ARTÍCULO ORIGINAL

Aspectos epidemiológicos de la criptosporidiosis en becerros de rebaños lecheros

ENRICO LIPPI ORTOLANI* y PIERRE CASTRO SOARES**

EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF CRYPTOSPORIDIOSIS IN DAIRY CALVES

*Two groups of 200 dairy calves, from calving to the 60th days of life, with and without diarrhoea were selected by clinical examination of 930 calves from 30 collective calf boxes, and 13 with individual boxes, chosen at random, in the State of Sao Paulo, Brazil. Feaces smears from the calves were stained by the modified Ziehl-Neelsen technique. A semi-quantitative score of oocysts numbers in feaces was done. The occurrence of diarrhoea was higher during the 2nd week of life, but cryptosporidiosis was similarly found in calves from the 1st - 3rd week of life. Diarrhoea and cryptosporidiosis were less frequent in older calves. Calves with cryptosporidiosis excreted more oocysts and were more frequently found (38%) than asymptomatic calves (11.5%). Most of these later calves were two-weeks old. Calves shedding *Cryptosporidium* oocysts were seen in 58% of the farms studied, being more prevalent in those farms that kept calves in collective boxes.*

Key words: *Cryptosporidium*, epidemiology, diarrhea, calves.

INTRODUCCIÓN

Entre las especies de animales domésticos, sin duda la que es más afectada por criptosporidiosis es la bovina, en especial los neonatos. Los resultados de encuestas epidemiológicas son muy variables, pero por lo general indican una morbilidad alta (10 - 85%)¹⁻⁴.

El síndrome diarreico tiene una etiopatogenia compleja, pues cuando el *Cryptosporidium* es el único causante la mortalidad es baja, pero dependiendo de su asociación con otros agentes infecciosos, del grado de inmunidad y del estado nutricional del huésped, la mortalidad puede ser alta^{2,5,6}.

Las edades más afectadas, conforme a las revisiones son de 4 a 30 días^{5,7-10}. Mientras más malas son las condiciones sanitarias del ambiente, principalmente en donde permanecen los becerros, mayor será el riesgo de contagio y presencia de la enfermedad^{11,12}. Al hablar respecto a la contaminación del medio ambiente, la mayoría de los autores trata el asunto de manera genérica y se limita al relato y correlación del binomio efecto - causa.

En consideración a la escasa literatura nacional acerca de las diarreas del ganado relacionadas con el *Cryptosporidium* y a la poca información existente sobre su frecuencia en animales portadores asintomáticos y de su contaminación

* Prof. PhD do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP CEP: 05508-090 e-mail: ortolani@usp.br

** Doutorando em Clínica Veterinária pela FMVZ – USP e-mail: psoares@usp.br

del ambiente, el presente trabajo tendrá como objetivo estudiar su ocurrencia en becerros de rebaños lecheros del estado de São Paulo, verificando la influencia que puede tener la edad de los animales y el manejo, así como evaluar la magnitud de los portadores sintomáticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

De un total de 930 becerros, provenientes de 43 rebaños lecheros del estado de São Paulo, se colectaron muestras de heces a 200 animales que presentaban diarrea, entre cero y 60 días y a 200 sin diarrea, siendo estos distribuidos aleatoriamente en cinco grupos de 40 animales, de acuerdo con la siguiente escala de edades: 0 a 7, 8 a 15, 16 a 22, 23 a 30 y 31 a 60 días.

Las heces fueron colectadas del recto y acondicionadas en bolsas plásticas, siendo mantenidas en refrigeración, para posterior análisis. Frotis fecales fueron coloreados por la técnica de Ziehl - Neelsen¹³, modificada en la concentración del ácido sulfúrico para promover la diferenciación del número de oocistos contabilizados en 25 campos ópticos¹⁴. Fueron observados, como mínimo 50 campos, antes de considerar una lámina negativa. Se realizó una evaluación semi-cuantitativa de los oocistos según la siguiente nomenclatura: re: - ausencia de oocistos, + de 1 a 4, ++ de 5 a 20, +++ de 21 a 84 y ++++ arriba de 84. La tasa de ocurrencia de diarrea fue calculada por la fórmula¹⁵:

$$\frac{\text{Número de casos existentes en la población} \\ \text{(cero a 60 días) en el momento}}{\text{Número de animales en la población}}$$

