



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

TÍTULO DEL TRABAJO:

**“Caracterización molecular de aislamientos de *Cryptosporidium* spp.
de cerdos en Argentina”**

AUTOR: Lorena Alejandra De Felice

DIRECTOR: Dr. Juan Manuel Unzaga

CODIRECTOR: Dr. Javier Alejandro Cappuccio

ASESOR CIENTÍFICO: Dr. Gastón Andrés Moré

LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA),
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

MIEMBROS DEL JURADO:

Dra. Mabel Ribicich

Dr. Rodrigo E.F. Sanabria

Dr. Ernesto J.A. Späth

2021

DEDICATORIA

A mi abuelo Osvaldo, por estar siempre a mi lado y al barrio de Lanús donde crecí, por tantos recuerdos lindos.

AGRADECIMIENTOS

A Juan, mi director, por su confianza y apoyo incondicional desde mis inicios en la docencia e investigación. Por escucharme siempre, por su optimismo y dedicación, fundamentales para llevar adelante este trabajo.

A Javier, mi codirector, por acompañarme en toda la etapa del muestreo y por los valiosos aportes a esta tesis.

A Gastón, mi asesor científico, por todas las enseñanzas en el laboratorio, por estar en cada detalle y trabajar conmigo a la par en este camino recorrido.

A Cecilia, directora del LAINPA, por darme un lugar en el grupo, por su calidez humana y su espíritu de responsabilidad y perseverancia.

A mis amigas y compañeras del laboratorio, Lucy y Lauri, feliz de haberlas conocido. Gracias por nuestras infinitas anécdotas y por estar en cada momento.

Al equipo del LAINPA, Andre, Lais, Magda, Marian, Eli, Kevin, Diego, Selva, por el compañerismo y las experiencias vividas a lo largo de los años. A Isidoro, técnico y amigo, por su paciencia, su gran ayuda y compañía durante las tardes.

A Eugenio por su importante colaboración en el muestreo y a las chicas de Patología, Inés y Estefi por compartir información y material de trabajo.

A Estela Bonzo, un agradecimiento especial por brindarnos todo su tiempo y ayudarnos con el análisis estadístico.

A Moni, compañera de emociones desde nuestros comienzos en Veterinaria, gracias por tu amistad y la buena onda de siempre.

A mis abuelos, Elsa y Osvaldo que hoy me guían desde el cielo, a mis primas, Andre, Ro, Malén y Aimé, las adoro. A mis padres, por criarme con tanto amor y enseñarme a valorar las pequeñas cosas de la vida.

A Andrés y a mi hija Lara, mis dos amores, gracias por tanto.

Citas bibliográficas correspondientes a las publicaciones parciales del trabajo de tesis

Presentaciones en congresos y reuniones científicas

De Felice LA, Cappuccio J, Perez E, Moré G, Unzaga JM, Venturini MC, Identificación de *Cryptosporidium* spp. en lechones de establecimientos intensivos de Buenos Aires y La Pampa. Congreso Nacional de Producción Porcina 2014. 12 al 15 de agosto de 2014. Mar del Plata. Buenos Aires. Argentina.

De Felice LA, Unzaga JM, Cappuccio J, Moré G. Caracterización molecular de aislamientos de *Cryptosporidium* spp. de cerdos en Argentina. Revista Analecta Veterinaria. Vol. 34 n° 1 y 2. 2014. Presentaciones de planes de tesis, Jornada Científico-Tecnológica de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

De Felice LA, Moré G, Cappuccio J, Valette E, Venturini MC, Unzaga JM Ocurriencia de *Cryptosporidium* spp. en cerdos de granjas intensivas. Estudio preliminar del diagnóstico molecular. Congreso Nacional de Producción Porcina 2016. 9 al 12 de agosto de 2016. Resistencia. Chaco. Argentina.

De Felice L, Bonzo E, Moré, G, Campero LM, Venturini MC, Unzaga JM. Identificación de *Cryptosporidium* spp. en lechones de granjas intensivas y su asociación con los distintos tipos de manejo. XXII Reunión Científico Técnica. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnósticos (AAVLD). 15 al 17 de noviembre de 2018. Río Cuarto, Córdoba. Argentina.

De Felice LA, Moré G, Venturini MC, Unzaga JM. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* spp. from domestic pigs in Argentina. 5th International meeting on Apicomplexan Parasites in farm Animals. 2-4 de octubre de 2019. Berlín, Alemania.

Trabajos publicados

De Felice LA, Moré G, Cappuccio J, Venturini MC, Unzaga JM. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from domestic pigs in Argentina. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 22 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100473>.

Citas bibliográficas correspondientes a las publicaciones parciales relacionadas de modo indirecto al trabajo de tesis

Presentaciones en congresos y reuniones científicas

Unzaga JM, **De Felice LA**, Dellarupe A, Eiras D, Moré G, Rambeaud M, Kienast M, Venturini MC. Molecular identification of *Cryptosporidium* from dogs in Argentina. XXIII Congreso Internacional de la Asociación Mundial para el avance de la Parasitología Veterinaria (WAAVP). Ciudad de Buenos Aires, 21 al 25 de agosto de 2011.

De Felice LA, Unzaga JM, Costa EF, Dellarupe A, Venturini MC. Molecular identification of *Cryptosporidium* sp. from calves in Argentina. Apicomplexa in farm animals. International meeting. Lisboa 25 al 28 de octubre 2012.

De Felice LA, Eiras DF, Gos ML, Unzaga JM. Identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en gatos domésticos de la zona sur del Gran Buenos Aires. XIII Congreso Nacional de la Asociación de Veterinarios especializados en animales de compañía de Argentina (AVEACA). 17 al 20 de septiembre de 2013. Buenos Aires, Argentina.

De Felice LA, Unzaga JM, Flores Vogel F., Venturini MC. Identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en corderos de Santa María (RS) Brasil. XXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología (SAP). 24 y 25 de octubre 2013. Rosario, Santa Fe.

Unzaga JM, **De Felice LA**, Dellarupe A, Fitte B, Robles MR, Steffen K, Navone G, Venturini MC. Presencia de *Cryptosporidium* spp. en roedores sinantrópicos de áreas urbanas y periurbanas de la ciudad de La Plata. XXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología (SAP). Noviembre 2015. CABA.

Unzaga, JM, **De Felice LA**, Dellarupe A. Caracterización molecular de *Cryptosporidium* spp. en animales domésticos y silvestres en Argentina. VII Congreso Argentino de Parasitología. 24 al 27 de abril 2019. Corrientes. Argentina.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNasa: desoxirribonucleasa

BSA: *bovine serum albumin* (albúmina de suero bovino)

COWP: *Cryptosporidium oocyst wall protein* (proteína de la pared del ooquiste de *Cryptosporidium*)

dNTPs: desoxinucleósidos trifosfatos

ELISA: enzimoimmunoensayo

HSP70: *heat shock protein* (proteína del shock térmico de 70 kilodalton)

IC: intervalo de confianza

IgG: inmunoglobulina G

kDa: kilodalton

MgCl₂: cloruro de magnesio

ml: mililitro

mM: milimol

MO: microscopio óptico

ng: nanogramo

nm: nanómetro

nPCR: *nested-PCR* (PCR anidada)

NTC: *no template control*

OR: odds ratio

pb: pares de base

PCR: *polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

RFLP: *Restriction fragment length polymorphism* (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción)

SSU-rRNA: *Small subunit ribosomal ribonucleic acid* (sub-unidad menor del ARN ribosómico)

TBE: tris-borato-EDTA

TI: tasa de infección

μl: microlitro

μm: micrometro

μM: micromol

ZNM: Ziehl-Neelsen-modificado.

INDICE DE CONTENIDOS

TÍTULO: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE <i>Cryptosporidium</i> spp. DE CERDOS EN ARGENTINA.....	1
PALABRAS CLAVES.....	1
RESUMEN.....	1
TITLE: MOLECULAR CHARACTERIZATION OF <i>Cryptosporidium</i> spp. ISOLATES FROM PIGS IN ARGENTINA.....	3
KEYWORDS.....	3
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. HISTORIA.....	6
1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	8
1.3. MORFOLOGÍA.....	14
1.4. CICLO BIOLÓGICO.....	18
1.5. SALUD PÚBLICA.....	20
1.6. DIAGNÓSTICO.....	24
1.7. CONTROL Y PREVENCIÓN DE LA CRYPTOSPORIDIOSIS.....	28
1.8. CRYPTOSPORIDIOSIS EN DIFERENTES ANIMALES. SITUACIÓN EN ARGENTINA.....	30
1.9. CRYPTOSPORIDIOSIS EN CERDOS.....	31
1.9. PRODUCCIÓN PORCINA Y SITUACIÓN EN ARGENTINA.....	35
2. HIPÓTESIS.....	38
3. OBJETIVOS.....	39

4. PRESENCIA DE <i>Cryptosporidium</i> spp. EN CERDOS DE CATEGORÍAS PRE-DESTETE Y RECIENTEMENTE DESTETADOS DE ESTABLECIMIENTOS INTENSIVOS.....	41
4.1. MATERIALES y MÉTODOS.....	41
4.1.1. Muestras.....	41
4.1.2. Diagnóstico microscópico.....	47
4.1.3. Análisis estadístico.....	51
4.2. RESULTADOS.....	52
4.3. DISCUSIÓN.....	61
5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES/GENOTIPOS LOCALES DE <i>Cryptosporidium</i> spp. AISLADOS DE CERDOS DE CATEGORÍAS PRE-DESTETE Y RECIENTEMENTE DESTETADOS DE ESTABLECIMIENTOS INTENSIVOS.....	66
5.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	66
5.1.1. Extracción de ADN.....	66
5.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación.....	68
5.1.3. Análisis estadístico.....	73
5.2. RESULTADOS.....	73
5.3. DISCUSIÓN.....	79
6. CONCLUSIONES.....	83
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
ANEXOS.....	103

TÍTULO: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Cryptosporidium* spp. DE CERDOS EN ARGENTINA

PALABRAS CLAVES

Cryptosporidium spp., lechones, ooquistes, microscopía, nested-PCR, secuenciación.

RESUMEN

Cryptosporidium spp., protozoos parásitos de distribución mundial, afectan a una amplia variedad de hospedadores vertebrados incluido el hombre, ocasionando importantes brotes transmitidos generalmente por el agua y causando desde infecciones asintomáticas hasta severos cuadros intestinales. La cryptosporidiosis en cerdos es causada por diferentes especies o genotipos de *Cryptosporidium*, sin embargo, *C. suis* y *C. scrofarum* son consideradas como las especies específicas de los porcinos. *Cryptosporidium suis*, ha sido identificada en todas las edades/categorías, siendo más frecuente en lechones lactantes, mientras que *C. scrofarum* aparenta ser específico de los lechones destetados, mayores a 4 semanas de vida. Ambas especies han sido reportadas también en infecciones en humanos. Actualmente la información acerca de la infección por *Cryptosporidium* spp. en cerdos en Sudamérica es muy escasa.

En este trabajo el muestreo se llevó a cabo en 13 granjas porcinas de manejo intensivo, distribuidas en la zona de cría más relevante del país. Un total de 520 muestras individuales (n= 40 por granja) fueron obtenidas de lechones de 1^{er}, 2^{da}, 3^{er} y 4^{ta} semana de edad (n= 130 de cada semana). El diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. se realizó mediante microscopía óptica y por técnicas moleculares. La genotipificación de las muestras con estructuras compatibles con ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se realizó siguiendo protocolos de *nested*-PCR género-específica y especie-específica que tienen como *target* fragmentos del gen 18S ARNr y por secuenciación. Se encontraron *Cryptosporidium* spp. en 47/520 (9%) muestras de materia fecal por microscopía óptica, y fueron detectadas en 11/13 (85%) granjas, con una prevalencia entre 0 y 17,5%. La identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se asoció con la presencia de diarrea (p=0,0116 /OR=2,62; IC= 1,22-2,62) y con la partición de tipo reja (p= 0,0018 /OR= 3,23; IC= 1,50-3,23) en los corrales del sector maternidad. El resto de las variables analizadas no presentaron asociación con el resultado positivo a la microscopía (p>0,05). En el sector de recría ninguna variable presentó asociación al diagnóstico positivo. La proporción de muestras positivas al microscopio no estuvo asociada con la edad en semanas de los lechones. Un total de 15/47 (32% de las muestras con estructuras compatibles con ooquistes) resultaron positivas por la *nested*-PCR género y especie-específica. La PCR especie-específica, así como la secuenciación mostraron la presencia de *C. suis*, *C. scrofarum* y ambas especies en 3, 8 y 4 muestras de

materia fecal, respectivamente. La proporción de muestras positivas para cada PCR específica fue similar entre las edades de los lechones, siendo la proporción de *C. suis* ligeramente más alta en lechones de cuarta semana. La prevalencia obtenida por medio de la coloración y microscopía fue baja a moderada y ampliamente distribuida en la zona principal de cría de cerdos en Argentina. El uso de herramientas moleculares permitió confirmar la presencia de *C. suis* y *C. scrofarum* en cerdos de Argentina, ambas con potencial zoonótico, por lo que deberían considerarse la eliminación apropiada de los residuos fecales para evitar la contaminación ambiental.

TITLE: MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Cryptosporidium* spp. ISOLATES FROM PIGS IN ARGENTINA

KEYWORDS

Cryptosporidium spp., piglets, oocysts, microscopy, nested-PCR, sequencing.

ABSTRACT

Cryptosporidium spp. are protozoan parasites with a worldwide distribution infecting a wide variety of vertebrate hosts including humans, producing

important water-borne outbreaks and causing from asymptomatic infections to severe intestinal symptoms. Cryptosporidiosis in pigs is caused by different *Cryptosporidium* species or genotypes, however *C. suis* and *C. scrofarum* are considered as the porcine specific species. *Cryptosporidium suis* infects all age categories, being detected more frequently in pigs younger than 5 weeks-old, whereas *C. scrofarum* appears to be specific for post weaning piglets, older than 4 weeks of age. Currently, there is scarce information on *Cryptosporidium* spp. infection in pigs in South America.

In this work, the sampling was carried out in 13 intensively managed pig farms, distributed in the most relevant breeding area of the country. A total of 520 individual fecal samples were obtained from piglets of 1st, 2nd, 3th and 4th week of age. *Cryptosporidium* spp. diagnosis was conducted by microscopy and molecular techniques. Genotyping from samples with *Cryptosporidium*-like oocysts at microscopy was performed by genus-specific and species-specific nested-PCR protocols targeting 18S rRNA gene fragments and sequencing. *Cryptosporidium* spp. were found in 47/520 (9%) fecal samples by microscopy and it was detected in 11/13 (85%) farms, with a farm prevalence between 0 and 17.5%. The presence of *Cryptosporidium* oocyst was associated with diarrhea ($p=0,0116$ /OR=2,62; IC= 1,22-2,62) and grill partition ($p= 0,0018$ /OR= 3,23; IC= 1,50-3,23) in the nursery. The rest of the variables analyzed did not show an association with the positive microscopy result ($p>0,05$). In the sector of recently weaned piglets, no variable was associated with a positive diagnosis.

The proportion of microscopy positive samples was not associated with the piglets' ages. A total of 15/47 (32% of samples with oocysts compatible structures) resulted positive by genus and species-specific nested PCRs. Species-specific PCR and sequencing showed the presence of *C. suis*, *C. scrofarum* and both species in 3, 8 and 4 samples, respectively. The proportion of positive samples on each specific PCR was similar among piglets' ages, being *C. suis* proportion slightly higher in fourth-week piglets. The prevalence obtained by staining and microscopy was low to moderate and was widely distributed in the main pig husbandry area from Argentina. The use of molecular tools allowed the confirmation of *C. suis* and *C. scrofarum* infection in Argentinean pigs, both with zoonotic potential, for which the appropriate disposal of fecal waste should be considered to avoid environmental contamination.

1. INTRODUCCIÓN

Las *Cryptosporidium* spp. son protozoarios de distribución mundial que pertenecen al *phylum* Apicomplexa y parasitan a una gran variedad de hospedadores vertebrados como anfibios, aves, peces, reptiles y mamíferos, incluido el hombre (Fayer, 2010).

1.1. HISTORIA

Ernest Edward Tyzzer fue el primero en describir este género (*Cryptosporidium*= esporocistos “ocultos”). Reconoce la especie *Cryptosporidium muris* en glándulas gástricas de un ratón de laboratorio (Tyzzer, 1907). Más tarde, realiza una descripción más completa del ciclo biológico (Tyzzer, 1910); y posteriormente, refiere una segunda especie, también a partir de un ratón de laboratorio, con localización en intestino delgado al que denominó *Cryptosporidium parvum* por ser de menor tamaño que el anterior (Tyzzer, 1912). Seguido a estos primeros descubrimientos, transcurrió un período de tiempo de aproximadamente 50 años en el cual estos protozoos fueron confundidos frecuentemente con otros, especialmente con los del género *Sarcocystis* debido a que sus esporocistos contienen 4 esporozoitos, al igual que los ooquistes del género *Cryptosporidium*. Luego del reconocimiento de las verdaderas diferencias entre los géneros *Cryptosporidium* y *Sarcocystis*, se aplicó el concepto erróneo de especificidad estricta de hospedador (Pellérdy, 1965). Esto llevó al nombramiento de especies como *C. agni* en ovejas, *C.*

anserinum en gansos, *C. bovis* en terneros, *C. cuniculus* en conejos, *C. garnhami* en humanos y *C. rhesi* en monos (Barker y Carbonell, 1974; Bird, 1981; Inman y Takeuchi, 1979; Levine, 1980; Proctor y Kemp, 1974). Estudios posteriores de transmisión cruzada demostraron que aislamientos del género *Cryptosporidium* a partir de diferentes animales podían transmitirse con frecuencia de una especie huésped a otra, motivo por el cual comenzó a nombrarse *C. parvum* a la mayoría de estas nuevas especies en lugar de basarse en el origen de la especie animal. Sin embargo, varias especies del género, como *C. meleagridis* en pavos, *C. wrairi* en cerdos de Guinea y *C. felis* en gatos, se mantuvieron a causa de las diferencias biológicas encontradas entre éstas y las previamente reconocidas como *C. parvum* y *C. muris*. Posteriormente, se nombraron otras especies como *C. baileyi* en aves y *C. saurophilum* en lagartos, todos basados en diferencias biológicas con respecto a las especies antes mencionadas. Más recientemente, la caracterización molecular ha ayudado a aclarar cuestiones de taxonomía y a validar la existencia de una diversidad de especies en cada clase de vertebrados. Como resultado, muchas especies nuevas de *Cryptosporidium* se fueron nombrando. Por lo tanto, *C. andersoni* del ganado bovino, *C. canis* de los perros, *C. hominis* de los humanos y *C. molnari* de los peces fueron establecidos mediante el uso de múltiples parámetros que incluían no solo la morfología sino también el desarrollo biológico, la especificidad por el hospedador, la histopatología, y/o la biología molecular (Xiao y col., 2004).

1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La clasificación taxonómica clásica propuesta por Current y Garcia (1991) se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de Cryptosporidium spp.

Clasificación	Nombre	Características biológicas
Phylum	Apicomplexa	Las formas invasivas tienen un complejo apical con anillos polares, roptrias, micronemas y microtúbulos subpeliculares
Clase	Sporozoasida	Locomoción de las formas invasivas por deslizamiento, por flexión u ondulación
Subclase	Coccidiasina	El complejo apical presenta conoide. Ciclo biológico con merogonia, gametogonia y esporogonia
Orden	Eucoccidiorida	Producción de ooquistes. Hospedadores vertebrados
Suborden	Eimeriorina	Desarrollo de macro y microgametas, haploides.

Familia	Cryptosporidiidae	Ciclo de vida homoxeno (un solo hospedador) con desarrollo dentro de la célula hospedadora. Ooquistes sin esporocistos y con 4 esporozoitos. Microgametas sin flagelos.
----------------	-------------------	---

La clasificación taxonómica y el nombramiento de las especies de *Cryptosporidium*, está experimentando un cambio rápido a medida que se publica información nueva basada principalmente en datos moleculares (Fayer, 2004). Durante mucho tiempo se relacionó al género *Cryptosporidium* con los coccidios, parásitos importantes en medicina humana y veterinaria, debido a fuertes similitudes morfológicas a lo largo del ciclo de vida y la presencia de genes específicos de mitocondrias (Riordan et al., 1999). Sin embargo, no se ha demostrado que *C. parvum* posea una organela similar a la mitocondria (Tetley et al., 1998) como presentan los coccidios clásicos. Los estudios moleculares sugieren que el género *Cryptosporidium* puede estar más estrechamente relacionado con los gregarínidos (Carreno et al., 1999), y el hallazgo de etapas del ciclo biológico similares a estos, respalda esta sugerencia (Hijjawi et al., 2002). Con el uso de las herramientas moleculares, el número de especies ha aumentado exponencialmente, la mayoría descrita en base a las diferencias

genéticas y ocurrencia en el hospedador. En la mayoría de los casos los caracteres morfológicos para describir especies de *Cryptosporidium* son mínimos (Slapeta, 2013). La revisión más reciente enumeró 30 especies, pero además de las especies reconocidas como resultado de estudios en humanos y animales domésticos, hay evidencia creciente de numerosos genotipos identificados en la vida silvestre y en muestras del ambiente (Appelbee et al., 2005; Oates et al., 2012; Slapeta, 2013). El resumen actualizado de las especies de *Cryptosporidium* se puede observar en la tabla 2.

