



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

Programa de Doctorado en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

Tesis Doctoral

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *Cryptosporidium* spp.  
MEDIANTE MÉTODOS TRADICIONALES Y PCR EN DIFERENTES  
MATRICES (HECES Y AGUAS).**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por

**D. Fernando Guillermo Fredes Martínez**

Director: **Dr. D. Francisco Javier Martínez Moreno**

Noviembre - 2015

CÓRDOBA-ESPAÑA

TITULO: *Detección y caracterización de Cryptosporidium spp. mediante métodos tradicionales y PCR en diferentes matrices (heces y aguas)*

AUTOR: *Fernando Guillermo Fredes Martínez*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2016  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

Programa de Doctorado en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

Tesis Doctoral

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *Cryptosporidium* spp.  
MEDIANTE MÉTODOS TRADICIONALES Y PCR EN DIFERENTES  
MATRICES (HECES Y AGUAS).**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por

**D. Fernando Guillermo Fredes Martínez**

Director: Dr. D. Francisco Javier Martínez Moreno

Noviembre - 2015

CÓRDOBA-ESPAÑA





**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

Programa de Doctorado en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

**Tesis Doctoral**

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *Cryptosporidium* spp. MEDIANTE MÉTODOS  
TRADICIONALES Y PCR EN DIFERENTES MATRICES (HECES Y AGUAS).**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por

**D. Fernando Guillermo Fredes Martínez**

**Director:** Dr. D. Francisco Javier Martínez Moreno

Fdo. Fernando Guillermo Fredes Martínez

Fdo. Francisco Javier Martínez Moreno

Noviembre - 2015

CÓRDOBA-ESPAÑA



**TÍTULO DE LA TESIS:**

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *Cryptosporidium* spp. MEDIANTE MÉTODOS TRADICIONALES Y PCR EN DIFERENTES MATRICES (HECES Y AGUAS).

**DOCTORANDO/A:** FERNANDO GUILLERMO FREDES MARTÍNEZ

*INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS*

FRANCISCO JAVIER MARTÍNEZ MORENO, Profesor Titular de Universidad del Área de PARASITOLOGÍA, de la Universidad de CÓRDOBA

INFORMA

Que la Tesis Doctoral que lleva por título DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *Cryptosporidium* spp. MEDIANTE MÉTODOS TRADICIONALES Y PCR EN DIFERENTES MATRICES (HECES Y AGUAS), ha sido realizada bajo nuestra dirección y supervisión por el licenciado FERNANDO GUILLERMO FREDES MARTÍNEZ, cumpliendo los requisitos exigidos para optar al Título de Doctor por la Universidad de Córdoba.

Fruto de este trabajo es la publicación de tres artículos científicos en revistas indexadas:

- P Muñoz, F Fredes\*, A Díaz-Lee, R Mercado, L. S. Ozaki. Detección de *Cryptosporidium* spp. en terneras de lecherías de la Región Metropolitana mediante Ziehl Neelsen y confirmada por inmunocromatografía y ensayo molecular. Archivos de Medicina Veterinaria 43: 111-116. (ISI). 2011.
- Díaz-Lee A, Mercado R, Onuoha, EO, Ozaki, LS, Muñoz P, Muñoz V, Martínez, FJ and Fredes F\*. *Cryptosporidium parvum* in diarrheic calves detected by microscopy and identified by immunochromatographic and molecular methods. Veterinary Parasitology 176: 139–144. (ISI). 2011.
- A Díaz-Lee, R Molina, C Dougnac, R Mercado, P Retamal, F Fredes\*. Analytical sensitivity of staining and molecular techniques for the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts isolated from bovines in water samples: a preliminary study. Archivos de Medicina Veterinaria. Archivos de Medicina Veterinaria 47: 83-88. (ISI). 2015.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Firma del director

Fdo.: FRANCISCO JAVIER MARTÍNEZ MORENO



## INDICE

ABREVIATURAS.....	1
AGRADECIMIENTOS.....	5
INTRODUCCIÓN.....	11
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVOS.....	21
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	25
Etiología.....	27
Ciclo biológico y morfología.....	30
Epidemiología.....	38
Patogenia y signos clínicos.....	43
Diagnóstico.....	47
Control y tratamiento.....	49
Implicación en salud pública.....	53
MATERIAL Y MÉTODOS.....	59
Diseño experimental.....	61
Experiencia 1:.....	61
Experiencia 2:.....	67
Experiencia 3:.....	70
PUBLICACIONES GENERADAS.....	79
Publicación asociada a la Experiencia 1:.....	81
Publicación asociada a la Experiencia 2:.....	88
Publicación asociada a la Experiencia 3:.....	95
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	103
En relación a las técnicas microscópicas.....	107
En relación a las técnicas moleculares.....	111
En relación con la detección de <i>Cryptosporidium</i> en agua.....	114
CONCLUSIONES.....	117
RESUMEN.....	123
SUMMARY.....	127
BIBLIOGRAFÍA.....	131





**ABREVIATURAS**



## ABREVIATURAS

spp.	Especies
ZN	Zielh-Neelsen
AU	Aureamina
IFA	Inmunofluorescencia
PCR	Reacción de la Polimerasa en Cadena
ADN	Acido Desoxirribonucleico
H1	Hipótesis 1
H2	Hipótesis 2
TM	Técnicas Microscópicas Tradicionales
CR	Cryptos Strip®
µm	Micrómetro
αTNF	Factor de Necrosis Tumoral
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandinas
Cl <sup>-</sup>	Ión cloro
NaCl	Cloruro de Sodio
AMP cíclico	Adenosín Monofosfato cíclico
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
IFD	Inmunofluorescencia directa
ELISA	Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas
FDA	Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América
Codex	<i>Codex Alimentarius</i>
FAO	Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación

## Abreviaturas

---

OMS	Organización Mundial de la Salud
OIE	Organización Mundial de Salud Animal
mL	Mililitros
g	Fuerza g
cm	Centímetro
mM	Milimolar
$\mu$ L	Microlitro
SDS	Dodecilsulfato Sódico
mg	Miligramo
min.	Minuto
V	Volt
ARN	Ácido Ribonucleico
ng	Nanogramo
dNTP	Deoxinucleósido Trifosfato como dATP, dCTP, dTTP y dGTP
TAE	Tris-Acetato-EDTA
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal
pb	Pares de Bases
ADNsa	Desoxirribonucleasa
ARNsa	Ribonucleasa
pM	Picomolar
Mg	Magnesio
Cl	Cloro
Taq polimerasa	ADN polimerasa termoestable de bacteria <i>Thermus aquaticus</i>
v/s	<i>versus</i>
n	Tamaño muestral

**AGRADECIMIENTOS**



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a las instituciones y autoridades que hicieron posible realizar este Programa de Doctorado a través del convenio institucional existente entre las Facultades de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Córdoba, en España y de las Universidades de Concepción y de Chile, en Chile.

Así también, en forma muy especial expreso mi profundo y sincero reconocimiento al Dr. Francisco Javier Martínez Moreno, Profesor Titular del Área de Parasitología del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, por su excelente disposición, guía, colaboración y tiempo de dedicación en la realización de este trabajo.

A mis compañeros y profesores del Doctorado, con quienes compartimos los cursos de este Programa. En especial a su coordinador el Dr. Manuel Quezada, por su constante apoyo.

A todos los integrantes, incluido mis estudiantes de pre y posgrado, de la Unidad de Parasitología del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

A dos amigos y colegas, que de una u otra forma colaboraron para hacer posible la realización de esta Tesis, los Doctores Rubén Mercado y Shozo Ozaki.

Este trabajo de investigación fue financiado por los siguientes proyectos:

- DI MULT 06/17-2. Departamento de Investigación y Desarrollo. Universidad de Chile.
- FIV 12101401.9102.006. Dirección de Investigación. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.





*Por ellos soy un hombre pleno y feliz.  
Gracias a mis dos amores y tesoros, Jessica y Camila;  
a mis queridos y amados padres, Patricia y Fernando;  
a mi adorado hermano y sobrinito, Miguel Angel y Vicente.;  
a mi querida cuñada Pamela;  
a mis suegros, que ya no están con nosotros Angela, Aída,  
Ricardo y Eduardo.  
A cada uno de ellos lo que corresponda,  
en su cuota de paciencia, comprensión, sacrificio y compañía.  
“Gracias a la vida que me ha dado tanto, “  
Compuso nuestra cantautora chilena  
Violeta Parra (1917-1967).*



**INTRODUCCIÓN**



## INTRODUCCIÓN

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria del aparato digestivo, producida por un protozoo parásito obligado del phylum Apicomplexa y del género *Cryptosporidium* spp. (Balatbat *et al.*, 1996; Hunter *et al.*, 2003; Fayer y Xiao, 2008; Del Coco *et al.*, 2009; Xiao, 2010; Cacciò y Widmer, 2014). Aunque las especies de *Cryptosporidium* se conocen y se han descrito desde comienzos del siglo veinte, ha sido a fines de éste cuando se ha reconocido como un agente patógeno ampliamente distribuido en diferentes especies animales, como en la animales de producción, aves de corral, animales de compañía y de vida silvestre, así como una amenaza para la salud pública (Fayer, 2004; Gómez-Couso *et al.*, 2005; Fayer y Xiao, 2008; Cacciò y Widmer, 2014). Este protozoario se encuentra descrito en todos los continentes (Neira, 2005; Fayer y Xiao, 2008), incluida recientemente la Antártica (Fredes *et al.*, 2007, 2008). En los humanos y algunos animales, es considerada una zoonosis re-emergente (Fayer, 2004; Almeida *et al.*, 2006; Sunnotel *et al.*, 2006; Smith y Nichols, 2010; Neira *et al.*, 2013; Cacciò y Widmer, 2014).

Afecta principalmente a animales recién nacidos y se caracteriza clínicamente por distintos grados de diarrea. En los humanos puede llegar a producir, en pacientes inmunocomprometidos, una enfermedad clínica grave que se asocia a una severa deshidratación, lo que unido a un difícil tratamiento puede ser mortal (Almeida *et al.*, 2006; Sunnotel *et al.*, 2006; Del Coco *et al.*, 2009).

En terneros, especie objeto de estudio de esta experiencia, la enteritis y la diarrea son las principales causas de muerte durante sus primeras semanas de vida. Una amplia gama de agentes infecciosos pueden estar implicados en esta patología. En general, las principales causas son las infecciones bacterianas, aunque agentes virales y protozoarios también pueden infectar a los animales de forma concomitante o exclusiva dentro de los primeros 10-14 días de edad. Se ha descrito que los terneros infectados con el protozoario *Cryptosporidium* spp. suelen ser asintomáticos, y sólo animales estresados o con una

patología concomitante muestran manifestaciones clínicas de una criptosporidiosis (Blowey y Weaver, 2004; Del Coco *et al.*, 2008).

El género *Cryptosporidium* comprende protozoos que se desarrollan y multiplican en las células epiteliales del aparato digestivo y ocasionalmente en otros epitelios como el respiratorio y renal, especialmente en individuos inmunocomprometidos (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Mercado *et al.*, 2007; Neira *et al.*, 2013). Así también, este agente biológico tiene una ubicación particular dentro de la célula ya que se sitúa en el borde luminal de los enterocitos, localización que se ha definido como intracelular, pero extracitoplasmática (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer, 2004; Fayer y Xiao, 2008; Del Coco *et al.*, 2009; Neira *et al.*, 2013; Cacciò y Widmer, 2014). Su ciclo biológico se desarrolla en dos fases reproductivas: asexuada (esquizogonia) y sexuada (gametogonia), las cuales se desarrollan, ambas, dentro del mismo hospedador y en el interior de los enterocitos, donde se producen ooquistes, que esporulan en el hospedador, por lo que son inmediatamente infectantes (Acha y Szyfres, 2003; Fayer, 2004; Fayer y Xiao, 2008; Del Coco *et al.*, 2009; Neira *et al.*, 2013; Cacciò y Widmer, 2014), los cuales son expulsados por las heces contaminando el medio ambiente, principalmente aguas y suelos (Fayer, 2004; Ramirez y Sreevatsan, 2006; Fayer y Xiao, 2008; Del Coco *et al.*, 2009; Neira *et al.*, 2013; Cacciò y Widmer, 2014). Por esto las vías de transmisión incluyen todos los vehículos que contengan un número de ooquistes suficientes para provocar infección, siendo las más comúnmente reconocidas para el ser humano el agua y los alimentos (Fayer, 2004; Fayer y Xiao, 2008; Smith y Nichols, 2010). De esta manera, desde el punto de vista de salud pública, la transmisión indirecta a través de vehículos es factible, ya que es frecuente encontrar ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en aguas para consumo humano (Kirby *et al.*, 2003; Fayer, 2004; Krewski *et al.*, 2004; Fayer y Xiao, 2008; Del Coco *et al.*, 2009; Neira *et al.*, 2013; Cacciò y Widmer, 2014).

En consecuencia, la principal transmisión de *Cryptosporidium* es horizontal y la infección ocurre con la ingestión de ooquistes. Sin embargo, en los animales, como por ejemplo en terneros, la transmisión del parásito sería principalmente directa, vía fecal-oral, y la principal fuente de infección serían las heces excretadas por los animales neonatos con

diarrea, aunque también, hay que considerar la eliminación de ooquistes por parte de los animales adultos, que actúan como portadores asintomáticos (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer y Xiao, 2008; Del Coco *et al.*, 2008; 2009).

La criptosporidiosis transmitida por agua es particularmente importante, debido a que los ooquistes de *Cryptosporidium* son resistentes a desinfectantes como el cloro, comúnmente utilizado para el tratamiento de aguas (Carpenter *et al.*, 1999 Fayer y Xiao, 2008). La contaminación de aguas de consumo humano con material fecal de ganado bovino o humano, se ha asociado con brotes de diarrea causada por este parásito (Mac Kenzie *et al.*, 1994; Rodríguez-Salinas *et al.*, 2000; Fayer, 2004; Smith y Nichols; 2010). Por lo anterior este agente debe ser considerado como un importante problema de salud pública, ya que los métodos usuales de tratamiento de aguas potables no son completamente eficaces en la remoción o inactivación de los ooquistes.

El número de comunicaciones de brotes de criptosporidiosis en países desarrollados, por consumo de aguas contaminadas con este agente, se ha incrementado en los últimos años (Atías, 1998; García, 2001; Fayer, 2004; Fayer y Xiao, 2008; Del Coco *et al.*, 2009). De esta manera, es frecuente encontrar *Cryptosporidium* spp. en aguas superficiales, subterráneas, estuarios de mar y potable (Fayer, 2004; Fayer y Xiao, 2008), por lo que su hallazgo podría ser utilizado como un indicador de calidad e inocuidad de agua.

El hecho de ser infectivos aún en bajas dosis, siendo su dosis mínima infectante de 1 a 30 ooquistes (DuPont *et al.*, 1995; Fayer y Xiao, 2008; Del Coco *et al.*, 2009), así como el bajo número de ooquistes presente habitualmente en muestras ambientales (LeChevallier *et al.*, 1991), hacen necesarios métodos rápidos y sensibles para detectar ooquistes tanto en muestras fecales como en matrices ambientales, como el agua (Fayer, 2004; Ramirez y Sreevatsan, 2006).

El método diagnóstico de rutina para el diagnóstico de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en heces animales se realiza a través de la visualización microscópica de éstos con técnica de tinción de Zielh-Neelsen modificada (ZN) (Ramirez y Sreevatsan, 2006). Otra técnica de tinción para el diagnóstico de este protozoo en muestras clínicas, es la de



Aureamina (AU), utilizada principalmente en medicina humana (De Quadros *et al.*, 2006; Fayer y Xiao, 2008).

Además de estas técnicas, en animales también se ha utilizado el examen histológico de intestino delgado para localizar el parásito en la mucosa, pero es un método invasivo y de escasa sensibilidad (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

Por otra parte, la técnica diagnóstica más ampliamente usada para la detección de *Cryptosporidium* spp. en muestras de agua es el ensayo de inmunofluorescencia (IFA), técnica laboriosa, que requiere un gran número de ooquistes para su detección y presenta un alto número de resultados falsos positivos y falsos negativos (Nikaeen *et al.*, 2005; Ramirez y Sreevatsan, 2006).

En los últimos años se han desarrollado a nivel mundial métodos moleculares basados en la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR). Estos últimos han sido aplicados a muestras fecales y ambientales, mostrando una alta sensibilidad y especificidad (Fayer, 2004; Fayer y Xiao, 2008; Del Coco *et al.*, 2009), junto con la ventaja de permitir el análisis rápido de muchas muestras, de tener un bajo costo y la posibilidad de discriminar entre especies (Rochelle *et al.*, 1997; Fayer y Xiao, 2008).

En Chile, lugar donde se llevó a cabo este estudio, hasta la fecha, al menos en el área veterinaria, se ha descrito sólo un protocolo molecular para el diagnóstico de este agente parasitario en heces bovinas (Neira-Otero *et al.*, 2005), mostrando una baja prevalencia, a pesar de los antecedentes nacionales que indican que ésta sería más bien alta (Gorman *et al.*, 1986 y 1989; Campano, 1997). De igual modo, no existen antecedentes bibliográficos de laboratorios chilenos que realicen protocolos de detección microscópica, ni molecular de *Cryptosporidium* spp. a partir de muestras de agua. Por ello, resulta de interés desarrollar y estandarizar un nuevo protocolo tanto de extracción de ADN, como de ensayo de PCR para mejorar la detección molecular de *Cryptosporidium* género-específico tanto en heces diarreicas de terneros, como en muestras de agua contaminadas con el agente, que serían la base para contar en un futuro con métodos que permitan la genotipificación de este agente.

**HIPÓTESIS**



## HIPÓTESIS

La creciente importancia de *Cryptosporidium* ha motivado que su diagnóstico empiece a ser habitual entre sus hospedadores. De hecho, al ser un agente zoonótico, ha comenzado a estudiarse mediante técnicas moleculares de diagnóstico en varios países, incluido Chile, tanto a nivel humano como veterinario. Sin embargo, en nuestro país (Chile), hasta la fecha, el diagnóstico de rutina en animales se hace sólo mediante la detección de ooquistes en extensiones de heces concentradas y posterior tinción con Ziehl-Neelsen. Es probable que este método no detecte a todos los individuos positivos a la infección, por la menor sensibilidad de dicha prueba, por lo que los resultados obtenidos pueden no reflejar correctamente la realidad.

Sumado a lo anterior y teniendo en consideración:

a) que los ooquistes de este protozoario (al igual que quistes y ooquistes de otros protozoos) se encuentran presentes en bajo número, proporcionalmente, en el ambiente acuático, siendo el agua la principal fuente de infección;

b) y que no se encuentran disponibles técnicas de cultivo *in vitro*, que aumenten el número de ooquistes previo a su identificación en agua potable y debido a la baja dosis infectante de *C. parvum* y *C. hominis* en humanos;

es de gran relevancia poder desarrollar un protocolo de recuperación y detección de ooquistes presentes en agua, de manera eficaz, para así diagnosticar con precisión este protozoario.

Por todo lo anterior, la presente tesis plantea las siguientes hipótesis de partida en las que se sustentan los objetivos del presente estudio:

- **H1:** Los métodos microscópicos tradicionales (Ziehl-Neelsen modificado y Aureamina) y la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR) género-específico permiten detectar *Cryptosporidium* spp. en muestras de heces y agua contaminadas o inoculadas artificialmente con este agente zoonótico.

- **H2:** La Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR) es capaz de detectar una menor cantidad de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. por volumen de muestra de agua que la pruebas microscópicas tradicionales.

**OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio es contribuir al conocimiento del diagnóstico de laboratorio tanto microscópico como molecular de *Cryptosporidium* spp. en muestras de heces diarreicas de terneros y de agua inoculada con el agente, mediante la implementación y estandarización de protocolos o técnicas microscópicas tradicionales (TM) y un ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) género-específico.

Para conseguir este objetivo general se plantean unos específicos, que se concretan en los siguientes apartados:

1. Detectar *Cryptosporidium* spp. mediante tinción de Ziehl Neelsen modificada (ZN) y mediante tinción de Aureamina (AU) en muestras de heces bovinas.
2. Analizar y comparar los resultados obtenidos por ambas técnicas microscópicas.
3. Confirmar muestras de heces bovinas positivas a *Cryptosporidium* spp. mediante un “kit” inmunodiagnóstico Crypto Strip<sup>®</sup> (CR).
4. Implementar y estandarizar un ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) género-específico que permita la detección de *Cryptosporidium* presente en las muestras de heces bovinas positivas a TM y CR.
5. Determinar y comparar la sensibilidad analítica (límite de detección) del ensayo de PCR y del método de diagnóstico microscópico (ZN), en diluciones crecientes de una muestra de heces bovinas positiva a *Cryptosporidium* spp.
6. Desarrollar un protocolo que permita recuperar, concentrar y detectar ooquistes de *Cryptosporidium* presentes en diferentes concentraciones de muestras de agua.
7. Determinar y comparar la sensibilidad analítica (límite de detección) de las TM y PCR en estudio, en muestras de agua inoculadas con el agente.





**REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Etiología

El género *Cryptosporidium*, del griego *kryptos*: oculto; *sporos*: esporas, fue descrito por Tyzzer en 1907 y se encuentra en constante revisión taxonómica. Este ha sido considerado en el phylum Apicomplexa, clase Sporozoa, subclase Coccidia, orden Eucoccidiida, suborden Eimeriina, familia Cryptosporidiidae (Soulsby, 1987; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer y Xiao, 2008; Fayer, 2010, Neira *et al.*, 2013; Cacciò y Widmer, 2014).

La especiación del género *Cryptosporidium* es un aspecto en continua revisión. En un principio se pensó que era específico de hospedador, si bien estudios posteriores de transmisión cruzada demostraron claramente su inespecificidad. Así por ejemplo, las primeras descripciones apuntaban a que únicamente cuatro especies deberían ser consideradas como válidas, estableciendo la relación en base al hospedador vertebrado que las albergaba (mamíferos, aves, reptiles y peces), lo que se modificó posteriormente, indicando que las especies parasitarias de mamíferos solo eran dos: *C. muris* (Tyzzer, 1907) y *C. parvum* (Tyzzer, 1912) (Compañ *et al.*, 1991; Neira *et al.*, 2013).

En la actualidad, se reconocen alrededor de 25 especies de *Cryptosporidium*, de los más de 40 genotipos descritos en diversos hospederos vertebrados, en base a diferencias genéticas, morfológicas y de sitio de infección (Cuadro 1) (Fayer, 2010; Smith y Nichols, 2010; Cacciò y Widmer, 2014). Entre ellas destacan: *C. muris* en roedores, *C. andersoni* en vacunos, *C. parvum* en rumiantes y humanos, *C. wrairi* en cobayos, *C. hominis* en humanos, *C. meleagridis*, *C. baileyi* y *C. galli* en aves, *C. serpentis*, *C. saurophylum*, *C. scopthalmi* y *C. varanii* en serpientes y lagartos, *C. molnari* y *C. natorum* en peces, *C. felis* en gatos y *C. canis* en perros (Xiao y Ryan, 2004; Sunnotel *et al.*, 2006; Mercado *et al.*, 2007; Cama *et al.*, 2008).

**Cuadro 1. Descripción de las 25 especies válidas de *Cryptosporidium* con sus distintos tipos de hospederos (adaptado de Fayer, 2010; Smith y Nichols, 2010; Cacciò y Widmer, 2014).**

Especie	Hospedero principal	Hospedero secundario	Sitio de infección
<i>C. hominis</i>	Humanos	Dugongo, ovinos	Intestino Delgado
<i>C. parvum</i>	Bovinos, humanos, ovinos	Ciervos, ratones, cerdos, camelidos	Intestino Delgado
<i>C. viatorum</i>	Humanos	Desconocido	Intestino Delgado
<i>C. meleagridis</i>	Pavos, humanos	Loros	Intestino Delgado
<i>C. canis</i>	Perros	Humanos	Intestino Delgado
<i>C. felis</i>	Gatos	Humanos, bovinos	Intestino Delgado
<i>C. suis</i>	Cerdos	Humanos	Intestino Delgado y Grueso
<i>C. scrofarum</i>	Cerdos	Peces, humanos	Intestino (estómago)
<i>C. wrairi</i>	Cobayos	Desconocido	Intestino Delgado
<i>C. cuniculus</i>	Conejos	Humanos	Intestino Delgado
<i>C. muris</i>	Roedores	Humanos, caprinos	Estómago
<i>C. tyzzeri</i>	Roedores	Humanos	Intestino Delgado
<i>C. andersoni</i>	Bovinos, camellos	Ovinos, humanos	Abomaso
<i>C. bovis</i>	Bovinos	Ovinos, humanos	Intestino Delgado
<i>C. ryanae</i>	Bovinos	Desconocido	Desconocido
<i>C. xiaoi</i>	Ovinos	Caprinos, canguros, peces	Desconocido
<i>C. ubiquitum</i>	Ovinos	Bovinos, humanos, ciervos	Intestino Delgado
<i>C. fayeri</i>	Canguros	Humanos	Intestino Delgado
<i>C. macropodum</i>	Canguros	Desconocido	Desconocido
<i>C. baileyi</i>	Aves de corral	Codornices, avestruces, patos	Bursa
<i>C. galli</i>	Pinzones, pollos	Desconocido	Proventrículo
<i>C. serpentis</i>	Lagartos, serpientes	Desconocido	Estómago
<i>C. varanii</i>	Lagartos	Serpientes	Estómago e Int. Delgado
<i>C. fragile</i>	Anfibios	Desconocido	Estómago
<i>C. molnari</i>	Peces	Desconocido	Estómago (intestino)

En bovinos, son al menos cuatro las especies habitualmente descritas de *Cryptosporidium* que producen infección: *C. parvum*, de mayor prevalencia en terneros

neonatos y la más importante; y *C. andersoni*, *C. bovis* y *C. ryanae* (Santín *et al.*, 2004; Geurden *et al.*, 2006, Feng *et al.*, 2007; Fayer, 2010; Cacciò y Widmer, 2014; Björkman *et al.*, 2015). Además, recientemente también se ha descrito a *Cryptosporidium ubiquitum* en bovinos (Björkman *et al.*, 2015).

En el ser humano se han descrito 14 especies que provocan infección, siendo alguna de las reportadas *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. muris*, *C. suis* y *C. baileyi* (Fayer y Xiao, 2008; Smith y Nichols, 2010; Cacciò y Widmer, 2014). Incluso recientemente ha sido formalmente considerada válida en el ser humano *Cryptosporidium viatorum* (Cacciò y Widmer, 2014). En todo caso, las que se describen con mayor potencial de parasitar al ser humano son *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis* y *C. canis* (Xiao *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 2009) siendo *C. hominis* y *C. parvum* las más comúnmente presentes en muestras clínicas humanas y las responsables de la gran mayoría de los brotes generados por consumo de agua contaminada (Xiao *et al.*, 2004; Xiao y Ryan, 2004; Sunnotel *et al.*, 2006; Mercado *et al.*, 2007; Cama *et al.*, 2008; Pintar *et al.*, 2010).

Acerca de la relación con su hospedador, el comportamiento de las distintas especies varía. Fayer (2004), estableció que *C. parvum* no es hospedero-específico estricto, ya que se ha reportado en más de 155 especies de hospedadores mamíferos. Sin embargo, también existen especies de este protozoo que infectan casi exclusivamente a una especie u orden animal, como por ejemplo *C. fragile* que infecta sólo a anfibios, *C. galli* en aves, *C. macropodum* en marsupiales, *C. molnari* en peces, *C. ryanae* en búfalos, *C. serpentis* y *C. varanii* en reptiles, y *C. wrairi* que infecta sólo a cobayos (*Cavia porcellus*) (Cuadro 1); mientras que otras infectan predominantemente una especie u orden hospedadora y en menor medida a otras (Cuadro 1) (Fayer y Xiao, 2008; Cacciò y Widmer, 2014).

Algunos autores (Morgan *et al.*, 1999, 2000; Xiao *et al.*, 2004) mencionan que *C. parvum* no es una especie única, sino que está compuesta de al menos ocho genotipos distintos, pero morfológicamente iguales. Estos se describen como genotipo humano, bovino, ratón, cerdo, mono, perro, marsupial y ferret. Así también, mediante estudios epidemiológicos moleculares plantean que el genotipo humano sólo se asocia al hombre, el genotipo bovino se ha encontrado tanto en el humano como en rumiantes, mientras que

el genotipo perro se ha descrito en humanos asintomáticos (Abe *et al.*, 2002). Los genotipos mono, ratón, cerdo, marsupial y ferret han sido encontrados sólo en sus hospederos respectivos (Abe *et al.*, 2002; Gomez-Couso *et al.*, 2005).

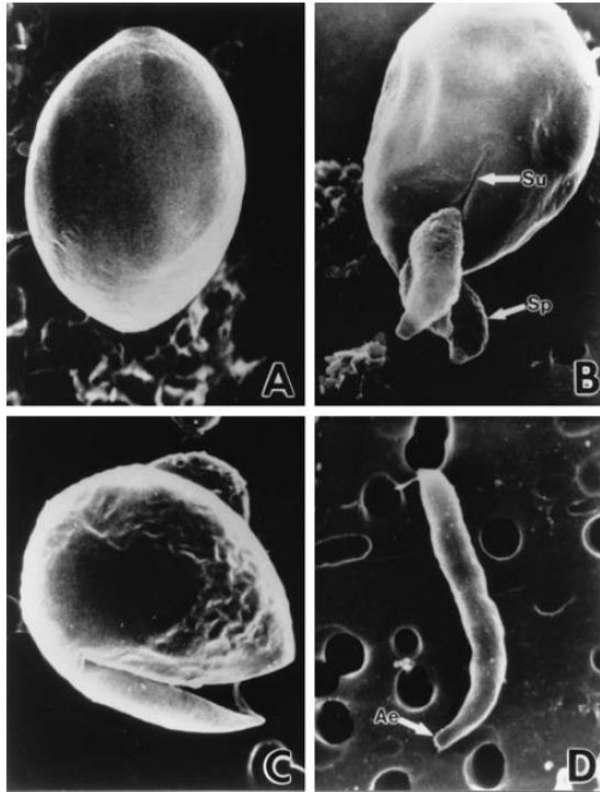
En cambio, otros autores (Awad-el-Kariem *et al.*, 1995; Sulaiman *et al.*, 1998; Morgan-Ryan *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2002; Sestak *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2003) han demostrado en base a la caracterización molecular de los ooquistes, la presencia de solo dos genotipos de *C. parvum*: uno está asociado con infecciones sólo en humanos y muy rara vez en otras especies, actualmente denominado *C. hominis* (Hashim *et al.*, 2004); y el otro, denominado *C. parvum*, el cual se asocia con infecciones en humanos y bovinos (Sturbaum *et al.*, 2001; Gatei *et al.*, 2003; Scorza *et al.*, 2003), aunque *C. hominis* es el que predomina en casos de brotes de criptosporidiosis en humanos (Hashim *et al.*, 2004).

Por lo relatado, el estado taxonómico de *Cryptosporidium* spp. está evolucionando rápidamente y muchos genotipos son susceptibles de ser descrito formalmente como especies en el futuro (Cacciò y Widmer, 2014).

### **Ciclo biológico y morfología.**

*Cryptosporidium* spp. es un parásito monógeno y heterogenético, lo primero debido a que todos los estadios de desarrollo ocurren en un mismo hospedador y lo segundo ya que el parásito tiene fases de reproducción asexual y sexual (Soulsby, 1987; Cordero Del Campillo *et al.*, 1999; Del Coco *et al.*, 2009; Neira *et al.*, 2013; Cacciò y Widmer, 2014).