También fue calculada la frecuencia de *Cryptosporidium* en animales con diarrea y en animales asintomáticos¹. Fueron catalogadas las propiedades en que no se encontraban animales portadores de infección criptosporídica; aquellas en que sólo fueron identificados portadores asintomáticos, eliminando oocistos en las heces; aquellas en que había tanto asintomáticos cuanto infectados con diarrea y aquellas apenas con criptosporidiosis. Los rebaños fueron clasificados según el tipo de becerra, siendo estos del tipo colectivo (30 propiedades) o individuales (13 propiedades).

Para el análisis estadístico de los datos, fue utilizado una prueba de diferencia entre dos

proporciones con aproximación normal¹⁶, en el cual fueron comparados resultados obtenidos de las frecuencias proporcionales entre dos tratamientos. Primeramente la determinación de tasas de riesgo relativo, factor etiológico de riesgo y de riesgo atribuido a la criptosporidiosis fueron realizadas por Chi-Cuadrado, para evaluar el riesgo de ocurrencia de diarrea entre becerros de rebaños considerados expuestos al parásito y los supuestamente no expuestos. Enseguida fue realizada la tasa de riesgo relativo (RR) a partir de un análisis retrospectivo de la criptosporidiosis com relación a la ocurrencia de diarrea en becerros¹⁷. La determinación del factor etiológico de riesgo de la criptosporidiosis en relación a la ocurrencia de diarrea en becerros fue evaluada según la fórmula:

$$\frac{\text{Tasa de expuestos} - \text{Tasa de no expuestos}}{\text{Tasa de expuestos}}$$

La tasa de riesgo atribuida a la criptosporidiosis en relación con la ocurrencia de diarrea en becerros fue obtenida a través de la substracción de la tasa de expuestos y de los no expuestos.

La comparación de excreción media de oocistos de *Cryptosporidium* sp, según las condiciones clínicas de los becerros, fue analizada por la prueba de diferencia entre medias¹⁶.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del examen de 930 becerros en 43 rebaños, se constató que 21,5% de los mismos presentaban heces diarreicas. Se verificó, en la Tabla 1, que becerros agrupados en escala de edades de 8 a 15 días evidenciaron mayores frecuencias de diarrea. Con relación a la influencia de la edad en la presencia de diarrea en becerros con *Cryptosporidium*, las frecuencias mayores se observaron en las primeras tres semanas. Con relación a los portadores asintomáticos, no se encontraron positivos en la primera semana de vida y una gran parte de ellos se encuentran de la segunda a la cuarta semana de observación.

Pocos son los trabajos nacionales que describen la frecuencia de diarrea en becerros recién nacidos. Ocurrencia de 8,2% fue encontrada en Goiania - GO¹⁸, en becerros de 0 a 10 meses edad. Otros autores^{2,19,20} observaron 36,82% en Botucatu - SP, 22,64% en Pará de

Minas - MG y 15,8% en Bela Vista - GO, respectivamente.

Como la tasa de ocurrencia de diarrea fue verificada en un determinado momento, y no a través de su acompañamiento continuo en los primeros 60 días de vida, se infiere que la morbilidad podría haber sido mayor²¹, quienes apuraron que 90 a 100% de los becerros de la región lechera de Sete Lagoas - MG, presentaron diarrea durante los primeros meses de vida.

La constatación, en este trabajo, de que los becerros con 8 a 15 días de edad presentaron diarrea con frecuencia mayor que animales de otra escala de edades, se ajustan a las verificaciones de otros autores⁶. Los mismos autores sugirieron que en este periodo aumenta la probabilidad que de un mayor número de especies de microorganismos enteropatógenicos cause disturbios entéricos y superior a las demás escalas de edades.