Tabla 2. Especies de *Cryptosporidium* (Modificado de Slapeta, 2013).

Número correlativo de especie	Nombre de la especie	Hospedadores	Potencial zoonótico
I	<i>C. muris</i> (Tyzzer, 1907)	Mamíferos/aves	Si
II	<i>C. parvum</i> (Tyzzer, 1912)	Mamíferos	Si
III	<i>C. meleagridis</i> (Slavin, 1955) syn. <i>C. tyzzeri</i> (Levine, 1961)	Mamíferos/aves	Si

IV	<i>C. wrairi</i> (Vetterling et al, 1971)	Mamíferos	No
V	<i>C. agni</i> (Barker y Carbonell, 1974)	Mamíferos	No
VI	<i>C. bovis</i> (Barker y Carbonell, 1974)	Mamíferos	No
VII	<i>C. cuniculus</i> (Inman y Takeuchi, 1979)	Mamíferos	Si
VIII	<i>C. felis</i> (Iseki, 1979)	Mamíferos	Si
IX	<i>C. serpentis</i> (Levine, 1980)	Reptiles/mamíferos	No
X	<i>C. nazoris</i> (Hoover et al, 1981)	Peces	No
XI	<i>C. baileyi</i> (Current et al, 1986)	Aves	No
XII	<i>C. varanii</i> (Pavlašek et al, 1995) <i>syn. C. saurophilum</i> (Koudela y Modrý, 1998)	Reptiles	No
XIII	<i>C. cichlidis</i> (Paperna y Vilenkin, 1996)	Peces	No

XIV	<i>C. reichenbachklinkei</i> (Paperna y Vilenkin, 1996)	Peces	No
XV	<i>C. galli</i> (Pavlasek, 1999)	Aves	No
XVI	<i>C. andersoni</i> (Lindsay et, 2000)	Mamíferos	Si
XVII	<i>C. canis</i> (Fayer et al, 2001)	Mamíferos	Si
XVIII	<i>C. hominis</i> (Morgan et al, 2002)	Mamíferos	Si
XIX	<i>C. molnari</i> (Alvarez- Pellitero y Sitja- Bobadilla, 2002)	Peces	No
XX	<i>C. suis</i> (Ryan et al, 2004)	Mamíferos	Si
XXI	<i>C. scophthalmi</i> (Alvarez-Pellitero et al, 2004)	Peces	No
XXII	<i>C. pestis</i> (Šlapeta, 2006)	Mamíferos	Si

XXIII	<i>C. fayeri</i> (Ryan et al, 2008)	Mamíferos	Si
XXIV	<i>C. ryanae</i> (Fayer et al, 2008)	Mamíferos	No
XXV	<i>C. fragile</i> (Jirkú et al, 2008)	Anfibios	No
XXVI	<i>C. macropodum</i> (Power y Ryan, 2008)	Mamíferos	No
XXVII	<i>C. ducismarci</i> (Traversa, 2010)	Reptiles	No
XXVIII	<i>C. ubiquitousum</i> (Fayer et al, 2010)	Mamíferos	Si
XXIX	<i>C. viatorum</i> (Elwin et al, 2012)	Mamíferos	Si
XXX	<i>C. scrofarum</i> (Kvác et al, 2013)	Mamíferos	Si

Número correlativo de especie: el orden se corresponde con las descripciones originales.

1.3. MORFOLOGÍA

El género *Cryptosporidium* comprende organismos que se desarrollan y multiplican en las células epiteliales de los aparatos digestivo y respiratorio de vertebrados (Fayer y Ungar, 1986).

Zoitos: Una vez que el esporozoito ingresa a la célula, recibe el nombre de zoito. Son formas intracelulares, esféricas y miden de 2 a 2,5 μm de diámetro. Éstos, al igual que los demás estadios intracelulares, se encuentran dentro de una vacuola parasitófora rodeada de una membrana originada por la célula hospedadora. La vacuola parasitófora presenta una localización intracelular, pero extracitoplasmática. En la interfase entre la célula hospedadora y el parásito se puede observar una zona electrodensa que corresponde a una “organela de alimentación” o “zona de fijación” (figura 1).

Ooquiste: Entre los coccidios, el género *Cryptosporidium* presenta los ooquistes más pequeños. Son de forma esférica a ovoide y miden de 4,5 x 5 μm (*C. parvum*) a 5,6 x 7,4 μm (*C. muris*). Cada ooquiste esporulado contiene 4 esporozoitos libres (sin esporocistos) y un cuerpo residual compuesto por numerosos gránulos pequeños, pueden presentar paredes gruesas o delgadas. El ooquiste de pared gruesa, es aquel que se elimina con las heces, presenta una pared lisa e incolora con un espesor de 50 nm. aproximadamente. El ooquiste de pared delgada, presenta una pared fina la cual se rompe fácilmente permitiendo la liberación de los esporozoitos responsables de la autoinfección.

Esporozoitos: Generalmente tienen forma de media luna con el extremo anterior ligeramente puntiagudo, en el cual se encuentra el complejo apical, y el extremo posterior redondeado. Cada esporozoito contiene un núcleo prominente en el tercio posterior del soma celular.

Meronte: Estado multinucleado que se origina a partir de la multiplicación del núcleo en el zoito. Miden de 4 a 5 μm de diámetro. Se reconocen dos tipos de merontes, el de tipo I, aparece primero en el ciclo biológico y contiene 8 merozoitos; y el de tipo II, con 4 merozoitos (figura 2).

Merozoitos: Con forma de media luna, presentan un núcleo vesicular, retículo endoplasmático y numerosos gránulos. Al igual que otros coccidios presentan en el extremo anterior un “complejo apical” formado por conoide, anillo polar, róptrias y micronemas. Este complejo permite la adhesión y penetración a la célula hospedadora, con la formación de un ambiente intracelular adecuado para el desarrollo del parásito. Los merozoitos de *Cryptosporidium* spp. no poseen mitocondrias ni microporos. Los merozoitos pueden evolucionar a micro o macrogamontes.

Microgametas: A partir del microgamonte, un estado de vida corta, se originan 14 a 16 microgametas. Miden 0,95 x 0,4 μm . Presentan forma ahusada, con el extremo apical romo, contienen núcleo y mitocondria desarrollada. No tienen flagelo como en el caso de otros coccidios.

Macrogametas: Los estadíos tempranos no se pueden distinguir de los zoitos. Los estadíos tardíos se caracterizan por la presencia de dos tipos de gránulos, los

gránulos densos “formadores de pared” en la periferia y los gránulos de polisacáridos (amilopectina) en la parte basal.

*Figura 1. Zoito de **Cryptosporidium spp.** en un cultivo celular. Micrografía electrónica de transmisión (15700 X) (Modificado de Fayer, 1986)*

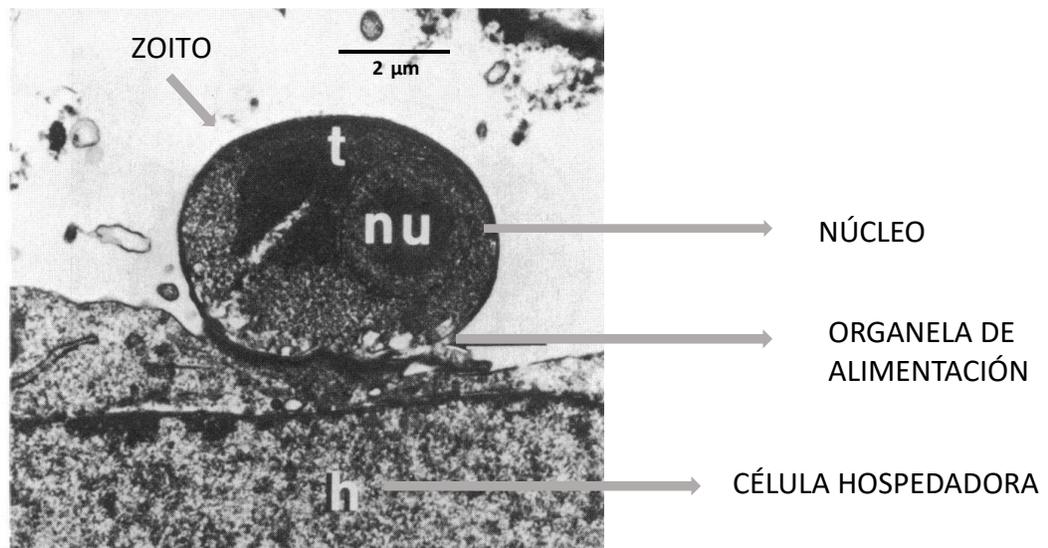
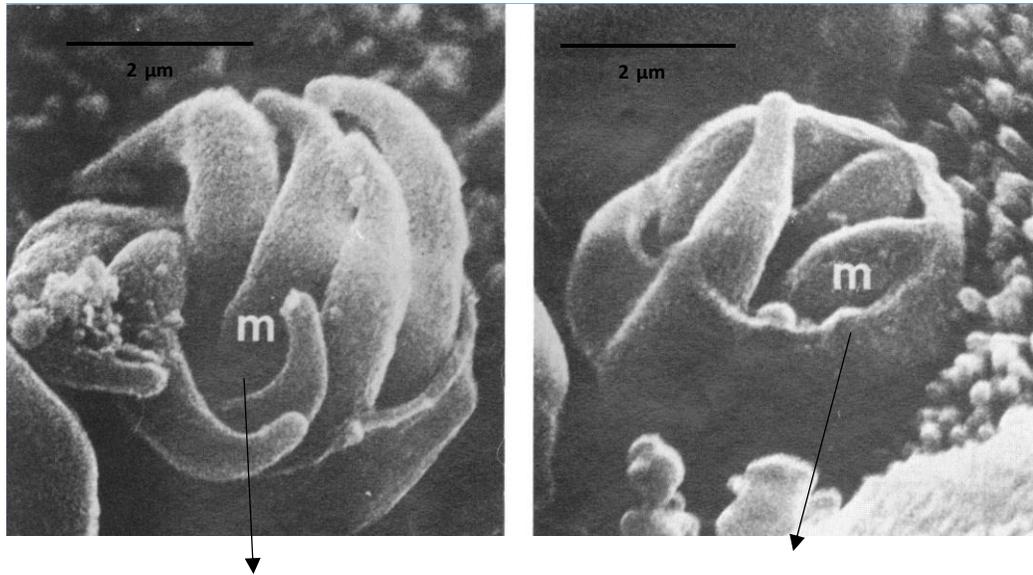


Figura 2. Meronte tipo I y tipo II. Micrografía electrónica de barrido (12000 X)

(Modificado de Fayer, 1986)



MERONTE TIPO I (7
merozoitos visibles)

MERONTE TIPO II (Los
4 merozoitos visibles)

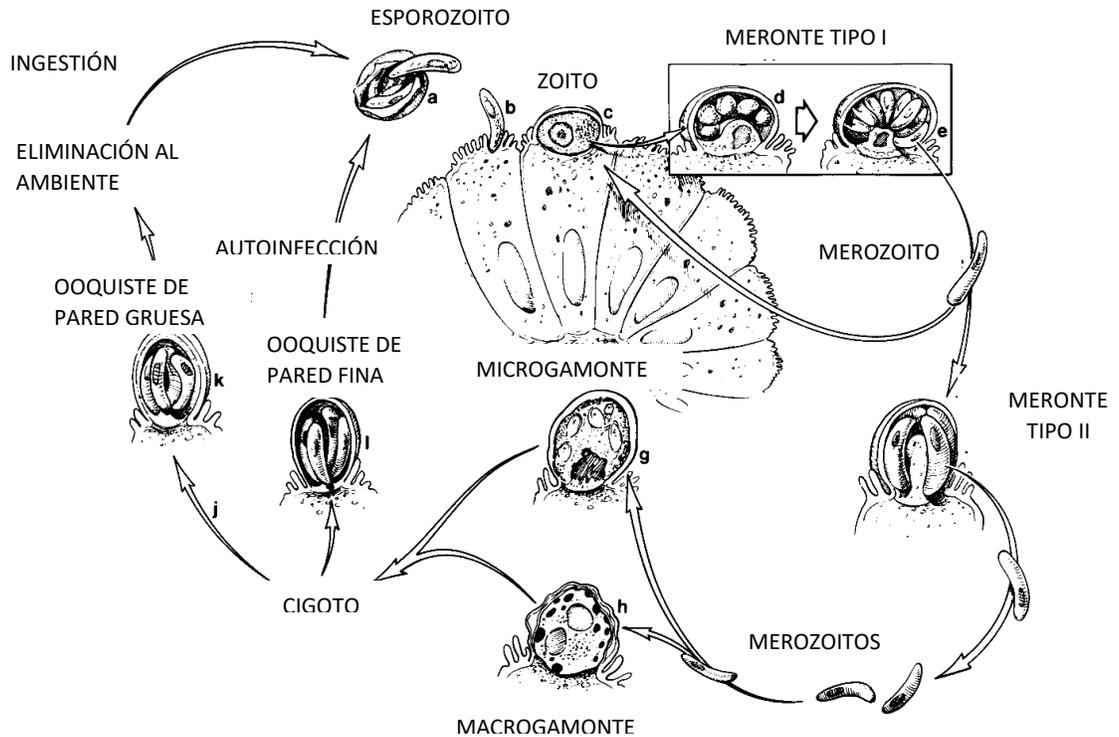
1.4. CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. es directo o monoxeno, es decir que todas sus fases ocurren en el mismo hospedador. Cuando los ooquistes son ingeridos por un hospedador adecuado se abren a lo largo de una línea de sutura preexistente, liberando los cuatro esporozoitos que invaden el borde de las microvellosidades de las glándulas gástricas de mamíferos y aves (*C. muris*; Tyzzer, 1907, 1910) o la segunda mitad del intestino delgado de mamíferos (*C. parvum*; Tyzzer, 1912). En aves y mamíferos, *C. meleagridis* (Slavin, 1955), se encuentra asociado a infecciones intestinales, mientras que una especie más virulenta, *C. baileyi* (Current et al., 1986), se ha asociado a infecciones del tracto respiratorio en aves.

En la fase de desenquistamiento los factores que más influyen son la temperatura corporal (en torno a los 37° C), las sales biliares y posiblemente la tripsina. Una vez liberados, los esporozoitos alcanzan el borde luminal de los enterocitos mediante movimientos de contracción-extensión y deslizamiento. Allí se invaginan siendo englobados por la membrana de la célula hospedadora que encapsula al zoito formando una vacuola parasitófora. Durante la fase de división asexual o “merogonia” se forman los merozoitos. El meronte de tipo I, es el primero en aparecer y origina 8 merozoitos, puede generar nuevas merogonias de primera generación o formar merontes tipo II, en los cuales se originan 4 merozoitos. La mayoría de los merozoitos tipo II que ingresan en la

célula hospedadora van a formar macrogametos mientras que solo unos pocos forman microgamontes, que contienen 16 microgametos en su interior. A esta fase se la denomina “gametogonia” o división sexual. Los microgametos carentes de flagelo, se dirigen hacia los macrogametos siguiendo el flujo intestinal o mediante la contracción y extensión de los microtúbulos intracitoplasmáticos con el fin de realizar la fecundación, dando como resultado una célula huevo o cigoto, que al rodearse de pared recibe el nombre de ooquiste. La última fase del ciclo, llamada “esporogonia” tiene como consecuencia la formación de 4 esporozoitos, con la particularidad de estar libres dentro del ooquiste, el cual pasa a ser un ooquiste esporulado o maduro. Esta etapa de esporulación ocurre en el interior de la célula hospedadora. La mayoría de los ooquistes son eliminados con las heces, presentan una pared gruesa por lo tanto representan las formas de resistencia en el ambiente y son los responsables de la transmisión entre los hospedadores. Una pequeña proporción (el 20% aproximadamente) de los ooquistes se rodean de pared fina y son los responsables de la autoinfección (Ortega Mora et al., 1999). La pared se rompe fácilmente tras la liberación de la célula hospedadora y los esporozoitos penetran en las células epiteliales adyacentes dando inicio al ciclo endógeno. El período de prepatencia, es decir el tiempo que transcurre desde que el ooquiste es ingerido hasta que nuevos ooquistes se eliminan con la materia fecal es de 3 a 7 días aproximadamente. Las etapas del ciclo de vida están esquematizadas en la figura 3 (Current y García, 1991).

Figura 3. Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. (Modificado de Current y García, 1991)



1.5. SALUD PÚBLICA

El primer caso de cryptosporidiosis en humanos fue reportado en 1976 en Estados Unidos, en un niño de 3 años de edad, con enterocolitis aguda autolimitante, el cual fue diagnosticado por biopsia rectal (Nime et al., 1976). Durante la década del 80, infecciones crónicas con altas tasas de mortalidad identificadas en pacientes con HIV/SIDA, llevaron a la inclusión de la cryptosporidiosis como una enfermedad “marcadora” de este síndrome (O’Donoghue, 1995). La importancia de la cryptosporidiosis en la salud pública

se hizo evidente cuando *Cryptosporidium* sp. fue reconocido como una causa común de diarrea aguda en individuos inmunocompetentes (Tzipori et al., 1983). Los principales signos de la cryptosporidiosis en los seres humanos, son diarrea acuosa que puede ser profusa y prolongada, dolor abdominal y a veces náuseas y vómitos. Ocasionalmente pueden ocurrir signos inespecíficos como mialgia, debilidad, malestar general, dolor de cabeza y anorexia (Current y García, 1991). La gravedad, persistencia y el resultado final de la infección dependen de una variedad de características propias del parásito y de factores del hospedador, como el estado inmune y la frecuencia de exposición al parásito (Meinhardt et al., 1996). Una infección con *Cryptosporidium* spp. puede variar desde una eliminación asintomática de ooquistes hasta una severa enfermedad que puede ocasionar la muerte. Los individuos inmunocompetentes pueden presentar una enfermedad autolimitante con una duración de hasta 2 o 3 semanas, sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos, la cryptosporidiosis puede representar una enfermedad crítica con síntomas persistentes que conducen a la deshidratación y emaciación (O'Donoghue, 1995) y se asocia con tasas significativas de mortalidad (Manabe et al., 1998). En estos pacientes además se puede observar manifestaciones atípicas tales como enfermedad gastrointestinal atípica, enfermedad del tracto biliar/respiratorio y pancreatitis (Hunter y Nichols, 2002).

La prevalencia estimada de *Cryptosporidium* en personas con diarrea es de 1 a 3% en países desarrollados y alrededor del 10% en países en vías de desarrollo (Del Coco y Córdoba, 2016).

La vía directa fecal/oral es probablemente la forma de transmisión más común para *Cryptosporidium* spp., ya sea por transmisión zoonótica o directamente entre personas (FAO, 2014). Los brotes asociados a la transmisión por fuentes de agua han sido un problema importante en la epidemiología de la cryptosporidiosis en todo el mundo y representan una alta carga financiera para los servicios públicos de agua en los países desarrollados. Se ha demostrado que el problema se ve exacerbado a causa de los biofilms, que actúan como reservorios de *Cryptosporidium* spp., en los cuales los ooquistes pueden quedar atrapados y posteriormente ser liberados en el suministro de agua (Thompson et al., 2016). En las últimas décadas, se informaron a nivel mundial, más de 45 brotes de cryptosporidiosis asociados al agua (Cacciò y Pozio, 2006). El brote de cryptosporidiosis ocurrido en el año 1993 en Milwaukee, Estados Unidos, ha sido reconocido como uno de los más importantes en relación al consumo de agua contaminada afectando a más de 400.000 personas (Mac Kenzie et al., 1994). En Argentina, la presencia del parásito en aguas subterráneas de abastecimiento poblacional y en aguas de superficie fue constatada en la provincia de Santa Fe, por Abramovich y col. (1996, 2001). La transmisión indirecta, donde la infección es el resultado de la vehiculización de ooquistes en forma mecánica por moscas u otros animales como perros o ganado, o por la

contaminación de alimentos, plantea una amenaza significativa (Thompson y Smith, 2011). Se considera que el riesgo de infección es mayor en los ambientes rurales que en las áreas urbanas, presumiblemente a causa de un incremento en la oportunidad de transmisión tanto directa como indirecta, asociado a deficiencias en el saneamiento y a un mayor contacto con animales silvestres y domésticos que actúan como reservorio de la infección. La mala higiene es un factor crucial para favorecer la transmisión de protozoos entéricos como *Cryptosporidium* spp. La transmisión por alimentos, como resultado de las prácticas agrícolas y la higiene deficiente por parte de los manipuladores de alimentos o dentro de los hogares, son responsables de un número significativo de infecciones por *Cryptosporidium* sp. (FAO, 2014; Thompson y Smith, 2011). Sin embargo, vincular la infección a una fuente de alimentos contaminados a menudo es difícil de determinar. Los datos preliminares obtenidos a partir de una revisión de la literatura, informes publicados y notificaciones de ocurrencia de *Cryptosporidium* spp., sugieren que el número de casos transmitidos por alimentos es de hasta 6 millones al año en la región del Mediterráneo Oriental y hasta 27 millones en África (Thompson y Smith, 2011).