El ciclo comienza con la ingestión de ooquistes esporulados por el hospedador susceptible. Una vez ingeridos, se produce el desenquistamiento en el tracto gastrointestinal del hospedador, es decir, la apertura de la pared del ooquiste a lo largo de una línea de sutura, lo que permite que los cuatro esporozoítos contenidos en su interior, sean liberados para producir la invasión (Figura 1) (Fayer, 2004; Cacciò y Widmer, 2014).



**Figura 1: Microfotografía electrónica de barrido del desenquistamiento de un ooquiste de *Cryptosporidium* y la liberación de sus esporozoitos.**

**(A) Ooquiste intacto ( $\times 16.000$ );**

**(B) Tres esporozoitos (*Sp*) saliendo desde el la línea de sutura (*Su*) ( $\times 16.000$ );**

**(C) Ooquiste vacío ( $\times 16.000$ );**

**(D) Esporozoito liberado con su extremo apical (*Ae*) ( $\times 14.000$ )**

**Obtenido de: Fayer y Xiao (2008).**

Aunque para Choudhry *et al.*, (2008), los mecanismos que conducen a la activación de los esporozoitos y la apertura de la pared de ooquistes no han sido totalmente dilucidados, el desenquistamiento se describe como un proceso que se cumple exclusivamente en parásitos metabólicamente activos y que involucra la acción de enzimas parasitarias como la cisteín proteinasa, cuya función es degradar moco, así como de la acción de enzimas intestinales del hospedador (Del Coco *et al.*, 2009). Los requerimientos



necesarios para iniciar el desenquistamiento, experimentalmente sugieren que se requieren un número de factores desencadenantes, como son los cambios de pH y temperatura (Smith *et al.*, 2005; Neira *et al.*, 2013). Así, al pasar desde el medio ambiente a la temperatura corporal, al pasar por el estómago y luego por las sales biliares y la acción de proteasas del nivel intestinal, estimulan el desenquistamiento de los ooquistes, lo que se ha demostrado por el aumento la permeabilidad de la pared de los ooquistes (Smith *et al.*, 2005).

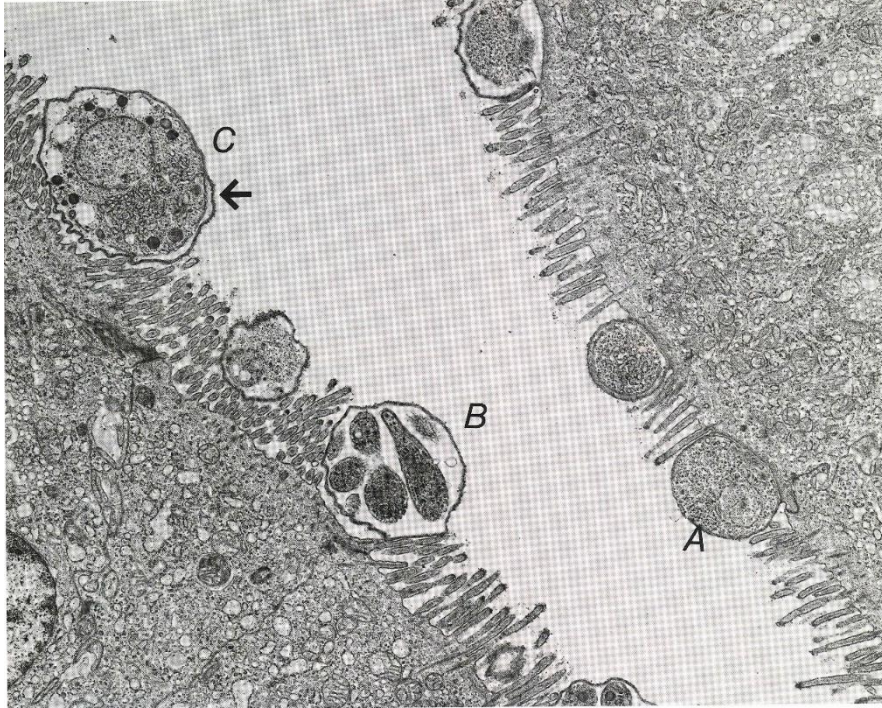
Por otro lado, se ha establecido que el desoxicolato de sodio mejora la invasividad de los esporozoitos a las células epiteliales (Feng *et al.*, 2006), en tanto que la liberación de esporozoitos ha sido obstaculizada por inhibidores de proteasas (Forney *et al.*, 1996). Sin embargo, se ha descrito que la proteasa tripsina del hospedero, no mejora la tasa de desenquistamiento, aunque si aumenta la motilidad de los esporozoitos (Robertson *et al.*, 1993).

Así también, el contacto directo entre los ooquistes y el ácido siálico, presente en la superficie de las células intestinales, también constituye un estímulo para el desenquistamiento (Smith *et al.*, 2005).

Los esporozoitos alcanzan los enterocitos mediante movimientos de deslizamiento-flexión y el extremo anterior de estos se adhiere, a través del antígeno tipo circumsporozoito, a un receptor presente en las microvellosidades intestinales, penetrando en su interior para formar una vacuola parasitófora (Soulsby, 1987; Cordero Del Campillo *et al.*, 1999; Fayer, 2004; Thompson *et al.*, 2005; Neira *et al.*, 2013). Lo anterior tiene lugar en la zona apical de las microvellosidades, intracelularmente, pero a nivel extracitoplasmático (Fayer, 2004; Fayer y Xiao, 2008; Del Coco *et al.*, 2009, Neira *et al.*, 2013). Allí, como trofozoito o merozoito, se multiplican formando esquizontes o merontes (Figura 2) (Current, 1985; Garcia y Bruckner, 1988; Atías, 1998; Fayer, 2004; Del Coco *et al.*, 2009; Neira *et al.*, 2013). Las dos primeras fases de multiplicación son asexuadas (esquizogonia o merogonia) e implica, que a partir de un esporozoito se constituirá el meronte I que contiene 6 a 8 merozoitos en su interior, los cuales se liberan y reciclan formando nuevos

merontes I. Posteriormente estos merozoitos ingresan a nuevas células y se constituyen los merontes II que contienen 4 merozoitos. Los merontes II se liberan al lumen y no reciclan, ingresando a nuevas células donde inician la etapa sexuada del ciclo o gametogonia (Figura 2a y 2b) (García y Bruckner, 1988; Atías, 1998; Del coco *et al.*, 2009; Neira *et al.*, 2013; Cacciò y Widmer, 2014). Algunos de ellos se diferencian en gametos masculinos, o microgametocitos de  $1.4 \times 0.5 \mu\text{m}$  en el caso de *C. parvum*, y en gametos femeninos, o macrogametocitos de 4 a 6  $\mu\text{m}$ , también en el caso de *C. parvum*. Los microgametocitos fecundan a los macrogametocitos y de esta forma se genera el ooquiste, el cual finalmente es excretado al exterior con las deposiciones como ooquiste inmediatamente infectante, ya que el proceso de esporulación es intrahospedero (Soulsby, 1987; Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Del Coco *et al.*, 2009; Neira *et al.*, 2013; Cacciò y Widmer, 2014).

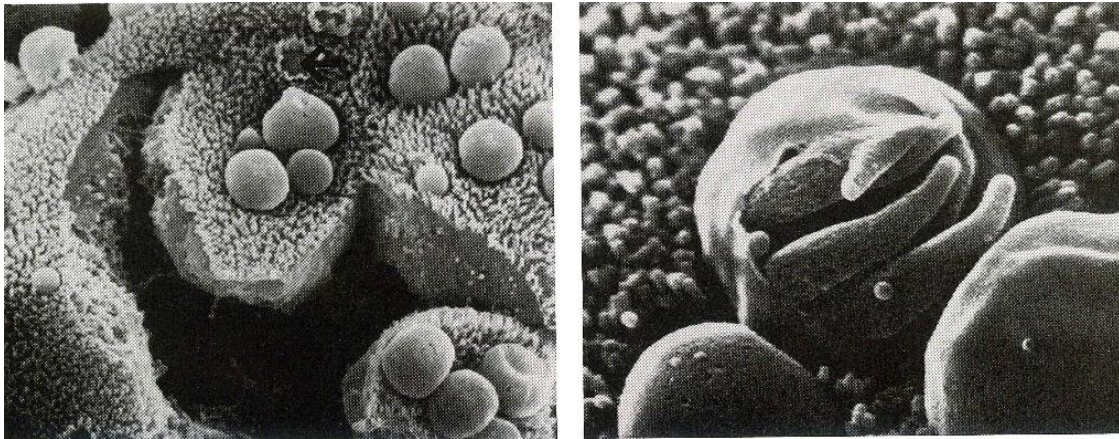
La formación de la pared del ooquiste ocurre antes que la esporulación, que tiene como consecuencia la formación de 4 esporozoitos. El 80% de los ooquistes presenta pared trilaminar y constituyen las formas de resistencia responsables de la transmisión entre hospedadores. Lo anterior, dado que esta conformación le confiere resistencia a las condiciones adversas del medio ambiente. En tanto que, existe un porcentaje de ooquistes de pared delgada (20%), pueden causar un proceso de retroinfección o autoinfección, el que ocurre dado que los ooquistes se desenquistan endógenamente, liberando los esporozoitos en la luz intestinal e ingresando a parasitar en nuevos enterocitos (Figura 2c) (Del Coco *et al.*, 2009; Neira *et al.*, 2013; Cacciò y Widmer, 2014). Esto último, muy importante en individuos inmunocomprometidos (Neira *et al.*, 2013), pues se mantiene o agrava el cuadro digestivo, incluso sin re infección exógena.



**Figura 2a: Microfotografía electrónica de transmisión del epitelio del intestino delgado de un cordero de una semana de edad infectados con *Cryptosporidium* spp.**

**(A) Trofozoito; (B) Meronte; (C) Macrogameto (x 5720)**

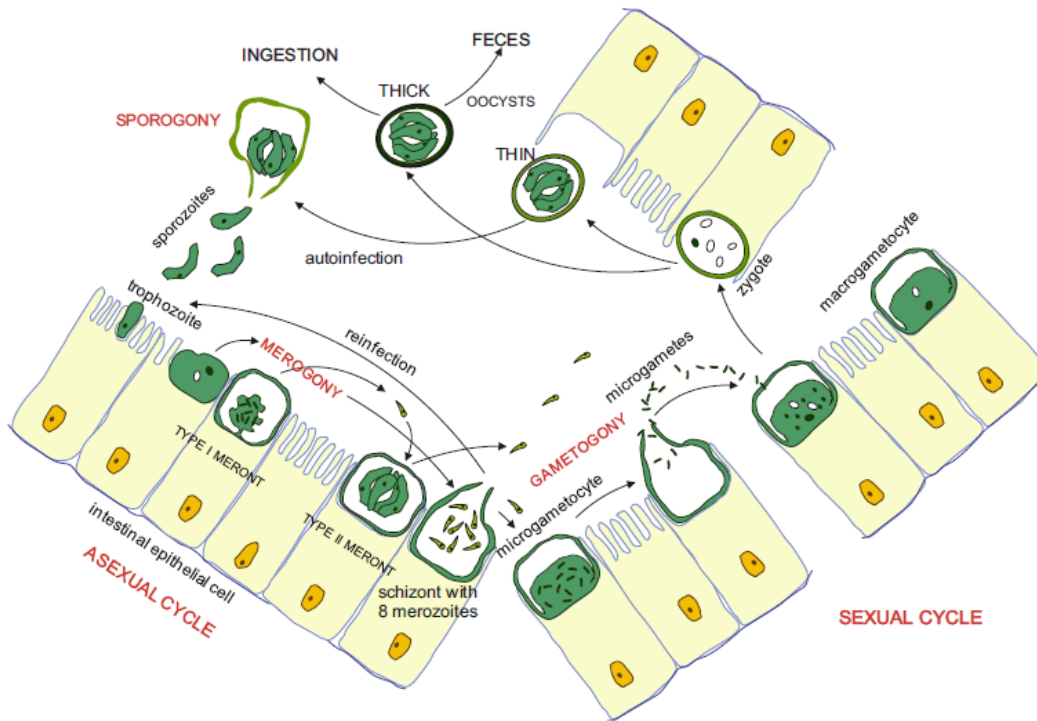
**Obtenido de: Gardiner et al., (1988).**



**Figura 2b: Microfotografía electrónica de barrido con numerosos estadios de *Cryptosporidium* en la superficie epitelial del intestino delgado de un cordero.**

**Izq. Flecha indica área lesionada luego de la salida del agente (x 3500); Der. Meronte con la membrana externa destruida, exponiendo los merozoitos de su interior**

**Obtenido de: Gardiner et al., (1988).**



**Figura 2c: Diagrama representativo del ciclo biológico de *Cryptosporidium*.**

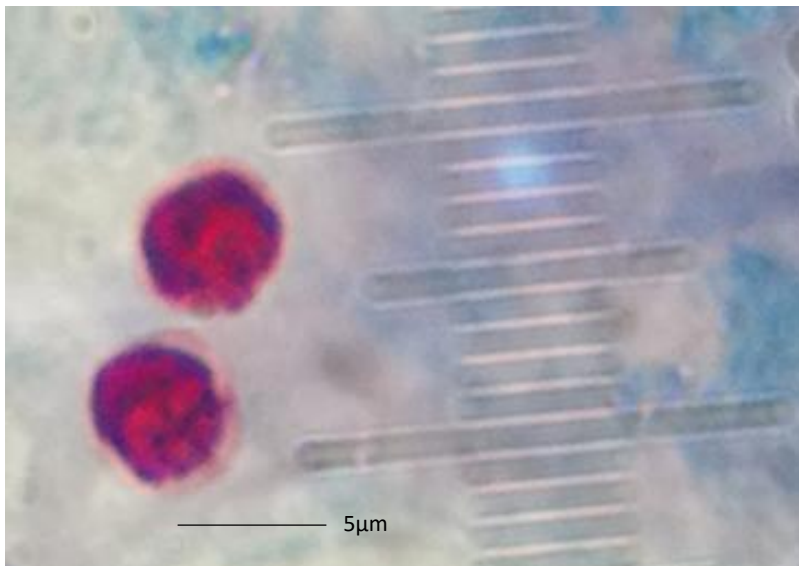
**Obtenido de: Cacciò y Widmer (2014).**

El periodo de prepatencia en los rumiantes domésticos es de 3-4 días, aunque dependiendo de la edad, de la dosis infectante y de la especie de *Cryptosporidium* involucrada, puede prolongarse hasta 6-7 días (Soulsby, 1987; Cordero Del Campillo *et al.*, 1999; Fayer y Xiao, 2008; Del Coco *et al.*, 2008; 2009), mientras que en humanos es de 4 a 22 días, según se trate de individuos inmunocompetentes o inmunosuprimidos (Fayer, 2004; Del Coco *et al.*, 2009). En cuanto al período de patencia, éste tiene una duración de 1 a 12 días en terneros (Soulsby, 1987; Cordero Del Campillo *et al.*, 1999) y de 1 a 20 días en humanos (Fayer, 2004; Del Coco *et al.*, 2008; 2009).

En relación a la morfología de los oocistos, se describe que éstos tienen forma sub-esférica, con un tamaño aproximado según la especie de 3,5 a 8  $\mu\text{m}$  de diámetro, son esporulados al ser excretados, poseen cuatro esporozoitos en su interior y no poseen esporocistos (Current, 1985; Soulsby, 1987; Georgi y Georgi, 1990; Atías, 1998; Cordero

del Campillo *et al.*, 1999; Fayer y Xiao, 2008, Del coco *et al.*, 2009; Neira *et al.*, 2013; Cacciò y Widmer, 2014).

En el caso particular de *C. parvum*, éste presenta ooquistes casi esféricos de 4 a 6  $\mu\text{m}$  (5,4 x 4,5  $\mu\text{m}$ ) y es la principal especie involucrada en los cuadros de enteritis aguda y diarrea, en mamíferos (Figura 3) (García y Bruckner, 1988; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; García, 2001, Castro-Hermida *et al.*, 2002a; Castro-Hermida *et al.*, 2002b; Fayer, 2004; Santín *et al.*, 2004; Fayer y Xiao, 2008; Del Coco *et al.*, 2009; Neira *et al.*, 2013; Cacciò y Widmer, 2014).

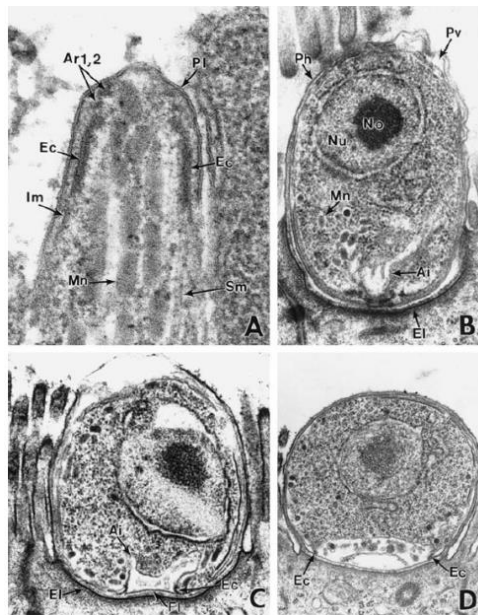


**Figura 3. Ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, de terneros diarreicos detectados mediante tinción de Ziehl-Neelsen (x 1000).**

**Obtenido de: Resultados del presente estudio**

Los esporozoitos de ooquistes de *C. parvum*, son similares a los de otros coccidios y mediante microscopía electrónica de transmisión se ha revelado la presencia de los organelos típicos del phylum (Fayer y Xiao, 2008). Así por ejemplo, los esporozoitos tienen una forma alargada, con el extremo apical afinado y el posterior redondeado. Los microtúbulos, se sitúan lateralmente por debajo de la membrana plasmática unidos al anillo polar, recorriendo el cuerpo del esporozoíto desde el ápice hacia su parte media. Ellos

permiten su desplazamiento y actúan durante el proceso de invasión (Del coco *et al.*, 2009). En tanto que en el extremo anterior de este zoito se presenta el complejo apical, compuesto por organelas secretorias (roptrias, micronemas, gránulos densos) y componentes no vesiculares (conoide y microtúbulos subpeliculares). Las roptrias y los micronemas le permiten adherirse e invadir la célula hospedadora e inducirla a envolver al parásito en la vacuola parasitófora (Figura 4) (Cacciò y Widmer, 2014).



**Figura 4: Microfotografía electrónica de transmisión de merozoitos de *Cryptosporidium* spp. (A) Complejo apical de un merozoito ( $\times 99.000$ ), se observa entre otras estructuras los anillos apicales = Ar1,2 ; micronemas = Mn; microtúbulos subpeliculares= Sm; (B) Estado temprano adherido a una célula epitelial intestinal ( $\times 32.500$ ), se observa entre otras estructuras nucléolo= No; núcleo = Nu; vacuola parasitófora = Pv; (C) Estado más avanzado ( $\times 34.000$ ), se observa entre otras estructuras collar electro denso = Ec; capa electro densa = El; capa fibrosa = Fl; (D) Trofozoito con collar electro denso ( $\times 19.500$ )**

**Obtenido de: Fayer y Xiao (2008).**

## Epidemiología

La criptosporidiosis es una parasitosis de distribución cosmopolita y ubicua, ya que su aparición no está limitada a ninguna región geográfica o al grado de desarrollo tecnológico de la misma (Fayer, 2004; Zanaro y Garbossa, 2008; Yoder y Beach, 2010; Cacciò y Widmer, 2014), habiendo sido descrito en todo el mundo, incluida una reciente descripción en el continente Antártico (Fredes *et al.*, 2007; 2008), y afecta tanto a animales como a humanos (Fayer, 2004; Fayer y Xiao, 2008; Neira *et al.*, 2013; Cacciò y Widmer, 2014).

A nivel mundial, existe diversos estudios que demuestran que en los animales afecta principalmente a aquellos recién nacidos, como son los terneros, corderos y cabritos (Soulsby, 1987; Muñoz *et al.*, 1996; Cordero Del Campillo *et al.*, 1999; Fayer y Xiao, 2008; Sánchez *et al.*, 2009; Navarro-i-Martínez *et al.*, 2011). Así por ejemplo, en España la infección en ganado ovino y caprino ha tenido creciente importancia, desde 1985 a la fecha, principalmente en los animales comprendidos entre la primera y tercera semana, cuando los corderos, en contacto con animales infectados, ingieren los ooquistes eliminados con las heces que contaminan paredes, comederos, bebederos, ubres, etc. (Muñoz *et al.*, 1996; Cordero Del Campillo *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2009; Navarro-i-Martínez *et al.*, 2011), situación muy similar a la descrita en los grandes rumiantes.

Por lo anterior, *Cryptosporidium parvum*, es uno de los agentes más importantes causantes del síndrome de diarrea neonatal en rumiantes (Soulsby, 1987; Muñoz *et al.*, 1996; Cordero Del Campillo *et al.*, 1999; Fayer, 2004; Geurden *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2007; Fayer y Xiao, 2008; Sánchez *et al.*, 2009; Navarro-i-Martínez *et al.*, 2011; Neira *et al.*, 2013; Cacciò y Widmer, 2014).

Su transmisión (Figura 5) es de tipo horizontal y ocurre por la ingestión de ooquistes. En los animales domésticos, la principal fuente de infección son los ooquistes presentes en las heces excretadas por los animales neonatos con diarrea, aunque también hay que considerar la eliminación de ooquistes por los animales adultos que actúan como

portadores asintomáticos (Soulsby, 1987; Cordero Del Campillo *et al.*, 1999; Cacciò y Widmer, 2014).

También es de gran importancia la transmisión por los alimentos y el agua contaminados con ooquistes, ya que desde el punto de vista de salud pública, es frecuente encontrar *Cryptosporidium* en aguas para consumo humano (Fayer, 2004; Fayer y Xiao, 2008; Neira *et al.*, 2013; Cacciò y Widmer, 2014).

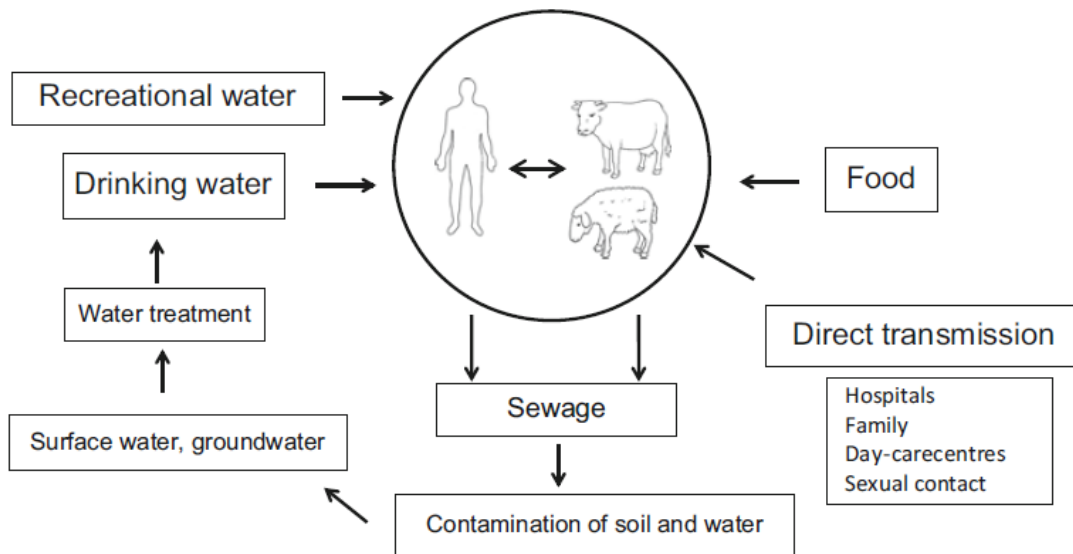
Esta última vía, considerada indirecta, es la más significativa desde el punto de vista epidemiológico en cuanto a su diseminación, dadas las características del parásito, ya que, presenta ooquistes de pequeño tamaño, una gruesa pared quística, resistencia al tratamiento con cloro y ácidos, viabilidad prolongada de hasta varios meses en el ambiente, excreción de estadios inmediatamente infectivos, baja dosis infectante para infectar otros organismos y considerable potencial zoonótico (García, 1999; Fayer y Xiao, 2008; Zanaro y Garbossa, 2008; Yoder y Beach, 2010; Cacciò y Widmer, 2014).

La contaminación de aguas de consumo con material fecal de ganado bovino o humano se ha asociado con brotes de diarrea causada por este parásito. Este aspecto es especialmente importante, y debe ser considerado desde el punto de vista de la salud pública, ya que los métodos usuales de tratamiento de aguas potables como son la filtración, floculación, sedimentación y desinfección, no son completamente eficaces en la remoción o inactivación de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Luna *et al.*, 2002; Kirby *et al.*, 2003; Fayer, 2004; Krewski *et al.*, 2004; Fayer y Xiao, 2008; Del Coco *et al.*, 2009).

Se ha descrito la importancia en la transmisión de la criptosporidiosis, de las fuentes de agua recreacionales, como piscinas públicas, estuarios y agua de mar. En el caso de piscinas públicas, la combinación de contaminación fecal frecuente, la resistencia de los ooquistes a la acción del cloro, la baja dosis infectante necesaria y la alta densidad de personas en estas, la transforma en una importante fuente de transmisión. En el caso de estuarios y aguas de mar, se describe la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en mariscos, debido a que estos filtran pequeñas partículas provenientes del agua para su



alimentación. Mediante el uso de pruebas moleculares los ooquistes que están presentes en mayor cantidad son *C. parvum* y en menor cantidad *C. hominis*, *C. baileyi* y *C. canis*. También se ha referido la presencia de ooquistes en aquellas zonas en las cuales desembocan los canales o aguas de alcantarillados (Fayer, 2004; Fayer y Xiao, 2008).



**Figura 5: Principales rutas de transmisión de *Cryptosporidium parvum*.**

**Obtenido de: Obtenido de: Cacciò y Widmer, 2014.**

El desarrollo de nuevas técnicas para el diagnóstico molecular ha permitido identificar a *C. hominis* y *C. parvum*, como aquellos que con mayor prevalencia infectan al hombre (Xiao y Ryan, 2004; Sunnotel *et al.*, 2006; Mercado *et al.*, 2007; Cama *et al.*, 2008; Pintar *et al.*, 2010; Cacciò y Widmer, 2014).

La prevalencia de la enfermedad en humanos y países industrializados oscila entre 0,1 y 27,1%, con una media de 4,9%, mientras que en países en desarrollo los resultados varían entre 0,1 a 31,5%, con una media de 7,9%, excluyendo los brotes epidémicos específicos y a los sujetos con SIDA. Aun cuando los estudios epidemiológicos han demostrado que la parasitosis está más difundida de lo que anteriormente se pensaba, es

difícil determinar la extensión del problema, tanto a nivel médico veterinario como humano (Fayer y Xiao, 2008; Del Coco *et al.*, 2009; Neira *et al.*, 2013; Cacciò y Widmer, 2014).

En todo caso, en la actualidad y en seres humanos, se describe que las manifestaciones clínicas son más frecuentes en los niños, lo anterior debido a que todavía en los adultos la infección puede ser subdiagnosticada y comúnmente los datos clínicos disponibles son menores (Fayer y Xiao, 2008; Neira *et al.*, 2013).

Como modelo animal, la criptosporidiosis en ganado bovino afecta tanto a razas de carne como de leche, siendo la principal fuente de infección las heces excretadas por los animales neonatos con diarrea, vía fecal-oral, aunque también hay que considerar la eliminación de ooquistes por animales adultos que actúan como portadores asintomáticos. Durante el periodo de máxima eliminación, los neonatos infectados pueden excretar entre  $10^6$ - $10^7$  ooquistes por gramo de heces (Soulsby, 1987; Cordero Del Campillo *et al.*, 1999; Fayer y Xiao, 2008; Cacciò y Widmer, 2014).

Entre los factores de riesgo a considerar en esta especie animal, existen estudios que revelan que hay una asociación significativa entre la edad y el riesgo de infección para terneros menores de 30 días. Así también el riesgo aumentaría si los animales están hacinados y si la higiene y otras prácticas de manejo son deficientes (Cordero Del Campillo *et al.*, 1999; Fayer, 2004; Del Coco *et al.*, 2008; Fayer y Xiao, 2008; Cacciò y Widmer, 2014).

Un estudio describe, que al mantener a los terneros estabulados junto a su madre evitando el contacto con otros terneros, la prevalencia de infección por *C. parvum* es menor comparada con aquellos terneros estabulados, pero con contacto con otros animales de su misma especie y edad (Castro-Hermida *et al.*, 2002a).

A su vez, existen discrepancias en relación a que la ausencia de consumo de calostro sea considerado un factor de riesgo, ya que se ha descrito que los anticuerpos calostrales producidos en respuesta a la infección natural tienen un efecto protector variable frente a la infección neonatal en terneros (Fayer y Xiao, 2008; Cacciò y Widmer, 2014). Sin embargo, otros autores han visto que la ingestión de por lo menos 750 mL de calostro dentro de la

primera hora de vida si protegería a los terneros de la infección (Cordero Del Campillo *et al.*, 1999).

El tamaño del rebaño condiciona la presentación de la infección, existiendo mayor frecuencia en rebaños grandes (mayor densidad de animales, alta carga de patógenos, etc.) (Soulsby, 1987; Cordero Del Campillo *et al.*, 1999; Cacciò y Widmer, 2014).

Cuando *Cryptosporidium* es el único agente causante de diarrea, la mortalidad es baja, pero en asociación con otros agentes infecciosos la mortalidad puede ser alta (Lippi y Castro, 2003).

Desde que los animales fueron domesticados, y los seres humanos se convirtieron en dependientes de los productos o servicios que suministran, en particular de los alimentos y las fibras, las infecciones que afectan a la salud y la productividad de la ganadería han sido una preocupación (Soulsby, 1987; Cordero Del Campillo *et al.*, 1999; Cacciò y Widmer, 2014).

Así, desde que *Cryptosporidium* fue descrito como una curiosidad biológica por Tyzer en 1907, hasta que fue identificado por primera vez como un agente biológico causante de enfermedad en animales pasaron muchas décadas. Precisamente, no fue hasta 1950 en pavos y luego a principios de 1970 en terneros cuando esto ocurrió. Sin embargo, el mayor interés por la criptosporidiosis se estableció con el primer reporte de un caso humano y el reconocimiento de que *Cryptosporidium* tenía importancia médica, lo que también sucedió a fines de esa década. Desde entonces el conocimiento sobre la importancia veterinaria de la infección por *Cryptosporidium* se ha expandido enormemente, sobre todo en el sector ganadero más afectado por la criptosporidiosis, como son los terneros jóvenes. Sin embargo, como la evidencia lo demuestra, casi todos los animales domésticos pueden ser patológicamente afectados por al menos una especie de *Cryptosporidium*, llegando incluso en algunos casos a ser fatal. Hasta la fecha, como ha sido indicado, algunas especies de *Cryptosporidium* de animales pueden ser transmitidos al ser humano (zoonosis) y viceversa (antropozoonosis). Así también, se ha descrito que *Cryptosporidium* es un parásito de gran éxito, como lo demuestra su amplia gama de hospederos, su gran distribución geográfica y

su complejo control. Por lo tanto, mientras los seres humanos tengan y dependan de los animales, habrá una necesidad de prevenir la transmisión de la criptosporidiosis entre los animales, las personas y, las personas y los animales deficientes (Cordero Del Campillo *et al.*, 1999; Fayer, 2004; Del Coco *et al.*, 2008; Fayer y Xiao, 2008; Del Coco *et al.*, 2009; Cacciò y Widmer, 2014).

