Veterinary Clinics: Animal Feed Practice*, 6(1), 37-57.

- Naylor, J. M. (1989). A retrospective study of the relationship between clinical signs and severity of acidosis in diarrheic calves. *The Canadian Veterinary Journal*, 30(7), 577.
- Octavia, S., y Lan, R. (2014). The Enterobacteriaceae family. En E. Rosenberg, E. Delong, S. Lory, E. Stackebrandt, y F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 225-275). Berlin: Springer.
- O'Handley, R. M., y Olson, M. E. (2006). Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 22(3), 623-643.
- Osorio, J. (2020). Gut health, stress, and immunity in neonatal dairy calves: the host side of host-pathogen interactions. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11(1), 1-15.
- Panciera, R. J., Thomassen, R. W., y Garner, F. M. (1971). Cryptosporidial infection in a calf. *Veterinary Pathology*, 8(5-6), 479-484.
- Paraud, C., y Chartier, C. (2012). Cryptosporidiosis in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 103(1), 93-97.
- Piva, S., Caffara, M., Pasquali, F., Castagnetti, C., Iacono, E., Massella, E., ... & Galuppi, R. (2016). Detección y cuantificación de ooquistes de *Cryptosporidium* en superficies ambientales de una Unidad de Perinatología Equina. *Medicina Veterinaria Preventiva*, 131, 67-74.
- Ponziani, F. R., Zocco, M. A., D'Aversa, F., Pompili, M., y Gasbarrini, A. (2017). Eubiotic properties of rifaximin: disruption of the traditional concepts in gut microbiota modulation. *World Journal of Gastroenterology*, 23(25), 4491.
- Renaud, D. L., Buss, L., Wilms, J. N., y Steele, M. A. (2020). Is fecal consistency scoring an accurate measure of fecal dry matter in dairy calves?. *Journal of Dairy Science*, 103(11), 10709-10714
- Renaud, D. L., Kelton, D. F., Weese, J. S., Noble, C., y Duffield, T. F. (2019). Evaluation of a multispecies probiotic as a supportive treatment for diarrhea in dairy calves: A randomized clinical trial. *Journal of Dairy Science*, 102(5), 4498-4505.
- Robertson, L. J., Campbell, A. T., & Smith, H. V. (1992). Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Applied and environmental microbiology*, 58(11), 3494-3500.
- Ryan, U. N. A., Fayer, R., y Xiao, L. (2014). *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*, 141(13), 1667-1685.

- Sánchez, R., Romero, J., y Rossanigo, C. (2013). Epidemiología y control de coccidios y *Cryptosporidium*. En C. Fiel, y A. Nari, *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Fundamentos epidemiológicos para su diagnóstico y control* (pp. 357-380). Montevideo: Hemisferio Sur.
- Santos, F.H.R., De Paula, M.R., Lezier, D., Silva, J.T., Santos, G., y Bittar, C.M.M. (2015). Essential oils for dairy calves: effects on performance, scours, rumen fermentation and intestinal fauna. *Animals*, 9 (6), 958-965.
- Saravia, A. (2020). *Identificación, dinámica de eliminación de ooquistes de Eimeria spp. y su asociación con la edad de los terneros* (Tesis de maestría). Facultad de Veterinaria, Udelar, Montevideo.
- Schild, C. O., Caffarena, R. D., Gil, A., Sánchez, J., Riet-Correa, F., y Giannitti, F. (2020). A survey of management practices that influence calf welfare and an estimation of the annual calf mortality risk in pastured dairy herds in Uruguay. *Journal of Dairy Science*, 103(10), 9418-9429.
- Selvi, M. H., y Tapki, İ. (2019). The effects of oregano oil (*Origanum onites* L.) on the growth performance and some blood parameters of holstein friesian calves. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 22(6), 935-941.
- Shahiduzzaman, M., y Dauschies, A. (2012). Therapy and prevention of cryptosporidiosis in animals. *Veterinary Parasitology*, 188(3-4), 203-214.
- Sima, F., Stratakis, A., Ward, P., Gundogdu, O., Stef, L., Pet, I y Corcionivoschi, N. (2019). The effect of an antimicrobial mixture on *Cryptosporidium*. *AgroLife Scientific Journal*, 8(1), 227-232.
- Silverlås, C., Emanuelson, U., de Verdier, K., y Björkman, C. (2009). Prevalence and associated management factors of *Cryptosporidium* shedding in 50 Swedish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 90(3-4), 242-253.
- Smith, D. R. (2012). Field disease diagnostic investigation of neonatal calf diarrhea. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 28(3), 465-481.
- Smith, H. V., Cacciò, S. M., Cook, N., Nichols, R. A., y Tait, A. (2007). *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Veterinary Parasitology*, 149(1-2), 29-40.
- Smith, R. P., Clifton-Hadley, F. A., Cheney, T., y Giles, M. (2014). Prevalence and molecular typing of *Cryptosporidium* in dairy cattle in England and Wales and examination of potential on-farm transmission routes. *Veterinary Parasitology*, 204(3-4), 111-119.