Aunque se han identificado varias especies en humanos, *Cryptosporidium hominis* y *C. parvum* representan más del 90% de los casos de cryptosporidiosis (Cacciò, 2005). El cuadro clínico causado por *C. hominis* en individuos HIV/SIDA, así como en niños, se asoció con diarrea, náuseas, vómitos y malestar general, mientras que *C. parvum*, y otras especies como *C. meleagridis*, *C. canis* y *C. felis*

fueron asociadas únicamente con diarrea (Cama et al., 2007, 2008). Además, la infección por *C. hominis* se asoció con secuelas no intestinales como dolor articular, ocular, dolor de cabeza recurrente y fatiga (Hunter et al., 2004). En el año 2002, *C. suis* fue identificado en Perú, en un paciente de 24 años con HIV/SIDA (Xiao et al., 2002). Más tarde, se diagnosticó en pacientes con HIV/SIDA en Perú, en el 2007 (Cama et al., 2007) y en China en el 2013 (Wang et al., 2013). *Cryptosporidium suis* ha sido identificado también en pacientes con enfermedad del tracto digestivo en el Reino Unido y Madagascar (Leoni et al., 2006; Bodager et al., 2014) *Cryptosporidium scrofarum* se diagnosticó en un paciente humano inmunocompetente de 29 años de edad con cuadro de diarrea (Kváč et al., 2009).

1.6. DIAGNÓSTICO

Los principales métodos de diagnóstico se basan en la detección de estadíos parasitarios, principalmente ooquistes en muestras de tejidos o materia fecal. Antes de 1980 el diagnóstico de la cryptosporidiosis humana se basaba en la identificación de estructuras correspondientes a las distintas etapas del ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. en cortes histológicos de la mucosa del intestino delgado y ocasionalmente del recto. Con la tinción estándar de hematoxilina-eosina, *Cryptosporidium* spp. toman la coloración basófila. Las

tinciones especiales para tejidos no resultaron ser más eficientes (Fayer y Ungar, 1986). El uso del microscopio electrónico permitió la observación de detalles celulares y fue utilizado frecuentemente para la confirmación (Dobbins et al., 1985). El diagnóstico “no invasivo” fue reportado por primera vez en 1978 en terneros (Pohlenz et al., 1978) y en 1980 en humanos (Tzipori et al., 1980) a partir de la detección de ooquistes en extendidos fecales teñidos con Giemsa. Posteriormente, numerosas técnicas de concentración para materia fecal y tinción de ooquistes fueron aplicadas para la detección de *Cryptosporidium* spp., pero con un pobre consenso para determinar el método más satisfactorio (Fayer y Ungar, 1986). La concentración de la muestra de heces adquiere mayor importancia en infecciones con bajo número de ooquistes o en estudios epidemiológicos (Holten-Anderson et al., 1984). Las técnicas de concentración para materia fecal incluyen las de flotación con solución azucarada de Sheather, sulfato de zinc al 33% o cloruro de sodio al 36% y las técnicas de sedimentación como Ritchie modificado con solución de formol-sal (Fayer y Ungar, 1986). La solución de Sheather permite el reconocimiento de los ooquistes, pero éstos pierden su forma esférica característica luego de 15 minutos (McNabb et al., 1985). Se han aplicado una amplia variedad de técnicas de tinción para detectar ooquistes de *Cryptosporidium* spp., de las cuales las más utilizadas han sido las técnicas modificadas ácido-resistentes, como Ziehl-Neelsen modificado, que diferencian los ooquistes teñidos de color rojo (Henricksen y Pohlenz, 1981) y las tinciones con dimetil sulfóxido-carbol fucsina (Bronsdon, 1984). Las

coloraciones fluorescentes como naranja de acridina o auramina-rodamina también han sido utilizadas para detectar *Cryptosporidium* spp., sin embargo, éstas no permiten visualizar los detalles de los ooquistes (Casemore et al., 1984). Los ensayos de inmunofluorescencia directa se utilizan en determinados laboratorios, pero no para el diagnóstico clínico a gran escala (Sterling y Arrowood, 1986). Las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y ELISA han sido utilizadas para la detección de anticuerpos humorales contra *Cryptosporidium* spp. (Casemore et al., 1985; Ungar et al., 1986). En estudios serológicos se puede detectar IgG anti-*Cryptosporidium* específica en más del 50% de las personas en las que se desconoce la infección, lo que sugiere que es común el contacto con el parásito en algún momento de la vida (Koch et al., 1984). Los hallazgos son similares en muchas otras especies animales (Tzipori y Campbell, 1981). En el laboratorio clínico, ya sea que se trate de muestras de humanos, animales domésticos o silvestres, sigue habiendo una necesidad de contar con herramientas de diagnóstico rápidas, sensibles y específicas que puedan guiar a la terapia adecuada (Fletcher et al., 2012). Se destaca, entre las pruebas rápidas, la inmunocromatografía, para la detección de antígenos fecales a partir de muestras concentradas o no concentradas (Atías, 1998). Los métodos actuales de laboratorio que se basan en el examen microscópico de muestras fecales para detectar ooquistes de *Cryptosporidium* spp. han mostrado la dificultad de distinguir el parásito de otros componentes fecales de tamaño y forma similares como levaduras y algas, así como la variabilidad de

resultados entre los laboratorios (Thompson et al., 2016). La microscopía no puede diferenciar los ooquistes de las distintas especies/genotipos de *Cryptosporidium* ya que son morfológicamente indistinguibles en términos de tamaño (Smith et al., 2007). Por lo tanto, los procedimientos moleculares basados en PCR, han dominado la investigación sobre el diagnóstico y la detección de *Cryptosporidium* spp. durante los últimos 25 años, ya que proporcionan información sobre el genotipo o la especie de *Cryptosporidium* presente en una muestra clínica o ambiental (Smith et al., 2006; Thompson y Ash, 2015). El diagnóstico molecular por técnicas de PCR ha demostrado tener particular importancia en las investigaciones epidemiológicas al proporcionar información sobre la fuente de infección y el significado para la salud pública de los aislamientos identificados (Cacciò et al., 2005), aumentando la comprensión de las posibles rutas de transmisión entre el ambiente y los animales tanto de compañía como el ganado (Fayer et al., 2000). También ha permitido la identificación de “nuevos” genotipos y la posterior descripción de nuevas especies y sus respectivos hospedadores (Slapeta, 2013; Xiao y Fayer, 2008). Otros genes como el de la proteína del shock térmico de 70 kDA (HSP70) o el de la proteína de la pared del ooquiste de *Cryptosporidium* (COWP) son utilizados como genes adicionales para la genotipificación. La glicoproteína de 60 kDA se utiliza comúnmente para obtener un mayor grado de discriminación filogenética de especies y genotipos para relacionar con las posibles rutas de transmisión (Lymbery y Thompson, 2011).

1.7. CONTROL Y PREVENCIÓN DE LA CRYPTOSPORIDIOSIS

El ooquiste de *Cryptosporidium* puede permanecer infectante en condiciones frescas y húmedas durante muchos meses. Estudios de laboratorio intentaron evaluar los efectos del calor, el frío, la radiación ultravioleta y la desecación en la supervivencia de los ooquistes (Fayer, 2004). Por ejemplo, ooquistes de *Cryptosporidium parvum* suspendidos en agua desionizada a 0°C, 5°C, 10°C, 15°C y 20°C permanecieron infectantes para ratones luego de 6 meses. Los mantenidos a 25°C y 30°C resultaron infectantes luego de 3 meses y aquellos mantenidos a 35°C permanecieron infectantes solo por 1 semana (Fayer et al., 1998). Los ooquistes también sobreviven en agua de mar por largos períodos de tiempo. Pueden permanecer viables por más de 35 días a 4°C en agua marina a la oscuridad (Robertson et al., 1992). Los ooquistes entran en contacto con muchos tipos de suelo. Un estudio demostró que la proporción de ooquistes de *C. parvum* potencialmente infectantes expuestos al suelo y a materia fecal de bovino en tres granjas, disminuía más rápidamente que los controles expuestos a buffer o agua mantenidas a las mismas temperaturas (Jenkins et al., 1999).

Después de muchos años de investigación sobre estrategias y drogas para el tratamiento y control de la cryptosporidiosis, no hay productos aprobados que sean consistentemente efectivos tanto para animales como humanos. Algunos reducen la multiplicación del parásito, otros han mostrado cierta eficacia solo en modelos animales y otros no resultaron eficaces. A pesar de conocer la importancia de la inmunidad celular y los intentos para identificar antígenos que

estimulen una respuesta inmune protectora, ninguna inmunoterapia o vacuna ha sido aprobada para el tratamiento y control de la cryptosporidiosis humana o animal (Fayer, 2004).

Se ha probado la eficacia de muchos desinfectantes químicos contra los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Los más efectivos y tóxicos han sido los compuestos de bajo peso molecular que incluyen amoníaco, óxido de etileno, bromuro de metilo y ozono (Fayer et al., 1997). El cloro, efectivo contra muchos microorganismos, afecta lentamente a *Cryptosporidium* spp., incluso a altas concentraciones, en instalaciones y piscinas tienen poco o ningún impacto en la viabilidad de los ooquistes (Carpenter et al., 1999). Del mismo modo, se descubrió que la floculación con alumbre tal como la utiliza la industria del agua, no tiene ningún impacto sobre la viabilidad de los ooquistes y las altas concentraciones de cal o sulfato férrico reducen significativamente la viabilidad del ooquiste solo a niveles altos de pH durante un tiempo prolongado (Robertson et al., 1992). Se han realizado muchos estudios sobre estrategias de desinfección y filtración para el agua potable (Rose et al., 1997). El ozono y la luz ultravioleta han demostrado ser eficaces en la desinfección de ooquistes en instalaciones de tratamiento de agua (Clancy et al., 2000; Kanjo et al., 2000; Rose et al., 1997). El tratamiento con productos químicos combinados como el cloro y la monoclорamina o el ozono y la monoclорamina ha demostrado una mayor desinfección que la exposición a un solo producto químico (Fayer, 2004).

1.8. CRYPTOSPORIDIOSIS EN DIFERENTES ANIMALES. SITUACIÓN EN ARGENTINA

La prevalencia y detección de la cryptosporidiosis en animales varía de acuerdo a la especie estudiada. En Argentina, La primera detección de este parásito se realizó en un ternero con diarrea neonatal a partir de un estudio histopatológico (Odeon y Magnasco, 1983). Posteriormente se observó la presencia de ooquistes en muestras de materia fecal y se asoció la presencia de *Cryptosporidium* spp. con el complejo de diarrea neonatal en terneros (Bellinzoni et al., 1990). En la ciudad de La Plata y áreas rurales de influencia se ha evaluado la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en materia fecal de mamíferos del zoológico y bovinos, con una prevalencia de 42,5% en terneros (Pezzani et al., 2001). Venturini et al., en 2006, llevaron a cabo un estudio en animales domésticos y monos de un zoológico de la provincia de Buenos Aires, comprobando la presencia de infecciones por *Cryptosporidium* spp. en perros, ovinos, equinos, cobayos, gatos, bovinos, caprinos y en distintas especies de monos. En Magdalena, provincia de Buenos Aires se reportó una prevalencia en terneros de raza Holando Argentino del 17%, con alta intensidad de infección en los animales de ≤ 7 días de vida, considerando a este grupo etario como una importante fuente de infección para el ambiente (Del Coco et al., 2008). En un estudio similar en terneros de tambo en la provincia de Santa Fe, se obtuvo una tasa de infección del 19,8% y se asoció la eliminación de ooquistes con la presencia de diarrea (Aguirre et al., 2014). En el 2015, se llevó

a cabo un estudio en roedores sinantrópicos de áreas urbanas y periurbanas de la Ciudad de La Plata, detectándose la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en el 25% de las muestras de materia fecal pertenecientes a *Ratus rattus* (Unzaga et al., 2015). La aplicación de técnicas de biología molecular como PCR-RFLP o PCR-secuenciación permitieron la confirmación y caracterización de distintas especies/genotipos de *Cryptosporidium*. En la Ciudad de Buenos Aires y La Plata se realizó la caracterización molecular de *Cryptosporidium* spp. en perros (Unzaga et al., 2011), terneros (De Felice et al., 2012; Tomazic et al., 2013) y geckos leopardo (Dellarupe et al., 2016).

1.9. CRYPTOSPORIDIOSIS EN CERDOS

La cryptosporidiosis porcina fue descrita por primera vez en Estados Unidos. Se diagnosticó en un lechón con enteritis necrótica en Dakota del Sur (Bergeland, 1977), mientras que en Kansas *Cryptosporidium* spp. se observaron en el intestino grueso de tres lechones inoculados por vía oral con contenido de colon de cerdos con disentería (Kennedy et al., 1977). En ambos casos, el diagnóstico se realizó por histopatología. La severidad de la infección presenta relación con la edad de los animales (Tzipori et al., 1982). En un experimento con inóculos de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., los lechones que fueron infectados entre el 1^{er} y 3^{er} día de vida presentaron afecciones severas, como vómitos, diarrea y anorexia, mientras que los animales de una semana de vida

y los infectados a los 15 días de edad no presentaron signos clínicos, o éstos fueron moderados (solo diarrea). En otra inoculación experimental, cerdos libres de patógenos específicos infectados a las 4 semanas de edad, durante el destete, no presentaron diarrea post-destete. (Tzipori, 1981; 1983). Aunque la enfermedad clínica atribuida a la cryptosporidiosis no parece ser común en los cerdos (Tzipori et al., 1982), infecciones experimentales muestran un amplio rango de respuestas que van desde infecciones subclínicas hasta manifestaciones clínicas severas (Moon et al., 1981; Tzipori et al., 1981b; Tzipori et al., 1982). Se han encontrado elementos parasitarios en diferentes etapas del ciclo biológico en íleon, ciego y colon, siendo más numerosos en las células que recubren las criptas de Lieberkühn (Kennedy et al., 1977). Los cambios histopatológicos fueron más marcados en el intestino delgado posterior donde se observó un extenso daño en la mucosa caracterizado por acortamiento y fusión de las vellosidades, desprendimiento de la punta de las mismas con edema e inflamación en la lámina propia adyacente (Moon et al., 1981; Tzipori et al., 1981). En la lámina propia se observaron células mononucleares y neutrófilos. Los leucocitos en las criptas del colon provocan disrupción física de la mucosa durante el proceso de fagocitosis (Kennedy et al., 1977). En estudios experimentales, los epitelios traqueal y conjuntival de cerdos han sido infectados con ooquistes provenientes de aislamientos humanos y bovinos respectivamente (Heine et al., 1984; Tzipori, 1983). Esto corrobora la hipótesis de que *Cryptosporidium* spp. tienen la capacidad de infectar sitios

extraintestinales debido a que los ooquistes pueden exquistarse sin requerir enzimas pancreáticas y sales biliares como otros coccidios (Fayer y Leek, 1984). La cryptosporidiosis en cerdos prevalece a nivel mundial con tasas de infección variables. En América del norte la tasa de infección varía entre 17,8% y 55,7%, en Europa 5,3% y 74,6% y en Asia 59,6% y 71,4% (Farzan et al., 2011; Buduamoako et al., 2012; Petersen et al., 2015; Němejc et al., 2013; Yui et al., 2014). La producción porcina se ha vuelto altamente especializada e industrializada y su volumen de producción se ha incrementado constantemente durante las últimas décadas. Si bien los sistemas de producción porcina varían enormemente en todo el mundo, la tendencia es transformarse en una producción altamente especializada e industrializada mediante el confinamiento y producción intensiva. (Němejc et al., 2013). Diferencias en los sistemas de producción, edad de muestreo, así como el tamaño de la muestra y las técnicas de diagnóstico pueden ser responsables de las diferencias en las tasas de infección de *Cryptosporidium* spp. entre las diferentes áreas geográficas (Zheng et al., 2019).

Con el desarrollo de las herramientas moleculares de diagnóstico, se determinó que los cerdos pueden ser infectados por distintas especies/genotipos de *Cryptosporidium*, como *C. parvum*, *C. muris*, *C. tyzzeri*, *C. andersoni*, *C. hominis* y *C. meleagridis* (Morgan et al., 1999; Ebeid et al., 2003; Xiao et al., 2006; Chen y Huang, 2007). Sin embargo, *C. suis* (previamente conocido como pig genotype I) y *C. scrofarum* (previamente conocido como pig genotype II) son las especies

más frecuentemente detectadas en porcinos y de las cuales el cerdo demostró ser el hospedador específico (Ryan, et al., 2004; Kváč et al., 2013).

Cryptosporidium suis es la especie dominante que infecta a los cerdos menores de 5 semanas de edad en todo el mundo (Ryan et al., 2004). Aunque *C. suis* infecta a todas las categorías su prevalencia es menor en los cerdos adultos en comparación con *C. scrofarum*. La infección con *C. suis* es asintomática y no se asocia con la presencia de diarrea en cerdos (Jeníková et al., 2011), aunque infecciones concomitantes con rotavirus han sido fatales en lechones (Enemark et al., 2003).

Cryptosporidium scrofarum: infecta a cerdos domésticos y jabalíes eurasiáticos (Kváč et al., 2013; García-Preledo et al., 2013). Es una especie cosmopolita usualmente con una baja tasa de infección (< 5%) reportado frecuentemente en animales mayores a las 6 semanas de vida (Kváč et al., 2013). Los cerdos infectados son asintomáticos y la multiplicación del parásito ocurre en el duodeno, yeyuno e ileon (Kváč et al., 2013). No se logró la infección experimental en animales de laboratorio (Kváč et al., 2013).

Las especies frecuentemente detectadas en porcinos han sido evidenciadas en casos clínicos humanos (Xiao et al., 2002; Leoni et al., 2006; Cama et al., 2007; Kváč et al., 2009; Wang et al., 2013; Bodager et al., 2014).

1.10. PRODUCCIÓN PORCINA Y SITUACIÓN EN ARGENTINA

La producción porcina puede desarrollarse a tres escalas diferentes, extensiva, semi-intensiva e intensiva según la relación o peso relativo de los factores de producción. A nivel mundial y también en nuestro país, la producción porcina ha ido migrando hacia los sistemas de manejo intensivo donde los animales se encuentran en confinamiento absoluto y el ambiente donde se alojan está controlado por el hombre. Estos sistemas requieren de una importante inversión en instalaciones fijas y la superficie de tierra necesaria para la producción animal es reducida en términos de número de animales por unidad de superficie. Una característica distintiva de estos sistemas corresponde a las excretas, para la cual es fundamental contar con un plan de recolección, conducción y uso o eliminación de las mismas. Sumado a esto, la cantidad de animales por unidad de superficie favorece la transmisión y expresión clínica de múltiples agentes, más si las condiciones de manejo no son las adecuadas.

En Argentina, tradicionalmente la principal ubicación del stock porcino se encuentra en la zona centro del país coincidiendo con la disponibilidad de granos y especialmente con los centros de faena y consumo, sin embargo, la incorporación de tecnología en instalaciones ha permitido la implementación de granjas confinadas de gran escala en provincias no tradicionalmente productoras y con condiciones climáticas adversas para la producción de cerdos. Esto contribuyó a incrementar el consumo en estas regiones (Maisonave et al., 2016).

En el sector maternidad de los sistemas intensivos, los animales se encuentran en el período de lactancia, permanecen en el mismo desde el nacimiento hasta el destete. Con la finalidad de obtener un mayor número de lechones/cerda/año, actualmente se busca la adopción de períodos de amamantamiento cada vez más cortos. El peso óptimo de los animales al finalizar este período es de 6 - 8 kg. Este es el período más delicado en la vida de los lechones ya que carecen de los cuidados y la alimentación láctea de la cerda. La decisión de una edad óptima depende mucho del estado sanitario, del desarrollo de los animales, del manejo de la ración y del agua, de la higiene del criadero, de los factores ambientales, de las instalaciones y de los cuidados por parte del criador. (Manual de Porcinos, 2009). El sector recria es la etapa que abarca desde el destete hasta los 60-70 días. Los animales deben alojarse en locales adecuados para lograr óptimos rendimientos zootécnicos. El tipo de piso más común es el enrejillado (*slat*), parcial o total con capacidad para una o varias camadas. El peso óptimo al final de esta etapa es de 50-70 kg (Muñoz et al., 1998).

Por último, en cerdos las enfermedades infecciosas virales o bacterianas han sido ampliamente estudiadas, sin embargo, no ha ocurrido lo mismo con algunas enfermedades parasitarias y particularmente con la cryptosporidiosis. Lo anteriormente expuesto demuestra la importancia de identificar las especies/genotipos de *Cryptosporidium* que infectan a los cerdos, así como

determinar en condiciones de campo su asociación con la presencia de diarrea.