En Chile, lugar donde se llevó a cabo este estudio, se reconoce la criptosporidiosis como causa de diarrea en animales desde la década del 80' y en relación a los humanos, se asocia como causa de cuadros digestivos a partir de 1985 (Gorman *et al.*, 1986; Alcaíno *et al.*, 1989, Atías, 1998). Hasta la fecha se ha descrito la presencia de este coccidio en algunos animales domésticos como, vacunos, ovinos, cerdos, cabras, llamas, alpacas, equinos, pollos, palomas, perros y gatos (Gorman *et al.*, 1986; Alcaíno *et al.*, 1989; Alcaíno y Gorman, 1999) y recientemente se encontraron ooquistes de *Cryptosporidium* en heces de pingüinos Adelia y Papua del territorio antártico chileno (Fredes *et al.*, 2007; 2008), en cotorra argentina silvestres (*Myiopsitta monachus*) y en animales exóticos en cautiverio, como son leones africanos y tigres de bengala (Fredes *et al.*, resultados no publicados). La frecuencia de infección por *Cryptosporidium* spp., reportada a fines de la década de los 80' en terneros diarreicos de lechería y en la Región Metropolitana era de un 23,2% (Gorman *et al.*, 1989). Así también, a fines de los 90', los niveles de infección en otras zonas del país, como la zona sur, fueron de alrededor de un 30% (Campano, 1997).

### **Patogenia y signos clínicos**

Como fue indicado en el ciclo biológico, una vez producido el desenquistamiento en el tracto gastrointestinal, los esporozoítos de *Cryptosporidium* se liberan e inician la adhesión y la invasión, ingresando por un proceso desconocido, a la parte apical de la célula hospedadora, donde se internaliza en un compartimiento extracitoplasmático, al interior de una vacuola parasitófora generada en esta célula. La invasión y multiplicación que provoca este protozoo, principalmente en los enterocitos, ya que puede propagarse a

través del tracto digestivo y a sitios extraintestinales, se traduce en la destrucción de las células digestivas, lo que produce una atrofia parcial de las vellosidades intestinales y fusión de éstas, quedando la superficie de absorción disminuida (Soulsby, 1987; Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999, Fayer y Xiao, 2008; Del Coco *et al.*, 2009; Neira *et al.*, 2013; Cacciò y Widmer, 2014).

La presencia de la vacuola parasitófora, produce que las células regulen el aumento de su tamaño a través de la modificación de la permeabilidad de la membrana plasmática al agua y a ciertos iones. A su vez, *Cryptosporidium* recluta un cotransportador de Na<sup>+</sup>/glucosa y una acuoporina en el sitio de adhesión. Todo lo anterior, posibilita el ingreso de glucosa y agua a la célula hospedadora, provocando una mayor protrusión de esta (Chen *et al.*, 2005). Los diferentes estadios parasitarios desplazan el borde de las microvellosidades y, eventualmente, llevan a la pérdida de la superficie intestinal. Así también, se reduce el tamaño de las vellosidades y aumentan de longitud las criptas intestinales por la aceleración de la división celular a fin de compensar la muerte celular (Gookin *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2007). La apoptosis celular, secundaria a la infección, es un mecanismo defensivo de la mucosa, sin embargo se ha descrito que *Cryptosporidium* puede inhibir la muerte celular programada de las células parasitadas (Deng *et al.*, 2004). El efecto antiapoptótico predomina entre las 6 y las 24 horas posinfección; en tanto que a las 24-48 horas posinfección existen señales proapoptóticas, lo que permite que el protozooario complete su ciclo de vida antes de que la célula hospedadora entre en apoptosis (Okhuysen y Chappell, 2002).

Simultáneamente, el organismo intenta reemplazar las células dañadas mediante hiperplasia de las criptas, reemplazando las células maduras dañadas por otras nuevas, cuya funcionalidad y capacidad absorptiva y enzimática es menor, siendo además secretoras de iones Cl<sup>-</sup>, lo que se agrava por el paso de fluidos desde la vellosidad al lumen intestinal, debido al aumento de la presión osmótica por el acúmulo de nutrientes en el lumen, generando un síndrome de mala absorción (Soulsby, 1987; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Botero y Restrepo, 2003; Del Coco *et al.*, 2009) lo que además lleva a un sobre crecimiento bacteriano que agrava aún más el cuadro (Atías, 1998; Del Coco *et al.*, 2009).

Paralelamente, puede existir una alteración en la permeabilidad del epitelio intestinal, por la modificación de las uniones celulares. Como consecuencia de todos estos factores, se rompe el equilibrio entre absorción y secreción (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

Por otro lado, existe infiltración de la lámina propia por células inflamatorias, como respuesta del hospedador. Así por ejemplo, los macrófagos podrían producir factor de necrosis tumoral ( $\alpha$ TNF), estimulando la producción de prostaglandinas ( $\text{PGE}_2$ ) por parte de los fibroblastos u otros tipos celulares de la lámina propia que secretan  $\text{Cl}^-$  e inhiben la absorción de NaCl. Igualmente, polimorfonucleares neutrófilos podrían activar la síntesis de  $\text{PGE}_2$  u otros productos que estimulan la secreción. La existencia de una respuesta hipersecretora se ha relacionado con la activación de diversos mediadores de la inflamación celular (bradiquinina y  $\text{PGE}_2$ ) y también con el efecto de las sales biliares, que al no ser absorbidas en íleon, dañarían el epitelio del colon estimulando la secreción de fluidos y electrolitos por activación del AMP cíclico (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

La gravedad de los cambios morfológicos se correlaciona con el número de parásitos presentes en el sitio de infección. Éstos se evidencian como macro y microgamontes basófilos, de 4-5  $\mu\text{m}$  de diámetro, adheridos a la superficie de las células intestinales formando cadenas (Pantenburg *et al.*, 2008). Los hallazgos histológicos de la mucosa intestinal se asocian con una atrofia leve, moderada o intensa de las vellosidades, que se presentan acortadas y ensanchadas, hiperplasia y elongación de las criptas intestinales e intensa apoptosis (Sasahara *et al.*, 2003). En la lámina propia se evidencia un infiltrado inflamatorio con predominio de linfocitos, macrófagos y neutrófilos (Laurent *et al.*, 1999).

Sin embargo lo anterior, los mecanismos causales de la diarrea secretora e inflamatoria no han sido del todo esclarecidos, ya que como ha se ha indicado, es multifactorial, dado por efecto directo del parásito y sus productos en la capa epitelial, por efecto indirecto por la respuesta inmune e inflamatoria del hospedador, e incluso como mecanismo específico, se ha sugerido la participación de una enterotoxina, que no ha sido aislada, ya que en cultivos celulares se ha observado apoptosis de células del epitelio intestinal y biliar humano (Neira *et al.*, 2013).

Se desconoce la puerta de ingreso cuando *Cryptosporidium* ocasionalmente infecta otros epitelios como el respiratorio y renal, especialmente en individuos inmunocomprometidos (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Mercado *et al.*, 2007). Lo más probable es que cuando se trata de las vías respiratorias sea por aspiración a partir del tracto digestivo. Así por ejemplo, en las aves se ha descrito la transmisión por inhalación (Neira *et al.*, 2013). Sin embargo, el concepto de transmisión por ingestión de ooquistes de pared gruesa eliminados por las heces, es el que comúnmente se acepta (Cordero Del Campillo *et al.*, 1999; Del Coco *et al.*, 2009).

En este caso, y a pesar de los síntomas, no existen signos patognomónicos que diferencien a la criptosporidiosis, de procesos causados por otros enteropatógenos, y el principal signo clínico de esta parasitosis es la diarrea, no hemorrágica (Georgi & Georgi, 1990; Cordero del Campillo, 1999; Santín *et al.*, 2004; Fayer y Xiao, 2008; Del Coco *et al.*, 2009; Cacciò y Widmer, 2014), la cual se asocia a la excreción de un gran número de ooquistes en las heces. Su duración es variable, oscilando entre 3-5 días en los casos leves y 1-2 semanas en los más graves (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). El periodo de incubación, similar en seres humanos y animales, es de 3 a 5 días (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Neira *et al.*, 2013; Cacciò y Widmer, 2014), periodo similar al de prepatencia (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

Dependiendo de diversos factores como la edad, el estado inmunitario y las condiciones medio ambientales, se pueden generar otros signos clínicos como cólicos abdominales, vómitos, pérdida de peso, postración, anorexia y fiebre (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Botero y Restrepo, 2003; Fayer, 2004; Neira *et al.*, 2013).

Las alteraciones que se pueden observar a la necropsia de un rumiante neonato afectado por este parasitismo incluyen: una atrofia de la grasa mesentérica, infarto en los linfonodos regionales y una enteritis congestiva del intestino delgado, con la mucosa hiperémica, pero no hemorrágica. Así mismo, las vellosidades de este segmento intestinal se encuentran atrofiadas y el epitelio columnar es sustituido por células inmaduras. El contenido intestinal es, por lo general, amarillento, acuoso y suele existir acumulo de gas en ciego y colon (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

La evolución clínica en seres humanos depende del estado inmunológico del paciente, ya que en personas inmunocomprometidas *Cryptosporidium* es un agente oportunista. Así por ejemplo en pacientes HIV positivos, este protozoo causa infecciones recurrentes o crónicas, por lo que la criptosporidiosis intestinal crónica representa una enfermedad definitoria de SIDA y que puede comprometer a todo el tracto digestivo. Por otra parte, en inmunocompetentes, la infección es autolimitante. Sin embargo, los síntomas pueden prolongarse en promedio por dos semanas, con una recurrencia de hasta un 40% (Del Coco et al., 2009; Neira et al., 2013).

Cada vez hay más evidencia en el ser humano que entre las especies y los genotipos zoonóticos, la virulencia y las manifestaciones clínicas pueden ser diferentes (Neira et al., 2013; Cacciò y Widmer, 2014).

### **Diagnóstico**

Los antecedentes epidemiológicos y la sintomatología que se observa, al ser esta última inespecífica, puede ayudar a hacer un diagnóstico, pero de tipo presuntivo. Para un diagnóstico correcto es necesario confirmar la presencia del parásito por técnicas de laboratorio.

El diagnóstico de criptosporidiosis intestinal se efectúa mediante la búsqueda e identificación de ooquistes en la materia fecal (Del Coco et al., 2009). Así por ejemplo, en los rumiantes en general, se sospecha de criptosporidiosis por la presencia de una diarrea intensa, en animales de menos de un mes de edad que no responden a tratamiento (Barriga, 2002). En estos casos, la confirmación de la infección es a través de la demostración de los ooquistes en las deposiciones (Cordero del Campillo et al., 1999; Botero y Restrepo, 2003; Neira et al., 2013).

Además de la observación en heces, se puede realizar la confirmación por otros métodos. La obtención de biopsias de intestino delgado también permite visualizar al parásito, como trofozoito en el borde apical de los enterocitos (García y Bruckner, 1988;



Atías, 1998). Existen diversas técnicas de tinción histológica que podrían ser usadas, entre las que se encuentran hematoxilina-eosina y azul de toluidina (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Sin embargo, este método no es usado en el diagnóstico *in vivo*, debido a su carácter invasivo, a su escasa sensibilidad y al elevado costo.

Los protocolos de laboratorio de rutina para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., tanto en heces como en muestras de medio ambiente (ej. agua), incluyen la examinación microscópica de estas extensiones, previa concentración de la muestra, con el objeto de aumentar la sensibilidad, realizando una tinción posterior ya sea con Giemsa, Heine o ZN (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer, 2004; Neira *et al.*, 2013). Dentro de estas, la técnica más difundida para la detección de ooquistes en heces, es la de ZN modificada (Georgi y Georgi, 1990; Atías, 1998; Barriga, 2002; Neira *et al.*, 2013).

Otro método de tinción para el diagnóstico de este protozoo es la de AU, utilizado principalmente en medicina humana. Éste, al igual que la tinción de ZN, consiste en la visualización de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en extendidos de heces previamente concentradas y teñidas con AU, pero a través de microscopía de luz ultravioleta que permite ver la fluorescencia de los estadios parasitarios (Atías, 1998; Fayer, 2004). AU posee ventajas frente al método de tinción de ZN en cuanto a la rapidez en su realización y lectura microscópica (De Quadros *et al.*, 2006).

Otro grupo de técnicas que se pueden emplear son de tipo inmunitario. Entre éstas se encuentran la aglutinación en látex, la inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales, y ELISA de inmunocaptura de antígenos parasitarios en heces (García y Bruckner, 1988; Leng *et al.*, 1996; Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; García, 2001; Botero y Restrepo, 2003; Del Coco *et al.*, 2009). Estas técnicas se han aplicado con el propósito de mejorar la calidad de diagnóstico (Atías, 1998; Del Coco *et al.*, 2009). De todos los métodos señalados, es la inmunofluorescencia la que presenta mayor sensibilidad y especificidad y es la técnica que se usa con mayor frecuencia en el diagnóstico de la enfermedad en humanos (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Sin

embargo, esta técnica en estudios nacionales de pacientes con diarrea crónica y SIDA, demostró una sensibilidad de un 78,3% versus un 86,9% para ZN (Atías, 1998).

También se han implementado técnicas inmunológicas como el Crypto Strip<sup>®</sup> (CR) (CORIS, 2001), que es un test inmunocromatográfico que permite detectar ooquistes de *C. parvum* en muestras fecales concentradas o no concentradas. La prueba se basa en la utilización de un sistema inmunocromatográfico con partículas de oro coloidal. Se presenta en un kit comercial que se encuentra listo para ser utilizado y sólo requiere una dilución de la muestra fecal en una solución tampón proporcionada por el fabricante, que es puesta en contacto con una tira reactiva (membrana de nitrocelulosa sensibilizada con anticuerpos anti *C. parvum*). La especificidad de la prueba se asegura mediante el empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de superficie de la membrana del ooquiste, y conjugado con el oro coloidal.

Recientemente se han estudiado técnicas moleculares, las que no necesariamente son más sensibles debido a múltiples factores, como la inadecuada extracción del ADN desde los ooquistes del parásito (Wiedenmann *et al.*, 1998), a la degradación del ADN extraído, y a la presencia de inhibidores en muestras de heces de la actividad de la polimerasa responsable de la amplificación del material genético (Jaranillo *et al.*, 2006), sumado al escaso número de ooquistes que suelen ser eliminados por los animales sin sintomatología gastrointestinal. Por todo lo anterior, la técnica de ZN, sigue siendo la más utilizada para la detección de este agente parasitario zoonótico.

## **Control y tratamiento**

Como ya fue indicado, la criptosporidiosis se contrae fundamentalmente, por ingestión de los ooquistes. Este hecho, unido a la dificultad para su tratamiento, hace que las medidas sanitarias efectivas deben recaer, necesariamente, en la implementación de medidas adecuadas para prevenir la transmisión del parásito (Fayer, 2004; Zanaro y Garbossa, 2008; Del Coco *et al.*, 2009).

En el caso humano el control frente a esta enfermedad consiste en evitar la ingesta de agua, sobre todo no potable, o alimentos crudos, que puedan estar contaminados con heces humanas o de animales, así como verduras y frutas (Acha y Szyfres, 2003; Del Coco *et al.*, 2009; Neira *et al.*, 2013). Igualmente debe evitarse la inmersión en aguas que contienen efluentes de alcantarillado o de granjas bovinas (Acha y Szyfres, 2003), acompañado de practicar una buena higiene en actividades recreativas, sexuales, de viajes y en el manejo de animales que implique una posible exposición a material fecal (Neira *et al.*, 2013). Además, el consumo de leche no pasteurizada y moluscos marinos y terrestres crudos o insuficientemente cocidos implican un riesgo de infección (Fayer y Xiao, 2008; Neira *et al.*, 2013; Cacciò y Widmer, 2014).

Por todo lo anterior, resulta crucial y constituye un desafío permanente para las plantas de tratamiento, la remoción de este agente protozoario desde las aguas, aún en países con tecnología avanzada. Por esto, el proceso de potabilización debe lograr agua bebible que cumpla los requisitos exigidos por la legislación vigente, que abarca las etapas de coagulación, floculación, decantación, filtración y desinfección. Sin embargo, dado que los ooquistes de *Cryptosporidium* resisten las condiciones del medio ambiente, que el cloro, a las concentraciones usadas para potabilizar el agua no los destruye y que son infectivos aún en bajas dosis, es obvio que, una vez superadas las barreras de tratamiento del agua, el microorganismo estará en condiciones de infectar un nuevo hospedero (Fayer, 2004; Sunnotel *et al.*, 2006; Zanaro y Garbossa, 2008; Pintar *et al.*, 2010; Yoder y Beach, 2010).

En la búsqueda de métodos de destrucción de este agente parasitario, se ha descrito que tanto el ozono como la luz ultravioleta, son eficaces en la eliminación de ooquistes en las plantas de tratamiento de agua (Fayer, 2004; Yoder y Beach, 2010). Así también, el tratamiento y uso combinado de distintos químicos, como el cloro y la monoclорamina, así como con el ozono y la monoclорamina, han demostrado mayor eficacia que usándolos por separado (Fayer, 2004).

En todo caso, las medidas que se toman habitualmente durante el procesamiento de alimentos, para el control de la transmisión de enfermedades infecciosas y zoonosis

(bajo pH, congelado, calentamiento a 55 °C por 30 seg o a 70 °C por 5 seg), son útiles para eliminar el parásito (Zanaro y Garbossa, 2008).

En relación a los pacientes inmunocomprometidos, las medidas indicadas deben extremarse en relación a la no ingestión de verduras crudas y agua potable sin hervir (Atías, 1998; Neira *et al.*, 2013). Sin embargo, el riesgo de infección también puede reducirse con una adecuada higiene de manos, sobre todo ante una posible contaminación con heces humanas o animales y antes de consumir alimentos (Neira *et al.*, 2013), sobre todo en el caso de manipuladores de alimentos.

El control de esta parasitosis en los animales es muy difícil, ya que prevenir la exposición de los terneros a la contaminación es complicado. Se pueden adoptar medidas de manejo, como puede ser poner los bebederos y comederos altos para de esta forma evitar la contaminación con heces. Así también, se recomienda remover las deposiciones diariamente, para impedir la diseminación de los ooquistes. Otras medidas que pueden disminuir el riesgo de infección son aquellas que permitan controlar la temperatura y humedad de las maternidades, así como mantener la limpieza (Cordero del Campillo *et al.*, 1999) e incluso desinfectar estas instalaciones con ozono o luz ultravioleta (Fayer, 2004). En este sentido medidas tan básicas como separar a los animales enfermos de los sanos y procurar que la ingestión de calostro y leche sea la adecuada no pueden dejar de practicarse (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer y Xiao, 2008).

En relación al tratamiento, hasta la fecha no existen fármacos 100% eficaces contra la criptosporidiosis animal ni la humana. Esto a pesar que la lista de productos probados ha sido larga (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2007; Fayer y Xiao; 2008; Neira *et al.*, 2013). Este hecho, podría estar relacionado a la ubicación de este agente parasitario en el hospedero, ya que como fue relatado anteriormente se encuentra a nivel intracelular, pero extrocitoplasmático (Figura 2) (Neira *et al.*, 2013).

En seres humanos inmunocompetentes, al tratarse de una enfermedad autolimitante, el tratamiento suele no ser necesario (Del Coco *et al.*, 2009; Neira *et al.*, 2013). A pesar de lo anterior, en este tipo de pacientes se han utilizado diversos

medicamentos como la espiramicina, macrólidos, paramomicina, entre otros, todos con un éxito limitado (Neira *et al.*, 2013). Este último ha demostrado una favorable respuesta clínica y parasitológica en más de la mitad de los casos tratados, pero luego de discontinuar el tratamiento los pacientes recaen (Atías, 1998). Por último, el calostro bovino hiperinmune proporcionado a personas infectadas ha dado resultados clínicos sin diferencias estadísticas, comparadas con el grupo control (Atías, 1998; Botero y Restrepo, 2003; Cacciò y Widmer, 2014).

Así, la urgencia por encontrar una terapia medicamentosa efectiva contra la criptosporidiosis en individuos con SIDA, ha llevado a la administración sin precedentes de una amplia gama de agentes quimioterápicos, inmunomoduladores y paliativos a esta población, que no han sido efectivos. Sin embargo, la Nitazoxanida (Alinia®), actualmente se encuentra aprobada por la FDA como tratamiento para la criptosporidiosis en individuos inmunocompetentes (Fayer y Xiao, 2008; Neira *et al.*, 2013).

Entre los productos que han mostrado alguna actividad parcial en algunos animales, como rumiantes neonatos, se mencionan al amprolio, la salinomicina y la sulfaquinoxalina, las que reducen el número de ooquistes excretados (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

Dado que no hay drogas universalmente efectivas para la profilaxis o terapia en humanos o animales que prevenga o detenga la producción de ooquistes por parte de los individuos infectados, la higiene, incluyendo la desinfección, sigue siendo la herramienta de manejo más efectiva (Fayer y Xiao, 2008; Del Coco *et al.*, 2009; Cacciò y Widmer, 2014).

Ante esta situación, tanto en humanos como en animales, una terapia efectiva para la criptosporidiosis considera la rehidratación con reposición de electrolitos, uso de drogas antidiarreicas, y el uso de drogas que por reputación son consideradas útiles contra *Cryptosporidium* spp. (Fayer y Xiao, 2008; Del Coco *et al.*, 2009; Cacciò y Widmer, 2014).

En Europa está aprobado, para el tratamiento de la criptosporidiosis en terneros, el uso de Lactato de Halofuginona. Este medicamento, cuando se utiliza como tratamiento profiláctico, ha demostrado algunos efectos beneficiosos, tales como reducir la salida de ooquistes y hacer más leves los signos clínicos. Sin embargo, el margen de seguridad es

estrecho, ya que es tóxico en sólo dos veces la dosis terapéutica. Por lo anterior, el tratamiento con lactato de Halofuginona sólo debe ser considerado en rebaños con problemas diarreicos graves y asociada con *C. parvum*. Cuando se utiliza el tratamiento, siempre debe ser en conjunto con la aplicación de medidas para reducir la contaminación ambiental y el riesgo de infección (Cacciò y Widmer, 2014).

### **Implicación en salud pública**

Como ya fue indicado este microorganismo es un agente ubicuo, ya que su aparición no está limitada a ninguna región geográfica o al grado de desarrollo tecnológico de la misma. Es así como los procesos de urbanización acelerados, la expansión de la pobreza, las migraciones no controladas de personas, sumada a la facilidad y rapidez en los desplazamientos, el movimiento creciente de animales y de productos de origen animal o la falta de saneamiento ambiental, son algunos de los factores que, sumados a la escasez de normas legales regulatorias, han posibilitado la dispersión de este agente y de la enfermedad. Esto junto a falta de una terapia adecuada incrementa las tasas de morbilidad, mortalidad y los gastos de atención médica asociados con el control de brotes epidémicos, por lo que la criptosporidiosis representa una amenaza de alcance mundial que exige una respuesta coordinada de los servicios de salud pública de todos los países (Fayer, 2004; Zanaro y Garbossa, 2008; Yoder y Beach, 2010).

Si bien los primeros casos fueron notificados en 1976, desde 1984, año en que se reportó el primer brote de criptosporidiosis transmitido a través del agua, en San Antonio, Texas, numerosos autores han descrito la presencia de este parásito en aguas de superficie y en aguas residuales no tratadas y su rol como agente etiológico de diarrea (Madore *et al.*, 1987; Ungar, 1990; 1994; WHO, 2009).

La criptosporidiosis adquirió verdadera importancia a partir de 1993, oportunidad en la que se produjo el brote epidémico más importante a nivel mundial, en Milwaukee, EE.UU., el cual afectó a más de 400.000 personas (Fayer, 2004; WHO, 2009). Desde

entonces, los casos de criptosporidiosis han sido informados en más de 40 países, tanto en individuos inmunocompetentes como en pacientes inmunocomprometidos (Fayer, 2004; Zanaro y Garbossa, 2008).

Se describe que la prevalencia de infecciones humanas es menor en los países industrializados, dado que la población tiene acceso a mejores servicios sanitarios y de agua de bebida, que en los países menos desarrollados. Las estadísticas publicadas abarcan valores desde 0,3 a 4,3% en los países de América del Norte hasta cifras que cubren el rango 3,2 -31,5% en América Central y del Sur (Fayer, 2004; Zanaro y Garbossa, 2008). Sin embargo, últimamente se ha incrementado el número de comunicaciones de brotes de criptosporidiosis, incluso en países industrializados como en Estados Unidos, España, Inglaterra, entre otros, por ingesta de aguas contaminadas con este agente, ya sea por aguas de piscina, aguas de ríos e incluso redes de agua potable (Fayer, 2004; Krewski *et al.*, 2004; Fayer y Xiao, 2008; Pintar *et al.*, 2010; Smith y Nichols, 2010), donde supuestamente las condiciones y manejos sanitarios podrían ser considerados como adecuados.

Su hallazgo frecuente en el agua para consumo humano es importante desde el punto de vista de la salud pública ya que, como fue mencionado, los métodos usuales de tratamiento de aguas potables no son muy eficaces para eliminar o destruir los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Kirby *et al.*, 2003; Fayer, 2004; Krewski *et al.*, 2004; Del Coco *et al.*, 2009; Fayer y Xiao, 2008; Pintar *et al.*, 2010; Cacciò y Widmer, 2014). Además, la resistencia de los ooquistes de este protozoario le permiten sobrevivir por varios meses en el agua potable (García y Bruckner, 1988; Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Sturbaum *et al.*, 2001; Fayer, 2004; Krewski *et al.*, 2004; Sunnotel *et al.*, 2006; Fayer y Xiao, 2008; Pintar *et al.*, 2010).

Precisamente, a raíz de una solicitud del organismo mundial de normas alimentarias, la Comisión del *Codex Alimentarius* (Codex), para que la Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) revisaran el estado actual de los conocimientos sobre los parásitos en los alimentos y sus efectos en la salud pública y el comercio, se confeccionó una lista con expertos en el tema. Como resultado de lo anterior, se concluyó que para estas organizaciones y para los

especialistas los parásitos afectan a la salud de millones de personas cada año, viviendo en el cuerpo humano durante décadas, y que a pesar del enorme coste social y su impacto a nivel mundial, existe por lo general falta de información sobre de donde proceden, cómo viven en el cuerpo, y lo más importante, la forma en que nos hacen enfermar. Para la FAO/OMS, esto es un primer paso para superar este obstáculo, centrandose inicialmente en los diez parásitos transmitidos por los alimentos con mayor impacto a nivel mundial. En este estudio, aparte de ser considerado un agente re-emergente, como ya fue descrito, *Cryptosporidium* en la actualidad es uno de los diez principales parásitos transmitidos por los alimentos y que causan mayor preocupación en el mundo, sobre la base de los siguientes criterios: número de enfermedades a nivel mundial, distribución global, morbilidad aguda, morbilidad crónica e impacto económico (FAO, 2014).

A raíz de lo anterior, el Comité del Codex sobre Higiene de los Alimentos se encuentra ahora desarrollando nuevas directrices para el control de estos parásitos, a nivel mundial, incluyendo expertos de Chile. La FAO/OMS apoyan el proceso proporcionando información científica y técnica. El informe de la FAO/OMS enumera una serie de formas de reducir el riesgo de infecciones parasitarias. Aconseja a los agricultores vigilar el uso de fertilizantes orgánicos, asegurándose que el compostaje se realice correctamente y se elimine toda la materia fecal. También es necesario supervisar de cerca la calidad del agua. Para los consumidores, se aconseja que toda la carne esté bien cocinada y sólo se utilice agua limpia para lavar y preparar las verduras (FAO, 2014).

Además, Organismos Internacionales, como la Organización Mundial de Salud Animal (OIE), FAO y OMS, hace algunos años han estado preocupados de la necesidad de que el mundo, a través de sus gobiernos y organizaciones académicas y de investigación, integren los conceptos de “Un Mundo Una Salud” en forma multisectorial, ofreciendo nuevas alternativas de investigación, desarrollo e innovación, para satisfacer así los requerimientos actuales de las poblaciones humanas y animales, integradas con los impactos medio ambientales (OIE, sf). Se espera que esto permita que existan debates en torno al concepto, que den por resultado compromisos cada vez más concretos de todos los países del mundo en lo que atañe a la transparencia de su situación sanitaria y al



establecimiento de mecanismos que permitan detectar oportunamente los brotes de enfermedades, mediante bases legales sólidas e inversiones nacionales que posibiliten su conformidad con las normas de calidad, especialmente a nivel de los Servicios Veterinarios, con el apoyo de la OIE y de sus gobiernos y, si es necesario, de donantes internacionales (Vallat, sf).

Desde esta última perspectiva, precisamente la criptosporidiosis es un buen modelo de enfermedad zoonótica re-emergente transmitida por el agua, que puede ser o es utilizada para demostrar los factores que influyen en su prevalencia, control y profilaxis, desde una mirada multifactorial y coordinada, al ser un problema inherente a la salud humana, animal y ambiental, de tal forma que permita disminuir el riesgo de contacto del agente con su hospedero, mediante la educación, la aplicación de medidas sanitarias efectivas (humana y animal), la vigilancia - monitoreo (espacial y temporal) y el adecuado resguardo de los recursos hídricos (Figura 6).



**Figura 6: Factores que afectan la prevalencia y vigilancia de *Cryptosporidium*.**

**Obtenido de: Cacciò y Widmer, 2014.**



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## MATERIAL Y MÉTODOS.

### Diseño experimental

El trabajo se estructura en tres experiencias para completar tanto el objetivo general como los objetivos específicos indicados.

#### Experiencia 1:

1. Detectar *Cryptosporidium* spp. mediante tinción de Ziehl Neelsen modificada (ZN) y mediante tinción de Aureamina (AU) en muestras de heces bovinas.
2. Analizar y comparar los resultados obtenidos por ambas técnicas microscópicas.
3. Confirmar muestras de heces bovinas positivas a *Cryptosporidium* spp. mediante Criptostrip®.

