

**FACTORES DE RIESGO EN GANADO LECHERO Y ESTRATEGIAS
PARA MITIGAR LA TRANSMISIÓN HÍDRICA DE OOQUISTES DE**

***Cryptosporidium* spp.**

Laura Beatriz Modini, Beatriz Lerman, Ana Valeria Pizarro y Mariel Guadalupe Zerbato

RESUMEN

Teniendo en cuenta el riesgo que significa para la salud humana la presencia de *Cryptosporidium* en fuentes de agua contaminadas con estiércol de ganado vacuno, se propuso: a) determinar la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en terneros de establecimientos de la cuenca lechera de la provincia de Santa Fe, Argentina, y los factores de riesgo potenciales asociados a la excreción de ooquistes de este enteroparásito, y b) evaluar su inactivación en estiércol mediante compostaje y digestión anaeróbica. Para cumplir con estos objetivos se recolectaron heces de 367 terneros. Las muestras se concentraron por el método de Sheather y los ooquistes fueron identificados por la técnica de Kinyoun. Las condiciones higiénico-sani-

tarias y de explotación de cada establecimiento fueron registradas y evaluadas como potenciales factores de riesgo. Para estudiar la inactivación de *Cryptosporidium* en el estiércol se trabajó a escala de laboratorio, reproduciendo las condiciones del compostaje en hilera y la digestión convencional anaeróbica. Se determinó la viabilidad mediante desenquistación *in vitro* antes y después de cada tratamiento. *Cryptosporidium* se halló en el 89% de los tambos y el 28,5% de los terneros analizados. Los factores asociados con el riesgo de infección fueron: edad, tipo de crianza, estado del suelo y convivencia con otros animales. El compostaje y la digestión anaeróbica resultaron efectivos en la inactivación de ooquistes.

Introducción

Cryptosporidium es un parásito zoonótico que causa enfermedad entérica en muchas especies de mamíferos incluyendo al hombre (Del Coco *et al.*, 2008). El ooquiste es la forma infectante del parásito, un estadio de su ciclo de vida que lo

capacita para sobrevivir y diseminarse en el ambiente. Si bien el riesgo de infección a partir de alimentos no debe ser descartado, el agua contaminada con heces humanas o animales es la vía más importante de transmisión ambiental (Lerman *et al.*, 1999). La gran magnitud de algunas epidemias

(MacKenzie *et al.*, 1995), la afectación preferente en la infancia y en personas malnutridas e inmunodeficientes, así como la capacidad de este protozoo de resistir más a los factores ambientales y a la desinfección que las bacterias indicadoras de contaminación fecal, deben alertar sobre su importancia

como problema de salud en la comunidad.

El ganado vacuno es una de las fuentes principales de infección por *Cryptosporidium* spp. (Del Coco *et al.*, 2009). Para evaluar la magnitud del problema, se debe tener en cuenta que una vaca lechera produce diariamente 8% de su peso vivo en heces (Céspedes

PALABRAS CLAVE / Compostaje / *Cryptosporidium* / Estiércol Vacuno / Inactivación / Reactor Anaeróbico /

Recibido: 27/11/2014. Modificado: 30/10/2015. Aceptado: 03/11/2015.

Laura Beatriz Modini: Bioquímica y Candidata a Doctora en Química, Universidad Nacional del Litoral (UNL), Argentina. Docente-Investigadora, UNL, Argentina. Dirección: Sección Aguas, Departamento de

Ciencias Biológicas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Ciudad Universitaria, Ruta Nacional N° 168, km 472, CC 242, CPA S3000ZAA, Santa Fe, Argentina. e-mail: lauramodini@hotmail.com

Beatriz Lerman. Bioquímica. UNL, Argentina. Profesora-Investigadora, UNL, Argentina.
Ana Valeria Pizarro. Tesista, Carrera de Licenciatura en Biotecnología, UNL, Argentina.

Mariel Guadalupe Zerbato. Licenciada en Biotecnología y Magíster en Salud Ambiental, UNL, Argentina. Docente-Investigadora, UNL, Argentina.

RISK FACTORS IN DAIRY CATTLE AND STRATEGIES TO MITIGATE THE WATERBORNE TRANSMISSION OF *Cryptosporidium* spp. OOCYSTS

Laura Beatriz Modini, Beatriz Lerman, Ana Valeria Pizarro and Mariel Guadalupe Zerbatto

SUMMARY

Given the risk posed to human health by the presence of *Cryptosporidium* in water sources contaminated with cattle manure, it was proposed: a) to determine the prevalence of *Cryptosporidium* spp. in calves from farms of a dairy area of the province of Santa Fe, Argentina, and the potential risk factors associated to infection for this enteroparasite, and b) to evaluate its inactivation in manure through composting and anaerobic digestion. Feces from 367 calves were collected. Samples were concentrated by the method of Sheather and oocysts were identified by the technique of Kinyoun. The sanitary hygienic and exploitation conditions

of each establishment were recorded and evaluated as potential risk factors. The study of inactivation of *Cryptosporidium* in manure was carried out at laboratory scale, reproducing the conditions of windrow composting and conventional anaerobic digestion. Viability was determined by excystation in vitro before and after each treatment. *Cryptosporidium* was found in 89% of dairy farms and 28.5% of studied calves. Factors associated with the risk of infection were age, type of rearing, soil conditions and coexistence with other animals. Composting and anaerobic digestion were effective in inactivating oocysts.