La genotipificación de los aislamientos de *Cryptosporidium* spp. en diferentes partes del mundo es de suma importancia desde el punto de vista epidemiológico.

2. HIPÓTESIS

En cerdos pertenecientes a las categorías lactancia y recientemente destetados de establecimientos intensivos en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, La Pampa, Entre Ríos y Misiones, la presencia de ooquistes compatibles con *Cryptosporidium* spp. varía según las edades de los animales y las variables productivas, de instalaciones/bioseguridad y sanitarias.

La presencia de especies/genotipos de *Cryptosporidium* spp. en cerdos varía según las categorías lactancia y recientemente destetados en establecimientos porcinos de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, La Pampa, Entre Ríos y Misiones.

3. OBJETIVOS

General

Determinar la presencia y realizar la caracterización molecular de *Cryptosporidium* spp. en muestras de materia fecal de cerdos de categorías lactancia y recientemente destetados en establecimientos porcinos de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, La Pampa, Entre Ríos y Misiones.

Específicos

- Determinar la presencia de *Cryptosporidium* spp. mediante técnicas de concentración y tinción de Ziehl-Neelsen modificada.
- Determinar la asociación entre la presencia de *Cryptosporidium* spp., las edades de los animales y las variables productivas, de instalaciones/bioseguridad y sanitarias en los establecimientos intensivos.
- Identificar y caracterizar molecularmente aislamientos locales de *Cryptosporidium* spp. mediante la técnica de *nested*-PCR/secuenciación.

Para una mejor comprensión del presente trabajo, los apartados de materiales y métodos, resultados y discusión se presentan en dos capítulos diferentes cuyos encabezados se relacionan con los objetivos. Las conclusiones se expresan en forma conjunta a los dos capítulos.

Los capítulos se denominaron:

- Presencia de *Cryptosporidium* spp. en cerdos de categorías lactancia y recientemente destetados de establecimientos intensivos.

- Caracterización molecular de especies/genotipos locales de *Cryptosporidium* spp. aislados de cerdos de categorías lactancia y recientemente destetados de establecimientos intensivos.

4. PRESENCIA DE *Cryptosporidium* spp. EN CERDOS DE CATEGORÍAS LACTANCIA Y RECIENTEMENTE DESTETADOS DE ESTABLECIMIENTOS INTENSIVOS

4.1. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1. Muestras

Para determinar la presencia de *Cryptosporidium* spp., se realizó un muestreo por conveniencia y estratificado por edades, en el que se tomaron 520 muestras individuales de materia fecal de cerdos, obtenidas de 13 granjas con sistema de manejo intensivo (figura 5) ubicadas en distintas provincias de Argentina.

Categorías de edad: Se tomaron muestras de lechones de la categoría lactancia (1^{er}, 2^{da} y 3^{er} semana) pertenecientes al sector de maternidad (figura 6) y recientemente destetados (4^{ta} semana) pertenecientes al sector de recría (figura 7). En cada una de las granjas (N= 13) el muestreo se realizó según el siguiente esquema:

Edad de los lechones en semanas	Muestras/granja	Total
1 ^{er}	10	130
2 ^{da}	10	130
3 ^{er}	10	130
4 ^{ta}	10	130

Distribución geográfica: Para la recolección de muestras se seleccionaron en primer lugar las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe. Estas cuentan con el principal stock porcino del país, según datos del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) e integran la “zona núcleo maicera” a partir de donde se obtiene la principal materia prima para la alimentación de los cerdos. También se incluyeron las provincias de Entre Ríos, La Pampa y Misiones, las cuales incrementaron su stock porcino en los últimos años debido a la incorporación de tecnología en sus granjas. En la tabla 3, se muestra la distribución del número de granjas en relación a su ubicación geográfica.

Tabla 3. Distribución del muestreo por Provincia y partido/localidad

Provincia	N° de granjas	ID granja	Partido/localidad
Buenos Aires	4	1	Cañuelas/Cañuelas
		2	San Andrés de Giles/San Andrés de Giles
		3	Gral. Alvarado/Cmte. Nicanor Otamendi
		4	Cnel. Dorrego/Cnel. Dorrego
Córdoba	3	5	Marcos Juárez/Corral de Bustos
		6	Río Seco/Villa de María del Río Seco
		7	Marcos Juárez/Marcos Juárez
Santa Fe	3	8	Gral. López/Elortondo
		9	Caseros/Godeken
		10	San Martín/Landeta
Entre Ríos	1	11	Victoria/Victoria
La Pampa	1	12	Maracó/Dorila
Misiones	1	13	Guaraní/San Vicente
Total		13	

ID: identificación de la granja

La localización geográfica de las granjas muestreadas se señala en el mapa de Argentina (figura 4).

Figura 4. Mapa de Argentina. Localización de los establecimientos porcinos.

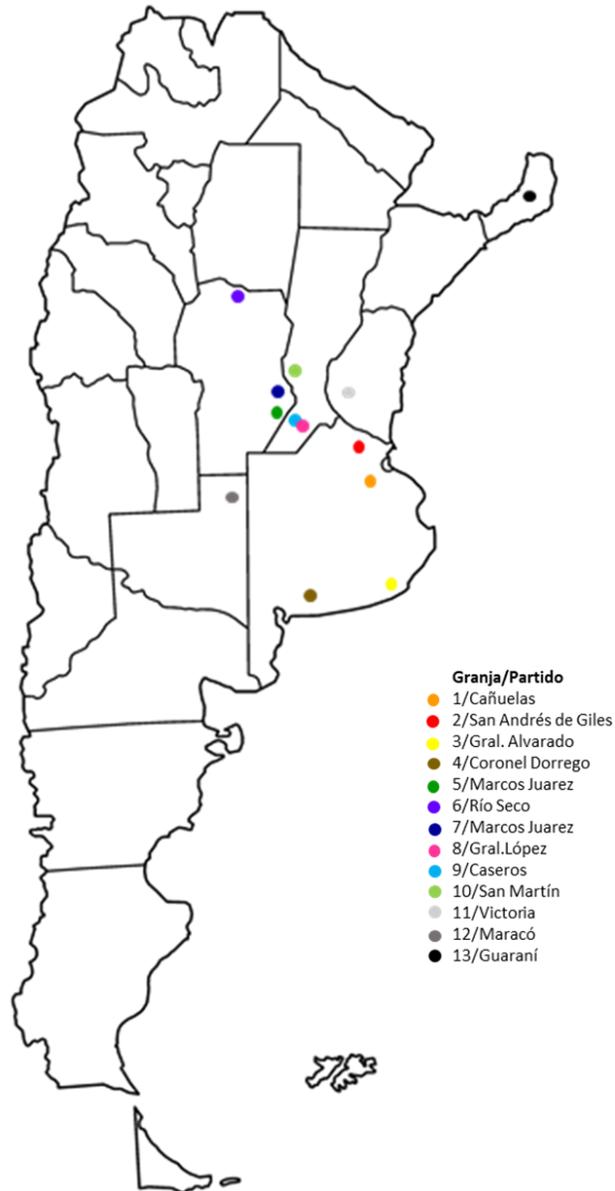


Figura 5. Vista exterior de un establecimiento intensivo. Granja 3, Buenos Aires.



Figura 6. Corrales de maternidad. Granja 5, Córdoba (A). Granja 11, Entre Ríos (B)



Figura 7. Corral de recría. Lechones destetados de 4^{ta} semana de vida. Granja 9, (Santa Fe).



Recolección de las muestras: Las muestras de materia fecal se recolectaron del suelo, inmediatamente luego de la deposición, mediante el uso de material descartable, como guantes de látex y cucharas de plástico, Se colocaron en bolsas de nylon individuales rotuladas según la edad en semanas (1^{er}, 2^{da}, 3^{er} y 4^{ta}) y se conservaron a 4°C hasta el posterior procesamiento en el laboratorio.

Recolección de datos: La recolección de los datos se realizó mediante una **encuesta** (anexo 1) en la cual se incluyó información acerca de los parámetros productivos, de bioseguridad e instalaciones y del estado sanitario de los animales. En cada establecimiento se completó manualmente una planilla, donde la información se obtuvo a partir de una breve entrevista al encargado del sector y por observación directa durante la toma de muestra.

4.1.2. Diagnóstico microscópico

Las muestras de materia fecal se clasificaron como normales o diarreicas. Se consideraron normales aquellas muestras que mantuvieron su forma original dentro de las bolsas y diarreicas las que tomaron la forma de la bolsa contenedora. La clasificación de las materias fecales acorde a Němejč, et al., 2013, se representa en la figura 8.

Figura 8. Clasificación de las heces en el laboratorio. Diarreica (A). Normal (B)



La concentración de la materia fecal se realizó mediante la técnica de sedimentación-flotación, descrita previamente para otros ooquistes de protozoarios (Schaes et al., 2005). Las muestras se homogeneizaron con agua de canilla dentro de las bolsas de nylon (figura 9). Se filtraron con colador y embudo a tubos de centrifuga de 50 ml con tapa a rosca y se dejaron sedimentar durante 24 horas. Se descartó el sobrenadante. Al sedimento se le agregó solución azucarada de Sheather (anexo 2) hasta completar 45 ml. Se homogeneizó y se centrifugó a 1600g durante 10 minutos. Se agregó cuidadosamente 3 ml de agua destilada a la superficie de flotación. Posteriormente, se utilizó una micropipeta de 1000 μ l con *tip* cortado en forma de bisel para extraer el agua y los primeros 4-5 ml del líquido de flotación realizando movimientos circulares lentos. El líquido removido, se colocó en un tubo de 50 ml y se completó con agua destilada para realizar el primer lavado. Se homogeneizó y se centrifugó a 1600g durante 8 minutos sin freno. Se descartó el sobrenadante y se realizó un segundo lavado con agua destilada. Se tomaron 10 μ l del sedimento para realizar los extendidos en portaobjeto, los cuales se dejaron secar al aire. Se preservaron alícuotas del material concentrado en tubos de 1,5 ml libres de ADNAsas en freezer a -20°C.

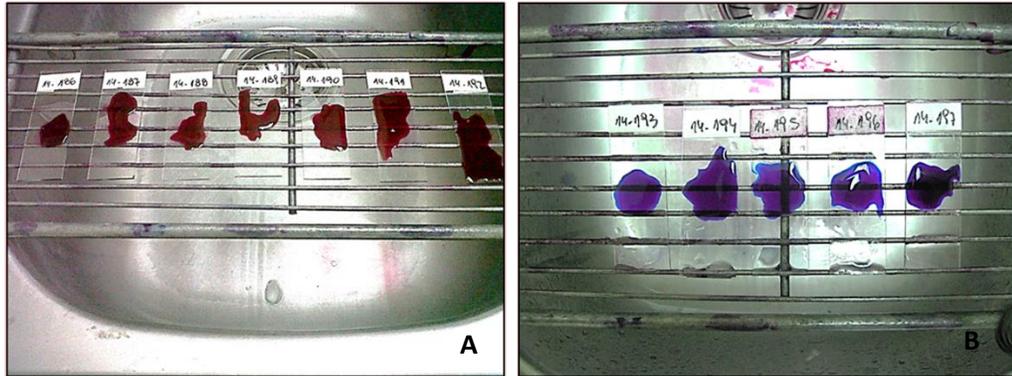
Figura 9. Muestra homogeneizada con agua de canilla en la bolsa contenedora



Los extendidos se fijaron con metanol. La tinción se realizó por la técnica de Ziehl-Neelsen modificada (ZNM), de acuerdo al protocolo descrito por Henriksen y Pohlenz, 1981 (anexo 3) (figura 10), utilizando un kit comercial (Ziehl-Neelsen equipo. Laboratorios Britania S.A., Argentina).

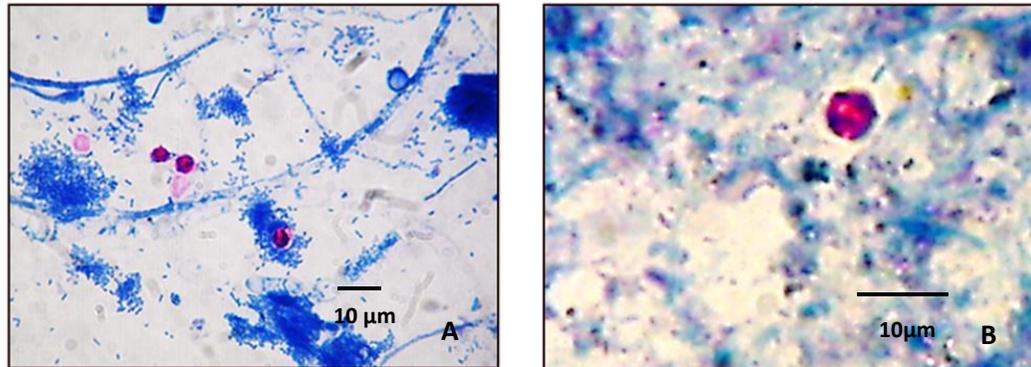
Se identificaron como positivas a *Cryptosporidium* spp. aquellas muestras con presencia de ooquistes ácido-alcohol resistentes de 4-5 μm de diámetro (figura 11), usando un microscopio óptico (MO) con objetivo 100X (Leica, Wetzlar, Alemania).

Figura 10. Técnica de tinción de Ziehl-Neelsen modificada (ZNM). Fucsina fenicada (A). Azul de metileno (B).



En las muestras positivas se realizó una estimación semicuantitativa de la carga parasitaria evaluando el número promedio de ooquistes observados en 20 campos, considerando “baja carga” (≤ 1 ooquiste), “media carga” (2-5 ooquistes), “alta carga” (6-10 ooquistes) y “muy alta carga” (> 10 ooquistes) (Castro-Hermida et al., 2002).

Figura 11. Ooquistes ácido alcohol resistentes (A y B). Observación al MO (1000X).



4.1.3. Análisis estadístico

Mediante el software WinEpi 1.0 (Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza) se calculó la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en el total de los animales muestreados, por provincia, intra-granja y por semanas de edad; la carga parasitaria en relación a la edad en semanas y a la presencia de diarrea. Se realizó un análisis exploratorio de los datos, y luego se aplicó la prueba de Chi-cuadrado, instancia de independencia, para calcular la asociación entre las variables evaluadas en la encuesta y el resultado obtenido en el diagnóstico parasitológico, para el sector de maternidad (categoría lactancia) y para el sector de recría (categoría recientemente destetados). En todos los estadísticos, se utilizó un nivel de significación $p < 0,05$ y se calcularon los Intervalos de confianza IC95%.

Las variables que resultaron estar significativamente asociadas en la prueba de chi-cuadrado se ingresaron en un modelo de regresión logística con el fin de estimar los respectivos *odds ratio* (OR) y sus intervalos de confianza (IC 95%).

Para las pruebas de chi-cuadrado y regresión logística se utilizó el software EpiInfo (versión 7.2.0.1).

4.2. RESULTADOS

La prevalencia aparente de *Cryptosporidium* spp. hallada en cerdos de establecimientos intensivos en las provincias estudiadas fue del 9% (47/520; IC 95%= 6,57 -11,50).

En todas las provincias se detectaron granjas positivas a *Cryptosporidium* spp. Las prevalencias más altas se encontraron en las provincias de Santa Fe y Entre Ríos, la más baja se encontró en la provincia de La Pampa, mientras que Córdoba, Misiones y Buenos Aires presentaron una prevalencia intermedia. La prevalencia por provincia y la cantidad de lechones analizados en cada una se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Prevalencia por provincia (diagnóstico microscópico-ZNM).

Provincia	Prevalencia (IC 95%)	Lechones positivos	Total
Santa Fe	15% (8,6-21,3) ^a	18	120
Entre Ríos	15% (3,9-26) ^a	6	40
Córdoba	8,3% (3,3-13,2) ^{abc}	10	120
Misiones	7,5% (0-15,6) ^{abc}	3	40
Buenos Aires	5,6% (2-9,2) ^{bc}	9	160
La Pampa	2,5% (0-7,3) ^c	1	40
Total	9% (6,5-11,5)	47	520

IC: Intervalo de confianza. Letras diferentes indica diferencias significativas.

Se detectaron muestras positivas a *Cryptosporidium* spp. en el 84,6% de las granjas examinadas (11/13; IC 95%= 65-100). Los 2 establecimientos que no presentaron resultados positivos correspondieron a la provincia de Buenos Aires.

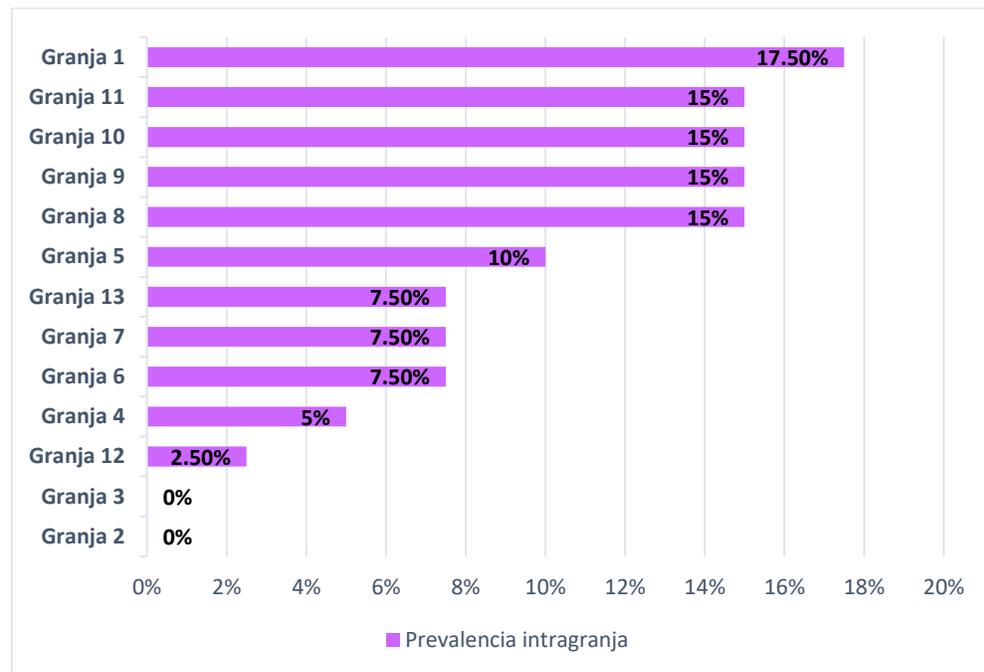
La prevalencia hallada intra-granja se encontró en un rango de 0 a 17,5% (IC 95%= 0%-29,2%). La dispersión de la prevalencia se muestra en la figura 12.

La prevalencia por granja se muestra se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Prevalencia de Cryptosporidium spp. por establecimiento en las distintas provincias.

Provincia	Granjas positivas	Total	Prevalencia de granjas	Prevalencia (Rango intra-granja)
Santa Fe	3	3	100%	15%
Córdoba	3	3	100%	7,5-10%
Entre Ríos	1	1	100%	15%
Misiones	1	1	100%	7,5%
La Pampa	1	1	100%	2,5%
Buenos Aires	2	4	50%	0-17,5%
Total	11	13	84,6%	0-17,5%

Figura 12. Dispersión de la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. intra-granja



El número de muestras positivas, así como la prevalencia correspondiente a cada semana de edad se muestra en la tabla 6. No se observó asociación estadística entre la prevalencia y la edad en semanas. ($p > 0,05$).

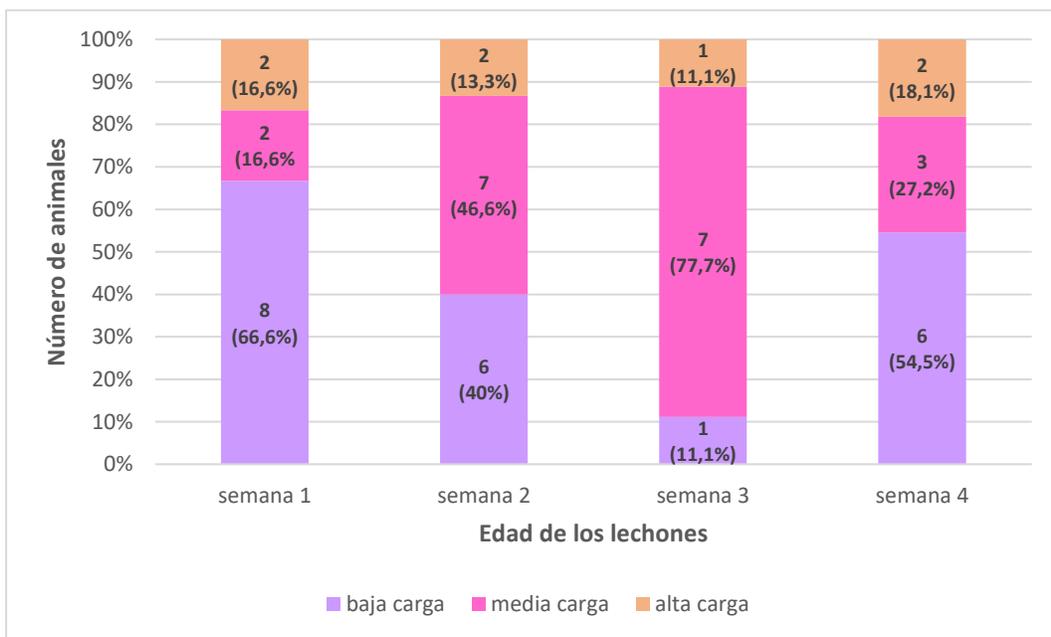
Tabla 6. Presencia de *Cryptosporidium* spp. por semanas de edad.