Semejante a todos lo levantamientos revisados, la frecuencia de criptosporidiosis detectada fue relativamente baja en becerros diarreicos en la cuarta semana y en el segundo

mes de vida (23 a 60 días). Analizando este resultado con otro trabajo⁴, la susceptibilidad a la criptosporidiosis varía con la edad y que otros factores de riesgo deban concurrir para la extensión de la infección, además de que alteraciones en la mucosa intestinal sean menos pronunciadas en becerros de mayor edad.

Con relación a los portadores asintomáticos (Tabla 1), fue observado en un trabajo²² que la mayoría de los animales portadores asintomáticos (68%) fue detectada en la primera semana de vida, contrariando tales observaciones con la de este estudio. Tales autores sugieren ser coincidente con la ingestión precoz de calostro en locales de presión infecciosa elevada (SIC). De cualquier forma, la identificación de portadores asintomáticos de un hasta cerca de dos meses de vida, caracteriza la categoría de gran potencial de infección criptosporídica.

Con relación a la excreción de oocistos de *Cryptosporidium*, según las condiciones clínicas de los becerros (Tabla 2), se verifica que el porcentaje de becerros con criptosporidiosis (38%) fue significativamente superior que el de

Tabla 1. Prueba de diferencia entre dos proporciones, con aproximación normal, para análisis de la influencia de edades en la ocurrencia de diarrea en becerros con criptosporidiosis y portadores asintomáticos

Escala de edades (Días)	Frecuencia de becerros (%)					
	Con Diarrea		Con Criptosporidiosi		Portador Asintomático	
0 a 7	20,25 ^{b*}	(32/158)	60,00 ^b	(16/32)	0,00	(0/40)
8 a 15	55,30 ^c	(103/186)	45,63 ^b	(47/103)	25,00 ^b	(10/40)
16 a 22	15,07 ^b	(22/146)	36,37 ^b	(8/22)	10,00 ^a	(4/40)
23 a 30	19,12 ^b	(26/136)	15,38 ^a	(4/26)	15,00 ^{ab}	(6/40)
31 a 60	5,54 ^a	(17/307)	5,88 ^a	(1/17)	7,50 ^a	(3/40)

* Letras diferentes en la misma columna difieren entre sí a un nivel de 5% de probabilidad

Tabla 2. Prueba de diferencia entre dos proporciones, con aproximación normal, para evaluación de la influencia de las condiciones clínicas de los becerros en la excreción y intensidad de excreción de oocistos de *Cryptosporidium*

Condición Clínica	Becerras con oocistos	Intensidad de Excreción			
		+	++	+++	++++
Criptosporidiosis	38,00 ^{b*} (76/200)	26,30 ^a (20/76)	43,42 ^b (33/76)	25,00 ^b (19/76)	5,26 (4/76)
Portadores Asintomáticos	11,50 ^a (23/200)	86,95 ^b (20/23)	8,70 ^a (2/23)	4,35 ^a (1/23)	

* Letras diferentes en la misma columna difieren entre sí a un nivel de 5% de probabilidad

los considerados portadores asintomáticos (11,5%). Relativas a la intensidad de excreción de los oocistos, están dispuestas las comparaciones estadísticas de las tres categorías, convencionalmente definidas por signos: una (+), dos (++) y tres (+++). Quedó patente que en la primera de ellas (+) predominan los becerros portadores asintomáticos, en cuanto en las demás categorías (++ y +++), predominaron los becerros con diarrea. Puede ser inferido que en la criptosporidiosis lo signo diarrea se presente en el mismo nivel en que tal tipo de infección reconocidamente autolimitante estuviese en el auge de su dominio sobre el huésped.

Considerándose las determinaciones medias de volumen de las muestras utilizadas y de las áreas de estirazo y del campo óptico adoptadas, se estiman que becerros con criptosporidiosis tengan excretado en media $2,74 \times 10^4$ oocistos/g de heces, en cuanto que los portadores asintomáticos apenas $4,15 \times 10^5$. Se resalta que el becerro que más eliminó oocistos tenía siete días de vida, criado en becerrero colectivo, y excretó más de 20×10^6 oocistos/g de heces, o sea, más del doble de número citado como de máxima excreción²³ (10×10^6 oocistos/g de heces). La literatura es limitante con lo que dice respecto a estas comparaciones de excreción. En Finlandia²², no fue encontrada, en este sentido, diferencia estadística entre becerros con criptosporidiosis y portadores asintomáticos, aunque no son citados comentarios que puedan explicar tal distinción.