FATORES DE RISCO EM GADO LEITEIRO E ESTRATÉGIAS PARA MITIGAR A TRANSMISSÃO PELA ÁGUA DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp.

Laura Beatriz Modini, Beatriz Lerman, Ana Valeria Pizarro e Mariel Guadalupe Zerbatto

RESUMO

Dado o risco que representam para a saúde humana a presença de *Cryptosporidium* nas fontes de água contaminadas com esterco bovino, foi proposto: a) determinar a prevalência de *Cryptosporidium* spp. em de bezerras de fazendas localizadas na Bacia Leiteira da província de Santa Fe, Argentina, e os potenciais fatores de risco associados à infecção por este enteroparasito, b) avaliar a sua inativação em esterco através da compostagem e digestão anaeróbia. Para atender estes objetivos 367 fezes de bezerras foram coletadas. As amostras foram concentradas pelo método de Sheather e os oocistos foram identificadas pela técnica de Kinyoun. As condições higiênico-sanitárias e de

funcionamento de cada estabelecimento foram registradas e avaliadas como potenciais fatores de risco. Para estudar a inativação de *Cryptosporidium* no estrume, foi trabalhado em escala de laboratório, reproduzindo as condições de compostagem em leira e digestão anaeróbia convencional. A viabilidade foi determinada pela excitação in vitro antes e depois de cada tratamento. *Cryptosporidium* foi encontrado em 89% das fazendas e 28,5% dos bezerras testados. Fatores associados ao risco de infecção foram: idade, tipo de criação, condições do solo e convivência com outros animais. Compostagem e digestão anaeróbia foram eficazes na inativação de oocistos.

y Cofré, 2006). Por otro lado, el ganado infectado puede excretar entre 1×10^6 y 1×10^7 ooquistes/g de materia fecal durante el período de máxima eliminación (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Estos enteroparásitos presentes en el estiércol pueden alcanzar las fuentes de agua potable por escurrimiento o por lixiviación (Modini *et al.*, 2010). En 2005 se notificaron 7960 casos de criptosporidiosis en 16 países de Europa. En varios de ellos, al realizar la investigación epidemiológica y ambiental, se detectaron prácticas agro-ganaderas en las proximidades de la fuente proveedora de agua que podrían haber provocado su contaminación con estiércol animal (Semenza y Nichols, 2007). Ocampo *et al.* (2012) han hallado, por la técnica de biología molecular, que

Cryptosporidium parvum es la especie más frecuente en el ganado infectado. Al ser la única especie proveniente de estos animales que puede infectar al hombre, se resalta la importancia de las aguas de escorrentía contaminada con heces de ganado en la transmisión hídrica de esta enteroparasitosis.

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, 2006) promulgó una regla (LT2ESWTR) para lograr una protección adicional frente al *Cryptosporidium*. Ésta requiere implementar una barrera múltiple a fin de imposibilitar que llegue al agua de bebida humana. Como primera etapa, es esencial impedir que la fuente de agua constituya un riesgo para la ocurrencia de ooquistes. El tratamiento del estiércol antes

de que alcance los recursos hídricos representaría una gestión adecuada para evitar esta transmisión zoonótica. Las tecnologías de compostaje y la digestión anaeróbica podrían cumplir con tal fin.

El compostaje aeróbico es un proceso biológico que estabiliza la materia orgánica y destruye microorganismos patógenos, permitiendo su utilización como enmienda de suelos. Una de las técnicas usualmente empleadas es el sistema en hilera debido a su sencillez, menor inversión inicial y fácil mantenimiento. En el campo, el material se dispone en grandes montículos de 2-4m de altura, que pueden o no estar cubiertos. La aireación se lleva a cabo por convección natural ayudada por volteos periódicos que se realizan en forma manual

(pequeña escala) o mecánica. En el compostaje en hilera la fermentación puede obtenerse en tres o cuatro semanas (Tchobanoglous *et al.*, 1998).

Los digestores anaeróbicos convencionales para la estabilización de aguas negras están constituidos por tanques cerrados con provisiones para mezclar, calentar o recolectar el biogás generado, pudiendo estar equipados también con controles de pH (Winkler, 1999). En el reactor de mezcla completa se mantiene la distribución uniforme de concentraciones, tanto de sustrato como de microorganismos, lo cual se consigue mediante un sistema de agitación (Campos *et al.*, 2005). Los lodos digeridos se pueden utilizar como fertilizantes y además, durante la digestión se produce biogás con un alto porcentaje de metano (50-70%),

aprovechable como energía mediante combustión.