Semana de edad	Resultado (MO-ZNM)			Prevalencia
	Positivo	negativo	Total	
1 ^{er}	12	118	130	9,2% ^a
2 ^{da}	15	115	130	11,5% ^a
3 ^{er}	9	121	130	6,9% ^a
4 ^{ta}	11	119	130	8,4% ^a
Total	47	473	520	9%

MO: microscópio óptico; ZNM: Ziehl-Neelsen modificado;

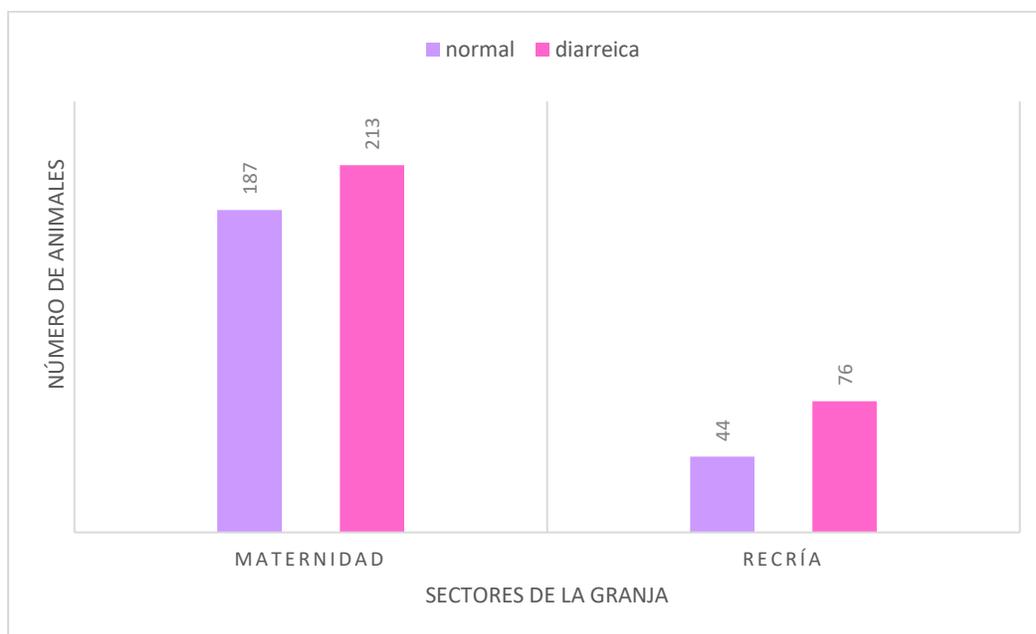
En la 1^{er} semana, de los 12 animales positivos a la presencia de *Cryptosporidium* spp., 66,6% presentaron baja carga, 16,6% media carga y 16,6% alta carga parasitaria. En la 2^{da} semana, de los 15 animales positivos, 40% presentaron baja carga, 46,6% media carga y 13,3% alta carga. En la 3^{er} semana, de los 9 animales positivos, 11,1% presentaron baja carga, 77,7% media carga y 11,1% alta carga. En la 4^{ta} semana, de los 11 animales positivos, 54,5% presentaron baja carga, 27,2% media carga y 18,1% alta carga. (figura 13). El nivel de excreción de ooquistes no se asoció significativamente con la edad en semanas, ni con la presencia de diarrea ($p>0.05$). Ningún animal presentó muy alta carga de ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

Figura 13. Distribución de la carga parasitaria según la edad en semanas.



El porcentaje de diarrea en la maternidad (lactancia) fue de 53,2% (213/400), mientras que en la recría (lechones recientemente destetados) fue de 63,3% (76/120). No se obtuvo asociación entre la proporción de diarrea y el sector de la granja ($p= 0,0513$). La distribución de la consistencia de las heces en ambos sectores se muestra en la figura 14.

Figura 14. Distribución de la consistencia de las heces por sectores de la granja.



A partir de los datos consignados en la encuesta se obtuvieron los siguientes resultados:

El 92 % (12/13) de las granjas muestreadas presentó un sistema de flujo de animales “todo dentro/ todo fuera” en la maternidad y el 100% en la recría. El 70 % (364/520) de la población muestreada alcanzó un peso óptimo al destete

(≥ 6 kg), el cual se realizó a los 21 días de edad en 12/13 establecimientos. El peso al final de la recría fue entre 25 y 30 kg.

En cuanto a la bioseguridad e higiene, alrededor del 85% de los establecimientos contaba con personal propio para cada sector. El 92% de las granjas contaba con indumentaria propia. Los baños de pie a la entrada de la granja, de cada edificio y de cada sala, se encontraron solamente en el 17% de los establecimientos. Todos los establecimientos utilizaron desinfectantes para la limpieza en la maternidad y en la recría. El vaciado de la fosa fue “total” en el 70% en la maternidad y en 60% en la recría, con una frecuencia mayor a 15 días. El 25% de las granjas tanto en la maternidad como en la recría, realizaron un vaciado óptimo entre los lotes de 7 días.

En cuanto a las instalaciones, el piso emparrillado “*slat*” de plástico se encontró en el 85% de las granjas en ambos sectores, mientras que el resto presentó pisos emparrillados de cemento. En el sector de maternidad, el 85% presentó una partición entre corrales de tipo sólida, mientras que en la recría se observó una partición de tipo reja en todas las granjas. En la recría, el número de animales/m² fue entre 0,32 y 0,35. La presencia de extractores se observó en el 60% en la maternidad y en un 40% en la recría. El uso de calefacción estuvo presente en el 60% de las granjas en ambos sectores.

En la maternidad las variables “partición entre corrales” y “presencia de diarrea” presentaron asociación con el resultado positivo al diagnóstico (tablas 7 y 8). El resto de las variables analizadas no presentaron asociación ($p>0,05$) (anexo 4).

En la recría ninguna variable resultó asociada al diagnóstico positivo ($p>0,05$) (anexo 4).

Tabla 7. Asociación entre animales positivos y partición entre corrales (maternidad)

Partición	Resultado		Total	% Positivos
	SI	NO		
Reja	12	48	60	20
Sólida	25	315	340	7,3
Total	37	363	400	9,2

$\chi^2= 9,718$; $p= 0,0018$

Tabla 8. Asociación entre animales positivos y presencia de diarrea (maternidad).

Diarrea	Resultado		Total	% Positivos
	SI	NO		
SI	27	186	213	12,6
NO	10	177	187	5,3
Total	37	363	400	9,2

$\chi^2= 6,371$; $p= 0,0116$

Se observó que los lechones en corrales con partición de tipo “reja” tuvieron 3,2 veces más riesgo de evidenciar ooquistes de *Cryptosporidium* spp. que los lechones alojados en corrales con partición “sólida”

Con respecto a diarrea, se observó que los lechones con resultado positivo a *Cryptosporidium* spp., tuvieron 2,6 veces más riesgo de evidenciar diarrea que los animales que resultaron negativos a la microscopía óptica.

Los resultados se detallan en la tabla 9.

Tabla 9. Factores de riesgo y Resultados de la prueba diagnóstica. Análisis de regresión logística (maternidad).

Variables	Coficiente	P valor	OR	IC _{95%}
Partición (1)	1,1731	0,0026	3,23	1,50 - 3,23
Diarrea (1)	0,9654	0,0131	2,62	1,22 - 2,62
Constante	-3,1429	0,0000		

Codificación: Partición reja (1); Diarrea SI (1)

4.3. DISCUSIÓN

La cryptosporidiosis en cerdos se ha identificado a nivel mundial y en todas las categorías de edad.

En este trabajo se determinó la presencia de *Cryptosporidium* spp. mediante microscopía óptica, utilizando la coloración específica a partir de concentrados de materia fecal de lechones de hasta 4 semanas de edad. Por medio de esta técnica se obtuvo una prevalencia aparente del 9% (6,5%-11,5%). Este resultado fue similar al publicado previamente por Nishi et al. (2000) en Brasil, Němejc et al. (2013) en República Checa y por Danišová et al. (2016) en Eslovaquia.

La prevalencia global de la cryptosporidiosis a nivel de las granjas presenta un amplio rango de variación, encontrándose entre 0 y 100% (Sanford 1987; Xiao et al., 1994; Wieler et al., 2001; Ryan et al., 2003; Maddox-Hyttel et al., 2006; Hamnes et al., 2007; Langkjaer et al., 2007; Suárez-Luengas et al., 2007; Johnson et al., 2008; Budu-Amoako et al., 2012; Zheng et al., 2019). Estas diferencias podrían deberse a diferentes factores como las edades o categorías de los animales muestreados, las distintas prácticas o sistemas de manejo en los establecimientos y las técnicas de diagnóstico aplicadas.

En este estudio, la mayoría de las granjas muestreadas (85%) resultaron positivas al diagnóstico microscópico, mientras que la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. a nivel intra-granja presentó un rango de 0 a 17,5 %. Este rango fue ligeramente superior al obtenido en un estudio realizado en China (Zheng et al., 2019), pero menor que en República Checa (Němejc et al., 2013).

Ambos estudios mencionados, también se llevaron a cabo en establecimientos de cría intensiva, en diferentes regiones geográficas y sin conocimiento previo del estado parasitológico, sin embargo, además de las categorías de lechones lactantes y recientemente destetados, incluyeron cerdos de mayor edad, con índices de infección más bajos.

La producción porcina se ha vuelto altamente especializada e industrializada en todo el mundo. En los últimos 30 años el modo de cría se ha transformado de pastoreo libre a lotes de alimentación (feed-lots) a gran escala (Zheng et al., 2019). Este estudio se llevó a cabo en granjas con sistema de manejo intensivo, equipadas con piso de tipo emparrillado o “*slat*”, donde las excretas percolan a través de los espacios abiertos, almacenándose en la fosa subyacente, lo que permite minimizar el contacto entre la materia fecal y los animales (Maisonave et al., 2016). Estudios previos revelaron una asociación entre la higiene deficiente en relación a la forma de eliminación de las heces y la frecuencia de *Cryptosporidium* spp. en las granjas (Xiao et al., 1994; Maddox-Hyttel et al., 2006; Nguyen et al., 2012). Němejc et al. (2013), asociaron la cryptosporidiosis porcina con el tipo de piso, con tasas de infección más altas en cerdos criados sobre camas de paja que en cerdos sobre piso de concreto o *slat*. En nuestra población de estudio, la baja a moderada prevalencia de *Cryptosporidium* spp. podría tener relación con las características del piso tipo emparrillado y el manejo óptimo de las excretas. Sumado a esto, ninguno de los lechones fue detectado con “muy altas cargas” de ooquistes, lo que redundaría en una menor

contaminación ambiental a nivel establecimientos (Castro-Hermida y col., 2002). La mayor parte de los establecimientos muestreados en el presente estudio presentaron condiciones aceptables en cuanto a las instalaciones y al estado sanitario de los lechones, los cuales llegaron al peso óptimo de destete. En la maternidad, la partición entre los corrales de tipo “reja” representó un factor de riesgo (OR 3,23) para la presencia de *Cryptosporidium* spp. Esto podría estar en relación al contacto estrecho entre camadas contiguas y la dificultad para higienizar adecuadamente las rejas que quedan marcadas con materia fecal. En los lechones de 4^{ta} semana, recientemente destetados, no se observó asociación entre las diferentes variables de manejo y la presencia del parásito. Posiblemente, y dada la prepatencia de las diferentes *Cryptosporidium* spp., la detección de ooquistes en la primera semana del destete sería consecuencia del nivel de exposición que presentan los lechones en la maternidad. La evaluación de las condiciones de manejo de la recría en relación a la presencia de ooquistes requiere también el análisis de animales de más de 1 semana de destetados. La relación entre la infección por *Cryptosporidium* spp. y la presencia de signos clínicos es controversial. Por un lado, en estudios previos se ha descrito como signos predominantes la anorexia y diarrea acuosa voluminosa en lechones predestetados infectados experimentalmente con *C. suis* (Enemark et al., 2003). Mišič et al. (2003) observaron diarrea en todos los lechones lactantes positivos a *Cryptosporidium* spp.; además, Nguyen et al. (2012) reportaron la asociación entre la ocurrencia de diarrea y el nivel de excreción de ooquistes de

Cryptosporidium spp. Por otro lado, Jeníková et al. (2011) y Němejc et al. (2013) no encontraron diarrea en cerdos naturalmente infectados con *C. suis* y *C. scrofarum*, ambas especies-específicas de porcinos. En este estudio, el signo clínico “diarrea” se asoció a la presencia de *Cryptosporidium* spp. en el sector maternidad (OR 2,62), mientras que en la recría ambas variables no resultaron significativamente asociadas. Sin embargo, no todos los animales positivos a la presencia de *Cryptosporidium* spp. mostraron heces diarreicas, lo que podría sugerir diferentes grados de susceptibilidad a la infección entre los individuos. Adicionalmente, la proporción de muestras diarreicas en la población de lechones muestreada fue alta (alrededor del 55%), lo que sugiere, además de la infección por *Cryptosporidium* spp., la participación de otras causas, ya sea infecciosas o no infecciosas, como las de origen alimentario, por diferentes dietas entre las granjas. Debido a que no se evaluaron otros agentes asociados con la diarrea en lechones lactantes, no se ha podido evaluar ni descartar la potencial sinergia entre diferentes infecciones.

La distribución de la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en las distintas edades/categorías de cerdos no se comprende completamente. El mayor riesgo de infección y desarrollo de signos clínicos se han asociado con el destete, el cual representa un paso crítico para los lechones en cuanto al desarrollo de su sistema inmunológico mientras se adaptan a los cambios dietéticos y ambientales (Thompson et al., 1996). Nguyen et al. (2012) reportaron que los lechones lactantes presentan el mayor riesgo de infección por *Cryptosporidium*

spp. seguido de los lechones destetados, las madres y los cerdos de engorde. Nĕmejc et al. (2013) identificaron un pico de infecci3n en lechones predestetados de hasta 5 semanas de vida. Sin embargo, Yui et al. (2014) y Zheng et al. (2019) entre otros, observaron las tasas de infecci3n m1s altas en lechones destetados, desde la 4^{ta} a la 8^{va} semana. En este estudio, se detectaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en muestras correspondientes a lechones de 1^{er} a 4^{ta} semana de edad sin diferencias en la proporci3n de muestras positivas entre las edades de los lechones. La carga parasitaria tampoco se asoci3 con las edades en semanas, siendo en la mayor1a de los animales de baja a media. La distribuci3n por edades de la cryptosporidiosis porcina en diferentes granjas podr1a estar en relaci3n a varios factores incluyendo diferentes tiempos de destete, cambios en el ambiente intestinal de los animales causados por la dieta, as1 como el estado de salud y posibles enfermedades concomitantes (Enemark et al., 2003; Zheng et al., 2019). Nuestros resultados sugieren un bajo nivel de exposici3n constante en lechones lactantes de granjas de manejo intensivo en Argentina.

5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES/GENOTIPOS LOCALES DE *Cryptosporidium* spp. AISLADOS DE CERDOS DE CATEGORÍAS PRE-DESTETE Y RECIENTEMENTE DESTETADOS DE ESTABLECIMIENTOS INTENSIVOS.

5.1. MATERIALES Y MÉTODOS

El diagnóstico y caracterización molecular de *Cryptosporidium* spp. se realizó mediante la técnica de *nested*-PCR- secuenciación.

Se seleccionaron las muestras de materia fecal que presentaron ooquistes compatibles con *Cryptosporidium* spp. en el diagnóstico microscópico (**punto 4.2.**), las cuales fueron previamente concentradas y mantenidas a -20°C.

5.1.1. Extracción de ADN

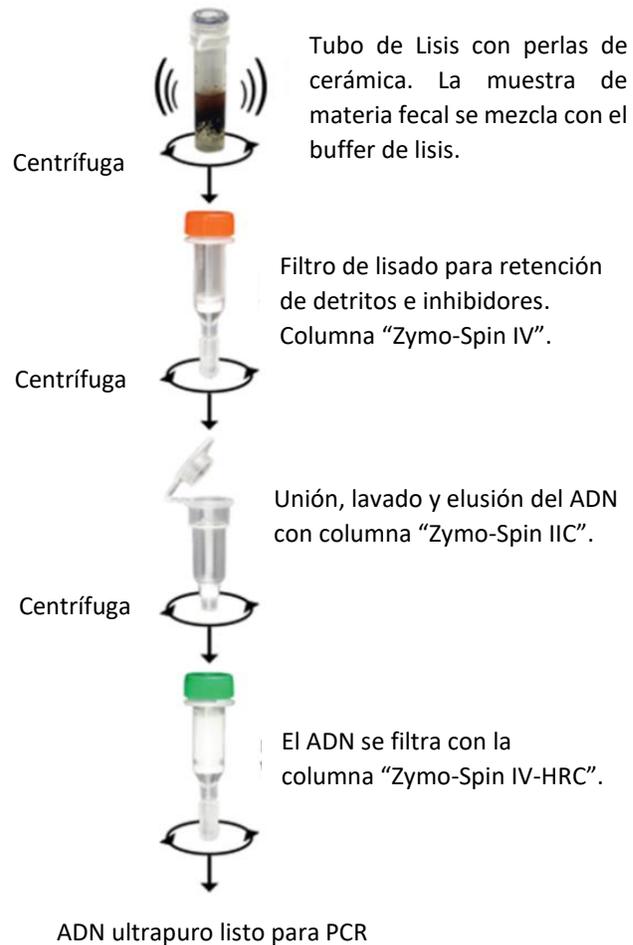
La extracción de ADN se realizó mediante un kit comercial, **ZR fecal DNA kit** (Zymo, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante (anexo 5). El kit está diseñado para el aislamiento simple y rápido de ADN de alta calidad libre de inhibidores, a partir de muestras de materia fecal (150 µl) de diferentes especies. El procedimiento se realizó mediante lisis por ruptura física con microesferas de cerámica y el uso de distintas columnas y filtros de purificación. El ADN se aisló y purificó de manera eficiente para su posterior aplicación en

técnicas de diagnóstico molecular como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (Herrmann et al., 2011). El procedimiento de extracción de ADN se esquematiza en la figura 15.

Para cada rutina de extracción se utilizó como control negativo un tubo de microcentrífuga conteniendo solo las soluciones del kit.

Las muestras de ADN purificado se conservaron en freezer a -20°C hasta su posterior amplificación por PCR.

Figura 15. Esquema del proceso de extracción de ADN con ZR fecal DNA kit



5.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación

Para la amplificación del ADN se realizó la técnica de *nested*-PCR, siguiendo protocolos que amplifican segmentos del gen de la subunidad 18S del ARNr (anexo 6).

Primero se realizó la *nested*-PCR género-específica (Xiao et al., 2001; Jiang et al., 2005) que amplifica un fragmento de aproximadamente 830 pb, para la cual se utilizaron los siguientes pares de primers:

Externos: 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'
 5'-CCCATTCCTTCGAAACAGGA-3'

Internos: 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'
 5'-CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA-3'

Las muestras positivas a la PCR género-específica fueron amplificadas mediante PCR especie-específica (Jeníková et al., 2011), para identificar la presencia de *C. suis* (~ 482 pb) y *C. scrofarum* (~ 443 pb), utilizando los siguientes pares de primers:

C. suis: 5'-CATAATAACTTTACGGATCACATTTTT-3'
 5'-CTCAAAGTAAAATTTATATACTAATAAAAAT-3'

C. scrofarum: 5'-GCGGATCACGTTATGTGACAT-3'
 5'-TTCCACATACTGTAAAGTAATGTG-3'

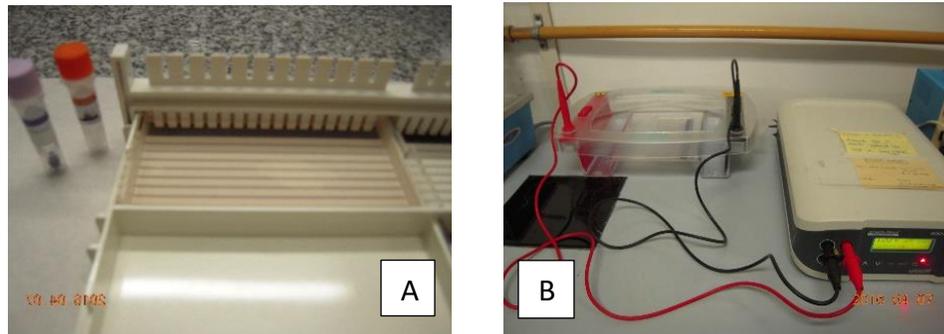
El *master mix* de PCR por cada reacción se conformó con 1 µl de ADN, 2,5 µl de 10X PCR buffer, 3,0 mM de MgCl₂, 250 µM de dNTPs, 1,25 U *Taq* ADN polimerasa recombinante (Invitrogen, Brasil), 2,5 µl (20 µg/ml) de BSA, 0,5 µM de cada primer y agua ultrapura para un volumen final de reacción de 25 µl.