El porcentaje de establecimientos en que fueron encontrados becerros con criptosporidiosis y como portadores asintomáticos no varió significativamente con las que presentaron apenas

animales con criptosporidiosis (Tabla 3) en lo totalmente negativos. En realidad, este grupo de haciendas ocupó una posición intermedia entre los dos “sólo negativos” y los “sólo con criptosporidiosis”, entretanto estas dos categorías difirieron entre sí. Tal observación refleja la precariedad del criterio “presencia de oocistos de *Cryptosporidium* en las heces” cuando combinada con el indicador “criptosporidiosis clínica”.

De cualquier modo, los solo negativos fueron la mayoría con proporción de 41,86, en cuanto los portadores asintomáticos fueron la categoría menos representada (9,30%). En este contexto se verifica que un gran número de haciendas, de diferentes regiones del estado de São Paulo, exhibieron becerros con criptosporidiosis (48,83%) y en la condición de portadores asintomáticos (34,88%), indicando que este parásito se encuentra geográficamente bien diseminado en la pecuaria lechera del Estado.

La comparación estadística entre las proporciones de becerreros individuales y colectivos evidenció que el número de propiedades fue semejante, estadísticamente, entre las haciendas que presentaron becerros negativos y aquellas en que sólo se identificó criptosporidiosis, con un mayor número de becerreros colectivos con la condición asociativa criptosporidiosis y portadores asintomáticos que en boxes individuales. La condición apenas de portadores asintomáticos sólo fue verificada en becerros individuales.

Con relación a la frecuencia de portadores asintomáticos aquí encontrada (1,5%), también fue compatible con los intervalos apuntados por revisión sobre el asunto¹ (0% a 14%). Según otros autores^{1,8}, todavía muy poco fue develado con

Tabla 3. Prueba de diferencia entre dos proporciones, con aproximación normal, para análisis de distribución de haciendas y tipos de becerrero cuanto a excreción de oocistos de *Cryptosporidium*

Condición Clínica	% de Haciendas		% de becerrero			
			Individual		Colectivo	
Sólo Criptosporidiosis	23,25 ^{b 1}	(10/43)	15,38 ^{A2}	(02/12)	26,70 ^A	(08/30)
Criptosporidiosis y Portador Asintomático	25,58 ^{bc}	(11/43)	7,70 ^A	(01/13)	33,30 ^B	(10/30)
Sólo Portador Asintomático	9,30 ^a	(04/43)	30,77	(04/13)	0,00	(00/30)
Negativos	41,86 ^c	(18/43)	46,15 ^A	(06/13)	40,00 ^A	(12/30)

¹ Letras minúsculas diferentes em la misma columna difieren entre sí a um nivel de 5% de probabilidad.

² Letras mayúsculas en la misma línea difieren entre sí a un nivel de 5% de probabilidad.

respecto a esta condición específica.

No fueron encontrados portadores asintomáticos en la primera semana de vida (Tabla 1) y gran parte de estos se encontraron de la segunda a la cuarta semana de observación. Los animales de edad comprendida entre 23 a 30 días presentaron proporciones indistintas, estadísticamente, de las de portadores asintomáticos de las tres últimas escala de edades citadas, corroborándose con o trabajo verificado en Suiza²⁴. Ya en el trabajo²² que la mayoría (68%) de los animales portadores asintomáticos fue detectada en la primera semana de vida, lo que según opinan sería fruto de concomitancia entre ingestión precoz de calostro (1ª hora de vida) en locales de presión infecciosa elevada (SIC). De cualquier forma, la identificación de portadores asintomáticos de una semana hasta cerca de dos meses de vida, caracteriza la categoría como peligrosa fuente de infección criptosporídica.