##### a. **Tamaño, recolección y procesamiento de las muestras**

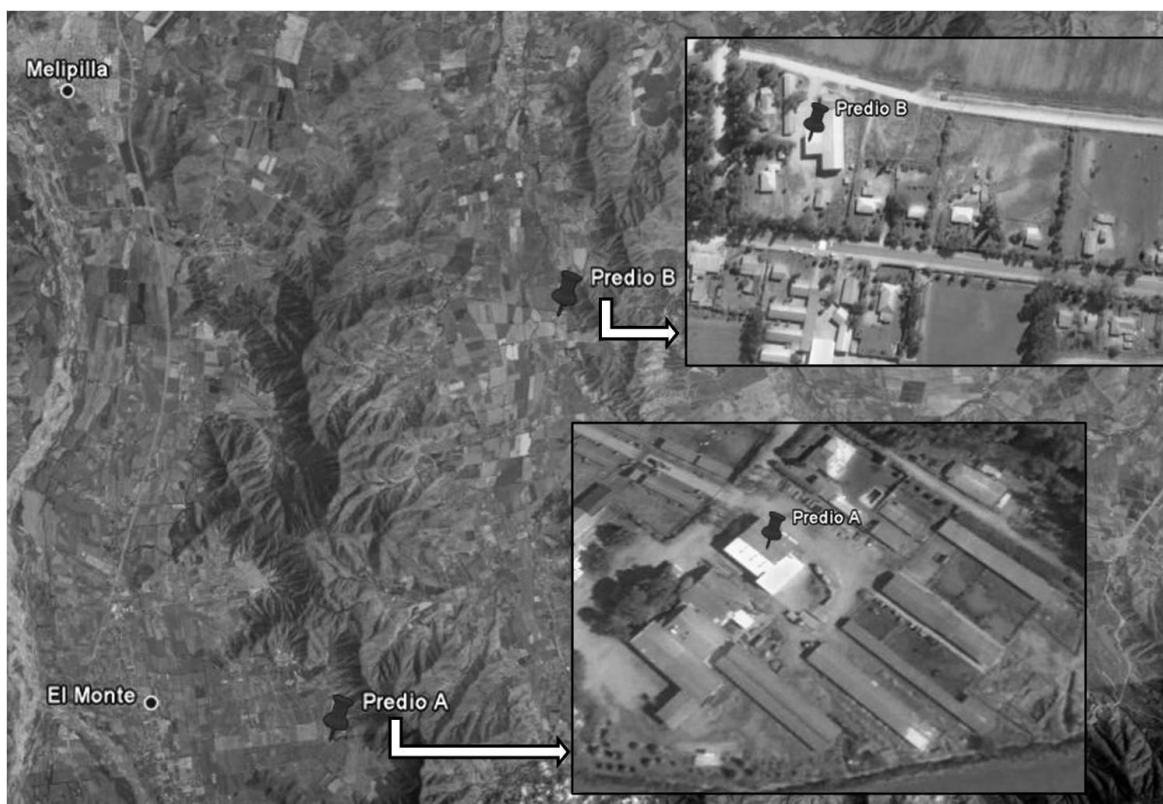
Se obtuvieron 205 muestras de heces de terneras diarreicas, desde el día de nacidas hasta las cuatro semanas de edad, de dos predios lecheros de la Región Metropolitana, Chile. El tamaño de muestras, para el diagnóstico por las técnicas microscópicas tradicionales (TM) se determinó para la comparación de dos proporciones asumiendo arbitrariamente un 70% de positivos para la prueba de ZN y un 85% para la prueba de AU (Fayer y Xiao, 2008). Con un 95% de confianza y 95% de potencia, el número de muestras necesarias fue de 200.

Para la realización de este estudio se recolectaron, principalmente durante los meses de otoño, invierno y primavera. Las muestras de heces se obtuvieron de dos predios bovinos lecheros distintos de la Región Metropolitana, Chile (predio A y predio B) (Figura 7).

La recolección de muestras se realizó directamente desde el recto de cada animal. Estas fueron depositadas en tubos plásticos de 50 mL, con su respectiva identificación (fecha de recolección, número de ternera y fecha de nacimiento), y almacenadas en un contenedor

adecuado, con hielo, y trasladadas inmediatamente al Laboratorio de Parasitología, Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, de la Universidad de Chile. Además se llevó un registro en el que se anotaron otros datos tomados a nivel de terreno como el predio de recolección, administración de calostro, tipo de alimentación, tipo de alojamiento y tratamientos realizados.

**Figura 7. Observación satelital del Predio A (33°38'S, 70°59'O) y Predio B (33°34'S, 71°06'O), ambos destinados a la producción de bovinos de leche. Región Metropolitana,**



**Chile.**

**Obtenido mediante Google Map®**

Una vez en el laboratorio, cada muestra se dividió en dos porciones; a una mitad se le agregó formalina al 10% y se mantuvo refrigerada entre 4 a 8 °C, para su uso en las TM

(Weitz y Tassara, 1989), mientras que la otra mitad se le agregó etanol al 70% y mantenidas a -20°C, para el posterior análisis por PCR (Mercado *et al.*, 2007).

Las muestras con formalina fueron tamizadas y posteriormente centrifugadas a 1.500 g por 15 min., para así concentrar los eventuales ooquistes presentes en la muestra. Transcurrido este tiempo se eliminó el sobrenadante y desde el sedimento se extrajo una pequeña cantidad de muestra con una micropipeta, con la que se realizó un extendido de 1 cm de largo por 0,5 cm de ancho en un portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente, para la posterior realización de la técnica de ZN. Del mismo sedimento se tomó otra pequeña cantidad de muestra y se realizó otro extendido de iguales características (duplicado), pero para realización de la técnica de AU.

La tinción de ZN, se realizó de acuerdo a lo descrito por Henricksen y Pohlenz (1981) y adaptado por Fayer y Xiao (2008), en tanto que la de AU siguió lo descrito por Fayer y Xiao (2008).

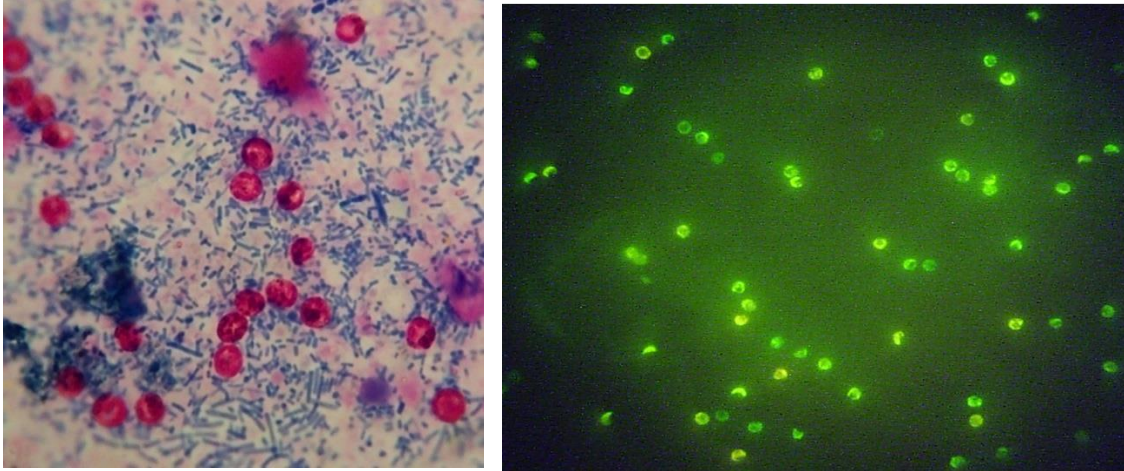
Una muestra se consideró positiva para *Cryptosporidium* si, al examen microscópico directo, se detectaba al menos un ooquiste que cumpliera con los criterios de propiedades ópticas (color), estructura interna, tamaño y forma, como se describe en Fayer y Xiao (2008) (Figura 8 a y b). Para la correcta lectura de las muestras en el microscopio, se contó con un control positivo. Se utilizó una muestra de heces humanas con abundantes ooquistes de *Cryptosporidium* spp., así como heces de bovinos positivos.

#### **b. Análisis de los resultados por las técnicas microscópicas.**

Se determinó la frecuencia de infección en porcentaje, durante el periodo de estudio, mediante los dos métodos microscópicos realizados.

Los resultados se analizaron mediante la prueba estadística de Mc Nemar, entre los resultados de las pruebas de ZN y AU para proporciones correlacionadas o dependientes (Remington y Schork, 1970). También se utilizó el Índice Kappa para determinar los niveles de concordancia entre ambas pruebas (Fleiss, 1981).





**a**

***Figura 6.a. Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. detectados mediante tinción de Ziehl-Neelsen en una muestra de heces de ternera diarreica de lecherías de la Región Metropolitana, Chile (x 1000).***

***Figura 6.b. Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. detectados mediante tinción de Aureamina en una muestra de heces de ternera diarreica de lecherías de la Región Metropolitana, Chile (x 400).***

***Obtenido de: Resultados del presente estudio***

### **c. Confirmación de muestras mediante Crypto Strip<sup>®</sup> (CR)**

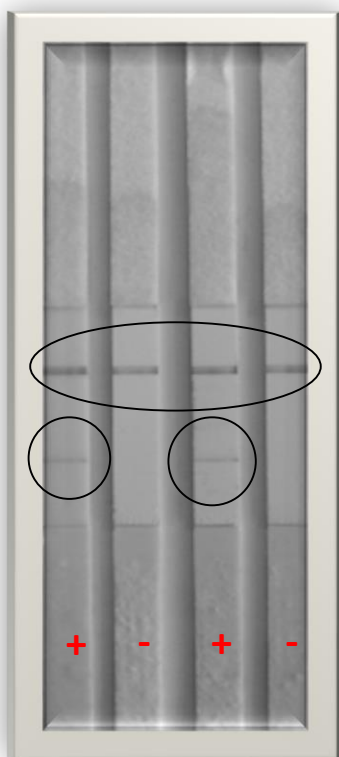
La prueba de diagnóstico inmunocromatográfica Crypto Strip<sup>®</sup> (CORIS Bioconcept, Bélgica), fue utilizada para la identificación del parásito en 22 muestras seleccionadas al azar, mediante una tabla de números aleatorios, que resultaron positivas (11) o negativas (11) a las TM. Este tamaño de muestra (n=11) fue calculado con un nivel de confianza de 95%, para detectar al menos un caso de enfermedad con un valor estimado de prevalencia de 25% (Gorman *et al.*, 1989) y en una población de enfermos de 200 animales (Thrusfield, 2005).

De acuerdo a la indicación del laboratorio fabricante, esta prueba diagnóstica posee una alta sensibilidad (cercana al 100%) cuando se aplica a heces humanas. Tiene también la ventaja de ser independiente de la lectura del operador, pero el inconveniente de un mayor costo.

CR se usó solo en las muestras congeladas y de acuerdo a instrucciones del fabricante. La prueba se basa en la utilización de un sistema inmunocromatográfico con partículas de oro coloidal. Está listo para ser utilizado y sólo requiere una dilución de la muestra fecal en una solución tampón proporcionada por el fabricante, que es puesta en contacto con una tira reactiva (membrana de nitrocelulosa sensibilizada con anticuerpos anti *C. parvum*). La especificidad de la prueba se asegura mediante el empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de superficie de la membrana del ooquiste, y conjugado con el oro coloidal.

Los kit se conservaron en su envase original, refrigerados a 4°C. Para su utilización, los reactivos se dejaron a temperatura ambiente previamente a la realización de la prueba.

Cuando la tira es sumergida en la suspensión fecal, esta migra con el conjugado por difusión pasiva (capilaridad) y llega al primer anticuerpo absorbido en la tira, el monoclonal anti *Cryptosporidium*. Si el parásito está presente en la muestra, éste es reconocido y revelado por la aparición de una línea de color rojo. Posterior a esto, la muestra continua fluyendo y llega a un segundo reactivo (anticuerpo que es considerado un control) que da a lugar a la aparición de una segunda línea roja oscura. Esta última línea indica que la cromatografía se ha desarrollado sin impedimentos y sería la única que aparecería en pruebas negativas (Figura 7).



***Figura 7. Observación de la positividad del “kit” inmunodiagnóstico Cryptos Strip<sup>®</sup> (como prueba confirmatoria), en muestras de terneras diarreicas de lecherías de la Región Metropolitana, Chile.***

***Obtenido de: Resultados del presente estudio***

**d. Publicación asociada a la Experiencia 1:**

***Cryptosporidium parvum* in diarrheic calves detected by microscopy and identified by immunochromatographic and molecular methods. Díaz-Lee A, Mercado R, Onuoha EO, Ozaki LS, Muñoz P, Muñoz V, Martínez FJ, Fredes F.\* Vet. Parasitol. 176: 139–144 (2011).**

## Experiencia 2:

1. Implementar y estandarizar un ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) género-específico que permita la detección de *Cryptosporidium* presente en las muestras de heces bovinas positivas a técnicas microscópicas (TM) y Crypto Strip® (CR).
2. Determinar y comparar la sensibilidad analítica (límite de detección) del ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) género-específico y de la tinción de Ziehl Neelsen (ZN), en diluciones crecientes de una muestra de heces bovinas positiva a *Cryptosporidium* spp.

### a. Tamaño y procesamiento de las muestras

El tamaño de muestras, requerido para detectar la enfermedad/infección por el método de diagnóstico molecular (PCR), se calculó de acuerdo a lo descrito por Thrusfield (2005), que considera que la proporción esperada de positivos cuando la prevalencia en los enfermos es de un 25% (Gorman *et al.*, 1989); y cuando el tamaño de la población es de 200 terneros diarreicos, tabularmente se precisa de una muestra de 11 terneros, para que con una seguridad del 95% se detecte a lo menos un ternero positivo.

Las muestras fijadas o preservadas con etanol, previo tamizaje y centrifugación, fueron descongeladas a temperatura ambiente.

Se tomaron 300 µL de heces a los cuales se les adicionó 300 µL de buffer TE (10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0).

Una vez realizado lo anterior, las muestras se hirvieron por 1 min. Pasado este tiempo se tomaron 200 µL de la solución, a la cual se le añadió 200 µL de SDS 10% más 20 µL de proteinasa K 10 mg/mL. Las muestras se incubaron durante toda la noche, a 65°C y posteriormente se guardaron a -20°C hasta la extracción de ADN (Mercado *et al.*, 2007).

La extracción de ADN se basó en los protocolos de Mercado *et al.*, (2007), que utiliza fenol, alcohol fenol cloroformo isoamílico y alcohol cloroformo isoamílico. El ADN fue precipitado con acetato de sodio y posteriormente lavado con etanol 70%. El pellet obtenido fue disuelto en 50 µL de agua estéril para PCR. El que finalmente fue visualizado

en una corrida electroforética (30-60 min. 50V) en geles de agarosa al 1,5% y teñidos con bromuro de etidio.

#### **b. Implementación del Ensayo de la PCR**

Para la PCR fueron diseñados y utilizados “primers” género-específicos, evaluados previamente por Ozaki y Mercado sólo en heces humanas, que amplifican un segmento de 522 pb de la subunidad 18S del gen ARN ribosomal de *Cryptosporidium* spp.

Los primers fueron:

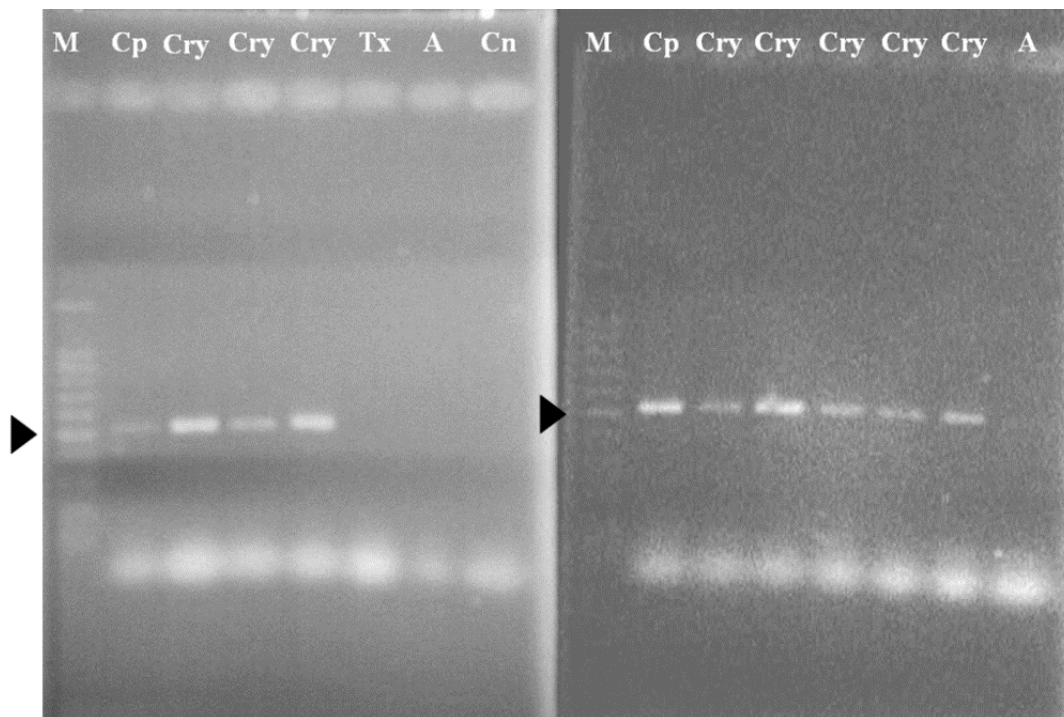
1. El CR18S3543F (5' -GTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATC-3')
2. y el CR18S31078R (5'-CCTCCAATCTCTAGTTGGC-3')

Las muestras a estudiar fueron amplificadas en un volumen de 25 µL con la adición de 20 ng/µL de cada “primer”, 250 mM de cada nucleótido dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 10x de buffer de PCR y 1 unidad de ADN Polimerasa (Paq5000™, DNA Polymerase, Stratagene®).

La amplificación de PCR fue realizada en un termociclador Swift Maxi Thermal Cycler (ESCO®), en condiciones de denaturación inicial a 95°C durante 5 min., seguido por 30 ciclos de 94°C de 30 segundos, alineamiento a 55°C durante 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos. La extensión final fue a 72°C durante 5 min.

Se consideró a una PCR positiva por la presencia de una banda de ADN de 522 pb, en un gel de agarosa al 1,5% en buffer TAE y teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/mL).

Como de control de especificidad, se utilizó ADN de *Toxoplasma gondii*. Como control negativo, se usó un pool de muestras de heces negativas para *Cryptosporidium* spp. mediante ZN/AU y Crypto Strip, repetidas 3 veces. Como control de reacción, se utilizó agua estéril para PCR (Figura 8).



**Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) de los productos de PCR para la detección del gen 18S ARNr de *Cryptosporidium* (522 pb) en muestras de heces de terneras diarreicas de lecherías de la Región Metropolitana, Chile.**

**M: marcador molecular. Cp: control positivo. Tx: Control de especificidad, ADN de *Toxoplasma gondii*. A: Control del proceso, agua de PCR. Cn: control negativo, pool de muestras de heces negativas a *Cryptosporidium* spp. Cry: muestras positivas.**

**Obtenido de: Resultados del presente estudio**

**c. Determinación y comparación de la sensibilidad analítica (límite de detección) de las técnicas en estudio en muestras de una muestra de heces bovinas positivas al agente.**

Una muestra PCR positiva, se homogenizó y se tamizó mediante rejilla de bronce fosfórico. El tamizado se sometió a centrifugación a 430 g por 5-10 min, se eliminó el sobrenadante y se re suspendió en agua destilada estéril. Este preparado se utilizó para determinar la sensibilidad analítica de las pruebas de ZN y PCR. Para esto, se realizó un recuento en cámara de Neubauer del número de ooquistes presentes en la muestra. Posteriormente, a través de diluciones crecientes, se ajustó la concentración de los

ooquistes del parásito y finalmente se diluyó nuevamente al doble hasta que estos no fueron detectados.

Cada dilución obtenida para determinar la sensibilidad analítica fue sometida a una tinción de ZN y a PCR.

**d. Publicación asociada a la Experiencia 2:**

**Detection of *Cryptosporidium* spp. in calves by using a acid fast method and confirmed by immunochromatographic and molecular assays. Muñoz P, Fredes F\*, Díaz-Lee A, Mercado R, Ozaki LS. Arch. Med. Vet. 43: 111-116 (2011).**

**Experiencia 3:**

1. Desarrollar un protocolo que permita recuperar, concentrar y detectar ooquistes de *Cryptosporidium* inoculados en diferentes concentraciones de muestras de agua.
2. Determinar y comparar la sensibilidad analítica (límite de detección) de las técnicas microscópicas (TM) y del ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) género-específico, en muestras de agua inoculadas con el agente.

**a. Tamaño, recolección y procesamiento de las muestras**

Se utilizaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. de origen nacional, obtenidos de muestras de heces de humanos y de terneras diarreicas de la Región Metropolitana, conservadas en los Laboratorios de Parasitología de las Facultades de Medicina y de Cs. Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, respectivamente.

Estas muestras fueron recolectadas para este estudio o bien en trabajos previos, donde en cada una de ellas, fue identificado el agente parasitario por ZN, AU, CR y PCR.

De estas muestras ya procesadas, se utilizaron tres muestras de terneros y tres muestras humanas.

Los ooquistes de las muestras mencionadas, se inocularon en seis muestras de agua destilada, tres de ellas con ooquistes provenientes de terneros y las tres restantes con los

de origen humano. El proceso de destilación del agua (por ebullición y condensación), asegura que el agua está libre de este agente parasitario. Sin embargo, de igual manera se consideró realizar los métodos diagnósticos microscópicos, a muestras de agua destilada pre y post inoculación.

Para inocular los ooquistes de origen animal y humano, se tomaron 500 mg de cada muestra de heces y se re suspendieron en 1 mL de agua destilada. Estos preparados, conformaron el material para determinar la concentración inicial de ooquistes. Para esto, se realizó un recuento en cámara de Neubauer del número de ooquistes presentes en la muestra (Schalm *et al.*, 1981).

Para la evaluación de la TM se inoculó una cantidad inicial de  $1 \times 10^6$  ooquistes en 250 mL de agua destilada, en tanto que para la PCR fue de  $1 \times 10^5$  ooquistes en 250 mL de agua destilada. En ambos casos, se realizaron diluciones al doble hasta que las técnicas en estudio no lograron detectar el agente.

**b. Recuperación y concentración de los ooquistes inoculados en las muestras de agua** (adaptado de Abramovich *et al.*, 2000; Nikaeen *et al.*, 2005):

Cada muestra de agua inoculada con los ooquistes de *Cryptosporidium* fue filtrada mediante un sistema de filtración MFS<sup>®</sup>, con fuerza de vacío, para un volumen máximo de 300 mL de muestra, utilizando membranas de nitrocelulosa estériles de tamaño de poro de 0,2  $\mu$  y de un diámetro de 47 mm (MFS<sup>®</sup>). Posteriormente, cada una de estas membranas:

1. Se retiró y lavó en un tubo de centrífuga con 15 mL de agua destilada, con 0,5 % de Tween-20 y 0,2 % de dodecil sulfato de sodio (SDS) en partes iguales.
2. Se rasparon y trituraron, mediante bisturí estéril.
3. Todo el contenido se centrifugó a 1.500 g durante 15 min, descartando el sobrenadante, mientras que

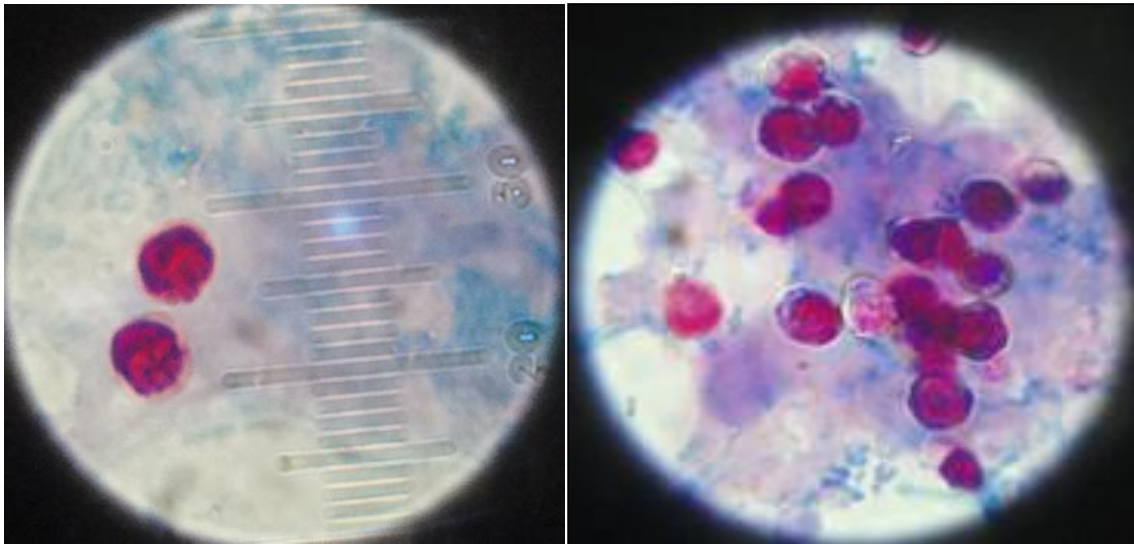
Para la realización de las TM, el pellet fue resuspendido en 1 mL de etanol 70%. De este se extrajeron 50  $\mu$ L con micropipeta y se realizó un extendido, para cada tinción, de 1 cm de largo por 0,5 cm de ancho en un portaobjetos, dejando secar a temperatura ambiente. Cada TM se realizó en triplicado por cada dilución.



Para la realización de las técnicas moleculares, el pellet obtenido a partir de la centrifugación, fue re suspendido en 1 mL de agua destilada y posteriormente se realizaron 3 lavados con 500  $\mu$ L de agua calidad PCR mediante centrifugación, con el fin de eliminar cualquier residuo de detergentes.

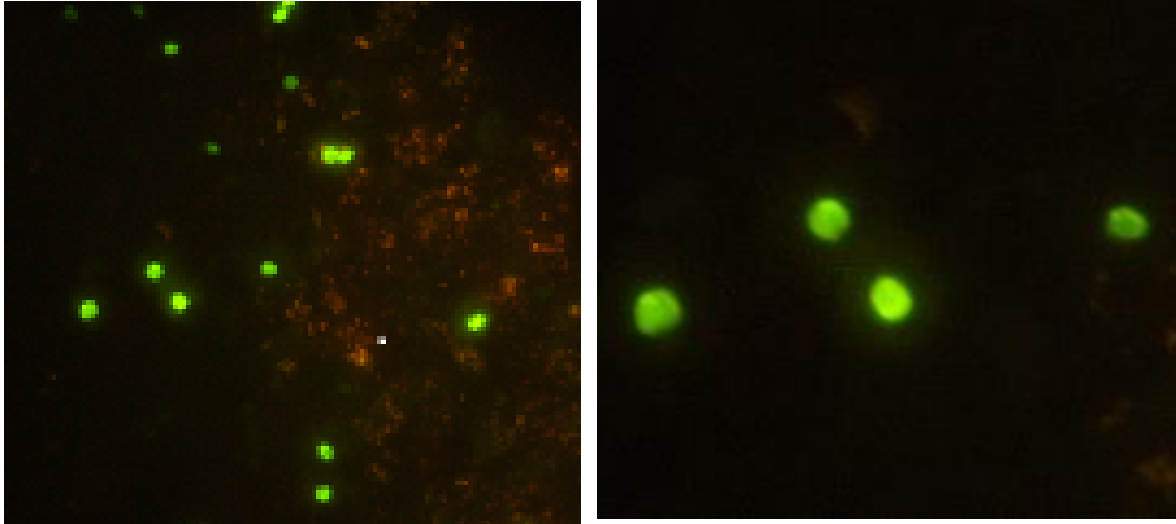
### c. Técnicas microscópicas

La tinción de ZN, se realizó de acuerdo a lo descrito por Henricksen y Pohlenz (1981) y adaptado por Fayer y Xiao (2008) (Figura 9). En tanto que la de AU por lo descrito por Fayer y Xiao (2008) (Figura 10).



***Figura 9. Ooquistes de Cryptosporidium presentes en una muestra agua, detectados mediante tinción de Ziehl-Neelsen, previa inoculación artificial (x 1000).***

***Obtenido de: Resultados del presente estudio***



**Figura 10. Ooquistes de *Cryptosporidium* presentes en una muestra agua, detectados mediante tinción de Aureamina, previa inoculación artificial (izq. x 100; der. x 400).**

***Obtenido de: Resultados del presente estudio***

#### **d. Técnica molecular**

En esta ocasión la extracción de ADN, se basó en la disrupción mecánica de la pared del ooquiste, para lo cual se utilizaron perlas de zirconia-sílica en un equipo de mini BeatBeater® y los pasos a seguir fueron los siguientes:

1. Agregar perlas de zirconia-sílica de 0,1 mm y 1,0 mm en un tubo para BeatBeater en cantidades iguales hasta completar 500  $\mu$ L aproximadamente
2. Dispensar en el mismo tubo 200  $\mu$ L de muestra, 300  $\mu$ L de Buffer TEy 200  $\mu$ L de Buffer de Lisis\*
3. Realizar 2 ciclos en el Mini-BeadBeater® de 80 segundos a 4.600 rpm
4. Centrifugar a 5000rpm durante 5 min.
5. Traspasar el sobrenadante a tubo de 1,5mL libre de ADNsa y ARNsa y Añadir 200  $\mu$ L de Binding Buffer\*

Para la purificación del ADN se utilizó el kit comercial High Pure PCR Template Preparation Kit de Roche®, según las indicaciones del fabricante.

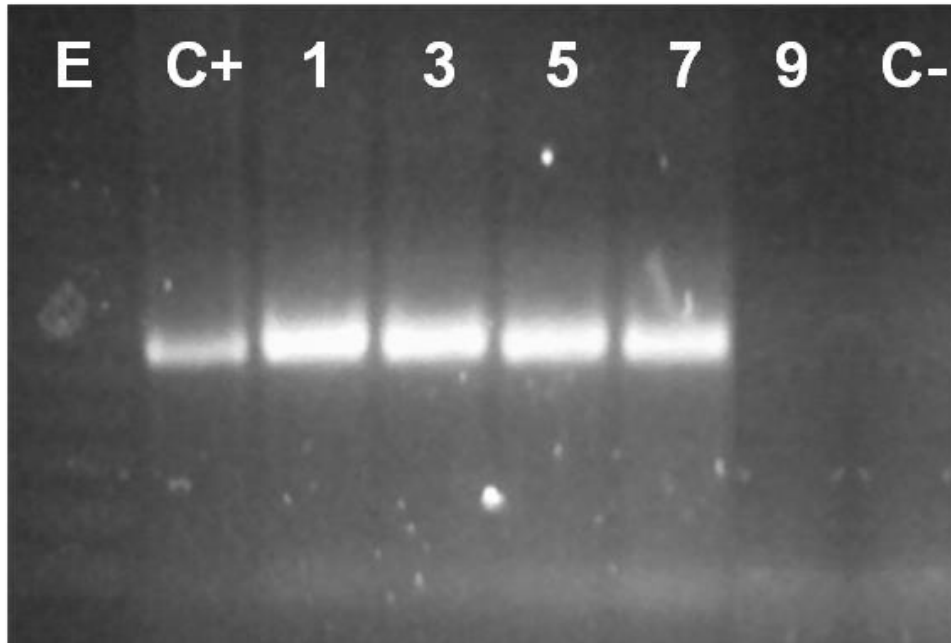
Se realizó un PCR anidado (nested), utilizando como primers externos género-específicos los descritos por Fayer y Xiao, (2008), que amplifican una región de ~820pb del gen 18S ADNr de *Cryptosporidium* spp. SSU-F3 (5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3') y SSU-R3 (5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3').

Las muestras fueron amplificadas en un volumen de 15 µL conteniendo 5 pM/µL de cada partidor, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de cada dNTP, 10x de buffer de PCR y 0,75U de Taq polimerasa (RBC Bioscience®).

La amplificación fue realizada en termociclador MultiGene Gradient Thermal Cycler TC9600 (Labnet®) con una denaturación inicial a 95°C durante 5 min., seguido de 35 ciclos de denaturación a 94°C de 45 segundos, alineamiento a 60°C durante 45 segundos y extensión a 72°C por 1 min. La extensión final fue a una temperatura de 72°C durante 10 min.

El segundo PCR (anidado) amplificó un fragmento de ~522pb, del gen 18S ADNr de *Cryptosporidium* spp. utilizando los primers internos CR18S3543F (5'-GTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATC-3') y CR18S\_3\_1078R (5'-CCTCCAATCTCTAGTTGGC-3'). La mezcla de PCR fue la misma utilizada para el primer PCR, y la amplificación se realizó con una denaturación inicial a 95°C durante 5 min., seguido de 35 ciclos de denaturación a 94°C de 30 segundos, alineamiento a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 40 segundos, con una extensión final de 72°C durante 5 min.