Teniendo en cuenta el riesgo que significa la presencia de *Cryptosporidium* en el estiércol vacuno y su consecuente transmisión hídrica se propuso: a) determinar la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en terneros de establecimientos de la cuenca lechera Santafesina y analizar los factores de riesgo potenciales asociados a la excreción de ooquistes de este enteroparásito, y b) evaluar su inactivación en estiércol mediante compostaje y digestión anaeróbica. De esta manera se pretende contribuir a minimizar el impacto que las actividades ganaderas pueden ocasionar a los recursos hídricos.

Materiales y Métodos

Se analizaron 367 muestras de materia fecal de terneros (1-60 días de edad) de 9 tambos, situados en el Departamento Las Colonias, perteneciente a la principal cuenca lechera de la provincia de Santa Fe, Argentina. Se registraron las características higiénico-sanitarias y las condiciones de explotación de cada establecimiento, como información necesaria para determinar los factores que podrían contribuir potencialmente a la infección en los tambos.

Obtención y procesamiento de las muestras

Las muestras de materia fecal, una por cada animal, se obtuvieron por la maniobra de estimulación del esfínter anal y se recolectaron en recipientes estériles individuales, manteniéndose refrigeradas hasta su procesamiento. Junto con las muestras fue remitida una planilla conteniendo los siguientes datos: procedencia (tambo), número de identificación, edad, sexo y características de las excretas de los terneros. De acuerdo a su consistencia las heces se clasificaron en: diarreicas (líquidas y semilíquidas) o normales (formadas y pastosas). En el laboratorio, las heces fueron concentradas por el método de Sheather (García, 2007), previo filtrado a través

de gasa doble y lavado con solución fisiológica. Con el sedimento obtenido se prepararon extendidos y colorearon con la técnica de Kinyoun (Henriksen y Pohlenz, 1981). Para detectar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se utilizó un microscopio óptico (aumentos 400× y/o 1000×). La identificación de los ooquistes se llevó a cabo teniendo en cuenta su tamaño, coloración y características morfológicas.

Preparación de una suspensión de ooquistes de *Cryptosporidium*

Se preparó una suspensión del orden de 1×10^6 ooquistes/ml en agua destilada. Para ello, se concentraron las heces que resultaron positivas para *Cryptosporidium* y se cuantificó por el método de Breed con coloración de Kinyoun (Henriksen y Pohlenz, 1981).

Compostaje

Materia fecal de ganado vacuno no infectado con este enteroparásito fue mezclada con residuos de jardín (hojas caídas recientemente) triturados. La proporción fue la necesaria para obtener una relación carbono/nitrógeno (C/N=40), óptima para el compostaje aeróbico (Tchobanoglous *et al.*, 1998). Cada pila a compostar (~200g) se inoculó con 1ml de la suspensión de ooquistes, cuya viabilidad se determinó previamente. Una alícuota de la misma suspensión se conservó a 4°C y sirvió como control para verificar que no ocurran cambios en la viabilidad por otros factores ajenos al tratamiento. El sistema de compostaje empleado fue el de hilera con volteo manual cada 2 o 3 días a fin de introducir aire y mantener la actividad de los microorganismos aeróbicos.

Las pilas de material a compostar, contenidas en bandejas individuales (n=3), se colocaron en una estufa con ventilación forzada y la temperatura fue modificada a fin de imitar la variación que se produce a

escala real de acuerdo a la Figura 1 (Tchobanoglous *et al.*, 1998). Se resalta que la fase termofílica (temperaturas >55°C) se mantuvo durante un período de 15 días, de acuerdo a los requerimientos de la EPA (2003) para el control adicional de patógenos (PRAP). El proceso completo tuvo una duración de 21 días.

Diariamente se controló la temperatura en el centro del montículo con un termómetro digital. A fin de mantener la humedad necesaria (50-60%) para la efectividad de este sistema se le adicionó agua, realizándose la comprobación de su contenido mediante la 'prueba del puño', que consiste en tomar el material en la mano y comprimirlo, observando que no se elimine agua y se forme un puñado que no se desmorone (Palmero Palmero, 2010). Al final del proceso, el material compostado se concentró por el método de Sheather para recuperar los ooquistes y determinar su viabilidad. Adicionalmente, se midió el pH y se comprobó la estabilización de la materia orgánica mediante el contenido de sólidos volátiles a un compost no inoculado con parásitos y procesado en idénticas condiciones a los de prueba.