Los datos de la Tabla 4, cuando sometidos al test del Chi-Cuadrado ($\chi^2 = 8,46$), reveló que el riesgo de ocurrencia de diarrea fue significativamente más alta en el grupo de los comprobadamente expuestos que en los supuestamente no expuestos, al nivel de 5% de probabilidad ($\chi^2 = 3,84$). Se evidenció, también, que el riesgo de ocurrencia de diarrea fue mayor en el grupo de los comprobadamente expuestos al *Cryptosporidium* que en los supuestamente expuestos. La tasa de riesgo relativo reveló que rebaños expuestos presentaron una frecuencia y un riesgo 1,66 meses mayores de diarrea que lo no expuestos, en cuanto que el factor etiológico de riesgo sugirió que caso fuesen adoptadas medidas profilácticas efectivas contra el parásito, erradicándolo del ambiente, la ocurrencia de diarrea en becerros disminuiría en 33,25%. Por otro lado, por el riesgo atribuido, se estimó que caso fuesen eliminados los *Cryptosporidium* de las haciendas expuestas, ocurriría una disminución de 8,13% de casos de diarrea en la población de becerros.

Se demostró que en los rebaños estudiados del estado de São Paulo, *Cryptosporidium* ejerce un papel de destaque en la etiología de diarrea en becerros; que hay nítida influencia de escala de edades del huésped, siendo la criptosporidiosis más frecuente en becerros con hasta tres semanas de vida, decreciendo con el aumento de edad.

Existe nítida asociación entre el grado de contaminación ambiental por oocistos de

Tabla 4. Frecuencia de becerros según la exposición de estos al riesgo de infección por *Cryptosporidium* y presencia o no de diarrea

Exposición	Condición clínica		Total
	Diarreicos	No Diarreicos	
Comprobadamente			
Expuestos	145	448	593
No expuestos	55	282	337
Total	200	730	930

$\chi^2_{cal.} = 8,46 > \chi^2_{tab.} = 3,84$

Cryptosporidium y la presencia de criptosporidiosis en becerros. Recíprocamente, becerros con criptosporidiosis excretan mayores cantidades de oocistos que animales portadores asintomáticos.

Fuera de que se presenten en los rebaños en menor número que los de becerros con criptosporidiosis, considerable fue el contingente de portadores asintomáticos de la infección criptosporídica, en los rebaños estudiados. Tales portadores asintomáticos fueron detectados desde la segunda semana hasta el sexagésimo día de vida, lo que los caracteriza como peligrosa fuente de infección.

RESUMEN

Dos grupos de 200 becerros cada uno, con y sin diarrea respectivamente, fueron extraídos mediante examen clínico de un total de 930 becerros de entre 0 a 60 días de vida, seleccionados al azar en 43 establecimientos pecuarios del estado de São Paulo, Brasil, de los cuales 30 contaban con criaderos colectivos y 13 con corrales individuales. Muestras de heces de estos animales fueron coloreadas por medio de la técnica de Ziehl-Neelsen modificada y una evaluación semi-cuantitativa del número de oocistos de *Cryptosporidium* en las heces fue llevada a cabo. La aparición de diarrea fue alta durante la segunda semana de vida, aunque criptosporidiosis fue igualmente detectada en becerros de 1 a 3 semanas de vida. Diarrea y criptosporidiosis fueron menos frecuentes en becerros de mayor edad. Becerros con criptosporidiosis excretan más oocistos y fueron encontrados con mayor frecuencia (68%) que becerros asintomáticos (11,5%). La mayoría de estos últimos contaba con 2 semanas de vida.

Becerras cuyos deyecciones contenían oocistos fueron encontrados en 58% de los establecimientos considerados, siendo más numerosos em aquellos que mantenían los becerros en criaderos coletivos.