La detección de los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis de 10 µL de muestra en gel de agarosa 1,5% con adición de red gel® (Biotium). Se utilizó como control positivo ADN de *Cryptosporidium* spp. obtenido a partir de una muestra de heces de ternera, y el control negativo fue agua para Biología Molecular (Merck Millipore®) (Figura 11).



**Figura 11. Gel de agarosa 1,5% con los amplificados del PCR anidado aplicado en muestras de agua inoculadas con *Cryptosporidium* spp. de origen animal.**

**E: estándar de peso de 100pb; C+: control positivo; (Nº de ooquistes/250mL) 1: 100.000 ooquistes; 3: 25.000 ooquistes; 5: 6.250 ooquistes; 7: 1.562 ooquistes; 9: 390,5 ooquistes; C-: control negativo.**

**Obtenido de: Resultados del presente estudio**

**e. Determinación y comparación de la sensibilidad analítica (límite de detección) de las técnicas en estudio en muestras de agua inoculadas con el agente.**

El punto de corte para determinar cuál fue la última dilución considerada positiva para cada TM se obtuvo de aquellas muestras en que al menos uno o dos extendidos del triplicado resultó negativo y los otros restantes positivos. Con cada una de estas muestras o diluciones seleccionadas se realizaron septuplicados, de manera tal que sólo se dio por positivo aquella dilución en la que se obtuvo más del 50% de los extendidos con esta condición. Además, se incluyó un control positivo (muestra original humana o bovina) y dos controles negativos (del agua destilada pre inoculada y post inoculada, pero post filtrada), cada vez que se realizaron las TM en estudio.

Con los resultados de las TM, se comparó cual fue la prueba que detectó la menor cantidad de ooquistes de *Cryptosporidium*, en las muestras de agua inoculadas. Los resultados se expresaron en ooquistes por mL, siendo la técnica más sensible aquella capaz de detectar la menor cantidad de ooquistes/mL (Cuadro 2).

**Cuadro 2: Límite de detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. mediante las técnicas de tinción de Zielh-Neelsen modificado (ZN) y Aureamina (AU), en muestras de agua inoculadas con el agente de origen animal.**

Dilución	Ooquistes / 250 mL	Ooquistes / mL	ZN	AU
1	1.000.000	4.000	+	+
2	500.000	2.000	+	+
3	250.000	1.000	+	+
4	125.000	500	+	+
5	62.500	250	+	+
6	31.250	125	+	+
7	15.625	62,5	+	+
8	7.812	31,2	+	+
9	3.906	15,6	+	+
10	1.953	7,8	+	+
11	976	3.9	-	-
12	488	1,9	-	-

Con los resultados obtenidos con la técnica molecular, se identificó cuál fue el límite de detección de este método expresando estos resultados en ooquistes/mL (Cuadro 3).

**Cuadro 3: Límite de detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. mediante la técnica de PCR anidado y diluciones realizadas en muestras de agua inoculadas con el agente de origen animal.**

Dilución	Ooquistes / 250 mL	Ooquistes / mL	PCR
1	100.000	400	+
2	50.000	200	+
3	25.000	100	+
4	12.500	50	+
5	6.250	25	+
6	3.125	12,5	+
7	1.562	6,2	+
8	781	3,1	-
9	390,5	1,6	-

Con los resultados obtenidos se pudo comparó e identificó cuál fue la técnica (microscópica v/s molecular) con el mejor límite de detección.

**f. Publicación asociada a la Experiencia 3.**

**Analytical sensitivity of staining and molecular techniques for the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts isolated from bovines in water samples: a preliminary study. Díaz-Lee A, Molina R, Dougnac C, Mercado R, Retamal P, Fredes F.\* Arch. Med. Vet. 47: 91-96 (2015).**



**PUBLICACIONES GENERADAS**





**PUBLICACIONES GENERADAS**

**Publicación asociada a la Experiencia 1:**

***Cryptosporidium parvum* in diarrheic calves detected by microscopy and identified by immunochromatographic and molecular methods. Díaz-Lee A, Mercado R, Onuoha EO, Ozaki LS, Muñoz P, Muñoz V, Martínez FJ, Fredes F.\* Vet. Parasitol. 176: 139–144 (2011).**



## *Cryptosporidium parvum* in diarrheic calves detected by microscopy and identified by immunochromatographic and molecular methods

A. Díaz-Lee<sup>a,1</sup>, R. Mercado<sup>b,2</sup>, E.O. Onuoha<sup>e,f,3</sup>, L.S. Ozaki<sup>f</sup>, P. Muñoz<sup>c,4</sup>, V. Muñoz<sup>d,5</sup>, F.J. Martínez<sup>g,6</sup>, F. Fredes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Parasitology, Department of Animal Preventive Medicine, College of Veterinary Sciences, University of Chile, Avenida Santa Rosa 11.735, La Pintana, 8820808 Santiago, Chile

<sup>b</sup> Parasitology Unit, Faculty of Medicine, University of Chile, Av. Las Palmeras 299, Int. Quinta Normal, 7760637 Santiago, Chile

<sup>c</sup> Laboratory of Veterinary Parasitology, Animal Pathology Institute, University Austral of Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile

<sup>d</sup> Medical Technology School, Faculty of Medicine, University of Chile, Av. Independencia 1027, 7760637 Santiago, Chile

<sup>e</sup> Department of Natural Science, Virginia Union University, Richmond, VA 23220, USA

<sup>f</sup> Center for the Study of Biological Complexity and Department of Microbiology and Immunology, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA 23298, USA

<sup>g</sup> Departamento de Sanidad Animal of Animal Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Córdoba España, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 March 2010

Received in revised form 29 October 2010

Accepted 1 November 2010

#### Keywords:

*Cryptosporidium parvum*

Ziehl-Neelsen

Auramine

Calves

Chile

### ABSTRACT

*Cryptosporidium* is an important protozoan parasite that causes diarrhea in neonates and young bovines. The objective of the present study was to determine the frequency of *Cryptosporidium* infection in animals of dairy farms of the Metropolitan Region (Santiago), Chile. Fecal samples of 205 newborn calves with diarrhea were studied and used for comparing the efficiency of two microscopic staining methods for diagnosis of the parasite, the auramine (AU) and a modified Ziehl-Neelsen (ZN) procedure. Out of the 205 fecal samples, we detected oocysts in 115 (56.1%) with AU and 102 (49.8%) with ZN. Comparison of results obtained with the two microscopic techniques showed significant difference ( $p < 0.05$ ), AU being more sensitive. On the other hand, concordance between the two methods was almost perfect (kappa value of 0.83). The results with these two operator dependent methods were confirmed using an operator independent immunochromatographic (IC) method. The IC method also enabled us to determine the identity of the parasite species as that of *Cryptosporidium parvum*. Identification of the parasite species was further corroborated by performing a *Cryptosporidium* species-specific polymerase chain reaction (PCR) test on few samples taken at random. Overall, the results showed a high number of infected animals suggesting the parasite *C. parvum* as a major parasitic disease agent of neonatal calves with diarrhea in dairy farms of the Metropolitan Region (Santiago) of Chile.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author. Tel.: +56 2 6785616; fax: +56 2 5416840.

E-mail addresses: [angela.diazlee@gmail.com](mailto:angela.diazlee@gmail.com) (A. Díaz-Lee), [rmercado@med.uchile.cl](mailto:rmercado@med.uchile.cl) (R. Mercado), [ezeobi.onu@gmail.com](mailto:ezeobi.onu@gmail.com) (E.O. Onuoha), [isozaki@vcu.edu](mailto:isozaki@vcu.edu) (L.S. Ozaki), [pamela.munoz@docentes.uach.cl](mailto:pamela.munoz@docentes.uach.cl) (P. Muñoz), [mmunoz@med.uchile.cl](mailto:mmunoz@med.uchile.cl) (V. Muñoz), [fjmartinez@uco.es](mailto:fjmartinez@uco.es) (F.J. Martínez), [ffredes@uchile.cl](mailto:ffredes@uchile.cl) (F. Fredes).

<sup>1</sup> Tel.: +56 2 9785616; fax: +56 2 9785551.

<sup>2</sup> Tel.: +56 2 6817911; fax: +56 2 6814499.

<sup>3</sup> Present address: Division of Infectious Diseases, University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, PA, USA.

<sup>4</sup> Tel.: +56 63 221454; fax: +56 63 221510.

<sup>5</sup> Tel.: +56 2 9786682; fax: +56 2 9786682.

<sup>6</sup> Tel.: +35 957218721.

0304-4017/\$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.vetpar.2010.11.001

## 1. Introduction

Enteritis and diarrhea are leading causes of calves' death during their first weeks of life. A wide range of causative infectious agents may be involved in this pathology. In general, the main causes are bacterial infections, although viral and protozoan agents can also infect the animals concomitantly or exclusively within the 10–14 days of age. It has been reported that calves infected with the protozoan *Cryptosporidium* spp. are usually asymptomatic, and only stressed animals or individuals with a concomitant pathology show clinical manifestations of the disease named cryptosporidiosis (Blowey and Weaver, 2003). *Cryptosporidium* spp. affects the digestive tract of many vertebrates, including humans, farm animals (cattle, sheep, goats, horses, chickens and turkeys), pets (dogs and cats), laboratory animals (rats and mice) and wild birds, reptiles and fishes (Gómez-Couso et al., 2005). In most of them, *Cryptosporidium* spp. grow and multiply in the microvillus borders of the enteric epithelium cells. The parasite may additionally infect other tissues such as the respiratory and renal epithelia, especially in immuno-compromised humans (Mercado et al., 2007; Fayer and Xiao, 2007). When oocysts are ingested by a suitable host, the endogenous phase of the parasite life cycle begins by invasion of target cells. This biological process includes schizogony, gametogony, fertilization, and sporogony (Bowman, 1999; Fayer and Xiao, 2007). The sporulated oocyst is the only exogenous stage in the life cycle of the parasite, and being excreted with the feces of an infected host (Fayer and Xiao, 2007) is highly relevant for the diagnosis of *Cryptosporidium* infection. It is eliminated in great quantities with fecal material and is capable of survival for long periods in the environment (Bowman, 1999; Naciri et al., 1999; Neira, 2005; Fayer and Xiao, 2007). The parasite infects a wide range of hosts and has a cosmopolitan geographic distribution that includes the Antarctic continent (Fredes et al., 2007, 2008). *Cryptosporidium* infection is most frequent in calves less than one month of age, clinically characterized by varying degrees of diarrhea. In immuno-compromised humans it is a severe disease, difficult to treat and can be fatal if extreme dehydration occurs (Sunnotel et al., 2006). Presently, there is no specific anti-parasitic chemotherapy for the treatment of *Cryptosporidium* infections (Caccio and Pozio, 2006). Cryptosporidiosis in cattle is mainly caused by *C. parvum* (Sunnotel et al., 2006). Other species involved are: *C. andersoni*, *C. bovis* and *C. ryanae* (*C. parvum* deer-like genotype) (Fayer, 2010). The disease in calves has been studied in many countries, with prevalence ranging between 2.4 and 100% (Quílez et al., 1996; De La Fuente et al., 1999; Wade et al., 2000; Castro-Hermida et al., 2002a,b; Fayer and Xiao, 2007). In Chile, updated information on the prevalence of *Cryptosporidium* in dairy calves is almost non-existent. The last reported survey was performed by Gorman et al. (1989), who reported an infection rate of 23.2% in diarrheic calves less than one month old. No species identification of the parasites was performed at the time. We report here an updated rate of *Cryptosporidium* infection in cattle rearing farms from the Metropolitan Region of Chile. For this purpose, we used in a first step, two

(AU) and the Ziehl-Neelsen acid-fast staining method (ZN) and compared the two methods for sensibility and agreement. We next used an immunochromatographic method (IC), which is operator independent, as a benchmark for the results obtained with AU and ZN and to aid in the identification of parasite. Finally, the identity of the parasite species was corroborated to be *C. parvum* by testing few samples, from which we obtained DNA, with a *Cryptosporidium* species-specific polymerase chain reaction (PCR) (Mercado et al., 2007).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample size

We worked with fecal samples of 205 diarrheic calves. This sample size was used for comparison of two proportions using a theoretical sensitivity of 70% by ZN and 85% by the AU test, with 95% confidence and 95% power. The sample size was calculated so to detect in one field working year the required number of animals proportional to the total animal population living in the farms.

### 2.2. Study period and area

Samples were obtained from two different dairy cattle farms in the Metropolitan Region (Santiago), Chile, with the consent of the owners' farms. Fresh stool samples were collected from diarrheic calves which age ranged from four days to four weeks. The collection of fecal samples was initiated in August of 2007 and ended in April 2008, corresponding to the austral winter and spring seasons of 2007, and summer and autumn of 2008 respectively, period in which the calculated sample size was reached.

### 2.3. Sample collection and processing

The samples were obtained directly from the rectum of female animals. Samples were collected in two 50 mL plastic tubes containing formaldehyde to 10% (Weitz and Tassara, 1989) or ethanol to 70% (Mercado et al., 2007). Samples identified by collection date, calf number and birth date were temporarily stored in an ice container and taken to the Laboratory of Parasitology, Faculty of Veterinary and Animal Sciences, University of Chile. Processing consisted of filtering the samples through a filter (bronze metal net) and centrifugation at  $1500 \times g$  for 15 min. For ZN and AU staining, the sediment of samples in formaldehyde was suspended in 500  $\mu$ L of formaldehyde to 10%. Fifty microliters of the suspension was spread on a glass slide, air dried and processed accordingly. For IC identification of parasite we followed the instructions of the kit manufacturer (Cryptostrip, CORIS Bioconcept, Belgium).

DNA extraction was performed on 200  $\mu$ L equivalent of fecal sample preserved in ethanol 70%. After centrifugation the sediment was resuspended in 200  $\mu$ L of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) and boiled for 1 min. Proteinase K at the final concentration of 50 mg/mL was added and the suspension incubated overnight at 65 °C in the presence of 10% sodium dodecyl sulfate. The solution with the digested material was then sequentially

treated with phenol, phenol-chloroform-isoamyl alcohol, and chloroform-isoamyl alcohol as described for DNA extraction. The DNA in the aqueous phase was then precipitated with sodium acetate (3 M, pH 5.2) and ethanol, and after centrifugation, the pellet dissolved in 50  $\mu$ L of water.

#### 2.4. ZN and AU staining

Samples were stained and microscopically screened for *Cryptosporidium* oocysts using the ZN (Casemore, 1991) and AU (Fayer and Xiao, 2007) methods. No other enteropathogen was studied in the samples. A sample was considered positive for *Cryptosporidium* if at least one oocyst was detected upon direct microscopic (100 $\times$ ) exam, according to the criteria of oocyst optical properties, internal structure, size and shape, as described in Fayer and Xiao (2007).

#### 2.5. Immunochromatographic test (IC) kit (Llorente et al., 2002)

A diagnostic immunochromatographic test (IC) kit (CryptoStrip, CORIS Bioconcept, Belgium) was used for identification of parasite in 22 randomly selected samples that were either positive (11) or negative (11) by the ZN or AU microscopic methods. The sample size ( $n=11$ ) was determined for the probability of 0.95 of finding at least one positive sample in a population of 120 diarrheic calves with and without *Cryptosporidium* infections detected by microscopical methods, with a prevalence of 25% (Gorman et al., 1989) and a confidence limit of 95% (Thrusfield, 2005).

#### 2.6. Polymerase chain reaction (PCR) for the identification of *Cryptosporidium* species

We used a species-specific PCR assay (Mercado et al., 2007) to determine the species of *Cryptosporidium* in the samples. *C. parvum* isolate Moredun (Okhuysen et al., 2002) (Fig. 2, lane 5 and 11, Cp) and *C. hominis* isolate TU502 (Widmer et al., 2000) (Fig. 2, lane 6 and 12, Ch) DNA's were used as PCR controls. In the species-specific PCR assay, a *C. hominis* DNA fragment of ~400 bp is amplified with the primer Lib13SF02 (5'-TTTTTCATTAGCTCGCTTC-3') combined with the *C. hominis* specific anti-sense primer Lib13SRT-1 (5'-ATTTATTAATTTATCTCTACTT-3'). Conversely, a *C. parvum* DNA fragment of about the same size is amplified when the primer Lib13SF02 is used with the *C. parvum* specific anti-sense primer Lib13SRT-2 (5'-ATTTATTAATTTATCTCTCG-3'). Amplifications were carried out in a PCR mixture of 10  $\mu$ L containing 0.25 mmol/L of each dNTP, 300 pmol/L of each oligonucleotide, and 1 unit of Taq DNA polymerase (HotMaster, 5 PRIME, Inc., Gaithersburg, MD, USA). Temperature cycling was performed on a GeneAmp PCR System (ABI, Foster City, CA, USA) with initial denaturation performed at 95 °C for 5 min, then 40 cycles at 95 °C for 30 s, 52 °C for 30 s, and 68 °C for 30 s. The mixture was then cooled to 4 °C prior to analysis by agarose gel electrophoresis. We obtained DNA from three fecal samples that were simultaneously

**Table 1**  
Number of fecal samples positive for *Cryptosporidium* oocysts within the 205 samples of diarrheic calves, using the Ziehl-Neelsen (ZN) or Aureamine (AU) method.

Method	Number of animals with oocysts		Total n
	n	%	
ZN	25(A) <sup>a</sup> +77(B) <sup>a</sup>	49.7	102
AU	34(A)+81(B)	56.1	115

<sup>a</sup> Dairy farms A (A) and B (B).

ZN, AU and IC positive for *Cryptosporidium* and performed the identification assay.

#### 2.7. Statistical analysis

The results were analyzed using the McNemar test for correlated or dependent proportions (Remington and Schork, 1970). In addition, the kappa coefficient was used to determine levels of agreement between ZN and AU staining tests (Fleiss, 1981).

### 3. Results

We detected *Cryptosporidium* oocysts in 49.8% and 56.1% of the 205 diarrheic calves studied during 2007–2008, by the ZN and AU staining methods respectively. The results obtained from the animals of the two surveyed dairy farm are presented in Table 1. Differences in detection sensitivity between AU and ZN were significant ( $p < 0.05$ ) being AU more sensitive than ZN for detecting oocysts. However, the level of agreement between both tests was almost perfect (kappa value = 0.83).

Fig. 1 shows monthly distributions of animals infected with *Cryptosporidium* sp. in both dairy farms as diagnosed by ZN or AU. Occurrence of the parasite in the surveyed animals was observed during the entire period of the survey.

The frequency of *Cryptosporidium* infection by age was also recorded. The highest intensity of infection was observed in animals between 7 and 14 days old (63%; data not shown).

To confirm the results obtained with the AU and ZN staining methods, and to aid in the identification of the *Cryptosporidium* species, an immunochromatographic (IC) test was applied to a total of 22 samples, 11 oocyst-positive with both ZN and AU microscopy methods and 11 oocyst-negative samples by the same criteria. *C. parvum* was the species of *Cryptosporidium* identified with IC in 10 out of the 11 samples oocyst-positive by ZN and AU, or 91%. No further parasite identification in the 11th sample was attempted. All eleven oocyst-negative samples were also negative by IC. Three samples that were parasite positive in all three assays were further tested with a species-specific PCR assay (Mercado et al., 2007). The *Cryptosporidium* species identified by the PCR method in the three samples was *C. parvum* (Fig. 2).

### 4. Discussion

The first report of *Cryptosporidium* spp. infection in cattle in Chile was published by Gorman et al. (1986). They

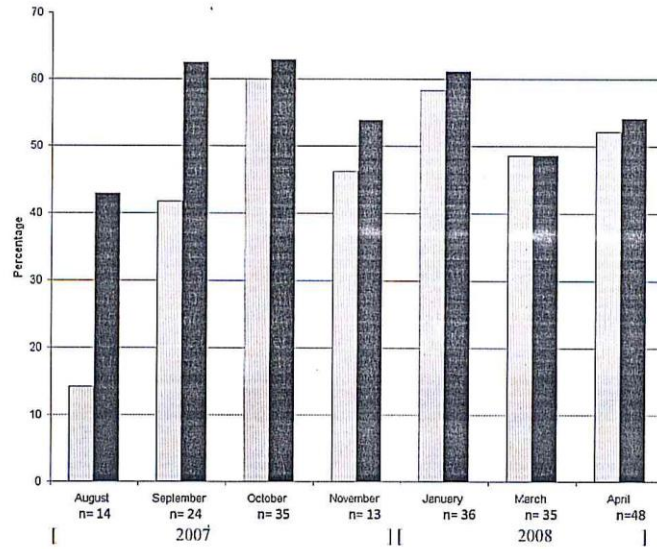


Fig. 1. Percent of diarrheic animals with *Cryptosporidium* oocysts as detected by Ziehl-Neelsen (ZN) (grey bars) or Aureamine (AU) (black bars) staining. Samples (total n=205) are grouped for the month of the years 2007 and 2008 they were collected, as indicated.

found 12 out of 51 diarrheic calves (23.5%) with the parasite oocysts. None of 66 non-diarrheic calves in the study showed oocysts. In another study, the same group found an average rate of 12.8% of *Cryptosporidium* spp. infection

in animals from the Metropolitan Region (Santiago), Chile. When considering healthy animals the infection rate was 2.3% while in diarrheic animals the rate was 23% (Gorman et al., 1989), Campano (1997) using an immunofluorescent

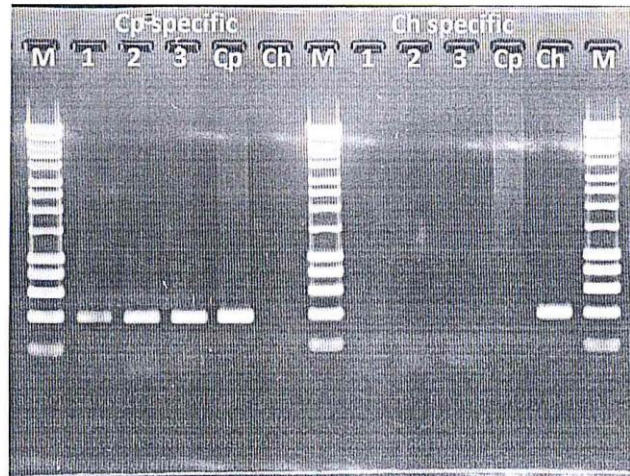


Fig. 2. Identification of *Cryptosporidium* species in DNA from fecal samples of three animals positive for the parasite by ZN, AU and IC with the *Cryptosporidium* species-specific Lib13 PCR assay (Mercado et al., 2007). M, DNA molecular marker (HyperLadder I, Bioline, Randolph, MA, USA, second band from bottom is 400 bp); 1, 2 and 3, DNA from the three selected animal samples; Ch, *C. hominis* DNA; Cp, *C. parvum* DNA.

diagnostic method, reported an infection rate by *Cryptosporidium* spp. of 30.6% of diarrheic calves in farms of a Southern Region of Chile. Our results revealed a higher frequency of infection by the parasite, more than twice the rate communicated by Gorman et al. (1986, 1989). Though restricted to only two sites, our sampling results suggest that cryptosporidiosis is highly endemic and that *Cryptosporidium* could be considered as a re-emergent agent of diarrheic disease in bovines at least in this region of Chile.

Intensive dairy cattle production, overcrowding, poor hygiene and inadequate management measures are risk factors for diarrheic diseases in farms. In the surveyed farms hygienic conditions and animal stock management were appropriate, with calves housed individually after delivery, and correct administration of colostrum and concentrated food. However, calves were housed in such a way that direct contact between the animals was possible. It has been reported that management of animals in which calves are housed with their mothers and without contact with other calves tends to decrease the prevalence of *Cryptosporidium* infections (Kvác et al., 2006).

Other important risk factors of cryptosporidiosis spreading in newborn ruminants are the method and frequency of pen cleaning and the floor type of the pen. Infection risk decreases when calves are housed individually in pens with a cement floor previously disinfected, and daily washing with water under pressure drag is used (Castro-Hermida et al., 2002a, 2006).

Studies have shown a direct association between age of animals and the risk of *Cryptosporidium* infection, most of them occurring between the first and fourth week of life (Castro-Hermida et al., 2002b). The parasite has not been found in animals younger than 4 days old (Sturdee et al., 2003; Kvác et al., 2006) and is only detected after 7 days of life (Del Coco et al., 2008). The highest reported infection rates are with calves between 7 and 14 (Kvác et al., 2006) or 8 and 21 days old (Del Coco et al., 2008). In the present study, the highest rate of infection we observed is in animals between 7 and 14 days old (63%).

We found AU more sensitive than ZN for the detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in bovine fecal samples ( $p < 0.05$ ). This contrasts with previous reports using the same staining methods, one with 29 fecal samples and another with 81 samples. Both studies showed no significant differences between the results obtained with the two techniques ( $p > 0.05$ ). However, the level of agreement of the results was just substantial (kappa value = 0.79) (De Quadros et al., 2006; Brook et al., 2008). The relatively small sample size in these two studies may have influenced the results. In the present study we found an almost perfect level of agreement between the results with the two methods (kappa value = 0.83).

The diagnostic efficiency of the staining methods is extremely operator dependent. The IC test is an alternative for a rapid, operator independent, diagnosis of cryptosporidiosis, although more expensive. The combined assays using AU, ZN and IC, did not result in an exact concordance of parasite detection. Nevertheless, our results suggest that the combination of AU and IC might give an acceptable sensibility level and confidence for *Cryptosporidium* detection in dairy cattle.

We demonstrated with the IC test that the oocysts observed with the two staining methods corresponded to *C. parvum*, and were not only artifacts or contaminating detritus. Furthermore, the species of the parasite in three fecal samples, which were parasite positive in all three tests, AU, ZN and IC, was confirmed to be *C. parvum* by using a specie-specific PCR method (Mercado et al., 2007). The identification of *Cryptosporidium* species using PCR assay, although not able to identify other known species apart from *C. hominis* or *C. parvum* enables us to further confirm the species infecting the calves. The three samples for species identification by PCR were randomly selected as a representation of samples collected between 2007 and 2008. This is the first clear identification of *C. parvum* infection in cattle in the Metropolitan Region in Chile using a PCR assay. *C. parvum* identification in Chilean bovine by PCR was also reported in the Valparaíso Region Neira-Otero et al. (2005) who found one infected out of 127 adult animals studied.

Our results show that *C. parvum* continues to be a highly enzootic disease agent at least in some locations of Chile. As a zoonotic pathogen, soil and water contamination by cattle infected with this parasite species, greatly contributes in the maintenance of both human and animal cryptosporidiosis. More studies are needed to determine an accurate epidemiological and enzootic profile of this parasitosis in the Country.

## 5. Conclusion

Our results suggest that, in the Metropolitan Region of Chile, *Cryptosporidium* is one of the leading cause of diarrhea in neonatal calves. We also obtained evidences, with the IC and the cryptosporidium species specific assays, that the oocysts present in the fecal samples of neonatal calves are those of *C. parvum*. Though no regular survey has been taken concerning cryptosporidiosis in Chile, this study suggests a significant increase in the frequency of infection, especially in calves, and therefore should be seen as a re-emerging infectious disease of cattle in this country. In our hands the AU test was more sensitive than ZN for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples ( $p < 0.05$ ), with an almost perfect level of concordance of the results between the two tests. We also used the IC test for confirming AU and ZN methods for parasite detection and for parasite species identification. Our results suggest that a combination of AU test, operator dependent, and IC test, operator independent, might give an acceptable sensibility and confidence level of parasite detection in dairy cattle.

## Acknowledgments

This study was supported by Project DI MULT 06/17-2 (University of Chile).

OEO was a recipient of a MARC U\*STAR grant T34 GM08503-15 from the MORE Division of NIH/NIGMS, for which he is grateful to Dr. A. Madu from Virginia Union University.

The contributions for this study from the owners and staffs of the farms, including Drs. Luis Moraga and Mario Duchens, are greatly acknowledged. We are also grateful

to Dr. Lafayette Eaton for suggestions and kind help in the translation and Dr. Luis Ibarra for statistical support.