- Shaw, H. J., Innes, E. A., Morrison, L. J., Katzer, F., y Wells, B. (2020). Long-term production effects of clinical cryptosporidiosis in neonatal calves. *International Journal for Parasitology*, 50(5), 371-376.
- Stafford, K. J., y Gregory, N. G. (2008). Implications of intensification of pastoral animal production on animal welfare. *New Zealand Veterinary Journal*, 56(6), 274-280.
- Stratakos, A., Sima, F., Ward, P., Linton, M., Kelly, C., Pinkerton, L., ... Corcionivoschi, N. (2017). The in vitro and ex vivo effect of Auranta 3001 in preventing *Cryptosporidium* hominis and *Cryptosporidium* parvum infection. *Gut Pathogens*, 9, 49.
- Thomson, S., Hamilton, C. A., Hope, J. C., Katzer, F., Mabbott, N. A., Morrison, L. J., y Innes, E. A. (2017). Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. *Veterinary Research*, 48, 1-16.
- Tyzzer, E. E. (1910). An extracellular coccidium, *Cryptosporidium* muris (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. *Journal of Medical Research*, 23(3), 487.
- Tyzzer, E. E. (1912). *Cryptosporidium* parvum (sp. nov.), a Coccidium. *Archiv für Protistenkunde*, 26, 394.
- Urbaniak, G.C., y Plous, S. (2013). Research Randomizer (Version 4.0.) [Software de computadora]. Recuperado de <http://www.randomizer.org/>.
- Urie, N. J., Lombard, J. E., Shivley, C. B., Kopral, C. A., Adams, A. E., Earleywine, T. J., ... Garry, F. B. (2018). Preweaned heifer management on US dairy operations: Part V. Factors associated with morbidity and mortality in preweaned dairy heifer calves. *Journal of Dairy Science*, 101(10), 9229-9244 doi:10.3168/jds.2017-14019.
- Uzal, F. A. (2014). Diarreas neonatales en terneros. En Centro Médico Veterinario de Paysandú (Ed.), *Jornadas Uruguayas de Buiatría* (Vol. XLII, pp. 97-99). Paysandú: CMVP.
- Vélez, J., Lange, M. K., Zieger, P., Yoon, I., Failing, K., y Bauer, C. (2019). Long-term use of yeast fermentation products in comparison to halofuginone for the control of cryptosporidiosis in neonatal calves. *Veterinary Parasitology*, 269, 57-64.
- Villacorta, I., Peeters, J. E., Vanopdenbosch, E., Ares-Mazas, E., y Theys, H. (1991). Efficacy of halofuginone lactate against *Cryptosporidium* parvum in calves. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(2), 283-287.
- Weyl-Feinstein, S., Markovics, A., Eitam, H., Orlov, A., Yishay, M., Agmon, R., ... y Shabtay, A. (2014). effect of pomegranate-residue supplement