Digestión anaeróbica

Se utilizó un reactor anaeróbico a escala de laboratorio de 2 litros de capacidad con agitación controlada (mezcla perfecta) a 37°C, alimentado con estiércol diluido (8%). Se monitoreó la evolución del gas (gasómetro flotante), pH y temperatura interna del digestor. Cuando fue necesario, se corrigió el pH con el agregado de NaOH 0,1N. Una vez estabilizados estos parámetros, se sembró con 1ml de la suspensión de ooquistes cuya viabilidad se estableció previamente. Alícuotas

(50 ml) del contenido del reactor se removieron a los 3, 4, 8, 14 y 23 días de tratamiento y se concentraron por el método de Sheather para luego determinar su viabilidad final.

Determinación de la viabilidad de los ooquistes

La evaluación de la viabilidad se llevó a cabo por una técnica de desenquistación *in vitro* en solución salina balanceada de Hank con 1% bilis e incubando en atmósfera de 10% CO₂. Estas condiciones son las que recrean más ajustadamente lo que sucede *in vivo* con los ooquistes en el medio intestinal (Pesani *et al.*, 1998). El porcentaje de viabilidad se calculó mediante el recuento (método de Breed con coloración de Kinyoun) del número de ooquistes/ml antes (n_i) y después del desenquistamiento (n_f), aplicando la Ec. 1:

$$\text{Viabilidad (\%)} = n_i / n_f \times 100$$

donde n_i: recuento inicial de ooquistes (viables y no viables), y n_f: recuento final de ooquistes (no viables). Los ooquistes no desenquistados se consideraron no viables. Todos los recuentos se realizaron por triplicado.

Análisis de Datos

Se calcularon proporciones para tener una aproximación al valor de la prevalencia. La comparación de la variable edad para los grupos de muestras independientes: presencia y ausencia de *Cryptosporidium* se realizó con la prueba t de Welch debido a la falta de homogeneidad de varianza. En

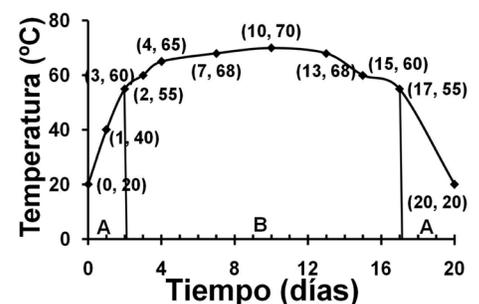


Figura 1: Variación de temperatura típica del compostaje en hilera.

base a la observación de los cuartiles de la distribución de edad de los terneros infectados y no infectados, se agrupó a los animales por edad, tomando intervalos de 15 días: 1) ≤ 15 días, 2) 16-30 días, 3) 31-45 días, 4) >45 días. Las relaciones entre variables cualitativas o cuantitativas se realizaron con la prueba de χ^2 o la exacta de Fisher cuando el valor esperado por celda fue <5 y se refrendaron con la prueba de razón de verosimilitud. La asociación entre infección por *Cryptosporidium* y presencia de diarrea se cuantificó a través del riesgo relativo (RR), calculado como $RR = \text{proporción de infección en terneros diarreicos} / \text{proporción de infección en terneros no diarreicos}$. Los factores de riesgos potenciales asociados a la excreción de este parásito (condiciones higiénico-sanitarias y de explotación de los tambos) se evaluaron mediante el riesgo relativo ($RR = \text{proporción de infección en terneros expuestos} / \text{proporción de infección en terneros no expuestos}$). Para una mejor estimación del riesgo se halló también su intervalo de confianza del 95% ($IC_{95\%}$), considerándolo significativo si dicho intervalo no contiene el 1. En los ensayos

de inactivación, la comparación entre las variables evaluadas se realizó mediante la prueba t de Student. El nivel de significación adoptado fue $\alpha=0,05$. Los datos fueron procesados utilizando el software SPSS (v. 19.0) y EPI-INFO (v. 3.5.3).

Resultados y Discusión

Prevalencia de terneros infectados con *Cryptosporidium*

Cryptosporidium spp. se halló en 88,9% (8/9) de los tambos y en 27,8% (102/367) de los terneros analizados. De acuerdo con la bibliografía consultada (Pulido-Medellín *et al.*, 2014), la prevalencia de excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* en distintas partes del mundo es variable según las condiciones climáticas, edad de los animales y manejo sanitario de la explotación. En Europa varía de 15 a 83% y en América de 10 a 75%. Del Coco *et al.* (2008), en un establecimiento de la provincia de Buenos Aires, Argentina, reportó una prevalencia de infección de 17% en terneros menores de 30 días.