Para ambas PCRs se adaptaron las condiciones descritas por Jeniková et al., 2011. Se realizaron 35 ciclos cada uno de 94°C por 45 seg, 55°C (PCR género-específica) y 62°C (PCR especie-específica) por 45 seg, 72°C por 1 minuto. Se realizó una desnaturalización inicial a 94°C por 4 min y una extensión final a 72°C por 7 min. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (T18, IVEMA, Argentina).

Como controles en cada rutina de PCR, se utilizó ADN de *Cryptosporidium* spp. de ooquistes correspondiente a una muestra de materia fecal de ternero como control positivo para la PCR género-específica, el control negativo de extracción y un tubo conteniendo solo el *master mix*, o NTC (no template control).

Los productos de PCR fueron revelados mediante electroforesis a 120 voltios durante 30 minutos (cuba de electroforesis y fuente de poder Enduro LabNet, EEUU), en geles de agarosa al 2,5% y teñidos con SYBR safe (Invitrogen, USA). Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb a 1000 pb (CienMarker, Biodynamics, Argentina) (Figura 16, A y B). Los productos fueron observados con transiluminador de luz azul (Safe Imager TM, Invitrogen, USA) (anexo 7).

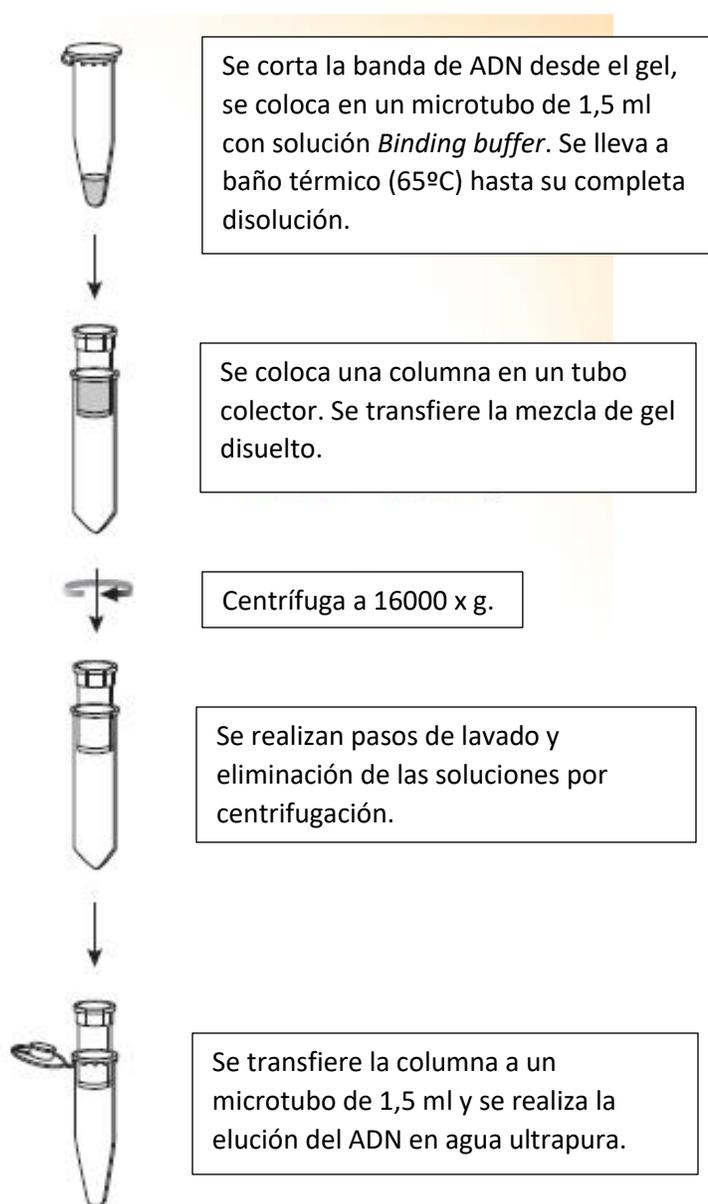
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa. A: gel de agarosa al 2,5%. B: cuba de electroforesis y fuente de poder.



Los amplicones obtenidos fueron purificados con el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) (anexo 8). Este kit está diseñado para extraer y purificar fragmentos de ADN de 100 pb a 10 kb a partir de un gel de agarosa estándar en buffer TBE o TE. El procedimiento de purificación se esquematiza en la figura 17.

Los fragmentos de ADN purificados fueron enviados a Macrogen (<http://dna.macrogen.com>) para la secuenciación en ambos sentidos con los primers utilizados para la PCR especie-específica. La secuencia de nucleótidos fue alineada y editada con el software GENEIOUS (versión R9). Las secuencias consenso obtenidas fueron comparadas con otras disponibles en GenBank mediante análisis MegaBlast del NCBI (National Center for Biotechnology Information; <https://blastn.ncbi.nlm.nih.gov>). Además, las secuencias obtenidas fueron registradas en el GenBank.

Figura 17. Esquema del proceso de purificación de ADN desde el gel de agarosa



5.1.3. Análisis estadístico

Se analizó la asociación entre las semanas de edad de los lechones y el resultado positivo al diagnóstico molecular por *nested*-PCR, mediante la prueba de chi-cuadrado (diferencia entre porcentajes) con un intervalo de confianza (IC) de 95% y un nivel de significación de $p < 0,05$. Se utilizó el software WinEpi, versión 1.0 (Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza).

5.2. RESULTADOS

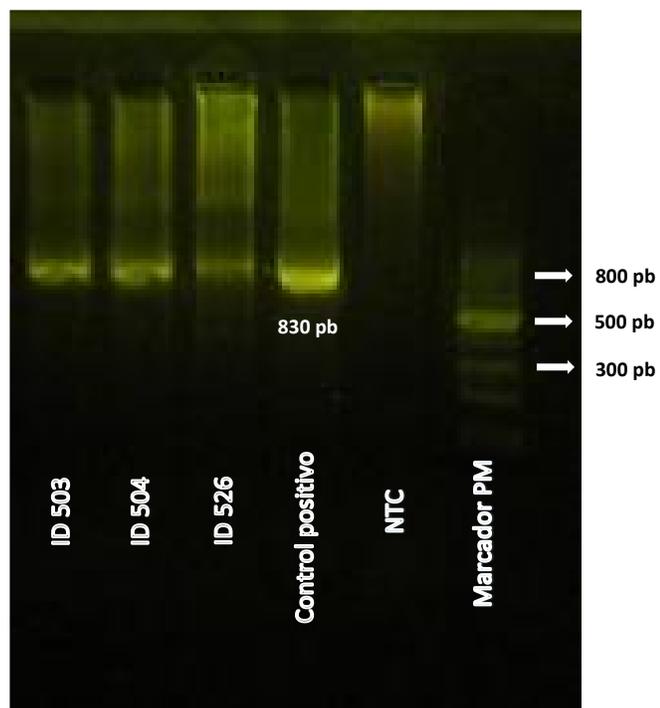
El diagnóstico molecular por *nested*-PCR género-específica permitió la detección de ADN de *Cryptosporidium* spp. en 15/47 muestras (32% de las muestras que presentaron ooquistes compatibles con *Cryptosporidium* spp. al MO) (figura 18).

Las 15 muestras resultaron positivas a las PCRs especie-específicas, de las cuales 10, se correspondían con lechones en lactancia y 5 con lechones recientemente destetados.

De las 15 muestras, 3 fueron positivas a *C. suis* (482 pb aproximadamente), 8 muestras fueron positivas a *C. scrofarum* (443 pb aproximadamente) y 4 resultaron positivas a ambas PCRs específicas, por lo que se identificaron como infecciones mixtas (figura 19).

Un total de 17 productos purificados (con una concentración estimada del gel mayor a 40 ng) de 15 muestras positivas de materia fecal fueron enviadas para secuenciación.

Figura 18. Resultado nested-PCR género específica.



ID: identificación de la muestra

Figura 19. Resultado de las PCRs especie-específicas



PM: control de peso molecular

Los resultados de las PCRs específicas y secuenciación en relación con la región geográfica y la edad de los lechones, se muestran en la tabla 11.

Se obtuvieron un total de 13 secuencias (4 muestras fallaron o tuvieron resultados de baja calidad en el proceso de secuenciación). Cinco secuencias consenso fueron 100% idénticas entre ellas y revelaron un 100% de identidad con las secuencias de *C. suis* reportadas en el GenBank. Ocho secuencias evidenciaron 99,70-100% de identidad entre ellas y 100% de identidad con las secuencias de *C. scrofarum* reportadas en el GenBank.

Todas las secuencias identificadas como *C. suis* tuvieron un porcentaje de identidad de 91.17-96.32% con las secuencias de *C. scrofarum*. Las secuencias obtenidas en este trabajo se registraron en el GenBank bajo los números de acceso o *accession ID* MT124665-MT124677 (tabla 11).

Las PCRs especie-específicas permitieron la confirmación de la infección por *Cryptosporidium* spp. en el 3,8% de los lechones de 1^{er} semana de vida (0,7% *C. suis* y 3,07% *C. scrofarum*), 1,5% de los lechones de 2^{da} semana (1,5% *C. scrofarum*), 2,3% de los lechones de 3^{er} semana (1,5% *C. suis* y 2,3% *C. scrofarum*) y 3,8% de los lechones de 4^{ta} semana (3,07% *C. suis* y 2,3% *C. scrofarum*).

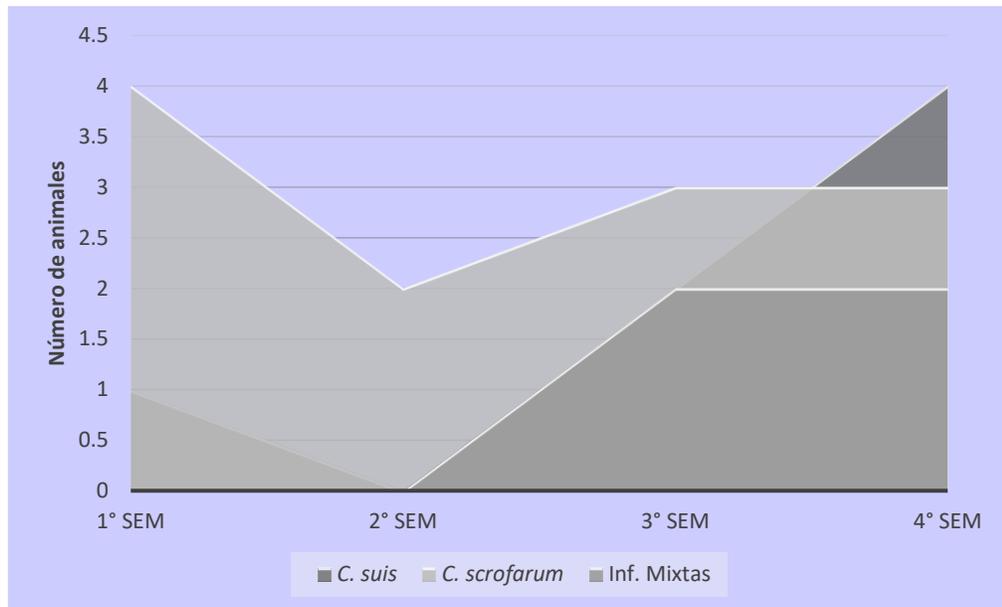
La proporción de muestras positivas en cada PCR específica fue similar entre las distintas edades de los lechones ($p>0,05$), siendo la proporción de *C. suis* ligeramente mayor en los lechones de 4^o semana o recientemente destetados. La distribución de los resultados de las *n*PCR específicas según la edad de los lechones se muestra en la figura 20.

Tabla 11. Resultados de las nPCRs específicas y secuenciación en relación a la edad de los lechones y su localización.

Granja/ Muestra ID	Edad (semanas)	Provincia/Localidad	nPCR específica	Secuencias Identidad-BLAST (#)	GenBank Accesion ID
11/259	1	Entre Ríos/Victoria	<i>C. suis</i>	100% <i>C. suis</i>	MT124675
13/214	1	Misiones/San Vicente	<i>C. scrofarum</i>	SD	
9/510	1	Santa Fé/Godeken	<i>C. scrofarum</i>	100% <i>C. scrofarum</i>	MT124670
10/547	1	Santa Fé/Landeta	<i>C. scrofarum</i>	SD	
10/554	1	Santa Fé/Landeta	<i>C. scrofarum</i>	100% <i>C. scrofarum</i>	MT124672
13/221	2	Misiones/San Vicente	<i>C. scrofarum</i>	100% <i>C. scrofarum</i>	MT124669
9/526	2	Santa Fé/Godeken	<i>C. scrofarum</i>	100% <i>C. scrofarum</i>	MT124671
9/534	3	Santa Fé/Godeken	<i>C. scrofarum</i>	SD	
1/107	3	Buenos Aires/Cañuelas	<i>C. suis</i>	SD	
			<i>C. scrofarum</i>	100% <i>C. scrofarum</i>	MT124665
9/528	3	Santa Fé/Godeken	<i>C. scrofarum</i>	100% <i>C. scrofarum</i>	MT124667
			<i>C. suis</i>	100% <i>C. suis</i>	MT124674
1/365	4	Buenos Aires/Cañuelas	<i>C. suis</i>	100% <i>C. suis</i>	MT124676
5/506	4	Córdoba/Corral de Bustos	<i>C. suis</i>	100% <i>C. suis</i>	MT124677
8/177	4	Santa Fé/Elortondo	<i>C. scrofarum</i>	100% <i>C. scrofarum</i>	MT124668
5/503	4	Córdoba/Corral de Bustos	<i>C. suis</i>	SD	
			<i>C. scrofarum</i>	SD	
5/504	4	Córdoba/Corral de Bustos	<i>C.scrofarum</i>	99.77% <i>C. scrofarum</i>	MT124666
			<i>C.suis</i>	100% <i>C. suis</i>	MT124673

(#) Secuencias de referencia para la comparación mediante BLASTn (Números de acceso en GenBank): *C. scrofarum* (JX424840, KP704557, MG516763) y *C. suis* (JF710255, KT22302, AF108861). SD = sin dato.

Figura 20. Distribución de los resultados de las nPCR específicas según la semana de edad de los lechones.



5.3. DISCUSIÓN

De las 47 muestras positivas a *Cryptosporidium* spp. identificadas por microscopía, solo 15 resultaron positivas por la técnica de *nested*-PCR tanto género-específica como especie-específica. Se ha sugerido que la baja carga de ooquistes en una muestra y el método de extracción de ADN, podrían generar falsos negativos en la PCR (Xiao et al., 2001). En el presente estudio, se aplicó una técnica de concentración para materia fecal con el fin de incrementar el número de ooquistes en la muestra. Se utilizó un volumen de muestra concentrada de aproximadamente 150µl (Schaes et al., 2005), y se utilizó una técnica de extracción de ADN previamente establecida para ooquistes de otros coccidios con control eficiente de inhibidores (Herrmann et al., 2011). Además, varias muestras resultaron negativas a la PCR, pero mostraron una alta carga de ooquistes durante la observación microscópica. Se sabe que ningún método de coloración es completamente efectivo para la detección de ooquistes en muestras de heces, sin embargo, la técnica de Ziehl-Neelsen modificada es hasta el momento una de las más utilizadas en los laboratorios de diagnóstico debido a su bajo costo y relativa simplicidad (Casemore et al., 1985; Ocampo Gallego et al., 2011). Debido a la baja especificidad del diagnóstico por microscopía mediante coloraciones ácido-alcohol resistentes, no se puede descartar la presencia de otros protozoarios capaces de producir estructuras parecidas a los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en algunas muestras (Aghamolaie et al., 2016), lo cual podría explicar en parte la escasa concordancia entre la

microscopía y la *nested*-PCR. En este trabajo de tesis, debido a los altos costos para el desarrollo de las técnicas moleculares, se consideró realizar las técnicas de PCR y secuenciación a aquellas muestras compatibles a la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. por las técnicas de tinción.

Muchos estudios han demostrado que los cerdos domésticos frecuentemente son infectados naturalmente por *C. suis* y *C. scrofarum*, las cuales son consideradas como especies adaptadas a los suinos (Ryan et al., 2004; Kváč et al., 2013). Sin embargo, otras especies de *Cryptosporidium* fueron identificadas también en cerdos con una baja prevalencia y a veces en infecciones mixtas (Morgan et al., 1999; Xiao et al., 2006). Además, varios estudios identificaron una distribución específica por edades en los cerdos infectados con *Cryptosporidium* spp., resultando *C. suis* la especie más prevalente y predominantemente detectada en lechones pre-destetados, mientras que *C. scrofarum* solamente fue detectada en lechones destetados y en cerdos de categorías mayores (Suárez-Luengas et al., 2007; Langkjaer et al., 2007; Johnson et al., 2008; Jeníková et al., 2011; Kváč et al., 2009, 2013; Němejc et al., 2013; Zheng et al., 2019). No obstante, Kváč et al. (2013) reportaron que los cerdos infectados con *C. scrofarum* comienzan a eliminar ooquistes en un rango de 6-7 días pos-infección. De acuerdo con lo reportado previamente, en este trabajo se detectaron únicamente las especies de *Cryptosporidium* adaptadas a los cerdos con la siguiente distribución: *C. suis* en 3 muestras, *C. scrofarum* en 8 muestras e infecciones mixtas por *C. suis* y *C. scrofarum* en 4 muestras. Aunque

se encontró una proporción ligeramente mayor de *C. suis* en lechones destetados recientemente (4^{ta} semana), ambas especies, *C. suis* y *C. scrofarum*, fueron identificadas en lechones pertenecientes a todos los grupos de edad. Resultados similares fueron publicados por Wang et al. (2010) y Danišová et al. (2016) ya que detectaron al menos una muestra positiva para *C. scrofarum* en lechones menores de 1 mes. Nuestros resultados mostraron una mayor distribución de *C. scrofarum*, el cual fue detectado en todas las categorías muestreadas y con mayor frecuencia que *C. suis*.

Cama et al. (2006) reportaron que la técnica de diagnóstico convencional por *nested*-PCR género-específica-secuenciación es un método limitado para identificar infecciones mixtas por *Cryptosporidium* spp. debido a que la especie o genotipo dominante en la muestra resulta preferentemente amplificado. En este estudio se decidió no secuenciar los amplicones género-específicos para evitar posibles cromatogramas mixtos, utilizándose solamente como screening, seguido de dos *n*PCRs usando los primers especie-específicos diseñados por Jeniková et al. (2011). Siguiendo este enfoque, se han podido identificar infecciones mixtas en 4 muestras. Curiosamente, estas infecciones mixtas se encontraron solo en lechones de 3^{er} y 4^{ta} semana de edad, lo que sugiere un incremento en cuanto al riesgo de infección con diferentes especies a lo largo del tiempo y en relación a la edad de los animales. Sin embargo, para confirmar esta observación deberían llevarse a cabo otros estudios con mayor número de muestras e incluyendo animales de más semanas de edad.

Las muestras positivas a la *n*PCR género-específica fueron también positivas para al menos una *n*PCR especie-específica. No obstante, la presencia de otras especies de *Cryptosporidium* concomitantes no se descartó por completo.

Las dos especies de *Cryptosporidium* identificadas tienen potencial zoonótico. Aunque los casos de infección en humanos por estas especies han sido reportados ocasionalmente, debería fortalecerse el manejo de los cerdos en las granjas de cría intensiva, mejorando medidas sanitarias como la eliminación segura de las heces, entre otras, para minimizar la contaminación ambiental sobre todo el agua y el consiguiente riesgo de infección para los humanos.

Los resultados del presente trabajo sugieren a la *nested*-PCR especie-específica como una herramienta útil para el diagnóstico molecular de infecciones por *Cryptosporidium* spp. en cerdos. Sin embargo, otros protozoarios deberían considerarse en aquellas muestras en las que se observan estructuras compatibles con ooquistes de *Cryptosporidium* spp., pero con resultado negativo al diagnóstico molecular por *n*PCR.

6. CONCLUSIONES

La prevalencia de *Cryptosporidium* spp. obtenida por la técnica de tinción y microscopía fue baja a moderada y se encontró ampliamente distribuida en la región de estudio.

Las prácticas de manejo e instalaciones fueron similares entre los establecimientos, lo cual impactó en un rango poco variable de infección a nivel de las granjas.

La detección de *Cryptosporidium* spp. presentó una distribución homogénea entre las edades de los lechones, presentando asociación con cuadros diarreicos y la separación de tipo reja en el sector de la maternidad.