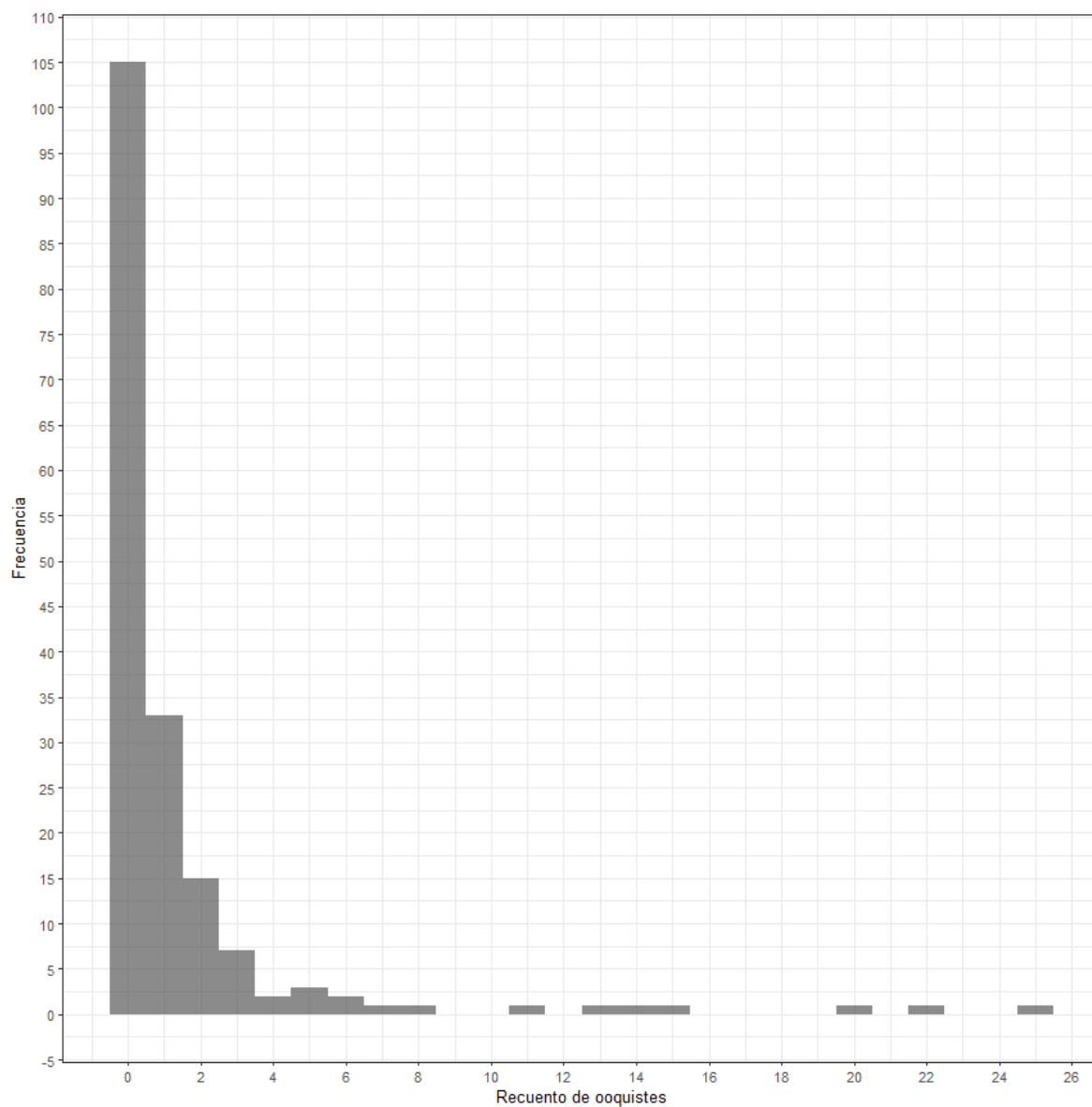
on *Cryptosporidium parvum* oocyst shedding in neonatal calves. *Journal of Dairy Science*, 97(9), 5800-5805.

Xiao, L., y Feng, Y. (2008). Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunology y Medical Microbiology*, 52(3), 309-323.

Zambriski, J.A., Nydam, D.V., Wilcox, Z.J., Bowman, D.D., Mohammed, H.O., y Liotta, J.L. (2013). *Cryptosporidium parvum*: Determination of ID50 and the dose–response relationship in experimentally challenged dairy calves. *Veterinary Parasitology, Cryptosporidium*, 197(1-2), 104–112. doi:10.1016/j.vetpar.2013.04.022

10. ANEXO

Gráfico 7. Histograma de frecuencias de conteos de ooquistes [se excluyeron los muestreos con conteos = 0 (519) para una mejor visualización]



10.1 Riesgo de eliminación de ooquistes (% de animales que liberan ooquistes) – Paso 1

Tabla 8. Modelo mixto generalizado para riesgo de eliminación de ooquistes.