## References

- Blowey, R.W., Weaver, A.D., 2003. Color Atlas of Diseases and Disorders of Cattle, second ed. Elsevier, pp. 14–20.
- Bowman, D.D., 1999. Georgis' Parasitology for Veterinarians, seventh ed. W.B. Saunders Company, USA, p. 414.
- Brook, E.J., Christley, R.M., French, N.P., Hart, C.A., 2008. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fresh and frozen cattle faeces. Comparison of three methods. Lett. Appl. Microbiol. 46, 26–31.
- Caccio, S.M., Pozio, E., 2006. Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. Expert. Rev. Anti. Infect. Ther. 4, 429–443.
- Campano, 1997. La criptosporidiosis de los animales domésticos. Bol. Epizoot. 6, 25–35.
- Casemore, D.P., 1991. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. J. Clin. Pathol. 44, 445–451.
- Castro-Hermida, J., González-Losada, Y., Ares-Mazás, E., 2002a. Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). Vet. Parasitol. 106, 1–10.
- Castro-Hermida, J., González-Losada, Y., Mezo-Menéndez, M., Ares-Mazás, E., 2002b. A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. Vet. Parasitol. 106, 11–17.
- Castro-Hermida, J., Pors, I., Méndez-Hermida, F., Ares-Mazás, E., Chartier, C., 2006. Evaluation of two commercial disinfectants on the viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Vet. J. 171, 340–345.
- De Quadros, R., Marques, S., Amendeira, C., De Souza, L., Amendeira, P., Comparin, C., 2006. Detection of *Cryptosporidium* oocysts by auramine and Ziehl-Neelsen staining methods. Parasitol. Latinoam 61, 117–120.
- Del Coco, V.F., Córdoba, M.A., Basualdo, J.A., 2008. *Cryptosporidium* infection in calves from a rural area of Buenos Aires, Argentina. Vet. Parasitol. 158, 31–35.
- De La Fuente, R., Luzón, M., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., García, A., Cid, D., Orden, J.A., García, S., Sanz, R., Gómez-Bautista, M., 1999. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. Vet. Parasitol. 80, 179–185.
- Fayer, R., Xiao, L., 2007. In: Fayer, Xiao (Eds.), *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*, second ed. CRC Press, 560 pp.
- Fayer, R., 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. Exp. Parasitol. 124, 90–97.
- Fleiss, J.L., 1981. Statistical Methods for Rates and Proportions, 2<sup>nd</sup> ed. Edita: Wiley and Sons, New York, Porport ISBN: 0-471-r06428-9.
- Fredes, F., Raffo, E., Muñoz, P., 2007. First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in stool of Adélie penguin from the Antarctic using acid-fast stain. Antarct. Sci. 19, 437–438.
- Fredes, F., Díaz, A., Raffo, E., Muñoz, P., 2008. *Cryptosporidium* spp. oocysts detected using acid-fast stain in faeces of gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) in Antarctica. Antarct. Sci. 20, 495–496.
- Gómez-Couso, H., Amar, C.F.L., Mc Lauchlin, J., Ares-Mazás, E., 2005. Characterization of a *Cryptosporidium* isolate from water buffalo (*Bubalus bubalis*) by sequencing of a fragment of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene (COWP). Vet. Parasitol. 131, 139–144.
- Gorman, T., Alcaíno, H., Weitz, J., 1986. Hallazgo de *Cryptosporidium* en animales de Chile. Parasitol. al Día. 10, 31–32.
- Gorman, T., Alcaíno, H., Santelices, J., 1989. *Cryptosporidium* y otras coccidias intestinales en terneros de lechería. Región Metropolitana. Chile. Arch. Med. Vet. 21, 29–34.
- Kvác, M., Kouba, M., Vitovec, J., 2006. Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. Vet. Parasitol. 137, 202–209.
- Llorente, M.T., Clavel, A., Varea, M., Olivera, S., Castillo, F.J., Sahagún, J., Rubio, M.C., Gómez-Lus, R., 2002. Evaluation of an immunochromatographic dip-strip test for the detection of *Cryptosporidium* Oocysts in stool specimens. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 21, 624–625.
- Mercado, R., Buck, G., Manque, P., Ozaki, L., 2007. *Cryptosporidium hominis* infection of the human respiratory tract. Emerg. Infect. Dis. 1, 462–464.
- Naciri, M., Paul, M., Mancassola, R., Pirier, P., Chermete, R., 1999. Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France. Vet. Parasitol. 85, 245–257.
- Neira, P., 2005. Acerca de *Cryptosporidium* spp en Chile. Rev. Med. Chile 133, 847–849.
- Neira-Otero, P., Muñoz-Saldías, N., Sanchez-Moreno, M., Rosales-Lombardo, M.J., 2005. Molecular characterization of *Cryptosporidium* species and genotypes in Chile. Parasitol. Res. 97, 63–67.
- Okhuysen, P.C., Rich, S.M., Chappell, C.L., Grimes, K.A., Widmer, G., Feng, X., et al., 2002. Infectivity of a *Cryptosporidium parvum* isolate of cervine origin for healthy adults and interferon- $\gamma$  knockout mice. J. Infect. Dis. 185, 1320–1325.
- Quílez, J., Sanchez-Acedo, C., del Cacho, E., Clavel, A., Causape, A.C., 1996. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragón (northeastern Spain). Vet. Parasitol. 66, 139–146.
- Remington, R.D., Schork, M.A., 1970. Chi-square test for frequency data. In: Statistics with Applications to the Biological and Health Sciences. Englewood Cliffs, N.J. Prentice-Hall, pp. 240–244.
- Sturdee, A.P., Bodley-Tickel, A.T., Archer, A., Chalmers, R.M., 2003. Long-term study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. Vet. Parasitol. 116, 97–113.
- Sunnotel, O., Snelling, X., Nioule, K., Moore, J.E., Cherie Millar, B., Dooley, J.S.G., Lowery, C.J., 2006. Rapid and sensitive detection of single *Cryptosporidium* oocysts from archived glass slides. J. Clin. Microbiol. 44, 3285–3291.
- Thrusfield, M., 2005. Veterinary Epidemiology, third ed. Blackwell Publishing, UK, p. 584.
- Wade, S.E., Mohammed, H.O., Schaafl, S.L., 2000. Prevalence of *Giardia* sp. *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium andersoni* (syn. *C. muris*) [correction of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris* (*C. andersoni*)] in 109 dairy herds in five counties of southeastern New York. Vet. Parasitol. 93, 1–11 (Erratum in: Vet. Parasitol. 96, 2001, 81).
- Weitz, J.C., Tassara, R., 1989. Diagnóstico de la criptosporidiosis: Estudio comparativo de las tinciones Ziehl-Neelsen y Safranina. Rev. Med. Chile 117, 899–902.
- Widmer, G., Akiyoshi, D., Buckholt, M.A., Fenga, X., Richa, S.M., Deary, K.M., et al., 2000. Animal propagation and genomic survey of a genotype 1 isolate of *Cryptosporidium parvum*. Mol. Biochem. Parasitol. 108, 187–197.



**Publicación asociada a la Experiencia 2:**

**Detection of *Cryptosporidium* spp. in calves by using a acid fast method and confirmed by immunochromatographic and molecular assays. Muñoz P, Fredes F\*, Díaz-Lee A, Mercado R, Ozaki LS. Arch. Med. Vet. 43: 111-116 (2011).**

Arch Med Vet 43, 111-116 (2011)

ARTÍCULO ORIGINAL

### Detección de *Cryptosporidium* spp. en terneras de lecherías de la Región Metropolitana mediante Ziehl Neelsen y confirmada por inmunocromatografía y ensayo molecular<sup>#</sup>

Detection of *Cryptosporidium* spp. in calves by using a acid fast method and confirmed by immunochromatographic and molecular assays

P Muñoz<sup>a</sup>, F Fredes<sup>b</sup>, A Díaz-Lee<sup>b</sup>, R Mercado<sup>c</sup>, LS Ozaki<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Parasitología Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

<sup>b</sup>Unidad de Parasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

<sup>c</sup>Unidad Docente de Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

<sup>d</sup>Department Microbiology & Immunology, Medical Center, Virginia Commonwealth University, Virginia, USA.

#### SUMMARY

From an animal production point of view, *Cryptosporidium* can cause great economic losses in systems that involve the raising of cattle by producing various degrees of diarrhea, particularly in calves that are less than 30 days of age. The main objective of this study was the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in faecal samples of diarrheic calves of less than one month of age from two milk farms in the Metropolitan Region of Chile. For the first time in the country, an immunochromatographic and a molecular assay were used to confirm the microscopical observation of *Cryptosporidium* spp. oocysts in the bovine samples studied. A total of 205 fecal samples were stained with acid-fast method (Ziehl Neelsen, ZN) and 102 (49.8%) were found to have parasite oocysts. From these ZN positive samples, 58 were randomly selected and were all confirmed positive by the immunochromatographic test (IC). Conversely, 10 ZN negative samples were all negative by using IC test. A genus-specific molecular assay (18S ribosomal RNA PCR) was designed and carried out in the study of the 58 ZN/IC positive and the 10 ZN/IC negative faecal samples for the detection of *Cryptosporidium* spp. 37 (64%) samples were confirmed positive by this genus-specific PCR assay while all the 10 ZN/IC negative samples yielded no amplification. Detection limit of the genus-specific PCR was compared with the ZN staining method. Fewer parasites were detected by PCR (10<sup>3</sup> oocysts/mL) when compared to ZN (2 x 10<sup>4</sup> oocysts/mL). The results showed that cryptosporidiosis continues to be a parasitic infection of high frequency in dairy farm cattle in the Metropolitan Region. The ZN stain method is extremely operator dependent, but this disadvantage can be reduced by combining ZN with the IC test. Further studies are needed to improve the yield of the genus-specific PCR method as a diagnostic tool for bovine *Cryptosporidium*. Molecular tests also contribute to define the veterinary epidemiology of this parasitic infection in a specific geographical area.

*Palabras clave:* *Cryptosporidium*, Ziehl Neelsen, PCR, terneros.

*Key words:* *Cryptosporidium*, Ziehl Neelsen, PCR, calves.

#### INTRODUCCIÓN

Protozoos del género *Cryptosporidium* son agentes causales de severos cuadros de diarrea en humanos, rumiantes recién nacidos y otros animales domésticos o silvestres. Esta parasitosis zoonótica se ha descrito en todos los continentes incluido el Antártico (Hunter y col 2003, Fredes y col 2007).

Tyzzler (1907) propuso el nombre del género, enumeró sus principales características morfológicas y describió a *Cryptosporidium parvum* como la especie involucrada en cuadros diarreicos de roedores (Tyzzler 1912). Actualmente se reconocen 19 especies de *Cryptosporidium* (Fayer 2010), pero en el caso específico del ganado vacuno la infección es causada principalmente por el patógeno zoonótico *C. parvum* (Fayer 2004, Sunnetel y col 2006). Sin embargo, también se describen otras especies que producen infección

en esta especie animal tales como: *C. andersoni*, *C. bovis* y *C. ryanae* o *C. parvum* genotipo deer-like (Geurden y col 2006, Feng y col 2007, Fayer 2010). Los dos últimos han sido identificados recientemente en Estados Unidos en ganado bovino (Feng y col 2007).

En el hombre se han descrito al menos ocho especies que provocan infección: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. muris*, *C. suis* y *Cryptosporidium* genotipo cervine (Cama y col 2008). Los más frecuentes son *C. hominis* y *C. parvum* (Xiao y Ryan 2004, Sunnetel y col 2006, Mercado y col 2007, Cama y col 2008); en cambio, *C. meleagridis* ha sido detectada tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunodeficientes, pero en una menor tasa (Mercado y col 2007).

En Chile el agente se considera endémico, afectando varias especies animales como equinos, bovinos, ovinos, caprinos, llamas, alpacas, cerdos, perros, gatos, aves (gallinas y palomas) y a humanos (Atías 1998, Alcaño y Gorman 1999). Hay escasos estudios sobre las especies de *Cryptosporidium* que estarían infectando a bovinos (*C. parvum*) y humanos (*C. hominis*) las que se determinan

Aceptado: 27.10.2010.

# Proyecto DI MULT 06/17-2, Universidad de Chile.

\* Casilla 2 Correo 15, La Pintana, Santiago, Chile; ffredes@uchile.cl

P MUÑOZ Y COL.

mediante pruebas moleculares (Neira y col 2005, Mercado y col 2007).

La transmisión de este parásito es directa, vía fecal oral por ingesta de alimentos y agua contaminada con ooquistes de donde salen esporozoitos que se desarrollan y multiplican en las células epiteliales del intestino delgado (Tyzzer 1910, Soulsby 1987, Barriga 2002, Fayer 2004). En el caso particular de rumiantes y principalmente en el bovino afecta especialmente a animales menores de 30 días de edad provocando distintos grados de diarrea de tipo no hemorrágica cuando es el único agente presente, así como anorexia, dolor abdominal, pérdida de peso, postración y fiebre con la excreción de un gran número de ooquistes por las heces (Ortega y col 1999, Barriga 2002, Sunnotel y col 2006).

Desde el punto de vista productivo, *Cryptosporidium* causa pérdidas económicas en sistemas que involucren la crianza de bovinos producto del natural retraso en el crecimiento de los animales y la aplicación de tratamientos con antiparasitarios y antibióticos inespecíficos que no son efectivos contra este agente (Smith y Nichols 2009).

A partir de la descripción realizada por Henricksen y Pohlenz (1981) según la cual los ooquistes de *Cryptosporidium* poseen la propiedad de ser microorganismos ácido alcohol resistentes, la utilización de exámenes de laboratorio basados en esta propiedad, en especial la tinción modificada de Ziehl Neelsen (ZN), pasaron a ser las pruebas de laboratorio más utilizadas para su diagnóstico (Elliot y col 1999, Fayer y Xiao 2008). Sin embargo, la principal desventaja de este método morfológico-microscópico radica en ser extremadamente operador-dependiente debiendo ser ejecutada por profesionales experimentados (Bowman 2004, Luján y Garbossa 2008).

En Chile, Gorman y col (1989) usó ZN determinaron que un 2,2% de bovinos sanos y un 23% de animales diarreicos en la Región Metropolitana eliminaban ooquistes del parásito, y en 1997 se reportó en las regiones VII, IX y X un 30,6% de prevalencia de infección para *Cryptosporidium* (Campano 1997).

El propósito del presente estudio fue determinar mediante ZN la frecuencia de hallazgo de *Cryptosporidium* spp. en terneras diarreicas de dos lecherías de la Región Metropolitana, para contribuir al conocimiento epidemiológico veterinario de esta parasitosis. Complementariamente, por primera vez en Chile se confirmaron los diagnósticos mediante ZN con una prueba inmunocromatográfica (IC) y una molecular (PCR), determinándose la sensibilidad analítica de ZN frente al método molecular.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se recolectaron un total de 205 muestras fecales de terneras diarreicas entre 1 y 30 días de edad, de dos lecherías de la Región Metropolitana (Fundo la Macarena, El Monte, 33°38'S, 70°59'O y fundo Pahuilmo, Mallarauco, 33°34'S, 71°06'O), durante el año 2008. Las muestras se obtuvieron

desde el recto de cada animal y fueron depositadas en tubos plásticos con tapa rosca de 50 ml. Las muestras obtenidas fueron depositadas en dos tubos, uno con etanol al 70% para análisis molecular y otro con formalina al 10% para el estudio microscópico de ZN. Cada muestra para ZN fue mantenida a 4 °C, en tanto que para el caso de PCR se mantuvo a -20 °C hasta ser examinada en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

El método ZN se realizó de acuerdo a lo descrito por Henricksen y Pohlenz (1981) y adaptado por Fayer y Xiao (2007).

Para el estudio inmunocromatográfico (IC) se empleó el Kit comercial Crypto-Strip® de laboratorio Coris (Bélgica), siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta prueba permite detectar ooquistes de *C. parvum* en muestras fecales concentradas o no concentradas. La prueba se basa en la utilización de un sistema inmunocromatográfico con partículas de oro coloidal. Es provisto en un kit comercial que se encuentra listo para ser utilizado y sólo requiere una dilución de la muestra fecal en una solución tampón proporcionada por el fabricante, que es puesta en contacto con una tira reactiva (membrana de nitrocelulosa sensibilizada con anticuerpos anti *C. parvum*). La especificidad de la prueba se asegura mediante el empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de superficie de la membrana del ooquiste y conjugado con el oro coloidal.

La extracción de DNA se hizo de acuerdo a lo descrito por Mercado y col (2007), con modificaciones. Las muestras fecales preservadas con etanol, previo tamizaje y centrifugación (1.500 g x 15 minutos), fueron descongeladas a temperatura ambiente. Se utilizaron 300 µl de heces a los cuales se le adicionó 300 µl de buffer TE (10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0). Fueron sometidas a ebullición por un minuto, para luego añadirle 300 µl de SDS 10% más 20 µl de proteinasa K 10 mg/ml. Las muestras se incubaron durante toda la noche a 65 °C y posteriormente se guardaron a -20 °C, hasta la extracción de DNA mediante cloroformo-fenol. El DNA fue precipitado con acetato de sodio y posteriormente lavado con etanol 70%. El pellet obtenido fue disuelto en 50 µl de agua estéril para PCR y el volumen utilizado para cada amplificación fue de 3 µl.

Para la PCR se diseñaron y utilizaron partidores género-específico, que amplifican un segmento de la subunidad 18S del gen RNA ribosomal de *Cryptosporidium* spp. denominados CR18S3543F 5'-GTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATC-3' y CR18S31078R 5'-CCTCCAATCTCTAGTTGGC-3'. El volumen de DNA utilizado para electroforesis fue de 10 µl. Se consideró a una PCR positiva por la presencia de una banda de DNA de 522 pb, en un gel de agarosa al 1,5% en buffer TAE y teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml).

Las muestras a estudiar fueron amplificadas en un volumen de 25 µl con la adición de: 20 ng/µl de cada primer,

250 µM de cada nucleótido dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), una unidad de DNA Polimerasa (Paq5000™, DNA Polymerase, Stratagene) en buffer 1X provisto por el fabricante. La amplificación de PCR fue realizada en termociclador Swift Maxi Thermal Cycler ESCO. El DNA fue inicialmente denaturado a 95 °C por 5 minutos, y luego 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos. La extensión final fue de 72 °C por 5 minutos.

El tamaño muestral requerido para detectar la enfermedad mediante el ensayo de PCR se calculó de acuerdo a lo descrito por Thrusfield (2005), que considera que la proporción esperada de positivos cuando la prevalencia en los enfermos es de un 25% (Gorman y col 1989); y cuando el tamaño de la población es de 200 terneros diarreicos, tabularmente se precisa de una muestra de 11 terneros, para que con una seguridad del 95% se detecte a lo menos un ternero positivo.

Para determinar la sensibilidad analítica de las pruebas ZN y PCR se realizó un recuento en cámara de Neubauer del número de ooquistes presentes en una muestra PCR positiva, utilizando una rejilla de bronce fosfórico. Luego, a través de diluciones crecientes, se ajustó la concentración

de los ooquistes del parásito y finalmente se diluyó nuevamente al doble hasta que éstos no fueron detectados. Cada dilución obtenida fue sometida a tinción mediante ZN y a PCR.

RESULTADOS

Del total de muestras (n = 205), 102 (49,8%) resultaron positivas a ZN. De estas muestras, se seleccionaron al azar 58 de las ZN positivas y 10 de las ZN negativas. Estas muestras fueron procesadas mediante IC y PCR género-específica. Todas las muestras ZN positivas también fueron positivas a la prueba IC. De igual manera, las 10 muestras ZN negativas no dieron reactividad con las tiras de IC. Mediante PCR, 37 (64%) muestras fecales de terneros diarreicos dieron una banda de amplificación del gen 18S rRNA de 522 pb correspondiente a la secuencia blanco del protozoo (figura 1).

Con respecto al límite de detección entre PCR y ZN, la muestra fecal original contenía 365.000 ooquistes/ml. Para la realización de PCR y ZN se utilizaron 200 µl de la muestra, es decir, 73.000 ooquistes. En el cuadro 1 es posible observar el resultado del límite de detección

Cuadro 1. Límite de detección de las pruebas de Ziehl Neelsen y PCR para ooquistes de *Cryptosporidium* spp. presentes en una muestra de heces de ternera diarreica.

Acid fast stain and PCR detection limit for *Cryptosporidium* spp. oocyst present in a fecal sample of a diarrheic calf.

	Ooquistes en muestra (200µl)	Ooquistes por ml aprox.	Detección mediante ZN	Detección mediante PCR
Sin dilución	73.000	365.000	Positivo	Positivo
1ª dilución	36.500	182.500	Positivo	Positivo
2ª dilución	18.250	91.250	Positivo	Positivo
3ª dilución	9.125	45.625	Positivo	Positivo
4ª dilución	4.563	22.813	Positivo	Positivo
5ª dilución	2.281	11.406	Negativo	Positivo
6ª dilución	1.141	5.703	Negativo	Negativo
7ª dilución	570	2.852	Negativo	Negativo

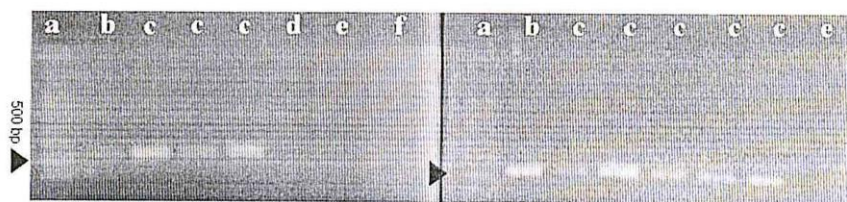


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para la detección del gen 18S rRNA de *Cryptosporidium* (522 pb) en muestras de heces de terneras diarreicas. a: marcador molecular. b: control positivo. c: muestras positivas a *Cryptosporidium* spp. d: DNA de *Toxoplasma gondii*. e: agua de PCR. f: pool de muestras de heces negativas a *Cryptosporidium* spp.

Agarose gel electrophoresis of PCR products of *Cryptosporidium* 18S rRNA gene (522 bp) in faecal samples from diarrheic calves. a: molecular marker. b: positive control. c: positive samples for *Cryptosporidium* spp. d: *Toxoplasma gondii* DNA. e: PCR water. f: pooled stool samples negative for *Cryptosporidium* spp.

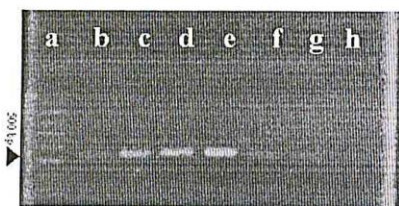
P MUÑOZ Y COL.

mediante PCR y ZN. La máxima dilución detectada por ZN equivale a  $4,6 \times 10^3$  ooquistes (22.813 ooquistes/ml), en tanto que mediante PCR, fue posible detectar al parásito en una dilución aun mayor, equivalente a  $2,3 \times 10^3$  ooquistes (11.406 ooquistes/ml) (figura 2).

#### DISCUSIÓN

La cifra de infección por *Cryptosporidium* spp. de 49,8% encontrada en los animales que cursaban un cuadro de diarrea fue mayor que las descritas por Gorman y col (1986, 1989) de 23%, para la Región Metropolitana de Chile. Esto contribuye a la contaminación ambiental de tierras y agua de los predios, con el consecuente riesgo de salud pública que esto pueda significar.

El control de esta parasitosis en los animales es muy difícil, ya que prevenir la exposición de los terneros a la contaminación es complicado. Las medidas sanitarias y de higiene ayudan a prevenir la presentación de la enfermedad, a disminuir su prevalencia en zonas endémicas y/o a atenuar el riesgo zoonótico (Ortega y col 1999). Sin embargo, la sobrevivencia y diseminación de este parásito es muy probable: primero, ya que los ooquistes son inmediatamente infectantes al salir de su hospedero; segundo, los ooquistes en el ambiente son muy resistentes y pueden permanecer infectivos por dos a tres semanas, incluso pueden sobrevivir en el suelo por más de 50 días a temperaturas inferiores a los  $-10$  °C (Kato y col 2002), y tercero, los ooquistes son muy pequeños y resisten a la cloración (Aífas 1998, Sturbaum y col 2001; Krewski y col 2004).



**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para la detección del gen 18S rRNA de *Cryptosporidium* (522 pb) en muestras de heces de terneras diarreicas. a: marcador molecular. b: muestra sin diluir equivalente a 365.000 ooquistes/ml. c: primera dilución, 182.500 ooquistes/ml. d: segunda dilución, 91.250 ooquistes/ml. e: tercera dilución, 45.625 ooquistes/ml. f: cuarta dilución, 22.813 ooquistes/ml. g: quinta dilución, 11.406 ooquistes/ml. h: sexta dilución, único carril en que no se observa banda de amplificación.

Agarose gel electrophoresis of PCR products of *Cryptosporidium* 18S rRNA gene (522 bp) in faecal samples from diarrheic calves. a: molecular marker. b: samples without dilute, 365,000 oocysts/ml. c: first dilution, 182,500 oocysts/ml. d: second dilution, 91,250 oocysts/ml. e: third dilution, 45,625 oocysts/ml. f: fourth dilution, 22,813 oocysts/ml. g: fifth dilution, 11,406 oocysts/ml. h: sixth dilution, no amplification band was observed.

Por lo tanto, las altas tasas de infección intrapredial por *Cryptosporidium* spp. en predios lecheros analizados en esta región pueden deberse a varias causas. Por una parte, ha habido una mayor intensificación de los sistemas productivos, lo que se traduce en un mayor número de animales, hacinamiento de éstos, sumado a posibles deficiencias en las condiciones de higiene e inadecuadas medidas de manejo. Así, por ejemplo, en este estudio, ambos predios muestreados presentaban similares condiciones de higiene y manejo, con terneros estabulados de forma individual, pero con contacto directo entre ellos y separados de la madre al momento de nacer, sin embargo con adecuada administración de calostro. Las medidas de higiene se basaban en la limpieza diaria de los corrales, con extracción del material de cama y las deposiciones, pero sin la aplicación de sustancias desinfectantes. Además, a los animales que presentaban diarrea se les aplicaba tratamiento antibiótico, pero en aquellos en que la diarrea no cedía con éste, no se aplicaba ningún tratamiento o medida adicional, tampoco se hicieron análisis o exámenes de laboratorio, salvo los que finalmente se llevaron a cabo debido a este estudio.

Como está descrito, un punto importante en la prevención y el control de esta parasitosis es la eficiencia en las medidas de manejo de los animales, tanto de tipo alimentario como sanitario (Ortega y col 1999, Duszynski y Upton 2001). Para lograr un óptimo resultado es muy importante contar con el personal adecuado, tanto en la capacitación, como en el compromiso con su trabajo. Este punto fundamental no se cumplía a cabalidad en ninguno de los dos predios muestreados, ya que en ambos el personal a cargo no era estable porque no creaban un verdadero compromiso con la actividad desempeñada.

Las medidas de manejo sugeridas en la literatura para la prevención de la criptosporidiosis son: la destrucción de ooquistes mediante aplicación de desinfectantes eficaces en las zonas que habitan los animales, separación de animales enfermos de sanos, instalar bebederos y comederos altos para evitar la contaminación de éstos con heces. También se aconseja la remoción diaria de materia fecal, controlar la entrada de animales portadores de otras especies (perros, ratones, etc.), mantener las maternidades limpias y desinfectadas, controlar la temperatura y humedad de estos lugares, y procurar que la ingestión de calostro y leche sea la adecuada (Ortega y col 1999, Fayer 2004).

Es necesario recalcar que actualmente la criptosporidiosis se considera tanto en los seres humanos, como en algunos animales, una zoonosis reemergente (Almeida y col 2006, Sunnotel y col 2006); lo anterior debido al gran aumento de factores que pueden llegar a afectar el sistema inmune, provocando inmunodepresión, la cual es una condición preponderante en la presentación humana y animal de esta enfermedad (Fayer y Xiao 2008).

En este estudio se confirmaron los diagnósticos microscópicos (ZN) en muestras positivas y negativas seleccionadas al azar usando una prueba IC diseñada originalmente para

detectar infecciones por *C. parvum* en muestras fecales humanas. Esta indica que la especie presente en estos terneros sería *C. parvum*. Sin embargo, para confirmar lo anterior es necesario realizar estudios moleculares que validen estos resultados; o bien enfrentar este test diagnóstico a otras especies de *Cryptosporidium* descritas en bovinos, previa identificación por biología molecular, en búsqueda de presencia o ausencia de reacciones cruzadas.

Este es el primer reporte de uso de IC dentro del ámbito veterinario en Chile para confirmar infecciones por este protozoo en bovinos. Existe al menos un trabajo extranjero que utilizó un kit IC, pero de diferente proveedor al utilizado en este estudio, con tan buenos resultados como los aquí descritos, encontrándolo rápido, simple y amigable (Trotz-Williams y col 2005).

Por otra parte, se desarrolló y estandarizó por primera vez en Chile, en un laboratorio de diagnóstico veterinario, un PCR género-específico para el diagnóstico de infecciones por *Cryptosporidium* spp. en muestras de origen animal. Mediante esta prueba molecular fue posible confirmar la existencia de la infección en el 64% de las 58 muestras ZN positivas procesadas. Posibles explicaciones para los resultados PCR negativos en el restante 36% de las muestras fecales serían: a) inadecuada extracción del DNA desde los ooquistes del parásito (Wiedenmann y col 1998, Nikaen y col 2005); b) degradación del DNA extraído y c) inhibición del PCR. En relación a estas dos últimas, es posible afirmar que el material fecal puede contener DNAs bacterianas que pueden degradar el material genético liberado. Además, se consideran inhibidores del PCR a las sales biliares, bilirrubina y algunos complejos polisacáridos (Wiedenmann y col 1998, Scorza y col 2003, Jaramillo y col 2008). La concentración de estos inhibidores en las heces es muy variable y depende de muchos factores como la dieta y flora intestinal de los individuos. Otro inhibidor importante es el fitato (mioinositol hexafosfato), sustancia que se encuentra de forma natural en cantidades importantes en el germen y en la cutícula de las semillas vegetales; y que está presente en grandes concentraciones en las heces de los animales herbívoros, actuando como un potente inhibidor del PCR (Thornton y Passen 2004). Los resultados obtenidos muestran que es muy importante frente al uso del PCR, como herramienta diagnóstica de agentes infecciosos en muestras fecales de bovinos, considerar que la inadecuada extracción y degradación del DNA blanco e inhibición afectan la sensibilidad de la prueba.

A pesar de lo anterior, mediante el ensayo de PCR desarrollado, el límite de detección fue superior que al de ZN, ya que se logró detectar aproximadamente  $10^4$  ooquistes/ml de heces, equivalente a  $2,3 \times 10^3$  ooquistes totales en los 200  $\mu$ l de muestra analizada; versus a los  $2 \times 10^4$  ooquistes/ml de heces detectados, equivalente a  $4,6 \times 10^3$  ooquistes totales en los 200  $\mu$ l de muestra analizada. Esto demuestra que el PCR es un método más sensible, al ser capaz de detectar una menor cantidad de ooquistes que el método microscópico evaluado.

Por último, se desea enfatizar que las infecciones por *Cryptosporidium* spp. en terneros diarreicos continúan siendo de elevada frecuencia en la Región Metropolitana del país, lo que probablemente ocasiona un daño de magnitud en estos animales jóvenes de lechería. La observación microscópica de muestras fecales, procesadas mediante ZN en bovinos diarreicos, es útil para diagnosticar la infección en animales. Sin embargo, dada su elevada dependencia con el operador de la prueba, podría ser complementada con el uso de tiras inmunocromatográficas o el empleo de PCR, mejorando en este último la extracción y conservación del DNA del agente.

Lo anterior, a pesar del mayor costo de implementación, permite confirmar los diagnósticos microscópicos así como avanzar en el estudio epidemiológico molecular de las especies del parásito que infectan a los animales y al hombre. Desde el punto de vista de éxito terapéutico, siempre es importante definir y confirmar que agentes infecciosos causan cuadros diarreicos en los distintos hospederos, en particular de aquellos agentes que tienen una dificultad terapéutica como el aquí estudiado.

## RESUMEN

*Cryptosporidium* causaría gran pérdida económica desde el punto de vista productivo, sobre todo en sistemas que involucren la crianza de bovinos afectando especialmente a animales menores de 30 días de edad con distintos grados de diarrea. El propósito de este estudio fue detectar *Cryptosporidium* spp. en muestras fecales de terneros diarreicos menores de un mes de edad en dos predios lecheros de la Región Metropolitana. Por primera vez en Chile se usó una prueba inmunocromatográfica (IC) y una molecular (PCR) para confirmar la observación microscópica de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en las muestras fecales de bovinos estudiadas. En 49,8% (102/205) de las muestras fecales se observaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp usando Ziehl Neelsen (ZN). De estas muestras positivas se seleccionaron al azar 58 para confirmar los diagnósticos mediante IC y todas resultaron también positivas. Diez muestras fecales ZN negativas también fueron confirmadas como negativas mediante IC. Mediante PCR en 37 de las 58 ZN positivas (64%) se obtuvo un resultado positivo. La PCR también fue realizada en las diez muestras IC negativas sin obtener amplificación. La técnica molecular fue capaz de detectar muestras con menos ooquistes ( $10^4$  ooquistes/ml) en comparación con ZN ( $2 \times 10^4$  ooquistes/ml). Los resultados obtenidos permiten afirmar que la criptosporidiosis bovina sigue siendo una infección parasitaria de alta frecuencia en predios lecheros en la Región Metropolitana. Desde el punto de vista diagnóstico, la combinación de ZN con IC permitiría reducir la desventaja de ZN de ser una prueba operador dependiente. Se requiere de nuevos estudios que busquen incrementar el rendimiento de la PCR como prueba diagnóstica en la criptosporidiosis bovina. La implementación de pruebas moleculares también contribuye al estudio epidemiológico veterinario de esta parasitosis en una determinada área geográfica.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Dr. Leonardo Sáenz, Centro Biotecnológico Veterinario de la Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, por su apoyo y orientación en la estandarización de la prueba molecular. Además, se agradece a los propietarios y al personal de las lecherías en cuestión por su colaboración, incluidos los Dres. Luis Moraga y Mario Duchens.

P MUÑOZ Y COL.