Al estudiar la relación entre infección por *Cryptosporidium* y la edad de los terneros, se observó que existía mayor

dispersión de edad en el grupo de los negativos, mientras el 75% de los terneros positivos tenía menos de 18 días, resultando las edades de estos 2 grupos significativamente diferentes ($p<0,001$). En la Tabla I se presenta la proporción de infección por *Cryptosporidium* en cada grupo etario. El mayor porcentaje se halló en los terneros menores de 15 días (52,5%), mientras en el grupo de animales mayores a 45 días, sólo uno resultó infectado (1,8%). Además, al comparar la proporción de infectados en cada grupo, se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,001$). Se decidió continuar con el análisis tomando intervalos más pequeños en días. Así, se encontraron ooquistes de *Cryptosporidium* en la materia fecal del 14,7% (5/34) de los terneros menores de ocho días. En el grupo entre 8 y 14 días de edad estaba infectado el 82,5% (33/40) y el 42,2% (19/45) de los animales en el intervalo etario de 15 a 21 días. Como se destaca, la mayor proporción de infección se encuentra en la segunda semana de vida, en coincidencia con lo señalado por otros autores (Díaz de Ramírez *et al.*, 2007). En este análisis no se incluyeron los terneros de edad desconocida.

Prosiguiendo con este estudio, se calculó la proporción de *Cryptosporidium* spp. según la consistencia de la materia fecal, hallándose que el 48,7% (55/113) de las calificadas como diarreicas presentaba este enteroparásito, mientras que en las heces normales sólo se detectaron ooquistes en el 18,5% (47/254). Se encontró una relación significativa entre infección por *Cryptosporidium* spp.

y la consistencia de la heces ($p<0,001$). Conjuntamente, la asociación entre excreción de *Cryptosporidium* spp. y presencia de diarrea reveló un $RR=2,464$ con $IC_{95\%}=1,844-3,291$.

En la Tabla II se presenta el análisis de la relación entre infección por *Cryptosporidium* spp. y la ocurrencia o no de diarrea según la edad. En todos los grupos etarios, la proporción de infección en los terneros con diarrea fue mayor con respecto a aquéllos cuyas heces presentaban consistencia normal. Sin embargo, el RR sólo resultó significativo en los terneros menores de 15 días.

Por otro lado, los terneros con diarrea en cuyas heces no se hallaron ooquistes, podrían sugerir la presencia de otros enteropatógenos (cepas patógenas de *Eschericia coli*, *Salmonella* spp., rotavirus, coronavirus bovino) (Quílez *et al.*, 1996) o problemas metabólicos causantes de tal sintomatología.

Factores de riesgo asociados a la infección por *Cryptosporidium*

Las características higiénico-sanitarias y de explotación de los tambos que fueron evaluadas como posibles factores de riesgo de infección se presentan en la Tabla III. Aquellos relacionados con un aumento del riesgo fueron: la crianza en estaca (respecto a la crianza en jaula), la convivencia con otros animales (ovinos, cerdos, ratones y otras especies de mamíferos) y el mal estado del suelo (presencia de barro y/o agua o bosta). El tiempo de permanencia con la madre ($\leq 12h$, $>12h$) y el uso de agua de perforación o red, no resultaron estadísticamente significativos. Los factores asociados a una disminución del riesgo incluyeron: separación de terneros por edad, calostrado dirigido-manual (respecto del natural), rotación de los lugares destinados a la cría de los terneros (guacheras) y presencia de sombra o algún tipo de reparo para los animales.

Sistemas de manejo que favorecen el contacto entre becerros estarían asociados con el

TABLA I
AGRUPACIÓN DE LOS TERNEROS POR RANGO DE EDADES: PROPORCIÓN DE INFECCIÓN POR *Cryptosporidium* spp.

Intervalos de edades (días)	Número de terneros estudiados	Número de terneros infectados	Proporción de infección (%) ¹
≤ 15	80	42	52,5 ^a
16 a 30	86	17	19,8 ^b
31 a 45	102	6	5,9 ^c
>45	56	1	1,8 ^d

¹ Letras distintas indican diferencia significativa ($p<0,001$).

TABLA II
PORCENTAJE DE INFECCIÓN POR *Cryptosporidium* spp. EN TERNEROS MENORES DE 45 DÍAS CON Y SIN DIARREA AGRUPADOS POR RANGO DE EDADES: CÁLCULO DEL RIESGO RELATIVO (RR) Y SU INTERVALO DE CONFIANZA DE 95% ($IC_{95\%}$)

Intervalos de edad (días)	Terneros con diarrea			Terneros sin diarrea			RR	$IC_{95\%}$
	n	Infectados (%)	No infectados (%)	n	Infectados (%)	No infectados (%)		
≤ 15	31	80,6	19,4	49	34,7	64,0	2,323	1,526-3,542*
16 - 30	32	28,1	71,9	54	14,8	85,2	1,899	0,815-4,424
31 - 45	27	11,1	88,9	75	4,0	96,0	2,775	0,596-12,940

* Indica significancia a $p<0,001$.