REFERENCIAS

- 1.- BOUFASSA-OUZROUT S, CHERNETTE R, MEISSONIER E. La Cryptosporidiose - une maladie animale et humaine cosmopolita. Ser Tech Off Int Epizooties 1986; 5: 1-97.
- 2.- GARCÍA A M. Prevalência do *Cryptosporidium* sp (Tyzzer, 1907) em Bezerros Lactantes na Bacia Leiteira de Pará de Minas, M.G. Tese de Mestrado. UFMG, Belo Horizonte, Brasil 1993; 80.
- 3.- ONGERTH J E, STIBBS H H. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in dairy calves in western Washington. Am J Vet Res 1989; 50: 1069-70.
- 4.- TZIPORI S. The relative importance of enteric pathogens affecting neonates of domestic animals. Advanc Vet Sci Comp Med 1985; 29: 103-206.
- 5.- POHJOLA S S. Diagnostic and epidemiological aspects of *Cryptosporidium* infection, a protozoan infection of in creasing veterinary public health importance (Academic Dissertation). Helsink (DFEH-CVM) Finland: College of Veterinary Medicine 1986; 97.
- 6.- REYNOLDS D J, MORGAN J H, CHARTER N et al. Microbiology of calf diarrhea in Southern Britain. Vet Rec 1986; 119: 34-9.
- 7.- TZIPORI S. Cryptosporidiosis in animal and man. Microb Vet 1983; 47: 84-96.
- 8.- KIRPATRICK C E. *Cryptosporidium* infection as a cause of calf diarrhea. Vet Clin North Amer Food Anim Pract 1985; 1: 515-28.
- 9.- HENRIKSEN S A, KROGH H V. Bovine Cryptosporidiosis in Denmark 1 - Prevalence, age distribution and seasonal variation. Nord Vet Med 1985; 37: 34-41.
- 10.- FAYER R. Cruptosporidiosis in cattle: a review. Large Animal Practice 2000; 21: 22-3.
- 11.- GARBER L P, SALMAN M D, HURD H S. Potential risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. JAVMA 1994; 205: 86-91.
- 12.- HEATH S E. Neonatal diarrhea in calves: diagnosis and intervention in problem herds. Compend Contin Educ Pract Vet 1992; 14: 995-1002.
- 13.- HENRIKSEN S A, POHLENS J. Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. Acta Vet Scand 1981; 22: 594-6.
- 14.- ORTOLANI E L. Padronização da técnica de Ziehl - Neelsen para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium*. Estudo de alguns aspectos epidemiológicos de criptosporidiose em bezerros de rebanhos leiteiros no estado de São Paulo. Tese de Doutorado. USP, São Paulo, SP, Brasil 1988; 85.
- 15.- SCHWABE C W, RIEMANN H P, PRANT C E. Epidemiology in Veterinary Practice. Lea & Febiger, Philadelphia, USA 1977; 303.
- 16.- SNEDECOR G W, COCHRAN W G. Statistical Methods. 6ª ed. Ames: Iowa State University Press 1967; 593.
- 17.- JENICEK M, CLEROUX R. Épidemiologie 2ª. ed. St. Hyacinthe: Edison & Maloine, 1983; 454.
- 18.- COSTA R R, SANTOS E E, ANDRADE M A et al. Frequência e causa de doenças do aparelho digestivo em bezerros na bacia leiteira de Goiânia. An Agron Vet 1979; 9:108.
- 19.- MODOLO J R, GONÇALVES R C, KUCHEMBUCK M R C et al. Ocorrência de criptosporidiose em bezerros na região de Botucatu - SP. Rev Bras Med Vet 1988; 10: 9-10.
- 20.- CARNEIRO J R. Aspectos clínicos, epidemiológicos e de diagnóstico da criptosporidiose bovina e humana. Tese de Doutorado. UFMG, Belo Horizonte MG, Brasil 1995; 127.
- 21.- LEITE R M, LIMA J D. Fatores sanitários que influenciam na criação dos bezerros. Arq Esc Vet Univ Fed M Gerais 1982; 34: 485-92.
- 22.- POHJOLA S S, OKSANEN H, NEUVONEN E et al. Certain enteropathogens in calves of finnish dairy herds with recurrent outbreaks of diarrhea. Prev Vet Med 1986; 3: 547-58.
- 23.- ANGUS K W. Cryptosporidiosis in domestic animals and humans. In Practice 1987; 9: 47-9.
- 24.- SPILLMAN S K, ECKERT J, MERK W et al. Zum vollkommen von Cryptosporidien bei kalbern in schweiz. Schweiz Arch Tierheilk 1986; 128: 111-8.