Las infecciones causadas por las especies específicas de cerdos, *C. suis* y *C. scrofarum*, fueron confirmadas mediante herramientas moleculares e identificadas en lechones de 1 a 4 semanas de edad.

Considerando el potencial zoonótico de estas especies debieran llevarse adelante medidas de decontaminación y eliminación apropiada de los residuos fecales de cerdos a fines de evitar la contaminación eventual de napas de agua. Estudios posteriores deberían llevarse a cabo en granjas con diferentes sistemas de manejo, incluyendo más edades/categorías con la finalidad de comprender mejor la epidemiología de la cryptosporidiosis en Argentina.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramovich BL, Lura de Calafell MC, Haye MA, Nepote A, Argañara MF. Detection of *Cryptosporidium* in subterranean drinking water. Rev Argent Microbiol. 1996; 28: 73-7.
- Abramovich BL, Gilli MI, Haye MA, Carrera E, Lurá MC, Nepote A, Gómez PA, Vaira S, Contini L. *Cryptosporidium* and *Giardia* in surface water. Rev Argent Microbiol. 2001; 3: 167-76.
- Aghamolaie S, Rostami A, Fallahi Sh, Tahvildar Biderouni F, Haghghi A, Salehi N. Evaluation of modified Ziehl–Neelsen, direct fluorescent-antibody and PCR assay for detection of *Cryptosporidium* spp. in children faecal specimens. J. Parasit. Dis. 2016; 40(3): 958–963.
- Aguirre F, Ruiz MF, Allassia M, Bagattin L, Otero JL. Presencia de *Cryptosporidium* spp. en terneros de establecimientos lecheros de la provincia de Santa Fe (Argentina). Revista FAVE - Ciencias Veterinarias. 2014; 13: 1-2.
- Appelbee AJ, Thompson RCA, Olson ME. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife—current status and future needs. Trends Parasitol. 2005; 21: 370–376.
- Atías, A. Parasitología Médica. Ed. Mediterráneo. Santiago, Chile. 1998; 146-151pp.

- Barker I K and P L Carbonell. *Cryptosporidium agni* sp.n. from lambs, and *Cryptosporidium bovis* sp.n. from a calf, with observations on the oocyst. Z. Parasitenkd. 1974; 44:289–298.
- Bellinzoni RC, Blackhall J, Terzolo HR. Microbiology of diarrhoea in young beef and dairy calves in Argentina, Rey. Argent Microbiol. 1990; 22: 130-6.
- Bergeland ME. Necrotic Enteritis in Nursing Piglets. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. 1977; 20: 151–158.
- Bird R G. Protozoa and viruses. Human cryptosporidiosis and concomitant viral enteritis. In E. U. Canning (ed.), Parasitological topics. Allen Press, Lawrence, Kans. 1981; p. 39–47.
- Bodager JR, Parsons MB, Wright PC, Rasambainarivo F, Roellig D, Xiao L, Gillespie TR. Complex epidemiology and zoonotic potential for *Cryptosporidium suis* in rural Madagascar. Vet Parasitol. 2014; 207: 140–3.
- Buduamoako E, Greenwood SJ, Dixon BR, Barkema HW, Hurnik D, Estey C, McClure JT. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in pigs on Prince Edward Island, Canada. Vet Parasitol. 2012; 184: 18–24.
- Bronsdon MA. Rapid dimethyl sulfoxide-modified acid-fast stain of *Cryptosporidium* oocysts in stool specimens. J. Clin. Microbiol. 1984; 19: 952-953.
- Cacciò S. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. Parasitologia. 2005; 47(2): 185–192.

- Cacciò SM, Thompson RC, McLauchlin J, Smith, HV. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. Trends Parasitol. 2005; 21: 430–437.
- Cacciò SM, Pozio E. Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of criptosporidiosis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2006; 4(3):429-43.
- Cama VA, Gilman RH, Vivar A, Ticona E, Ortega Y, Bern C, Xiao L. Mixed *Cryptosporidium* infections and HIV. Emerg. Infect. Dis. 2006; 12: 1025-1028.
- Cama VA, Ross JM, Crawford S, Kawai V, Chavez-Valdez R, Vargas D, Vivar A, Ticona E, Navincopa M, Williamson J, Ortega Y, Gilman RH, Bern C, Xiao L. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. J. Infect. Dis. 2007; 196: 684–691.
- Cama VA, Bern C, Roberts J, Cabrera L, Sterling CR, Ortega Y, Gilman RH, Xiao L. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. Emerg. Infect. Dis. 2008; 14: 1567– 1574.
- Carpenter C, Fayer R, Trout J, Beach, M. Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*. Emerg. Infect. Dis. 1999; 5: 579–584.
- Carreno RA, Marten DS, Barta JR. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. Parasitol. Res. 1999; 85: 899–904.
- Casemore DP, Armstrong M, Jackson B. Screening for *Cryptosporidium* in stools. Lancet. 1984; 1: 734-735.

- Casemore DP, Armstrong M, Sands RL. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *J. Clin. Pathol.* 1985; 38: 1337-1341.
- Castro-Hermida JA, Gonzales Lozada YA, Mezo-Menendez M, Ares-Mazas. A study of Cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. *Vet. Parasitol.* 2002; 106(1): 11-17.
- Chen F, Huang K. Prevalence and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* in pigs in eastern China. *Zoonoses Publ Health.* 2007; 54: 393–400.
- Clancy JL, Bukhari, Z, Hargy TM, Bolton, JR, Dussert BW, Marshall MM. Using UV to inactivate *Cryptosporidium*. *J. Am. Water Works Assoc.* 2000; 92: 97–104.
- Current WL, Upton SJ, Haynes TB. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *J. Protozool.* 1986; 33:289-296.
- Current W, García L. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews.* 1991; 325-358.
- Danišová O, Valenčáková A, Petrinčová A. Detection and identification of six *Cryptosporidium* species in livestock in Slovakia by amplification of SSU and GP60 genes with the use of PCR analysis. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2016; 23: 254–258.
- De Felice L, Unzaga JM, Costa EF, Dellarupe A, Venturini MC. Molecular identification of *Cryptosporidium* sp. from calves in Argentina. Apicomplexa in farm animals. 2012. 1st Internacional meeting. Lisboa, Portugal.

- Del Coco V, Córdoba M, Basualdo J. *Cryptosporidium* infection in calves from a rural area of Buenos Aires, Argentina. *Veterinary Parasitology*. 2008; 158: 31–35.
- Del Coco VF, Córdoba MA. *Cryptosporidium*. En: Basualdo JA (Ed). *Microbiología Médica*. 3º ed. Editorial Atlante. Buenos Aires.
- Dellarupe A, Unzaga JM, Moré G, Kienast M, Larsen A, Stiebel C, Rambeaud M, Venturini MC. *Cryptosporidium varanii* infection in leopard geckos (*Eublepharis macularius*) in Argentina. *Open Vet. J*. 2016; 6(2): 98-101.
- Dobbins WO, Weinstein WM. Electron microscopy of the intestine and rectum in acquired immunodeficiency syndrome. *Gastroenterology* 1985; 88: 738-749.
- Ebeid M, Mathis A, Pospischil A, Deplazes P. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* genotype I in conventionally reared piglets and lambs. *Parasitol Res*. 2003; 90: 232–235.
- Enemark HL, Ahrens P, Bille-Hansen V, Heegaard PM, Vigre H, Thamsborg SM, Lind P. *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the ‘porcine’ genotype. *Parasitology*. 2003; 126: 407–416.
- Farzan A, Parrington L, Coklin T, Cook A, Pintar K, Pollari F, Friendship R, Farber J, Dixon B. Detection and characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. on swine farms in Ontario, Canada. *Foodborne Pathog Dis*. 2011; 8: 1207-1213.

- FAO. Multicriteria-Based Ranking for Risk Management of Food-Borne Parasites. Microbiological Risk Assessment Series 23. Food Safety and Codex Unit, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014. Rome, Italy.
- Fayer R, Leek RG. The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on in vitro excystation of *Cryptosporidium*. J. Protozool. 1984; 31: 567-569.
- Fayer R, Ungar B. *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis. Microbiological Reviews. 1986; 50(4): 458-483.
- Fayer R, Speer CA, Dubey JP. The general biology of *Cryptosporidium*. In: Fayer, R. (Ed.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton. 1997; FL, pp. 1–41.
- Fayer R, Trout JM, Jenkins, MC. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. J. Parasitol. 1998; 84: 1165–1169.
- Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int. J. Parasitol. 2000; 30: 1305–1322.
- Fayer R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. Veterinary Parasitology. 2004; 126: 37–56.
- Fayer R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. Exp. Parasitol. 2010; 124: 90-97.

- Fletcher SM, Stark D, Harkness J, Ellis J. Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* 2012; 25: 420–449.
- García-Preedo I, Pedraza-Díaz S, González-Warleta M, Mezo M, Gómez-Bautista M, Ortega-Mora LM, Castro-Hermida JA, 2013. Presence of *Cryptosporidium scrofarum*, *C. suis* and *C. parvum* subtypes IIaA16G2R1 and IIaA13G1R1 in Eurasian wild boars (*Sus scrofa*). *Vet. Parasitol.* 2013; 196(3-4): 497-502.
- Hamnes IS, Gjerde BK, Forberg T, Robertson LJ. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in suckling piglets in Norway. *Vet. Parasitol.* 2007; 144: 222-233.
- Heine J, Moon HW, Woodmansee DB, Pohlenz JFL. Experimental tracheal and conjunctival infections with *Cryptosporidium* sp. in pigs. *Vet. Parasitol.* 1984; 17: 17-25.
- Henricksen S A, Pohlenz JFL. Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta. Vet. Scand.* 1981; 22: 594-596.
- Herrmann D C, Maksimov A, Pantchev N, Vrhovec MG, Conraths FJ, Schares G. Comparison of different commercial DNA extraction kits to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in cat faeces. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift.* 2011; 124: 497-502.
- Hijjawi NS, Meloni BP, Ryan UM, Olsen ME, Thompson RCA. 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*. *Int. J. Parasitol.* 2002; 32: 1719–1726.
- Holten-Anderson, Gerstofn WJ, Henriksen SA, Pedersen NS. Prevalence of *Cryptosporidium* among patients with acute enteric infection. *J. Infect.* 1984; 9: 277-282.
 - Hunter P, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15: 145–154.
 - Hunter P, Hughes S, Woodhouse S, Raj N, Syed Q, Chalmers RM, Verlander NQ, Goodacre J. Health sequelae of human cryptosporidiosis in immunocompetent patients. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 39: 504 –510.
 - Inman L R and Takeuchi. Spontaneous cryptosporidiosis in an adult female rabbit. *Vet. Pathol.* 1979; 16:89–95.
 - Jenkins MB, Walker MJ, Bowman DD, Anthony LV, Ghiorse WC. Use of a sentinel system for field measurements of *Cryptosporidium parvum* oocyst inactivation in soil and animal waste. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65: 1998–2005.
 - Jeníková M, Němejc K, Sak B, Květoňová D, Kváč M. New view on the age-specificity of pig *Cryptosporidium* by species-specific primers for distinguishing *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II. *Vet. Parasitol.* 2011; 176: 120–125.

- Jiang J, Alderisio KA, Xiao L. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71: 446-4454.
- Johnson J, Buddle R, Reid S, Armson A, Ryan UM. Prevalence of *Cryptosporidium* genotypes in pre- and post-weaned pigs in Australia. *Exp. Parasitol.* 2008; 119: 418-421.
- Kanjo Y, Kimata I, Iseki M, Miyanaga S, Okada H, Banno C, Matsumoto M, Shimada Y. Inactivation of *Cryptosporidium* spp. oocysts with ozone and ultraviolet irradiation evaluated by in vitro excystation and animal infectivity. *Water Sci. Technol.* 2000; 41: 119–125.
- Kennedy GA, Kreitner GL, Strafass AC. Cryptosporidiosis in three pigs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1977; 170: 348–350.
- Koch KL, Phillips DJ, Current WJ. Cryptosporidiosis in hospital personnel: evidence for person-to-person transmission. *Ann. Intern. Med.* 1984; 102: 593-596.
- Kváč M, Květoňová D, Sak B, Ditrich O. *Cryptosporidium* pig genotype II in immunocompetent man. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15: 982–983.
- Kváč M, Kestřánová M, Pinková M, Květoňová D, Kalinová J, Wagnerová P, Kotková M, Vítovec J, Ditrich O, McEvoy J, Stenger B, Sak B. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Vet Parasitol* 2013; 191: 218–227.

- Langkjaer RB, Vigre H, Enemark HL, Maddox-Hyttel C. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology*. 2007; 134: 339-350.
- Lymbery AJ, Thompson RCA. The molecular epidemiology of parasite infections: tools and applications. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2011; 181: 102–116.
- Leoni F, Amar C, Nichols G, Pedraza-Díaz S, McLauchlin J. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *J Med Microbiol.* 2006; 55: 703–7.
- Levine N D. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *J. Parasitol.* 1980; 66:830–834.
- Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox KR, Rose JB, Davis JP. A massive 42 outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med.* 1994; 331:161-7.
- Maddox-Hyttel C, Langkjaer RB, Enemark HL, Vigre H. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs- occurrence and management associated risk factors. *Vet. Parasitol.* 2006; 141: 48-59.
- Maisonnave R, Millares P, Lamelas K. Buenas prácticas de manejo y utilización de efluentes porcinos. Subsecretaría de Ganadería. Ministerio de Agroindustria. Presidencia de la Nación, 2016. <http://www.minagri.gob.ar>.

- Manabe YC, Clark DP, Moore RD, Lumadue JA, Dahlman HR, Belitsos PC, Chaisson RE, Sears CL. Cryptosporidiosis in patients with AIDS: correlates of disease and survival. *Clin. Infect. Dis.* 1998; 27: 536 – 542.
- McNabb, SJN, Hensel DM, Welch DF, Heijbel H, McKee GL, Instre GR. Comparison of sedimentation and flotation techniques for identification of *Cryptosporidium* sp. oocysts in a large outbreak of human diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22: 587-589.
- Meinhardt P, Casemore DP, Miller KB. Epidemiologic aspects of human cryptosporidiosis and the role of waterborne transmission. *Epidemiol. Rev.* 1996; 18: 118 –136.
- Millard PS, Gensheimer KF, Addiss DG, Sosin DM, Beckett GA, Houck-Jankoski A, Hudson A. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. *JAMA* 1994; 272: 1592–1596.
- Ministerio de Agroindustria. Presidencia de la Nación; INTA; Buenos Aires, Provincia, 2009. Manual de Porcinos. www.argentina.gob.ar/sites/default/files/manual_de_produccion_porcina_3er_ano.pdf.
- Mišič, Z., Katič-Radivojevič, S., Kulišič, Z., 2003. *Cryptosporidium* infections in nursing, weaning and post-weaned piglets and sows in the Belgrade district. *Acta Vet. (Belograd)* 5–6, 361-366.
- Moon HW, Bemrick WJ. Fecal transmission of calf cryptosporidia between calves and pigs. *Vet. Pathol.* 1981; 18: 248-255.

- Morgan UM, Buddle R, Armson A, Elliot A, Thompson RCA. Molecular and biological characterization of *Cryptosporidium* in pigs. Aust. Vet. J. 1999; 77: 44–47.
- Muñoz A, Marotta E, Lagreca L, Rouco A. Porcinotecnia Práctica y Rentable. Grupo Luzán 5, S.A. Madrid. 1998; ISBN: 84-7989-094-0.
- Němejc K, Sak B, Květoňová D, Kernerová N, Rost M, Cama VA, Kváč M. Occurrence of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* on commercial swine farms in the Czech Republic and its associations with age and husbandry practices. Parasitol Res. 2013; 112: 1143–54.
- Nguyen, S.T., Honma, H., Geurden, T., Ikarash, M., Fukuda, Y., Huynh, V.V., Nguyen, D.T., Nakai, Y., 2012. Prevalence and risk factors associated with *Cryptosporidium* oocysts shedding in pigs in Central Vietnam. Res. Vet. Sci. 93, 848-852.
- Nime F, Burek JD, Page DL, Holscher MA, Yardley JH. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. Gastroenterology. 1996; 70: 592–598.
- Nishi SM, Gennari SM, Lisboa MNTS, Silvestrim A, Caproni Junior L, Umehara O. Parasitas intestinais em suínos confinados nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Arquivo do Instituto Biológico. 2000; 67: 199-203.
- Oates SC, Miller MA, Hardin D, Conrad PA, Melli A, Jessup DA, Dominik C, Roug A, Tinker MT, Miller WA. Prevalence, environmental loading, and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from

- domestic and wild animals along the Central California Coast. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78: 8762–8772.
- Ocampo Gallego R, Cardozo Duque L, López Garnert G, Álvarez ME, Pérez J, Rivera Páez F. Evaluation of molecular and microscopic methods for detection of *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa – Cryptosporidiidae). *Biosalud.* 2011; 10: 19-29.
 - Odeón AC, Magnasco EJ. Primera observación de Cryptosporidiosis en terneros enfermos de diarrea neonatal en la República Argentina. *Gaceta Veterinaria.* 1983; Vol XLIVN 372: 670-3.
 - O’Donoghue P. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int. J. Parasitol.* 1995; 25: 139 –195.
 - Ortega Mora LM, Gómez Bautista M, Rojo Vázquez FA. Criptosporidiosis. *Parasitología Veterinaria.* McGraw Hill-Interamericana de España, S.A.U. 1999; 17: 213-221.
 - Pellérdy, L. *Coccidia and coccidiosis.* Akademiai Kiado, 1965. Budapest, Hungary.
 - Petersen HH, Wang J, Katakam KK, Mejer H, Thamsborg SM, Dalsgaard A, Olsen A, Enemark HL. *Cryptosporidium*, and *Giardia*, in Danish organic pig farms: seasonal and age-related variation in prevalence, infection intensity and species/genotypes. *Vet Parasitol.* 2015; 214: 29–39.

- Pezzani BCB, Lucila E, Apezteguía M, Basualdo JA. Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en animales mamíferos de la ciudad de La Plata y área rural de influencia. *Acta bioquim. clin. Latinoam.* 2001; 35(4).
- Pohlenz J, Moon HW, Cheville NF, Bemrick WJ. Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhea of calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1978; 172: 452-457.
- Proctor S J, and R L Kemp. *Cryptosporidium anserinum* sp. N. (Sporozoa) in a domestic goose *Anser anser* L., from Iowa. *J. Protozool.* 1974; 21:664–666.
- Riordan CE, Langreth SG, Sanchez LB, Kayser O, Keithly, JS. Preliminary evidence for a mitochondrion in *Cryptosporidium parvum*: phylogenetic and therapeutic implications. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1999; 46: 52S–55S.
- Robertson LJ, Campbell AT, Smith HV. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992; 58: 3494–3500.
- Rose JB, Lisle, JT, LeChevallier M. Waterborne cryptosporidiosis: incidence outbreaks, and treatment strategies. In: Fayer, R. (Ed.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. CRC Press, Boca Raton. 1997; FL, pp. 93– 110.
- Ryan UM, Samarasinghe B, Read C, Buddle JR, Robertson ID, Thompson RC. Identification of a novel *Cryptosporidium* genotype in pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69: 3970-3974.
- Ryan UM, Monis P, Enemark HL, Sulaiman, I, Samarasinghe B, Read C, Buddle R, Robertson, I, Zhou L, Thompson RC, Xiao L, 2004. *Cryptosporidium suis* n.

- sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). J. Parasitol. 2004; 90: 769–773.
- Sanford SE. Enteric cryptosporidial infection in pigs: 184 cases (1081–1985). J. Am. Vet. Med. Assoc. 1987; 190: 695-698.
 - Slapeta, J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow? Int. J. Parasitol. 2013; 43: 957–970.
 - Slavin, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). J. Comp. Pathol. 1955; 65:262-266.
 - Smith HV, Caccio, SM, Tait A, McLauchlin J, Thompson, RCA. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. Trends Parasitol. 2006; 22: 160–167.
 - Smith HV, Cacciò, SM, Cook N, Nichols RA, Tait A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. Vet. Parasit. 2007; 149: 29–40.
 - Sterling CR, Arrowood MJ. Detection of *Cryptosporidium* sp. infections using a direct immunofluorescent assay. Pediatr. Infect. Dis. 1986; 5: 5139-5142.
 - Suárez-Luengas L, Clavel A, Quílez J, Goñi-Cepero MP, Torres E, Sánchez-Acedo C, del Cacho E. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain). Vet. Parasitol. 2007; 148: 231-235.
 - Tetley L, Brown, SMA, McDonald VM, Coombs GH. Ultrastructural analysis of the sporozoite of *Cryptosporidium parvum*. Microbiology. 1998; 144: 3249–3255.