TABLA III
ANÁLISIS DE FACTORES DE RIESGO DE INFECCIÓN POR *Cryptosporidium* spp. EN TAMBOS

		Terneros Infectados/estudiados	%	RR	IC _{95%}	p
Convivencia con otros animales	si	40/68	58,8	2,883	2,137-3,890	<0,001
	no	61/299	20,4			
Tipo de crianza	estaca	73/213	34,3	1,885	1,285-2,765	0,001
	jaula	28/154	18,2			
Tipo de calostrado	dirigido	55/253	21,7	0,539	0,390-0,744	<0,001
	natural	46/114	42,1			
Tiempo de permanencia con la madre (horas)	≤12	44/192	22,9	1,490	0,922-2,406	0,097
	>12	20/130	15,4			
Estado del suelo	malo	40/68	58,8	2,883	2,137-3,890	<0,001
	bueno	61/299	20,4			
Separación por edad	si	55/256	21,5	0,518	0,376-0,715	<0,001
	no	46/111	41,4			
Rotación de terneros	si	39/195	20,0	0,555	0,393-0,783	0,001
	no	62/172	36,0			
Fuente de agua	red	6/31	19,4	1,100	0,481-2,514	0,822
	perforación	19/108	17,6			
Sombra	si	38/173	22,0	0,676	0,478-0,956	0,024
	no	63/194	32,5			
Reparo	si	57/273	20,9	0,446	0,325-0,602	<0,001
	no	44/94	46,8			

RR: riesgo relativo, IC_{95%}: intervalo de confianza de 95%, p: nivel de significancia.

riesgo de infección, ya que se incrementa la probabilidad de transmisión del parásito entre animales infectados y susceptibles (Díaz de Ramírez, 2002). Cuando se compararon los sistemas de crianza artificial, jaula vs estaca, el primero resultó más efectivo a la hora de disminuir el riesgo de infección por *Cryptosporidium*. Esto podría deberse a que el uso de compartimentos individuales evitaría que los terneros entren en contacto directo y se propague la infección. Asimismo, las jaulas proveen de reparo. La presencia de sombra y/o reparo disminuirían el riesgo de contraer la infección al reducir el estrés que provocan tanto la exposición a la radiación solar directa en el verano como el frío asociado a precipitaciones prolongadas en invierno (Osacar y Berra, 2008).

La convivencia con otros animales de cría susceptibles de infección con *Cryptosporidium* también favorecería la difusión de esta parasitosis (Díaz de Ramírez 2002). Otro factor que resultó significativamente asociado al riesgo de infección fue el estado del suelo. Los terneros necesitan un ambiente seco, limpio y libre de corrientes de aire. Condiciones inadecuadas del suelo pueden provocar que los animales se lesionen y/o sufran infecciones, disminuyendo el

estado inmunitario de los mismos y haciéndolos más susceptibles a la infección. Además, los ooquistes pueden permanecer viables en el agua y el suelo húmedo durante largos periodos, potenciando la diseminación del patógeno.

Al momento del nacimiento, el ternero no tiene inmunidad o 'defensas' para enfrentar los microorganismos del medio ambiente. El calostro producido por la madre contiene inmunoglobulinas y podrá absorberlas (inmunidad pasiva) en la medida que lo ingiera dentro del primer día de vida. Por esta razón, resulta de importancia asegurar un correcto calostrado. Si en el término de una hora luego del nacimiento el ternero no mamó el calostro, se debiera realizar un calostrado dirigido, ordeñando y dando al menos 4 litros durante las

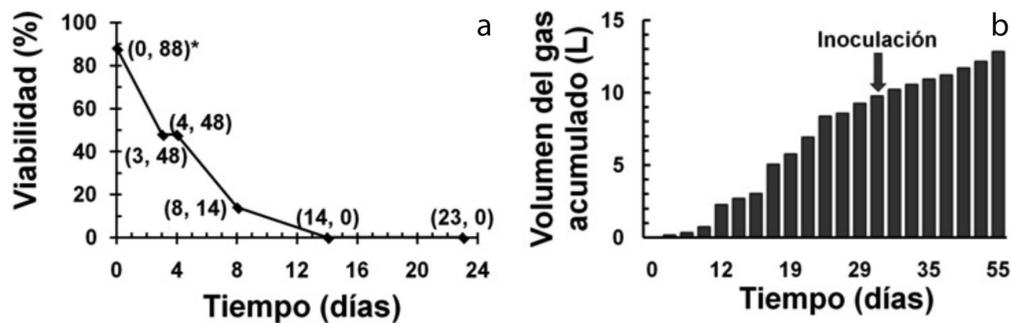
primeras 6 a 8h de vida (Lanuza, 2006). Algunos de los tambos estudiados, contaban además con bancos de calostro. La separación de terneros por edad disminuiría la probabilidad de infección, debido a que, como se determinó, existe asociación entre edad y excreción de *Cryptosporidium*. Otra práctica efectiva para controlar el contagio es la rotación de los espacios de cría, ya que permite un intervalo de descanso que posibilitaría la destrucción de los parásitos.