## REFERENCIAS

- Alcaño H, T Gorman. 1999. Parásitos de los animales domésticos en Chile. *Parasitol al día* 23, 33-41.
- Almeida A, M Delgado, S Soares, A Castro, M Moreira, C Mendonca, N Canada, J Correia Da Costa, H Coelho. 2006. Genetic characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Northern Portugal. *J Eukaryot Microbiol* 53, 26-27.
- Atías A. 1998. Criptosporidiosis. En: Atías A (ed). *Parasitología Médica*. Ed. Mediterráneo, Santiago, Chile, Pp 146-151.
- Barriga O. 2002. Las Criptosporidiasis. En: Barriga O (ed). *Las enfermedades parasitarias de los animales domésticos en la América Latina*. Ed. Germinal, Santiago, Chile, Pp 187-188.
- Bowman D. 2004. Protozoos. En: Bowman D (ed). *Georgis Parasitología para Veterinarios*. 8ª ed. Saunders, Madrid, España, Pp 103-105.
- Cama VA, C Bern, J Roberts, L Cabrera, CR Sterling, Y Ortega, RH Gilman, L Xiao. 2008. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Perú. *Emerg Infect Dis* 14, 1567-1574.
- Campano S. 1997. La criptosporidiosis de los animales domésticos. *Bol Epizootiol* 6, 25-35.
- Duszynski D, S Upton. 2001. *Cyclospora, Eimeria, Isospora* and *Cryptosporidium* spp. In: William S (ed). *Parasitic Diseases of Wild Mammals*. 2ª ed. Iowa States University Press, Iowa, USA, Pp 430-442.
- Elliot A, UM Morgan, RCA Thompson. 1999. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. *J Gen Appl Microbiol* 45, 139-142.
- Fayer R. 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol* 126, 37-56.
- Fayer R, L Xiao. 2008. Diagnostics of *Cryptosporidium*. In: Fayer R (ed). *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. 2ª ed. CRC Press, Florida, USA, Pp 173-202.
- Fayer R. 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol* 124, 90-97.
- Feng Y, Y Ortega, G He, P Das, M Xu, X Zhang, R Fayer, W Gatei, V Cama, L Xiao. 2007. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Vet Parasitol* 144, 1-9.
- Fredes F, E Raffo, P Muñoz. 2007. First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in stool of Adelle penguin from the Antarctic using acid-fast stain. *Antarct Sci* 19, 437-438.
- Geurden T, FY Goma, J Siwila, IGK Phiri, AM Mwanza, S Gabriel, E Claerebout, J Vercauteren. 2006. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* in three cattle husbandry systems in Zambia. *Vet Parasitol* 138, 217-222.
- Gorman T, H Alcaño, J Santelices. 1989. *Cryptosporidium* y otras coccidias intestinales en terneros de lechería. Región Metropolitana. Chile. *Arch Med Vet* 21, 29-34.
- Gorman T, H Alcaño, J Weitz. 1986. Hallazgo de *Cryptosporidium* en animales de Chile. *Parasitol al día* 10, 31-32.
- Henricksen SA, JFL Pohlenz. 1981. Staining of cryptosporidia by modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scand* 22, 594-596.
- Hunter P, R Chalmers, Q Syed, S Hughes, S Woodhouse, L Swift. 2003. Foot and mouth disease and Cryptosporidiosis: possible interaction between two emerging infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 9, 109-111.
- Jaramillo H, R Patiño, J Rodríguez. 2008. Detección molecular por PCR de *Yersinia pseudotuberculosis* en materia fecal de cuyes (*Cavia porcellus*). *Rev Corpoica* 9, 62-71.
- Kato S, M Jenkins, E Fogarty, D Bowman. 2002. Effects of freeze-thaw events on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in soil. *J Parasitol* 88, 718-722.
- Krewski D, J Balbus, D Butler-Jones, CN Haas, J Isaac-Renton, KJ Roberts, M Sinclair. 2004. Managing the microbiological risks of drinking water. *J Tox Env Health Part A* 67, 1591-1617.
- Luján N, G Garbossa. 2008. *Cryptosporidium*: 100 años después. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 42, 195-201.
- Mercado R, G Buck, P Manque, L Ozaki. 2007. *Cryptosporidium hominis* infection on the human respiratory tract. *Emerg Infect Dis* 13, 462-464.
- Neira-Otero P, N Muñoz-Saldías, M Sánchez-Moreno, MJ Rosales-Lombardo. 2005. Molecular characterization of *Cryptosporidium* species and genotypes in Chile. *Parasitol Res* 97, 63-67.
- Nikaeen M, A Mesdaghinia, M Jeddí Tehrani, M Rezaeian, K Makimura. 2005. A Nested-PCR assay for detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water samples. *Iranian J Publ Health* 34, 13-18.
- Ortega LM, M Gómez, FA Rojo. 1999. Criptosporidiosis. En: Cordero del Campillo M (ed). *Parasitología Veterinaria*. Ed. McGraw-Hill, Interamericana, Madrid, España, Pp 213-221.
- Scorza AV, MM Brewer, MR Lappin. 2003. Polymerase chain reaction for the detection of *Cryptosporidium* spp. in cat feces. *J Parasitol* 89, 423-426.
- Smith HV, RAB Nichols. 2009. *Cryptosporidium*: detection in water and food. *Exp Parasitol* 124, 61-79.
- Soulsby E. 1987. Phylum Apicomplexa Levine, 1970. En: Soulsby E (ed). *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 7ª ed. Nueva Editorial Interamericana, México DF, México, Pp 601-639.
- Sturbaum G, C Reed, P Hoover, H Jost, M Marshall, C Sterling. 2001. Species-specific, nested PCR-restriction fragment length polymorphism detection of single *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microb* 67, 2665-2668.
- Sunneti O, X Snelling, K Moulc, JE Moore, BC Millar, JSG Dooley, CJ Lowery. 2006. Rapid and sensitive detection of single *Cryptosporidium* oocysts from archived glass slides. *J Clin Microbiol* 44, 3285-3291.
- Thornton CG, S Passen. 2004. Inhibition of PCR amplification by phytic acid, and treatment of bovine fecal specimens with phytase to reduce inhibition. *J Microbiol Meth* 59, 43-52.
- Thrusfield M. 2005. Surveys. In: Thrusfield M (ed). *Veterinary Epidemiology*. 3ª ed. Blackwell Publishing, Edinburgh, UK, Pp 232-242.
- Trotz-Williams LA, SW Martin, D Martin, T Duffield, KE Leslie, DV Nydam, F Jamieson, AS Peregrine. 2005. Multiattribute evaluation of two simple tests for the detection of *Cryptosporidium parvum* in calf faeces. *Vet Parasitol* 134, 15-23.
- Tyzzler EE. 1907. A sporezoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc Soc Exp Biol* 5, 12-13.
- Tyzzler EE. 1910. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. *J Med Res* 23, 487-511.
- Tyzzler EE. 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv für Protistenkunde* 26, 394-412.
- Wiedenmann A, P Kruger, K Botzenhart. 1998. PCR detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental samples-a review of published protocols and current developments. *J Ind Microbiol Biot* 21, 150-166.
- Xiao L, UM Ryan. 2004. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Curr Op Infect Dis* 17, 483-490.

**Publicación asociada a la Experiencia 3:**

**Analytical sensitivity of staining and molecular techniques for the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts isolated from bovines in water samples: a preliminary study. Díaz-Lee A, Molina R, Dougnac C, Mercado R, Retamal P, Fredes F.\* Arch. Med. Vet. 47: 91-96 (2015).**



Arch Med Vet 47, 91-96 (2015)

COMMUNICATION

### Analytical sensitivity of staining and molecular techniques for the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts isolated from bovines in water samples: a preliminary study<sup>#</sup>

Sensibilidad analítica de técnicas de tinción tradicionales y una técnica molecular para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. aislados de bovinos en muestras de agua: estudio preliminar

A Díaz-Lee<sup>a</sup>, R Molina<sup>a</sup>, C Dougnac<sup>a</sup>, R Mercado<sup>b</sup>, P Retamal<sup>a</sup>, F Fredes<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Animal Preventive Medicine, Faculty of Veterinary and Animal Sciences, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

<sup>b</sup>Parasitology Unit, Faculty of Medicine, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

#### RESUMEN

*Cryptosporidium* spp. es un protozoario mundialmente distribuido, que causa enfermedad digestiva en diferentes especies animales incluido el humano. Los ooquistes excretados contaminan aguas y suelos, constituyendo una amenaza para la salud pública. Debido al escaso número de ooquistes presentes en el ambiente y su reducida dosis infectante se hacen necesarios métodos rápidos y sensibles para detección en muestras ambientales. En este trabajo se comparó la sensibilidad analítica de dos técnicas de tinción, Ziehl-Neelsen modificado y Aureamina, y un PCR anidado que amplifica una región de ~520pb del gen 18S rDNA en la detección de *Cryptosporidium* spp. en muestras de agua. Se inocularon concentraciones conocidas de ooquistes en agua, realizando diluciones seriadas. Previa filtración se recuperaron los ooquistes para aplicación de los métodos en estudio. Los resultados demostraron que ambas tinciones tienen similar sensibilidad analítica, detectando aproximadamente ocho ooquistes/mL, mientras que el PCR anidado detectó hasta seis ooquistes/mL. En conclusión, dichos métodos diagnósticos, así como los protocolos de inoculación y recuperación de ooquistes, son eficaces para detección del parásito en agua, contribuyendo a la implementación de protocolos de diagnóstico estandarizados en muestras de agua ambientales.

**Palabras clave:** *Cryptosporidium*, agua, diagnóstico, Ziehl-Neelsen, Aureamina, PCR anidado.

#### SUMMARY

*Cryptosporidium* spp. is a globally distributed protozoan that causes digestive disease in different animals including humans. Excreted oocysts contaminate water and soil, constituting a public health threat. Sensitive and fast methods to detect oocysts in water samples are necessary due to the small number of oocysts present in the environment and their low infectious dose. This study compared the analytical sensitivity of two staining techniques, modified Ziehl-Neelsen and Auramine versus a nested PCR that amplifies a region of ~520bp from 18S rDNA gene, to detect *Cryptosporidium* spp. in water samples. Water was inoculated with oocysts using serial dilutions, and then a water filtration method was used to recover the parasite oocysts. The staining techniques had similar analytical sensitivity, detecting 8 oocysts/mL, while the nested PCR detected down to 6 oocysts/mL. In conclusion, all of these methods are effective for *Cryptosporidium* spp. detection in water samples, contributing to the implementation of standardized diagnostic methods for environmental water infectious agents.

**Key words:** *Cryptosporidium*, water, diagnosis, Ziehl-Neelsen, Auramine, nested PCR.

#### INTRODUCTION

*Cryptosporidium* spp. is a protozoan parasite that infects a wide range of animal species, including humans. Cryptosporidiosis is a globally distributed disease, considered as a reemerging zoonosis and it has described in all continents (Neira 2005) including Antarctic (Fredes *et al* 2007).

Faeces containing infective oocysts can reach environmental sources, particularly water and soil (Ramírez and Sreevatsan 2006). Environmental transmission routes include all vehicles with enough oocysts to produce infection, being water and food the most commonly recognized, which are a threat to public health given the nature of re-emerging zoonosis of cryptosporidiosis (Fayer 2004, Smith and Nichols 2010). The small size of the *Cryptosporidium* spp. oocyst (4-6 µm) and its resistance to many chemical disinfectants (e.g., chlorine) makes this protozoan ideal for waterborne transmission (Carpenter *et al* 1999).

Contamination of drinking water with human or animal faeces has been associated with diarrhoea outbreaks caused by this parasite (Mac Kenzie *et al* 1994, Fayer 2004, Smith

Accepted: 29.05.2014.

<sup>#</sup> Financed by FIV 12101401.9102.006 FAVET Universidad de Chile and FONDECYT 1110255.

\* Ifredes@uchile.cl

DÍAZ-LEE ET AL

and Nichols 2010). Due to the description of low numbers of oocysts in environmental samples (LeChevallier *et al* 1991) and low infectious dose (1 to 30 oocysts) (DuPont *et al* 1995), fast and sensitive methods to detect oocysts in environmental samples are necessary (Fayer 2004, Ramirez and Sreevatsan 2006). The routine detection method of *Cryptosporidium* in faeces is carried out using direct microscopic visualization of oocysts stained by the modified Ziehl-Neelsen technique (ZN) (Ramirez and Sreevatsan 2006). Another staining method for the diagnosis of this protozoon is Auramine (AU), used mainly in human clinical samples (Smith 2008).

In water, the most widely applied diagnostic technique for the detection of oocysts is the immunofluorescence assay (IFA), but this method is labor-intensive, time-consuming, requires a large number of oocysts for positive detection and is subject to false positive and negative results (LeChevallier *et al* 2003, Ramirez and Sreevatsan 2006). The U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) has developed a refinement of the IFA, termed method 1622 for detection of *Cryptosporidium* or method 1623 for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. These techniques have higher efficiencies and precision, but they still suffer from the limitations of IFA (LeChevallier *et al* 2003).

Rapid and effective detection and monitoring methods are needed to determine the occurrence of oocysts in water sources. Development of such methods would facilitate the control and prevention of water pollution, as well as risk assessment for public health (Johnson *et al* 1995).

Methods based on Polymerase Chain Reaction (PCR) for detection of *Cryptosporidium* have been developed worldwide. These methods are more sensitive than conventional and immunological assays for detecting oocysts, including advantages such as rapid analysis of many samples, relatively low cost and the ability to discriminate between species (Johnson *et al* 1995, Rochelle *et al* 1997<sup>a</sup>, Smith 2008). The identification of *Cryptosporidium* species infecting humans and animals is important in determining the epidemiology of disease and transmission routes. Molecular methods targeting various genetic loci have been used for identifying *Cryptosporidium* species/genotypes and subtypes (Smith 2008, Xiao and Ryan 2008).

Worldwide, *Cryptosporidium* infection has been reported in people from 3 days to 95 years of age, but data suggest that young children are most susceptible to infection. Based on detection of oocysts in faeces, the prevalence of human infection is higher in developing than developed countries. In animals, domesticated cattle are the most thoroughly documented host species associated to distribution of *Cryptosporidium* infection, with the highest prevalence in pre-weaned calves (Fayer 2004).

In Chile, infections caused by *Cryptosporidium* spp. are endemic in humans and domestic animals, with high infection rates. Studies conducted in the Región Metropolitana showed *C. parvum* prevalence levels greater than 50% in diarrheic calves (Díaz-Lee *et al* 2011). In humans, *C. parvum* has

been diagnosed from 3.1 to 19.3% of hospitalized children with acute diarrhoea, while in adults the prevalence was less than 3% (Weitz and Tassara 1998). Another study showed a prevalence of 6.3% in immunocompetent and immunocompromised patients (Neira *et al* 2012).

Despite of this situation, in Chile there are no laboratories performing microscopic nor molecular protocols for detection of *Cryptosporidium* spp. in water samples. The aim of this study was to compare the analytical sensitivity of the traditional microscopic protocols and a molecular protocol, to detect the zoonotic protozoon *Cryptosporidium* spp. in artificially contaminated water samples.

## MATERIAL AND METHODS

### *Cryptosporidium* OOCYSTS

Oocysts were obtained from a naturally infected calf stool sample in which the agent was identified by ZN and confirmed by the CryptoStrip™ immunochromatographic test kit (CORIS Bioconcept) and a genus-specific PCR.

### OOCYST COUNTS

In this experiment, the oocysts were counted in a Neubauer chamber (recognizing the limitations in sensitivity of the hemocytometer as a counting tool) (Ramirez and Sreevatsan 2006) resuspending 500 mg of stool sample in 1 mL of distilled water and determining the initial concentration of oocysts.

### MICROSCOPIC TECHNIQUES

*Water sample artificial inoculation.* An initial dilution of 250 mL of distilled water was inoculated with  $1 \times 10^6$  oocysts, with 12-fold dilutions (see table 1).

*Inoculated oocyst recovery* (adapted from Nikaeen *et al* 2005). Inoculated water samples were filtered through a 47 mm diameter membrane filter with a pore size of 0.2 µm. The solids captured were removed by eluting in distilled water containing 0.5% Tween 20 and 0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS). The elute was collected in a 50 mL conical centrifuge tube and then centrifuged at 1500 g for 15 min. The supernatant was discarded and the pellet resuspended in 1 mL of 70% ethanol, 50 µL was extracted with a micropipette and used to make two smears (1x0.5 cm) on glass slides to perform staining techniques. The procedures were done in triplicate. The positive control was a diarrheic calf stool sample positive for *Cryptosporidium* spp. and the negative control was distilled water without oocysts. Additionally, a filtration control was performed, using distilled water recovered after filtration.

*Modified ZN staining* (adapted from Smith 2008). The smear, once dry, was covered with basic fuchsin, heated to vapor emission and stained for 20 min. Subsequently the slide was washed with tap water to remove the excess

**Table 1.** Detection limit of *Cryptosporidium* spp. oocysts by modified Ziehl-Neelsen (ZN) and Auramine (AU) staining techniques, in distilled water samples inoculated with the agent of animal origin.

Límite de detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. de origen animal mediante Ziehl-Neelsen modificado (ZN) y Aureamina (AU) en muestras de agua destilada inoculadas con el agente.

Dilution	Oocysts / 250 mL	Oocysts / mL	ZN	AU
1	1000000	4000	+	+
2	500000	2000	+	+
3	250000	1000	+	+
4	125000	500	+	+
5	62500	250	+	+
6	31250	125	+	+
7	15625	62.5	+	+
8	7812	31.2	+	+
9	3906	15.6	+	+
10	1953	7.8	+	+
11	976	3.9	-	-
12	488	1.9	-	-

dye. Acid alcohol was then added for 30 s and rinsed with tap water. Then the slide was covered with methylene blue for 2 to 5 min and rinsed in tap water. Finally, the smear was air-dried and observed in an optical microscope using the 100x objective lens.

**AU staining** (adapted from Smith 2008). A dry smear was covered with 0.3% auramine phenol stain for 10 min. Subsequently the slide was washed with tap water, covered with acid alcohol for 30 s and rinsed with tap water. Finally, the slide was covered with 0.1% potassium permanganate for 30 s and washed with tap water. Once dry, a drop of basic glycerine was added, the slide was covered with a coverslip and observed in fluorescence microscope using the 40x objective lens.

**Comparative determination of analytical sensitivity or detection limit of microscopic techniques under study.** With the results obtained with the staining techniques we compared the detection limit of the two methods, expressing the results as oocysts/mL.

#### MOLECULAR TECHNIQUE

**Water sample artificial inoculation.** 250 mL of distilled water was initially inoculated with  $1 \times 10^8$  oocysts, making 9-fold dilutions (see table 2).

**Inoculated oocyst recovery** (adapted from Nikaeen *et al* 2005). The protocol for filtration and recovery of oocysts was the same one used for microscopic techniques. However, the pellet obtained from centrifugation was resuspended in 1 mL of distilled water and three washes were performed with 500  $\mu$ L of Water for Molecular Biology™ (Merck Millipore) by centrifugation.

**Disruption of the oocyst wall.** *Cryptosporidium* spp. oocysts have a trilaminar, thick and strong wall (Fayer 2008). Therefore, prior to DNA purification a mechanical disruption of the oocyst wall was performed using zirconia silica beads (0.1 and 1.0 mm) and Mini-Beadbeater-1™ equipment in 2 cycles of 4600 rpm for 80 s each.

**DNA purification.** DNA was purified using a High Pure PCR Template Preparation Kit™ (Roche) according to the manufacturer's instructions.

**Nested PCR.** In the first PCR step a fragment of ~820bp of the 18S rDNA gene was amplified with *Cryptosporidium* genus-specific external primers SSU-F3 (5'- GAAGGGTTGTATTATTAGATAAA G-3') and SSU-R3 (5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3') (Xiao *et al* 1999, Muñoz *et al* 2011). The PCR reaction had a final volume of 15  $\mu$ L containing 10x PCR buffer, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 10 mM of each dNTP, 5 pM/ $\mu$ L of each primer, 0.75 U of RBC Taq polymerase™ (RBC Bioscience) and 1  $\mu$ L of DNA template. Temperature

**Table 2.** Detection limit of *Cryptosporidium* spp. oocysts by conventional and nested PCR, in distilled water samples inoculated with the agent of animal origin.

Límite de detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. de origen animal mediante PCR convencional y PCR anidado en muestras de agua destilada inoculadas con el agente.

Dilution	Oocysts / 250 mL	Oocysts / mL	Conventional PCR	Nested PCR
1	100000	400	+	+
2	50000	200	+	+
3	25000	100	-	+
4	12500	50	-	+
5	6250	25	-	+
6	3125	12.5	-	+
7	1562	6.2	-	+
8	781	3.1	-	-
9	390.5	1.6	-	-

DÍAZ-LEE ET AL

cycling was performed in a MultiGene Gradient Thermal Cycler TC9600™ (Labnet) with an initial denaturation at 95 °C for 5 min followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 45 s, annealing at 60 °C for 45 s and extension at 72 °C for 1 min, with final extension at 72 °C for 10 min. The positive control was *Cryptosporidium* spp. DNA from a calf stool sample, and negative control was Water for Molecular Biology™ (Merck Millipore) without oocysts.

The secondary PCR (nested) amplified a ~520bp from 18S rDNA gene of *Cryptosporidium* spp. using internal primers CR18S3543F (5'-GTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATC-3') and CR18S1078R (5'-CCTCCAATCTCTAGTTGGC-3') (Muñoz *et al* 2011). The PCR mixture was the same as the first PCR and the amplification was performed on the same equipment, with an initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s and extension at 72 °C for 40 s, and a final extension at 72 °C for 5 min.

**PCR product detection.** PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel and stained with GelRed™ (Biotium).

**Comparative determination of analytical sensitivity or detection limit of molecular techniques.** With the results of the molecular techniques we identified the detection limit of the methods, expressing the results as oocysts/mL.

## RESULTS AND DISCUSSION

In Chile there are no laboratories performing microscopic and molecular detection protocols to identify *Cryptosporidium* spp. in water samples. One limitation for monitoring this parasite is that the commonly used methods are very complex and expensive to be used in routine analysis. This raises the need to find more economical and practical methods that will aid in the establishment of surveillance and control of parasite water pollution (Arnedo *et al* 2008). As well as cysts and oocysts of other parasitic protozoa, *Cryptosporidium* spp. oocysts occur in low numbers in the aquatic environment (Smith and Rose 1990). *In vitro* culture techniques that augment parasite numbers prior to identification are not available for protozoan parasites in drinking water, therefore large volumes of water must be sampled to detect their presence (Smith and Nichols 2010). Previous studies have reported a low number of oocysts needed to cause infection; the minimum infective dose for this parasite is 1 to 30 oocysts (DuPont *et al* 1995, Guerrant 1997, Okhuysen *et al* 1999, Fayer *et al* 2000, Dillingham *et al* 2002). Therefore it is important to be able to concentrate small numbers of oocysts effectively and to identify them accurately (Smith and Nichols 2010).

Sampling volumes between previous studies are highly variable, ranging from 15 mL to 1000 L (Ramirez and Sreevatsan 2006, Smith and Nichols 2010). This preliminary investigation used a relatively small volume (250

mL) of water, to show the basic practicality of recovering *Cryptosporidium* oocysts and identifying them in an easily affordable water sample volume.

This study compared the analytical sensitivity of the ZN and AU staining, obtaining the minimum concentration of *Cryptosporidium* spp. oocysts that are required to give a positive sample (table 1). The staining techniques showed similar analytical sensitivity, as they were able to detect about 8 oocysts/mL, i.e. they detected oocyst concentrations as low as the infecting dose described for the parasite. Thus the choice of stain to use in water samples would not be based on the sensitivity of the techniques, but on the methodological advantages and disadvantages of its implementation.

Our results contradict those obtained by another study which compared the sensitivity of these microscopic techniques to detect the parasite in faeces of diarrheic calves, finding a statistically significant difference with AU staining more sensitive than ZN (Díaz-Lee *et al* 2011). However, the analytical results of this study are consistent with studies that analyzed stool samples from diverse domestic species by both staining techniques, finding no significant differences in sensitivity (De Quadros *et al* 2006, Brook *et al* 2008). In the case of water, one study analyzed samples of wastewater treatment plants for the detection of *Cryptosporidium* spp. by ZN and direct immunofluorescence. The agent was detected in 100% of the samples analyzed by both techniques, with 100% correspondence. Moreover, no significant difference was observed in the number of oocysts detected (Arnedo *et al* 2008).

Diagnostic tests based on microscopic observation of morphological features of infectious agents have the disadvantage of being operator-dependent, and the simple staining of the oocyst wall does not give any information about the viability and infectivity of the detected organism (Wiedenmann *et al* 1998). The main advantages of ZN staining are that it is inexpensive and the slides can be kept as permanent records, whereas slides with AU stain cannot (Brook *et al* 2008). Moreover, AU requires an expensive fluorescence microscope and background fluorescence could be a problem in AU-stained smears if there is a lot of fecal debris (Weber *et al* 1991). Still, if you have trained personnel and the necessary equipment to carry out the AU staining technique, it is quick and easy to read (Smith 2008).

Numerous attempts have been made to apply nucleic acid-based tests for sensitive and specific detection of *Cryptosporidium* oocysts in water (Rochelle *et al* 1997<sup>b</sup>). Most of these protocols are based on PCR for the rapid detection of parasite oocysts in polluted water samples (Smith 2008, Zarlenga and Trout 2004), because amplification of a target gene by PCR enabled detection of low numbers of *Cryptosporidium* oocysts in purified samples (Johnson *et al* 1995, Lowery *et al* 2000). Moreover, a nested PCR procedure enhances the sensitivity of PCR (Nikaen *et al* 2005).

In a previous study, a PCR assay for rapid and sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts was evaluated. Serial dilutions of purified oocysts were made in distilled water samples. In one step PCR, oocyst dilutions were detected at a level of approximately  $10^2$  oocysts, whereas with nested PCR as few as 1 oocyst could be detected, showing that performing a nested PCR may increase the detection sensitivity from 100 to 1 cell (Nikaen *et al* 2005).

This study estimated the analytical sensitivity of the nested PCR, determining that 6 oocysts/mL is the minimum concentration of *Cryptosporidium* spp. oocysts that are required to give a sample as positive, while using a conventional PCR, oocyst dilutions were detected at a level of 200 oocysts/mL (table 2). The protocol utilized would accomplish the requirement to detect low levels of oocysts in water samples, given the low infective dose and low oocyst burden present in environmental samples.

This is the first national study in which these diagnostic methods are used in this distilled water matrix. At this stage it was possible to develop, standardize and compare two microscopic protocols and one molecular protocol for detecting the protozoan oocysts in artificially inoculated water samples.

The results indicate that the diagnostic methods and protocols of inoculation and recovery of oocysts are effective. Therefore, the methods could be considered as the basis for further testing of sampling methods in naturally infested waters, and molecular diagnostic protocols to determine the parasite burden and the species present in environmental samples such as surface water.

It is necessary to emphasize the importance of including the detection of *Cryptosporidium* spp. as a water quality indicator, either in treated or potable water, because current Chilean water quality measurement parameters do not include the search for this parasite, although its presence in drinking water involves fecal contamination and thus the presence of other contaminating microorganisms harmful to human and animal health (Smith and Nichols 2010). Therefore, their finding could be used as an indicator of quality and safety of drinking water.

#### REFERENCES

- Arnedo I, M Bracho, O Díaz-Suárez, L Botero. 2008. Técnicas para la detección de *Cryptosporidium* spp. en sistemas de tratamiento de agua residual. *Kasmera* 36, 120-128.
- Brook E, R Christley, N French, C Hart. 2008. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fresh and frozen cattle faeces: comparison of three methods. *Lett Appl Microbiol* 46, 26-31.
- Carpenter C, R Fayer, J Trout, M Beach. 1999. Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*. *Emerg Infect Dis* 5, 579-584.
- De Quadros R, S Marques, C Amendoeira, L De Souza, P Amendoeira, C Comparin. 2006. Detection of *Cryptosporidium* oocysts by auramine and Ziehl Neelsen staining methods. *Parasitol Latinoam* 61, 117-120.
- Díaz-Lee A, R Mercado, E Onuoha, L Ozaki, P Muñoz, V Muñoz, F Martínez, F Fredes. 2011. *Cryptosporidium parvum* in diarrhetic calves detected by microscopy and identified by immunochromatographic and molecular methods. *Vet Parasitol* 176, 139-144.
- Dillingham R, A Lima, R Guerrant. 2002. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes Infect* 4, 1059-1066.
- DuPont H, C Chappell, C Sterling, P Okhuysen, J Rose, W Jakubowski. 1995. The Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in Healthy Volunteers. *N Engl J Med* 332, 855-859.
- Fayer R, U Morgan, S Upton. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* 30, 1305-1322.
- Fayer R. 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol* 126, 37-56.
- Fayer R. 2008. General Biology. In: Fayer R, Xiao L (eds). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. 2<sup>nd</sup> ed. CRC Press, Boca Raton, USA, Pp 1-42.
- Fredes F, E Raffo, P Muñoz. 2007. First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in stool of Adélie penguin from the Antarctic using acid-fast stain. *Antartec Sci* 19, 437-438.
- Guerrant R. 1997. Cryptosporidiosis: An Emerging, Highly Infectious Threat. *Emerg Infect Dis* 3, 51-57.
- Johnson D, N Pieniazek, D Griffin, L Misener, J Rose. 1995. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Appl Environ Microbiol* 61, 3849-3855.
- LeChevallier M, W Norton, R Lee. 1991. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. *Appl Environ Microbiol* 57, 2610-2616.
- LeChevallier M, G Di Giovanni, J Clancy, Z Bukhari, S Bukhari, J Rosen, J Sobrinho, M Frey. 2003. Comparison of Method 1623 and Cell Culture-PCR for Detection of *Cryptosporidium* spp. in Source Waters. *Appl Environ Microbiol* 69, 971-979.
- Lowery C, J Moore, B Millar, D Burke, K McCorry, E Crothers, J Dooley. 2000. Detection and speciation of *Cryptosporidium* spp. in environmental water samples by immunomagnetic separation, PCR and endonuclease restriction. *J Med Microbiol* 49, 779-785.
- Mac Kenzie W, N Hoxie, M Proctor, M Gradus, K Blair, D Peterson, J Kazmierczak, D Admiss, K Fox, J Rose, J Davis. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med* 331, 161-167.
- Muñoz P, F Fredes, A Díaz-Lee, R Mercado, L Ozaki. 2011. Detección de *Cryptosporidium* spp. en terneras de lecherías de la Región Metropolitana mediante Ziehl Neelsen y confirmada por inmunocromatografía y ensayo molecular. *Arch Med Vet* 43, 111-116.
- Neira P. 2005. Acerca de *Cryptosporidium* spp. en Chile. *Rev Méd Chile* 133, 847-849.
- Neira O, N Muñoz, G Wilson, M Barthel, M Rosales, C Henríquez. 2012. Especies de *Cryptosporidium* spp. en pacientes inmunodeficientes e inmunocompetentes de Valparaíso: Estudio descriptivo. *Rev Chil Infectol* 29, 63-71.
- Nikaen M, A Mesdaghinia, M Jeddi, M Rezaeian, K Makimura. 2005. A nested-PCR assay for detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water samples. *Iran J Public Health* 34, 13-18.
- Okhuysen P, C Chappell, J Crabb, C Sterling, H DuPont. 1999. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J Infect Dis* 180, 1275-1281.
- Ramírez N, S Sreevatsan. 2006. Development of a sensitive detection system for *Cryptosporidium* in environmental samples. *Vet Parasitol* 136, 201-213.
- Rochelle P, R De León, M Stewart, R Wolfe. 1997<sup>a</sup>. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. *Appl Environ Microbiol* 63, 106-114.
- Rochelle P, D Ferguson, T Handoyo, R De León, M Stewart, R Wolfe. 1997<sup>b</sup>. An assay combining cell culture with reverse transcriptase PCR to detect and determine the infectivity of waterborne *Cryptosporidium parvum*. *Appl Environ Microbiol* 63, 2029-2037.
- Smith H, J Rose. 1990. Waterborne cryptosporidiosis. *Parasitol Today* 6, 8-12.
- Smith H. 2008. Diagnostics. In: Fayer R and Xiao L (eds). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. 2<sup>nd</sup> ed. CRC Press, Boca Raton, USA, Pp 173-207.