- Thompson, P.B., Brewer, J., Brewer, E.E., 1996. Swine care handbook. National Pork Board, Des Moines, p 34.
- Thompson RCA, Smith A. Zoonotic enteric protozoa. Vet. Parasitol. 2011; 182: 70–78.
- Thompson RCA, Ash A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. Inf. Gen. Evol. 2015; 40: 315–323.
- Thompson RCA, Koh W, Clode P. *Cryptosporidium* — What is it?. Food and Waterborne Parasitology. 2016; 4: 54–61.
- Tomazic M, Maidana J, Dominguez, M, Louge Uriarte E, Galarza R, Garro C, Florin-Christensen M, Schnittger L. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from calves in Argentina. Veterinary Parasitology. 2013; 198: 382– 386.
- Tyzzer E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. Proc Soc Exp Biol Med. 1907; 5: 12.
- Tyzzer E. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the common mouse. J Med Res. 1910; 18: 487.
- Tyzzer E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Arch Protistenk. 1912; 26: 394.
- Tzipori S, Angus KW, Gray EW, Campbell I. Vomiting and diarrhea associated with cryptosporidial infection. N. Engl. J. Med. 1980; 303: 818.
- Tzipori S, Campbell I. Prevalence of *Cryptosporidium* antibodies in 10 animal species. J. Clin. Microbiol. 1981a; 14: 455-456.

- Tzipori S, McCartney E, Lawson GHK, Rowland AC. Experimental infection of piglets with *Cryptosporidium*. Res. Vet. Sci. 1981b; 31: 358-368.
- Tzipori S, Smith M, Maken T, Halpin C. Enterocolitis in piglets caused by *Cryptosporidium* sp. purified from calf feces. Vet. Parasitol. 1982; 11: 1121-1126.
- Tzipori S, Smith M, Birch C, Barnes G, Bishop R. Cryptosporidiosis in hospital patients with gastroenteritis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1983a; 32: 931–934.
- Tzipori, S. Cryptosporidiosis in animals and humans. Microbiol. Rev. 1983b; 47: 84-96.
- Ungar BLP, Soave R, Fayer R, Nash TE. Enzyme immunoassay detection of immunoglobulin M and G antibodies to *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunocompromised persons. J. Infect. Dis. 1986; 153: 570-578.
- Unzaga JM, De Felice LA, Dellarupe A, Eiras D, Moré G, Rambeaud M, Kienast M, Venturini MC. Molecular identification of *Cryptosporidium* from dogs in Argentina. XXIII Congreso Internacional de la Asociación Mundial para el avance de la Parasitología Veterinaria (WAAVP). 2011. Ciudad de Buenos Aires, Argentina.
- Venturini L, Bacigalupe D, Basso W, Unzaga, JM, Venturini MC, Moré G. *Cryptosporidium parvum* en animales domésticos y en monos de un zoológico. Parasitol Latinoam. 2006; 61: 90 - 93.

- Wang R, Qiu S, Jian F, Zhang S, Shen Y, Zhang L, Ning C, Cao J, Qi M, Xiao L. Prevalence and molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in pigs in Henan, China. *Parasitol. Res.* 2010; 107: 1489-1494
- Wang L, Zhang H, Zhao X, Zhang L, Zhang G, Guo M, Liu L, Feng Y, Xiao L. Zoonotic *Cryptosporidium* species and *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in HIV-positive patients on antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 557.
- Wieler LH, Ilieff A, Herbst W, Bauer C, Wieler E, Bauerfeind R, Failing K, Klos H, Wengert D, Bajer G, Zahner H. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany. *J. Vet. Med. B.* 2001; 48: 151-159.
- Xiao L, Herd RP, Bowman GL. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections on two Ohio pig farms with different management systems. *Vet. Parasitol.* 1994; 52: 331-336.
- Xiao L, Singh A, Limor J, Graczyk TK, Gradus S, Lal A. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67: 1097-1101.
- Xiao L, Bern C, Arrowood M, Sulaiman I, Zhou L, Kawai V, Vivar A, Lal AA, Gilman RH. Identification of the *Cryptosporidium* pig genotype in a human patient. *J Infect Dis.* 2002; 185: 1846–8.

- Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton S. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. Clin. Microbiol. Rev., 2004; 17(1): p. 72-97.
- Xiao L, Moore JE, Ukoh U, Gatei W, Lowery CJ, Murphy TM, Dooley JS, Millar BC, Rooney PJ, Rao JR. Prevalence and identity of *Cryptosporidium* spp. in pig slurry. Appl Environ Microbiol 2006; 72:4461–4463.
- Xiao L, Fayer R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. Int. J. Parasitol. 2008; 38: 1239–1255.
- Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. Exp. Parasitol. 2010; 124: 80–89.
- Yui T, Nakajima T, Yamamoto N, Kon M, Abe N, Matsubayashi M, Shibahara T. Age-related detection and molecular characterization of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* in pre- and post-weaned piglets and adult pigs in Japan. Parasitol Res. 2014; 113: 359–65.
- Zheng S, Li D, Zhou C, Zhang S, Wu Y, Chang Y, Chen Y, Huang J, Ning C, Zhang G, Zhang L Molecular identification and epidemiological comparison of *Cryptosporidium* spp. among different pig breeds in Tibet and Henan, China. BMC Veterinary Research. 2019; 15:101.

ANEXOS

Anexo 1: Encuesta

Identificación de la granja

Granja Provincia Fecha

Dentro del sistema de múltiples fases, ¿cómo se da el flujo de animales?

	Todo dentro/ todo fuera	Flujo continuo
Sitio I		
Sitio II		
Sitio III		

1. Parámetros de producción:

Nº cerdas	
Promedio lechones nacidos vivos/cerda/año	
Promedio de lechones destetados/cerda/año	
Ganancia diaria de peso (destete-venta)	
Edad y peso al final de lactancia	
Edad y peso al final de recría	
Edad y peso al final de terminación	

2. Bioseguridad

Personal exclusivo por sectores (tachar lo que no corresponda): Sí No

Si la respuesta es no aclarar que sectores comparten personal.....

Uso de indumentaria e instrumental

	Mamelucos	Botas	Instrumental Veterinario
Propios de la granja			
Descartables			
Ninguno			

Baño de pie	Marcar con X
A la entrada de la granja	
A la entrada de cada edificio	
A la entrada de cada sala	

Prácticas de limpieza	Instalaciones de maternidad / lactancia	Instalaciones de destete	Instalaciones de Engorde / terminación
Limpieza con agua fría	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Limpieza con agua caliente	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Utilización de desinfectante	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Nombre del desinfectante			
Presencia de defensa contra pájaros	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Vaciado de la fosa	Total <input type="checkbox"/>	Total <input type="checkbox"/>	Total <input type="checkbox"/>
	Parcial <input type="checkbox"/>	Parcial <input type="checkbox"/>	Parcial <input type="checkbox"/>
	Nunca <input type="checkbox"/>	Nunca <input type="checkbox"/>	Nunca <input type="checkbox"/>
Frecuencia de vaciado			
Tiempo de vacío sanitario entre lotes			

3. Instalaciones

	Maternidad	Sala de destete	Sala de engorde / terminación
Número de salas (tipo piso)			
Nº de corrales / sala			
Nº de camadas / corral			
Nº de cerdos / m ²			
Partición (sólida / reja)			
> 1 lote (misma edad) / sala			
Presencia de extractores	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Presencia de paneles de refrigeración	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Aspersores	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Calefacción	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>

4. MATERNIDAD

Porcentaje de mortalidad histórico en el período de lactancia (6 meses).....

Descripción clínica de enfermedades digestivas presentes en maternidad

Signos Clínicos	Marcar con X
Diarrea	
Vómitos	

Otros síntomas (especificar)	
Edad de aparición	
Prevalencia	
Distribución (aleatoria, camadas, salas, etc)	
Duración del cuadro (días)	
Tuvo diagnóstico (como)	

5. RECRÍA

Porcentaje de mortalidad histórico en el período de recría (6 meses).....

Descripción clínica de enfermedades digestivas presentes en recría

Signos Clínicos	Marcar con X
Diarrea	
Vómitos	
Otros síntomas (especificar)	
Edad de aparición	
Prevalencia	
Distribución (aleatoria, camadas, salas, etc)	
Duración del cuadro (días)	
Tuvo diagnóstico (como)	

Anexo 2: Solución de Sheather

Solución de Sheather: (d 1250-1300)

Azucar.....550 g

Agua.....csp 1 l

Anexo 3: Técnica de Ziehl Neelsen modificada

Materiales:

- Alcohol metílico
- Fucsina fenicada
- Decolorante de Ziehl Neelsen: alcohol clorhídrico (HCl 3% en alcohol etílico)
- Azul de metileno al 1%

Procedimiento:

Hacer frotis con una gota del sedimento de materia fecal y dejar secar al aire.

Fijar con alcohol metílico durante 1 minuto y dejar secar al aire.

Cubrir con el colorante primario (fucsina fenicada) durante 5 minutos.

Colocar el frotis en ángulo de 45 grados y decolorar por arrastre.

Enjuagar con agua potable o destilada.

Colorear con el colorante de contraste (azul de metileno) durante 1 minuto.

Enjuagar con agua potable o destilada.

Secar a temperatura ambiente.

Observar al microscopio óptico a 1000X con una gota de aceite de inmersión:

los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. toman un color fucsia intenso y el resto del preparado color azul (incluso levaduras y leucocitos)

Anexo 4: Variables de la encuesta que no se asociaron estadísticamente con el resultado al diagnóstico microscópico ($p \geq 0,05$)

Maternidad:

Flujo	Resultado al MO (ZNM)		Total
	Positivo	Negativo	
Todo dentro/todo fuera	37	333	370
Flujo continuo	0	30	30
Total	37	363	400

$p = 0,06$

Promedio lechones nacidos vivos/cerda/año	Resultado al MO (ZNM)		Total
	Positivo	Negativo	
Óptimo	21	189	210
No óptimo	16	174	190
Total	37	363	400

$p = 0,58$

Peso al destete	Resultado al MO (ZNM)		Total
	Positivo	Negativo	
Óptimo	26	254	280
No óptimo	11	109	120
Total	37	363	400

p=0,97

Baño de pie	Resultado al MO (ZNM)		Total
	Positivo	Negativo	
Óptimo	9	61	70
No óptimo	28	302	330
Total	37	363	400

p=0,25

Vaciado de la fosa	Resultado al MO (ZNM)		Total
	Positivo	Negativo	
Total	28	282	310
Parcial	9	81	90
Total	37	363	400

p=0,78

Frecuencia del vaciado de la fosa	Resultado al MO (ZNM)		Total
	Positivo	Negativo	
Óptimo	6	34	40
No óptimo	31	329	360
Total	37	363	400

p=0,18

Frecuencia del vaciado entre lotes	Resultado al MO (ZNM)		Total
	Positivo	Negativo	
Óptimo	6	84	90
No óptimo	31	279	310
Total	37	363	400

p=0,33

Tipo de piso	Resultado al MO (ZNM)		Total
	Positivo	Negativo	
Óptimo	33	307	340
No óptimo	4	56	60
Total	37	363	400

p=0,45

Presencia de extractores	Resultado al MO (ZNM)		Total
	Positivo	Negativo	
Óptimo	20	230	250
No óptimo	17	133	150
Total	37	363	400

p=0,26

Refrigeración	Resultado al MO (ZNM)		Total
	Positivo	Negativo	
Sí	14	116	130
No	23	247	270
Total	37	363	400

p=0,46

Recría:

Baño de pie	Resultado al MO (ZNM)		Total
	Positivo	Negativo	
Óptimo	0	20	20
No óptimo	10	90	100
Total	10	110	120

p=0,13

Vaciado de la fosa	Resultado al MO (ZNM)		Total
	Positivo	Negativo	
Total	6	74	80
Parcial	4	36	40
Total	10	110	120

p=0,64

Frecuencia de vaciado de la fosa	Resultado al MO (ZNM)		Total
	Positivo	Negativo	
Óptimo	5	45	50
No óptimo	5	65	70
Total	10	110	120

p=0,57

Extractores	Resultado al MO (ZNM)		Total
	Positivo	Negativo	
Si	5	45	50
No	5	65	70
Total	10	110	120

p=0,57

Refrigeración	Resultado al MO (ZNM)		Total
	Positivo	Negativo	
Si	0	30	30
No	10	80	90
Total	10	110	120

p=0,06

Aspersores	Resultado al MO (ZNM)		Total
	Positivo	Negativo	
Si	0	10	10
No	10	100	110
Total	10	110	120

p=0,31

Calefacción	Resultado al MO (ZNM)		Total
	Positivo	Negativo	
Si	5	65	70
No	5	45	50
Total	10	110	120

p=0,57

Diarrea	Resultado al MO (ZNM)		Total
	Positivo	Negativo	
Si	6	70	76
No	4	40	44
Total	10	110	120

$p=0,81$

Anexo 5: Técnica de extracción de ADN (ZR fecal DNA kit. Zymo-USA)**Materiales:**

Tubos de lisis con perlas (ZR Bashing Bead™ Lysis Tubes)

Buffer de unión (Fecal DNA Binding Buffer)

Buffer de pre-lavado (DNA Pre-Wash Buffer)

Buffer de lavado (Fecal DNA Wash Buffer)

Buffer de elución (DNA Elution Buffer)

Filtros con tapa naranja para lisado (Zymo-Spin™ IV Spin Filters)

Columnas para purificación de ADN (Zymo-Spin™ II Columns)

Filtros con tapa verde para purificar ADN (Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filters)

Tubos colectores (Collection Tubes)

Procedimiento:

Preparar los filtros de tapa verde rompiendo la base, colocarlo en un tubo colector y centrifugar a 8000 x g por 3 minutos.

- 1- Añadir hasta 150 mg (o un volumen de 150 µl de muestra concentrada) de materia fecal en el tubo de lisis con perlas. Adicionar buffer fecal DNA.
- 2- Colocar los tubos en un vortex a máxima velocidad por 30 minutos.
- 3- Centrifugar a 10000 x g durante 1 minuto.
- 4- Transferir 400 µl del sobrenadante al filtro de tapa naranja. Colocarlo en un tubo colector y centrifugar a 7000 x g durante 1 minuto.

- 5- Añadir 1200 μ l del buffer de unión al material filtrado en el tubo colector del paso 4.
 - 6- Transferir 800 μ l de la mezcla del paso 5 a una columna de purificación y colocarla dentro de un tubo colector. Centrifugar a 10000 x g durante 1 minuto.
 - 7- Descartar el material que se encuentra en el tubo colector y repetir el paso 6.
 - 8- Añadir 200 μ l del buffer de prelavado a la columna para centrifuga y colocarla en un nuevo tubo colector. Centrifugar a 10000 x g durante 1 minuto.
 - 9- Añadir 500 μ l de buffer de lavado a la columna para centrifuga y centrifugar a 10000 x g durante 1 minuto.
 - 10- Transferir la columna para centrifuga a un microtubo limpio de 1,5 ml y añadir 100 μ l del buffer de elución directamente al centro de la columna. Centrifugar a 10000 x g durante 30 segundos para eluir el ADN.
 - 11- Transferir el ADN eluido del paso 10 a un filtro de tapa verde (previamente preparado), colocarlo en un microtubo de 1,5 ml y centrifugar a 8000 x g durante 1 minuto. El ADN filtrado está apto para realizar PCR.
- Todos los pasos mencionados se realizan en una *sala de extracción* de ADN.

Anexo 6: Técnica de *nested*-PCRPreparación del *master mix* (mezcla madre):

Muestra de ADN: 1 μ l

10X PCR buffer: 2,5 μ l

BSA: 2,5 μ l (stock 200 μ g/ml)

MgCl₂: 3.0 mM

Concentración primer F (externo e interno): 0,50 μ M

Concentración primer R (externo e interno): 0,50 μ M

Nucleótidos (dNTPs): 250 μ M

Taq ADN polimerasa: 0,25 μ l (stock 5 U/100 μ l)

Agua ultrapura: hasta completar el volumen final de 25 μ l

Cálculo para la reacción: cada componente (excepto el ADN) se multiplica por el total de muestras a procesar más el control positivo, control de extracción y NTC. Se adiciona 1 muestra remanente para el cálculo cada 10 muestras para evitar falta de volumen por error de pipeta.

Procedimiento:

Ciclo externo: La mezcla se prepara en la *sala de master mix*, en un tubo de 1,5 ml. Las soluciones se mantienen en un soporte con hielo hasta la carga en el termociclador.

La mezcla se fracciona en tubos de 0,2 ml a razón de 23 μ l por tubo.

Se carga el ADN en la *sala de extracción*

Se cargan los tubos en el termociclador (T18, IVEMA, Argentina).

Ciclo interno: se prepara el *master mix* siguiendo los pasos del ciclo externo, se fracciona cargando 24 μl en cada tubo a los que luego se le agrega 1 μl del ADN amplificado en una cabina de bioseguridad.

Los programas utilizados en el termociclador son los siguientes:

***n*PCR género-específica:** (ciclo externo e interno)

Desnaturalización inicial: 94°C 4 min

Desnaturalización: 94°C 45 seg	} 35 ciclos
<i>Annealing</i> : 55°C 45 seg	
Extensión: 72°C 1 min	
Extensión final: 72°C 7 min	

PCR especie-específica:

Desnaturalización inicial: 94°C 4 min

Desnaturalización: 94°C 45 seg	} 35 ciclos
<i>Annealing</i> : 62°C 45 seg	
Extensión: 72°C 1 min	
Extensión final: 72°C 7 min	

Anexo 7: Preparación de geles de agarosa y electroforesisSolución de buffer Tris borato EDTA (TBE):

Solución madre (5 X):

Tris base.....54 g

Ácido bórico.....27,5 g

EDTA 0.5 M (pH 8).....20 ml

Agua destilada.....csp. 1000 ml

La solución se mantiene en frasco de vidrio a temperatura ambiente.

La solución de trabajo se prepara con la solución madre al 0,5X (madre diluida 10 veces) en agua destilada.

Gel de agarosa al 1.5%:

Para preparar un gel de 17 calles:

Agarosa (Biodynamics, N° de Catálogo B030).....0,6 gr

Buffer TBE 0.5%.....40 ml

SYBR Safe DNA gel stain.....4 μ l

(Invitrogen, Catálogo N°de Catálogo s33102)

Pesar la agarosa y colocarla en un Erlenmeyer. Agregar el buffer TBE y llevar a microondas a potencia máxima hasta que comience la ebullición. Sacar del microondas y agitar suavemente hasta su completa disolución. Dejar entibiar y agregar el colorante SYBR Safe DNA, homogeneizar. Volcar el contenido en el

molde para preparar el gel, colocar el peine y esperar hasta su gelificación completa protegido de la luz. Luego extraer el peine para poder sembrar las muestras.

Siembra de las muestras:

- Para el revelado de la PCR: homogeneizar 10 μ l de la muestra con 2 μ l de buffer de muestra coloreado (Byodinamics, N^o de Catálogo BO60) y luego cargar en la calle del gel. Repetir el mismo procedimiento para cada muestra y para el marcador de peso molecular, (Cienmarker, Byodinamics, 100 a 1000 pb). Para las muestras a las que luego se les realizará purificación, se homogenizan 25 μ l de muestra con 5 μ l de buffer.
- Colocar el gel en una cuba electroforética horizontal y llenarla con buffer TBE 0,5 X, controlando que cubra completamente el gel.
- La corrida electroforética se realiza a 120 voltios durante 30 minutos o hasta que el colorante haya migrado de acuerdo al peso molecular buscado.
- El gel se observa en cuarto oscuro, en transiluminador de luz azul que pone en evidencia los fragmentos de ADN.

Anexo 8: Purificación de ADN para geles de agarosa (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System)

Reactivos para 50 muestras:

Solución buffer de membrana (Membrane Binding Solution).....	20ml
Solución de lavado (Membrane Wash Solution).....	15ml
Agua libre de nucleasas (Nuclease-Free Water).....	3,75ml
Minicolumnas (Wizard® SV Minicolumns).....	50
Tubos colectores de 2 ml (Collection Tubes).....	50

Procedimiento:

1. Luego de la electroforesis, cortar cada una de las bandas de ADN del gel y colocarlas en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. Pesar en balanza de precisión.
2. Agregar 10 µl de solución buffer de unión de membrana cada 10 mg de gel, homogeneizar en vortex e incubar a 50-65°C hasta que la porción de gel quede completamente disuelto.
3. Insertar una minicolumna en un tubo colector.
4. Transferir la preparación de gel disuelto a la minicolumna e incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
5. Centrifugar a 16000 x g durante 1 minuto. Descartar el filtrado y reinsertar la minicolumna en el tubo colector.

6. Añadir 700 μ l de solución de lavado. Centrifugar a 16.000 x g durante 1 minuto. Descartar el filtrado y reinsertar la minicolumna en el tubo colector.
7. Repetir el paso 6 con 500 μ l de solución de lavado. Centrifugar a 16.000 x g durante 5 minutos.
8. Vaciar el tubo colector y centrifugar nuevamente la columna por 1 minuto.
9. Transferir cuidadosamente la minicolumna a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml
10. Agregar 25-50 μ l de agua libre de nucleasas a la minicolumna. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar a 16000 x g por 1 minuto.
11. Descartar la minicolumna y mantener el ADN a 4°C o -20°C.