Ensayos de compostaje

Al comienzo de estas experiencias, la viabilidad inicial promedio fue superior a 94%, hallándose al término de las mismas (21 días) valores que variarían en un intervalo de 18% hasta la reducción total,

significativamente inferiores a los del inicio (p<0,05). Durante este mismo periodo, no se observaron cambios en la viabilidad de los ooquistes en la suspensión control. El pH se mantuvo entre 6-8. Los sólidos volátiles se redujeron 30%.

Alguno de los factores que pueden haber contribuido a la pérdida de viabilidad de los ooquistes en el compost son: temperatura-tiempo de exposición y concentración de amoníaco. Van Herk *et al.* (2004) ensayaron la viabilidad de *Cryptosporidium* en compostaje en hilera, logrando la inactivación total de los ooquistes luego de 42 y 56 días utilizando estiércol vacuno mezclado con paja de cebada y con aserrín, respectivamente. Durante la descomposición de la materia orgánica a pH elevado se puede liberar amoníaco, quedando



*(x, y) = (Tiempo, porcentaje de viabilidad correspondiente al promedio de tres recuentos)

Figura 2: Reactor anaeróbico: disminución de viabilidad en el tiempo (a) y evolución del biogás generado (b).

los ooquistes expuestos a este gas. Jenkins *et al.* (1998) reportaron que una alta concentración de amoníaco libre puede inactivar estos parásitos. No obstante, las concentraciones de amoníaco comúnmente halladas en el estiércol tendrían sólo un efecto leve sobre los ooquistes. Además, las temperaturas muy elevadas tenderían a enmascarar la acción del amonio (Finstein, 1989).

En el presente trabajo el pH fue menor a 8. De ese modo se logra mantener la calidad del compost como abono al evitar la pérdida de nitrógeno, reconocido como excelente fertilizante de suelos.

Ensayos de digestión anaeróbica

En esta experiencia se observó una reducción significativa de la viabilidad ($p < 0,05$). La viabilidad inicial de los ooquistes fue 88,3% y disminuyó un 40,0% al tercer día de exposición, lográndose una inactivación total a los 14 días (Figura 2a). El pH alcanzado en estado estacionario fue 7,21-7,34. El volumen acumulado de gas al día 23 fue 12,83 litros (promedio: 0,45 l/día luego de la estabilización del reactor; Figura 2b). Además se comprobó la combustibilidad del biogás generado, lo cual permite su uso como energía.

Conclusiones

El ganado vacuno representa un reservorio significativo de infección en los tambos y plantea un riesgo para la salud pública, asumiendo que las especies excretadas son zoonóticas. Este trabajo muestra que *Cryptosporidium* se encuentra presente en heces de terneros con pocas semanas de vida y podría ser un agente causal de diarrea. Por lo tanto, las medidas emprendidas para reducir la morbilidad y la difusión de *Cryptosporidium*, deberían estar dirigidas hacia este grupo de alto riesgo.

No se han encontrado reportes de estudios realizados para

comprobar la eficacia de la implementación del compostaje y la digestión anaeróbica en la eliminación de microorganismos resistentes como *Cryptosporidium*. En el presente estudio, estos procesos biotecnológicos resultaron ser efectivos para inactivar los ooquistes de *Cryptosporidium* en el estiércol vacuno y por lo tanto contribuirían a mitigar la contaminación de los recursos hídricos por estos enteroparásitos. Se puede lograr así que, a partir de un residuo potencialmente perjudicial, se generen productos rentables (compost y biogás) con beneficios ambientales, económicos y sociales que permiten avanzar hacia un desarrollo sostenible de la actividad pecuaria.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado en el marco de los proyectos CAI+D que financia la Universidad Nacional del Litoral (Argentina).

REFERENCIAS

Campos E, Elías X, Flotats X (2005) Procesos biológicos: la digestión anaeróbica y el compostaje. En Castells XE, Díaz de Santo (Eds.) *Tratamiento y Valorización Energética de Residuos*. Díaz de Santo. Madrid, España. pp. 617-658.

Céspedes CL, Cofré P (2006) Transforme el residuo de su lechería en abono orgánico compuesto o compost. *Informativo Agropecuario, Bioleche. INIA Quilamapu*. www2.inia.cl/medios/quilamapu/pdf/bioleche/Boletin146.pdf (Cons. 01/10/2014).

Cordero del Campillo M, Rojo FA, Martínez A, Sánchez C, Hernández S, Navarrete J, Diez P, Quiroz H, Carvalho M (1999) *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill. Madrid, España. 968 pp.

Del Coco VF, Córdoba MA, Basualdo JA (2008) *Cryptosporidium* infection in calves from a rural area of Buenos Aires, Argentina. *Vet. Parasitol.* 158: 31-35.