Muestreo	Eliminación Ooq — %, Media MC (EE)		Diferencia A vs. B Media (IC _{95%})	Valor P	
	Tratamiento A (n=33)	Tratamiento B (n=33)		Sin ajustar	FDR
1	0,0 (0,1)	3,0 (2,5)	-3,2 (-8,2; 1,8)	0,2137	0,7123
2	27,1 (9,4)	24,2 (6,5)	2,9 (-9,2; 15)	0,6390	0,9473
3	72,6 (13,0)	72,7 (7,4)	-0,1 (-31,6; 31,3)	0,9928	0,9923
4	78,6 (9,5)	63,6 (7,4)	15,0 (-0,9; 31,0)	0,0651	0,3255
5	33,2 (4,3)	30,3 (4,9)	2,9 (-10,1; 15,9)	0,6631	0,9473
6	15,0 (8,2)	12,1 (2,5)	2,9 (-16,7; 22,5)	0,7723	0,9654
7	8,9 (4,3)	3,0 (2,5)	5,9 (-7,2; 19,1)	0,3775	0,8372
8	2,9 (2,4)	3,0 (2,5)	-0,1 (-8,6; 8,3)	0,9733	0,9928
9	15,0 (8,2)	6,1 (4,9)	8,9 (-12,8; 30,7)	0,4186	0,8372
10	12,0 (4,1)	0,0 (—)	12,0 (3,9; 20,1)	0,0038	0,0380

Media MC: Media de mínimos cuadrados. **EE:** Error estándar. **IC_{95%}:** Intervalo de confianza al 95%. **FDR:** False Discovery Rate adjustment

10.2 Recuento de Ooquistes sólo considerando animales que eliminan ooquistes – Paso 2

Tabla 9. Modelo mixto generalizado para recuento de ooquistes.

Muestreo	Recuento Ooquistes — Media MC (EE)		Ratio A vs. B Media (IC _{95%})	Valor P	
	Tratamiento A (n=33)	Tratamiento B (n=33)		Sin ajustar	FDR
2	0,28 (1,89)	0,35 (1,96)	0,81 (2,53; 2,72)	0,8574	0,9759
3	0,53 (1,53)	0,54 (1,53)	0,98 (1,83; 2,72)	0,9759	0,9759
4	0,79 (1,55)	0,53 (1,59)	1,48 (1,90; 2,72)	0,6493	0,9759
5	0,23 (1,69)	0,38 (1,72)	0,59 (2,13; 2,72)	0,6160	0,9759
6	0,04 (1,42)	0,09 (1,44)	0,48 (1,66; 2,72)	0,3850	0,9759
7	0,09 (1,37)	0,06 (1,43)	1,59 (1,62; 2,72)	0,5097	0,9759
8	0,05 (2,85)	0,11 (2,90)	0,40 (4,45; 2,72)	0,6488	0,9759
9	0,06 (1,43)	0,06 (1,58)	1,13 (1,79; 2,72)	0,8724	0,9759

Media MC: Media de mínimos cuadrados. **EE:** Error estándar. **IC_{95%}:** Intervalo de confianza al 95%. **FDR:** False Discovery Rate adjustment.

10.3 Riesgo de diarrea

Tabla 10. Modelo mixto generalizado para riesgo de diarrea.

Muestreo	Incidencia de diarrea — %, Media		Diferencia A vs. B	Valor P	
	MC (EE)			Sin ajustar	FDR
	Tratamiento A (n=33)	Tratamiento B (n=33)			
1	9,0 (4,8)	6,1 (2,5)	3,0 (-7,4; 13,3)	0,5752	0,6341
2	27,2 (6,1)	24,2 (6,5)	3,0 (-9,2; 15,1)	0,6341	0,6341
3	78,7 (4,1)	57,6 (10,8)	21,1 (-7,6; 49,9)	0,1488	0,3720
4	63,6 (2,3)	57,6 (8,9)	6,0 (-15,2; 27,2)	0,5793	0,6341
5	42,4 (3,7)	33,3 (9,9)	9,0 (-17,2; 35,3)	0,5001	0,6341
6	33,3 (7,4)	18,2 (4,3)	15,1 (-1,8; 32,0)	0,0798	0,2660
7	18,1 (7,5)	9,1 (7,4)	9,0 (-12,6; 30,6)	0,4132	0,6341
8	6,0 (4,7)	15,2 (2,5)	-9,2 (-23,3; 5,0)	0,2035	0,4070
9	6,0 (2,1)	0,0 (-)	6,0 (1,9; 10,0)	0,0039	0,0195
10	3,0 (2,4)	27,3 (7,4)	-24,3 (-34,2; -14,5)	< 0,0001	< 0,0001

Media MC: Media de mínimos cuadrados. **EE:** Error estándar. **IC_{95%}:** Intervalo de confianza al 95%. **FDR:** *False Discovery Rate adjustment.*