Del Coco VF; Córdoba MA, Basualdo JA (2009) Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. *Rev. Arg. Microbiol.* 41: 185-196.

Díaz de Ramírez A (2002). Sanidad Animal: Criptosporidiosis en

el ganado bovino. En *Memorias del XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal*. ULA. Trujillo, Venezuela. pp. 1-10.

Díaz de Ramírez A, Ramírez Iglesia LN, Morillo Luque JG, Barreto Bastidas AJ (2007) Infección con *Cryptosporidium* sp. y su asociación con diarrea en becerros de ganadería de doble propósito. *Zootecn. Trop.* 25: 29-36.

EPA (2003) *Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge*. EPA/625/R-92/013. Environmental Regulations and Technology. United States Environmental Protection Agency. Cincinnati, OH, EEUU. 177 pp.

EPA (2006) *National Primary Drinking Water Regulations: Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule; Final Rule*. Part II. EPA 815-Z-06-001. United States Environmental Protection Agency. *Fed. Reg.* 71(3). 136 pp.

Finstein MS (1989) Composting solid waster-costly mismanagement of a microbial ecosystem. *ASM News.* 55: 599-602.

García LS (2007) *Diagnostic Medical Parasitology*. American Society for Microbiology. Washington, DC, EEUU. 1202 pp.

Henriksen SA, Pohlenz JFL (1981) Staining of *Cryptosporidia* by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet. Scand.* 22: 594-596.

Jenkins MB; Bowman DD, Ghiorse WC (1998) Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts by ammonia. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 784-788.

Lanuza FA (2006) Crianza de terneros y reemplazos de lechería. *Boletín Inia* N° 148: 109-128. www2.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR33844.pdf (Cons. 06/10/2014).

Lerman de Abramovich B, Lura MC, Gilli MI, Haye MA (1999) *Cryptosporidium* y agua. *Rev. Arg. Microbiol.* 31: 97-105.

MacKenzie WR, Schell WL, Blair KA, Addis DG, Peterson DE, Hoxie NJ, Kazmierczak JJ, Davis JP (1995) Massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clin. Infect. Dis.* 21: 57-62.

Modini L, Otero JC, Carrera E, Zerbato MG, Eliggi S, Abramovich B (2010) *Cryptosporidium* spp. en ganado bovino: su potencial como

contaminante de los recursos hídricos. *Rev. FAVE.* 9: 33-38.

Ocampo RJ, Rivera FA, López GA, Álvarez ME, Cardozo LA, Pérez JE (2012) Primer reporte de *Cryptosporidium parvum* en terneros Holstein (*Bos taurus*) de Manizales, Caldas, Colombia. *Rev. Med. Vet. Zoot.* 59: 159-164.

Osacar G, Berra G, Mate A (2008) Bienestar de los terneros de la crianza: medio ambiente crítico. www.produccion-animal.com.ar/produccion_bovina_de_leche/cria_artificial/134-bienestar.pdf (Cons. 10/10/2014). 3 pp.

Palmero Palmero, R (2010) *Elaboración de Compost con Restos Vegetales por el Sistema Tradicional en Pilas o Montones*. Servicio Técnico de Agricultura y Desarrollo Rural del Cabildo Insular de Tenerife. www.agrocaldo.org/publica/Publicaciones/sost_257_L_sost_ela_compost.pdf (Cons. 09/09/2014). 16 pp.

Pesani BC, Bautista E, Córdoba A, De Luca MM, Basualdo JA (1998) Factores que influyen en la desenquistación in vitro de *Cryptosporidium* sp. *Rev. Arg. Microbiol.* 30: 138-142.

Pulido-Medellín MO, Andrade-Becerra RJ, Rodríguez-Vivas RI, García-Corredor DJ (2014) Prevalencia y posibles factores de riesgo en la excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en bovinos de Boyacá, Colombia. *Rev. Mex. Cienc. Pec.* 5: 357-364.

Quílez J, Sánchez-Acevedo C, Del Cacho E, Clavel A, Causapé AC (1996) Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragón (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* 66: 139-146.

Semenza JC, Nichols G (2007) *Cryptosporidiosis* surveillance and water-borne outbreaks in Europe. *Euro Surveill.* 12: 120-123.

Tchobanoglous G, Theisen H, Vigil S (1998) *Gestión Integral de los Residuos Sólidos*. McGraw-Hill. Madrid, España. 476 pp.

Van Herk FH, Mc Allister TA, Cockwill CL, Guselle N, Lamey FJ, Miller JJ, Olson ME (2004) Inactivation of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in beef feedlot manure by thermophilic windrow composting. *Compost Sci. Util.* 12: 235-241.

Winkler MA (1999) Tratamiento de lodos y procesos anaeróbicos. En *Tratamiento Biológico de Aguas de Desecho*. Limusa. México. pp. 315-322.