DÍAZ-LEE ET AL

- Smith H, R Nichols. 2010. *Cryptosporidium*: Detection in water and food. *Exp Parasitol* 124, 61-79.
- Weber R, R Bryan, H Bishop, S Wahlquist, J Sullivan, D Juranek. 1991. Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. *J Clin Microbiol* 29, 1323-1327.
- Weitz J, R Tassara. 1998. Criptosporidiosis. En: Atlas A (ed). *Parasitología Médica*. Mediterráneo, Santiago, Chile, Pp 146-151.
- Wiedenmann A, P Krüger, K Botzenhart. 1998. PCR detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental samples-a review of published protocols and current developments. *J Ind Microbiol Biotechnol* 21, 150-166.
- Xiao L, L Escalante, C Yang, I Sulaiman, A Escalante, R Montali, R Fayer, A Lal. 1999. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl Environ Microbiol* 65, 1578-1583.
- Xiao L, U Ryan. 2008. Molecular Epidemiology. In: Fayer R, L Xiao (eds). *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. 2<sup>nd</sup> ed. CRC Press, Boca Raton, USA, Pp 119-172.
- Zarlenga D, J Trout. 2004. Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. *Vet Parasitol* 126, 195-217.



## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presenta una discusión general sobre los resultados más relevantes, ya que los aspectos concretos de cada experiencia se presentan en cada una de las publicaciones.

La prevalencia previamente descrita para este parasitismo en terneros diarreicos de lechería y en esta región de Chile, mediante ZN fue de un 23,2% (Gorman *et al.*, 1989). En nuestro trabajo las tasas de parasitación alcanzan un valor cercano al 50%, dependiendo de la técnica de diagnóstico empleada. Estos resultados revelan un aumento de la frecuencia de infección por *Cryptosporidium* spp., ya que el presente estudio arrojó más del doble de infección con el mismo método diagnóstico, la misma especie animal y aproximadamente el mismo grupo etario. Esto sugiere que, al menos en los predios analizados de esta región del país y en esta especie animal, estamos frente a una infección altamente prevalente y re emergente.

Lo anterior se puede reafirmar, si se considera que los niveles de infección en otras zonas del país, como la zona sur, no sobrepasan ni se acercan a los niveles encontrados en este estudio, ya que se ha reportado una prevalencia para *Cryptosporidium* de alrededor de un 30% (Campano, 1997).

Además, es muy probable que el valor de infección detectado esté subestimando lo real, debido a lo descrito en la literatura científica internacional, que indica que un bajo número de muestras tomadas por animal durante este periodo de vida, podría revelar una prevalencia mucho menor a la que se obtendría si se toma un mayor número de muestras por animal. Como por ejemplo dos veces por semana durante un mes, en vez de la muestra única que se tomó para este estudio durante el primer mes de vida (Castro-Hermida *et al.*, 2002a).

Así también, es conveniente recordar que en el mundo la criptosporidiosis es considerada como una zoonosis re-emergente, tanto en seres humanos como en algunas especies animales, (Fayer, 2004; Almeida *et al.*, 2006; Sunnotel *et al.*, 2006; Smith y Nichols,

2010; Neira *et al.*, 2013; Cacciò y Widmer, 2014). Además, como ya fue indicado, *Cryptosporidium* en la actualidad es uno de los diez principales parásitos transmitidos por los alimentos, que causan mayor preocupación en el mundo, sobre todo porque ha aumentado tanto el número de casos a nivel mundial, por su distribución global, la morbilidad aguda, la morbilidad crónica y el impacto económico (FAO, 2014). Esto puede estar originado por el gran aumento de factores que afectarían el sistema inmune, provocando inmunodepresión, la cual es una condición preponderante en la presentación humana y animal de esta enfermedad (Fayer y Xiao, 2008).

El primer reporte en Chile de bovinos infectados con *Cryptosporidium* spp. fue hecho por Gorman *et al.*, (1986), mientras la Criptosporidiosis bovina fue reportada por primera vez en el mundo a principios de 1970 (Fayer y Xiao, 2008). Sin embargo lo anterior, el mayor interés por la criptosporidiosis se estableció con el primer reporte de un caso humano y el reconocimiento de que *Cryptosporidium* tenía importancia médica, lo que también sucedió a fines de esa década (Fayer y Xiao, 2008; Del Coco *et al.*, 2009; Cacciò y Widmer, 2014).

A partir de las fechas indicadas, la importancia veterinaria y el conocimiento sobre la infección por *Cryptosporidium* se ha expandido enormemente, sobre todo en el sector ganadero más afectado por la criptosporidiosis, como son los terneros jóvenes (Cordero Del Campillo *et al.*, 1999; Fayer, 2004; Del Coco *et al.*, 2008; Fayer y Xiao, 2008; Cacciò y Widmer, 2014).

Asimismo, se ha descrito que contribuyen a la presentación clínica de criptosporidiosis tanto la falta de absorción del calostro, la mala higiene, y la presencia de otros enteropatógenos. Así también, el riesgo de *Cryptosporidium* es más alto en los rebaños con hacinamiento, probablemente a causa de una mala higiene y condiciones de manejo (Alonso-Fresán *et al.*, 2005).

Además, recordemos que tanto en bovinos como ovinos, los animales adultos y jóvenes sanos pueden servir como una fuente de infección, manteniendo la criptosporidiosis en un rebaño entre períodos de parición, incluso como ha sido descrito, con aumento en la liberación de ooquistes de *C. parvum* al postparto en ovejas (Xiao *et al.*,

1994; Ortega-Mora *et al.*, 1999). Esto último, también reportado en el periparto de bovinos infectados con *C. andersoni*, donde no tan solo aumenta el número de ooquistes en las heces, ya que se acompaña con un aumento en la prevalencia de la infección (Ralston *et al.*, 2003). Sin embargo, esto es discutido aún en el ganado bovino, ya que en infecciones por *C. parvum* se ha observado incluso que ocurre lo contrario (De Waele *et al.*, 2012).

Por último, en relación a la prevención y el control de esta patología, la eficiencia en las medidas de manejo de los animales, tanto de tipo alimentario como sanitario son primordiales (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer y Xiao, 2008; Cacciò y Widmer, 2014).

### **En relación a las técnicas microscópicas**

Como fue indicado acerca de las diferentes técnicas descritas para el diagnóstico de laboratorio de *Cryptosporidium*, durante décadas los protocolos de rutina utilizaron la detección microscópica de la presencia de ooquistes del parásito en heces, previa realización de métodos de concentración (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer, 2004; Fayer y Xiao 2008). En medicina veterinaria, la tinción ZN es el método diagnóstico de elección (Georgi y Georgi, 1990; Atías, 1998; Barriga, 2002). En tanto que la tinción de AU, ha sido utilizada casi exclusivamente en muestras de origen humano (Atías, 1998; Fayer, 2004).

Por lo anterior y ya que en Chile, lugar donde se llevó a cabo este estudio, no existían antecedentes del uso de AU en medicina veterinaria, y con el fin de mejorar el diagnóstico de este endoparásito protozoario, en el presente estudio se implementó y desarrolló esta técnica de tinción, en extendidos de heces concentradas de terneros diarreicos de predios lecheros de la Región Metropolitana, para ser comparada con el método de rutina ZN.

Al pesquisar a *Cryptosporidium* spp., por ambos métodos diagnósticos, en muestras de heces de terneras diarreicas (n=205) provenientes de dos predios lecheros de la Región Metropolitana, se encontró un nivel de infección en estas de hasta un 57%, independiente

del predio de origen o de la técnica utilizada, ya que este valor fue de un 56,1% si solo se considera los resultados con AU, en tanto que para ZN fue de un 49,8%.

En relación al análisis de los resultados obtenidos, mediante la prueba estadística de McNemar se demostró que la diferencia resultante entre ambas técnicas, ZN y AU, fue estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ), lo que pone de manifiesto que existe una diferencia entre utilizar una técnica de tinción o la otra. Esto se contrapone con los resultados de Brook *et al.*, (2008) en un estudio realizado en 29 muestras de terneros igualmente sometidas a ambas técnicas de tinción, en las que no se encontraron diferencias significativas ( $p = 0,25$ ). Igualmente, De Quadros *et al.*, (2006) analizaron 331 muestras de heces de animales domésticos, de distintas especies, y detectaron un 7,5 y 5,7% de positividad para AU y ZN respectivamente, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambas técnicas. En el presente estudio, por el contrario, sí se aprecian diferencias significativas, con una mayor sensibilidad de la tinción de AU frente a la de ZN.

En relación con estas técnicas, los primeros estudios determinaron la elección de la tinción de AU como método de rutina, debido a que presentó una sensibilidad similar a una prueba comercial de inmunofluorescencia (Tee *et al.*, 1993). Posteriormente, considerando ambas técnicas, se ha sugerido que la tinción de ZN teñiría una pequeña proporción de los ooquistes presentes en una muestra, además de teñir un menor número de ooquistes que la técnica de AU (Brook *et al.*, 2008). Este mismo autor estimó una sensibilidad aceptable para ambas técnicas de tinción.

El uso del Índice Kappa permitió determinar los niveles de concordancia entre ambas pruebas (Fleiss, 1981), el cual arrojó como resultado que el nivel de concordancia es óptimo (con un valor de  $k = 0,83$ ), mientras que otros estudios han determinado un nivel de concordancia como bueno ( $k = 0,79$ ) (Brook *et al.*, 2008).

En esta experiencia se compararon también la dificultad de implementar ambas técnicas en el laboratorio. La principal ventaja de la técnica de tinción de ZN es su bajo costo, sumado a que los extendidos una vez teñidos, pueden ser conservados de forma permanente, a diferencia de la tinción de AU (Brook *et al.*, 2008). Esta técnica presenta

ciertas desventajas con respecto al método de rutina de ZN. Entre éstas, la fluorescencia del fondo de la muestra podría representar un problema de lectura en AU si la muestra presenta una gran cantidad de detritos fecales (Weber *et al.*, 1991). Aun así, si se cuenta con el personal capacitado, y el equipo necesario para la realización, la técnica de tinción de AU, según el presente estudio, resulta ser mejor.

Teniendo en cuenta que las pruebas de diagnóstico basadas en la observación microscópica de aspectos morfológicos de los agentes infecciosos, tienen la desventaja de ser totalmente operador-dependiente, en este estudio se empleó, por primera vez en Chile, una prueba de inmunodiagnóstico para confirmar los resultados obtenidos en la pesquisa de este parásito en muestras fecales de bovinos.

Mediante la técnica inmunocromatografica Crypto Strip® fue posible detectar 91% (10/11) de las muestras positivas a ooquistes de *Cryptosporidium* por ZN y AU, mientras que el 100% de las muestras de las once negativas a ZN y AU también fueron negativas. Esta experiencia, permitió demostrar que CR es una alternativa rápida e independiente del operador, aunque más cara, para el diagnóstico de la criptosporidiosis bovina en Chile. Lo anterior, precisamente ya ha sido descrito, así por ejemplo Fayer y Xiao (2008), al ponderar las ventajas y desventajas de los métodos diagnósticos utilizados para pesquisar ooquistes de *Cryptosporidium* en muestras de heces, otorga a la técnica inmunocromatografica la mejor evaluación, incluso a nivel de costo y beneficio (Cuadro 4).

**Cuadro 4: Ventajas y desventajas de los métodos diagnósticos utilizados para identificar ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en muestras de heces.**

**Obtenido de: Fayer y Xiao, 2008.**

Stain	Sensitivity	Specificity	Rapidity	Ease of Identification	Stool Consistency	Cost-Effectiveness
mZN	+	+	++	++	Better with liquid stools	++
AP	++	++	+++	+++	Better with liquid stools	+++
IF	+++	+++	++	+++	Better with liquid stools	+
EIA	+++	+++	+++	+++	Stool comminution required	++
IC	+++	+++	++++	++++	Stool comminution required	++

*Note:* mZN = modified Ziehl-Neelsen; AP = auramine phenol; IF = immunofluorescence; EIA = enzyme immunoassay; IC = immunochromatographic assay; + = moderate; ++ = good; +++ = very good; ++++ = excellent.

Sin embargo, es necesario considerar que el límite de detección indicado por el fabricante para CR es de 200 ooquistes en 100  $\mu$ L de heces y que es una prueba de detección de la fase aguda de la infección, por lo que las muestras recolectadas con posterioridad a esta fase, podrían contener concentraciones de antígenos muy bajos para su detección (CORIS, 2001).

Esta prueba además permitió identificar la presencia de *C. parvum*, lo que luego fue confirmado en tres de estas muestras positivas a CR, ZN y AU, mediante el uso de un método de PCR especie específico (Mercado *et al.*, 2007).

Al respecto, *C. parvum* ya había sido identificado por PCR en bovinos chilenos, pero en la Región de Valparaíso (Neira-Otero *et al.*, 2005). Sin embargo, el presente estudio es la primera identificación de infección por *C. parvum* en el ganado bovino de la Región Metropolitana de Chile utilizando PCR.

Resulta de interés analizar y discutir los resultados según la edad de los animales. Se ha informado que los terneros de 1 mes de edad son los más comúnmente infectados con *Cryptosporidium* spp. Según la bibliografía consultada, no se han encontrado animales menores de 4 días infectados naturalmente y de 3 días en infecciones experimentales con este endoparásito (Sturdee *et al.*, 2003; Kvác *et al.*, 2006; Fayer y Xiao, 2008, Cacciò y Widmer, 2014), pero sí existen infecciones descritas después de los 4 a 14 días de vida (Del Coco *et al.*, 2008; Fayer y Xiao, 2008; Cacciò y Widmer, 2014). La mayor prevalencia reportada a *Cryptosporidium* se produce en terneros de entre 8-14 y 15-21 días de edad, así como también, el mayor riesgo de infección (De la Fuente *et al.*, 1999). En el presente estudio, la mayor intensidad de infección se observó en los animales de entre 7 y 14 días de edad (63%), como ya se ha reportado. Sin embargo, el hallazgo de 2 animales positivos (2,5%) a este protozooario al día de nacido (dato no publicado), es decir durante el periodo prepatente, antes de los 3 a 4 días de infección, hace necesario iniciar estudios en esta línea, que permitan identificar la vía de infección, ya sea para confirmar así como para entender este resultado. Por lo anterior, esta sería la primera descripción de *Cryptosporidium* spp. en animales de un día de edad y podría sugerir la posibilidad de nuevas vías de transmisión, diferentes a las normalmente descritas para este endoparásito.

### En relación a las técnicas moleculares

Con el fin de mejorar la sensibilidad y especificidad de los métodos diagnósticos microscópicos, se han desarrollado numerosos protocolos moleculares para muestras clínicas y ambientales (Muccio *et al.*, 2004), ya que se indica que serían capaces de detectar hasta 500 ooquistes por gramo de heces, es decir entre 100 y 1.000 veces más sensible que las técnicas de rutina (Atías, 1998).

Estos métodos además de tener una alta sensibilidad y especificidad, han demostrado la ventaja de permitir el análisis rápido de gran número de muestras, a bajo costo y la posibilidad de discriminar entre especies (Johnson *et al.*, 1995; Rochelle *et al.*, 1997). Lo anterior, considerando los recursos del laboratorio, ya que este debe tener la infraestructura, el equipamiento, el personal entrenado y los conocimientos correspondientes (Cacciò y Widmer, 2014).

En el mundo, el desarrollo del primer ensayo de PCR para el diagnóstico de *Cryptosporidium* en las heces fue en los años 90. Desde esa década hasta la fecha, se han desarrollado muchas técnicas de PCR para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium*, tanto en muestras clínicas como ambientales (Fayer y Xiao, 2008).

En Chile, Neira (2005) indica en una carta al editor de la Revista Médica de Chile, que: “no se han reportado estudios mediante métodos moleculares”, antes de esa fecha.

Es por esto que en nuestro país, hasta la fecha de las publicaciones generadas, se puede afirmar que existía sólo un estudio realizado en PCR para el diagnóstico de este agente parasitario en bovinos, pero como fue indicado, en la Región de Valparaíso (Neira-Otero *et al.*, 2005), y junto a éste, existe al menos uno más que ha sido realizado en medicina humana para la pesquisa de *Cryptosporidium* en Chile (Neira-Otero *et al.*, 2005; Mercado *et al.*, 2007).

Los “primers” utilizados para implementar y estandarizar un PCR género-específico del presente estudio, fueron teóricamente evaluados mediante BLAST, corroborando que



sus secuencias tuvieran una alta homología con las distintas especies de *Cryptosporidium* reconocidos hasta la fecha de la publicación.

Durante el desarrollo del estudio se observó que de las 58 muestras en total analizadas para el ensayo molecular, hubo producto de amplificación para el gen 18S ARNr en 37 de éstas (64%). En esta prueba, es importante tener en cuenta que todas las muestras sometidas a estudio molecular habían demostrado positividad a la técnica microscópica de ZN y CR. Algunas de estas muestras positivas, sin embargo, no permitieron amplificar la secuencia blanco del protozoo.

Las posibles explicaciones para los resultados PCR falsos negativos, podrían estar dadas por una inadecuada distribución de los ooquistes dentro de la muestra a estudiar, y/o por el fracaso en la destrucción de la pared del mismo, y/o por la presencia de inhibidores de la reacción. Lo anterior provocaría una menor liberación del ADN (Wiedenmann *et al.*, 1998; Scorza *et al.*, 2003; Fayer y Xiao, 2008; Cacció y Widmer, 2014) lo que finalmente se traduce en una falla en la amplificación del material genético, y/o a la variabilidad genética en la región a amplificar.

En el presente estudio se utilizó para la detección de material genético parasitario la subunidad 18S ARNr, porque presenta al menos 20 copias por parásito y posee tanto regiones conservadas como hipervariables (Slapeta, 2009; Xiao, 2010). A partir de esta subunidad se pueden diseñar “primers” género específicos, debido a que este gen muestra un 99% de homogeneidad entre las diferentes especies de *Cryptosporidium* (Lowery *et al.*, 2000). Con esto se podría pensar que una posible variabilidad genética en la región a amplificar, si existe, no debería influir en la aparición de falsos negativos.

Un estudio describe que la región 18S es esencial para futuros estudios especie-específicos, debido que a lo largo de la secuencia de este gen existen regiones como la 5,8S ARNr que permite diferenciar las distintas especies de *Cryptosporidium*, lo que permitiría a futuro diseñar, a partir de esta región, “primers” especie-específicos (Zhou *et al.*, 2007).

De acuerdo con la revisión realizada, este es el primer estudio a nivel nacional que incorpora, al menos en bovinos, la estimación del límite de detección de un ensayo

molecular versus uno microscópico tradicional y que corresponde al método de rutina de los laboratorios veterinarios en nuestro país.

Al comparar la sensibilidad analítica del ensayo de la PCR en diluciones crecientes de muestras de heces bovinas positivas a *Cryptosporidium* spp. por ZN y confirmadas por CR, mediante la determinación del límite de detección del PCR y del ZN, el PCR desarrollado logró detectar aproximadamente  $10^4$  ooquistes/mL de heces, equivalente a  $2,3 \times 10^3$  ooquistes totales en los 200  $\mu$ L de muestra analizada, versus ZN en que se logró detectar hasta  $2 \times 10^4$  ooquistes/mL de heces, equivalente a  $4,6 \times 10^3$  ooquistes totales en los 200  $\mu$ L de muestra analizada.

Los resultados del presente estudio al ser contrastados con otros estudios realizados en veterinaria a la fecha de la publicación, que fueron hechos en heces de bovinos y gatos, realizaron una purificación diferente, por flotación, y la técnica comparada fue una ELISA o un IFI (Leng *et al.*, 1996; Scorza *et al.*, 2003). A pesar de lo anterior, en ellos se concluye, al igual que en éste, que la PCR es el método más sensible, al ser capaz de detectar una menor cantidad de ooquistes que el otro método evaluado.

Dado el resultado del único trabajo nacional publicado, que desarrolló un protocolo molecular diferente al de este estudio, el cual utilizó en primer lugar un “kit” de extracción de ADN, y en segundo lugar un ensayo de PCR que incluyó endonucleasas de restricción, PCR anidado y RFLP-análisis de un fragmento del gen ARNr SSU distinto al del presente trabajo (Neira-Otero *et al.*, 2005), se puede afirmar que al igual que estos autores, el presente estudio logró diagnosticar a *Cryptosporidium* en heces bovinas, pero utilizando una secuencia blanco diferente.

Además, en el estudio realizado por Neira-Otero *et al.* (2005), de 127 muestras de heces de bovinos, sanos y diarreicos, en sólo una de ellas se detectó *Cryptosporidium* (0,78%), indicando que existe una baja prevalencia en los bovinos muestreados. Sin embargo, al contrastar esta cifra con las publicadas con anterioridad y realizada con técnicas microscópicas, menos sensibles, se aprecia que los resultados no concuerdan, ya que se indican niveles de prevalencia mayores, cercanas al 30% en bovinos general y 23% en

terneros diarreicos. Por su parte, en el presente estudio se obtuvo una prevalencia intrapredial cercana al 50% en terneros diarreicos de la Región Metropolitana, y con la técnica molecular se logró detectar más de un ternero diarreico, llegando a ser un 64% de las muestras analizadas (n=58). Lamentablemente el estudio de Neira-Otero *et al.* (2005) no menciona cuantos animales dieron positivo o negativo a ZN.

### **En relación con la detección de *Cryptosporidium* en agua**

En Chile, hasta la fecha de la publicación, existen sólo antecedentes de dos laboratorios que realizan protocolos de detección microscópica del agente en muestras de agua, nuestro Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y pecuarias de la Universidad de Chile y uno del Ministerio de Salud. Sin embargo, no existían estudios de comparación de sensibilidad de éstas, a partir de fuentes de agua. A nivel internacional, son escasos los estudios acerca del uso de estas técnicas en la detección del parásito en muestras ambientales, a pesar que existen antecedentes de la transmisión de este agente zoonótico por el agua. Uno de estos trabajos es el de Arnedo *et al.*, (2008), que utilizaron dos pruebas microscópicas como son inmunofluorescencia directa (IFD) y ZN. Además, la pesquisa de *Cryptosporidium* en el agua potable no es realizada como procedimiento de rutina, debido a que los métodos utilizados para el diagnóstico son laboriosos, de elevado costo y consumen mucho tiempo por parte de los operadores (Smith y Nichols, 2010).

El presente estudio logró desarrollar un protocolo que permitió recuperar, concentrar y detectar ooquistes de *C. parvum*, a partir de muestras de agua inoculadas con diferentes concentraciones del agente, con las técnicas descritas. Así también, se determinó y comparó la sensibilidad analítica o límite de detección de cada una de las técnicas en estudio, utilizadas en la detección del agente. Además este es el primer trabajo a nivel nacional, hasta la fecha, en que los métodos diagnósticos mencionados son utilizados en esta matriz.

A partir de los resultados, se demuestra que ambas técnicas de tinción, son capaces de detectar concentraciones de ooquistes tan bajas como las dosis infectantes descritas para este parásito, es decir de 1 a 30 ooquistes (Dupont *et al.*, 1995; Guerrant, 1997; García, 1999; Okhuysen *et al.*, 1999; Fayer, 2000; Dillingham *et al.*, 2002; Zanaro y Garbossa, 2008).

Además, se determinó que la elección de uso de una u otra tinción en la pesquisa de este parásito en muestras de aguas, no se basaría en la sensibilidad de las técnicas, sino en ventajas y desventajas metodológicas para su implementación.

A nivel mundial se han realizado numerosos intentos por desarrollar una técnica molecular para la detección sensible, específica y rápida de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en muestras de agua contaminadas (Zarlenga y Trout, 2004; Fayer y Xiao, 2008). Estos intentos se basan en que la amplificación de un gen blanco mediante PCR permite la detección de bajos números de ooquistes en muestras purificadas (Johnson *et al.*, 1995; Lowery *et al.*, 2000). Además, la realización de un PCR anidado, mejora aún más la sensibilidad de la técnica (Nikaeen *et al.*, 2005).

Nikaeen *et al.*, (2005) evaluaron la sensibilidad de la técnica de PCR en muestras de agua inoculadas con distintas diluciones de ooquistes, detectando por medio de una PCR convencional, hasta aproximadamente  $10^2$  ooquistes, mientras que con PCR anidado detectaron hasta 1 ooquiste, demostrando que la realización de un PCR anidado podría aumentar la sensibilidad de la detección de 100 a 1 célula.

En el presente estudio, se determinó la sensibilidad analítica de la técnica de PCR anidado, obteniendo resultados positivos hasta la dilución de 6 ooquistes/mL, por lo que el protocolo analizado cumpliría con la exigencia de detectar niveles bajos de ooquistes presentes en muestras de aguas, considerando la baja dosis infectante y la baja carga de ooquistes presentes en muestras ambientales.

Por todo lo anterior, los métodos empleados pueden ser considerados como la base para, en un futuro cercano, implementar métodos de muestreo de aguas naturalmente infectadas, así como de protocolos de diagnóstico moleculares que permitan determinar la

carga parasitaria y las especies presentes en muestras medio ambientales, como son las de agua superficiales.

Es necesario hacer énfasis en la importancia de incluir la detección de *Cryptosporidium* spp. como indicador de la calidad del agua, ya sea en aguas tratadas o potabilizadas, debido a que los actuales parámetros de medición de calidad de esta, a nivel nacional, no consideran la pesquisa de este parásito. Lo anterior, a pesar que está descrito que su presencia en el agua potable, implica la contaminación con material fecal en esta matriz y con esto la presencia de otros microorganismos contaminantes perjudiciales para el hombre y los animales (Smith y Nichols, 2010), por lo que su hallazgo, podría ser utilizado como un indicador de calidad e inocuidad de agua potable.

**CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1. Al pesquisar *Cryptosporidium* spp. mediante Zielh-Neelsen y Aureamina en muestras de heces bovinas, fue posible determinar que la criptosporidiosis bovina es una infección parasitaria de alta frecuencia en terneros recién nacidos con diarrea en predios lecheros, en estudio, de la Región Metropolitana (Santiago) de Chile.
2. Mediante el método Cryptos Strip® fue posible identificar la presencia de *Cryptosporidium parvum*, lo que fue corroborado además por la realización de una PCR específica de la especie en unas pocas muestras tomadas al azar.
3. Al analizar y comparar los resultados obtenidos por ambas técnicas microscópicas, Aureamina fue más sensible que Zielh-Neelsen ( $p < 0,05$ ) y la concordancia entre los dos métodos fue casi perfecta (valor kappa de 0,83).
4. Se logró confirmar las muestras de heces bovinas positivas a *Cryptosporidium* spp. mediante el “kit” Crypto Strip®. Desde el punto de vista diagnóstico, la combinación de Zielh-Neelsen con Crypto Strip® permitiría reducir la desventaja de Zielh-Neelsen de ser una prueba operador dependiente.
5. Fue posible implementar y estandarizar un Reacción de la Polimerasa en Cadena género-específico que permitió la detección de *Cryptosporidium* presente en las muestras de heces bovinas positivas a Zielh-Neelsen, Aureamina y al “kit” Crypto Strip®.
6. La Reacción de la Polimerasa en Cadena género-específico tuvo una mayor sensibilidad analítica o mejor límite de detección, en las muestras de heces bovinas positivas a *Cryptosporidium* spp., en comparación a ZN.



7. Las técnicas microscópicas de Zielh-Neelsen y Aureamina, en muestras de agua inoculadas con el agente, tienen una similar sensibilidad analítica.
8. La Reacción de la Polimerasa en Cadena convencional desarrollada tuvo una sensibilidad analítica menor, en muestras de agua inoculadas con el agente, en comparación con el desarrollo y aplicación de una Reacción de la Polimerasa en Cadena anidada género-específica.
9. El protocolo utilizado para recuperar, concentrar y detectar ooquistes de *Cryptosporidium* inoculados en diferentes concentraciones de muestras de agua, lograría el requisito para detectar niveles bajos de ooquistes del parásito en muestras de agua.
10. Por último, de acuerdo a lo propuesto y los resultados obtenidos, se aceptan ambas hipótesis de partida de este trabajo de investigación, puesto que:  
H1: Los métodos microscópicos tradicionales (Ziehl-Neelsen modificado y Aureamina) y la Reacción de la Polimerasa en Cadena género-específico permiten detectar *Cryptosporidium* spp. en muestras de heces y agua contaminadas o inoculadas artificialmente con este agente zoonótico  
H2: La Reacción de la Polimerasa en Cadena es capaz de detectar una menor cantidad de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. por volumen de muestra de agua que la pruebas microscópicas tradicionales.

**Publicación asociada a las conclusiones 1, 2, 3, 4 y 10:**

***Cryptosporidium parvum* in diarrheic calves detected by microscopy and identified by immunochromatographic and molecular methods. Díaz-Lee A, Mercado R, Onuoha EO, Ozaki LS, Muñoz P, Muñoz V, Martínez FJ, Fredes F.\* Vet. Parasitol. 176: 139–144 (2011).**

**Publicación asociada a las conclusiones 4, 5, 6 y 10:**

**Detection of *Cryptosporidium* spp. in calves by using a acid fast method and confirmed by immunochromatographic and molecular assays. Muñoz P, Fredes F\*, Díaz-Lee A, Mercado R, Ozaki LS. Arch. Med. Vet. 43: 111-116 (2011).**

**Publicación asociada a las conclusiones 7, 8, 9 y 10:**

**Analytical sensitivity of staining and molecular techniques for the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts isolated from bovines in water samples: a preliminary study. Díaz-Lee A, Molina R, Dougnac C, Mercado R, Retamal P, Fredes F.\* Arch. Med. Vet. 47: 91-96 (2015).**



**RESUMEN**



**RESUMEN**

*Cryptosporidium* spp. es un importante parásito protozoario, mundialmente distribuido, que causa enfermedad digestiva en diferentes especies animales, especialmente a terneros menores de 30 días de edad, incluido el humano. Los ooquistes excretados por las heces, que son inmediatamente infectantes y resistentes, contaminan aguas y suelos, constituyendo una amenaza para la salud pública. Debido al escaso número de ooquistes presentes en el ambiente y su reducida dosis infectante se hacen necesarios métodos rápidos y sensibles para su detección en muestras animales y ambientales. Por lo anterior el objetivo de este estudio fue contribuir al conocimiento del diagnóstico de laboratorio tanto microscópico como molecular de *Cryptosporidium* spp. en muestras de heces diarreicas de terneros y de agua inoculada con el agente, mediante la implementación y estandarización de protocolos microscópicos tradicionales y un ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) género-específico. Para lo anterior, se utilizaron y analizaron 205 muestras fecales diarreicas de terneros, comparando la eficiencia de dos métodos de tinción microscópicas para el diagnóstico del parásito, el de Auremina (AU) y el de Ziehl-Neelsen modificado (ZN). Por primera vez en Chile se usó una prueba inmunocromatográfica (CR) y una molecular (PCR) para confirmar la observación microscópica de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en las muestras fecales de bovinos estudiadas. De las 205 muestras fecales, se detectaron 115 muestras positivas con AU (56,1%) y 102 con ZN (49,8%), resultado que mostró diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ), al ser AU más sensible. Por otro lado, la concordancia entre los ambos métodos fue casi perfecta (valor kappa de 0,83). El método CR y la realización de una PCR especie específica, también permitieron determinar la identidad de la especie del parásito detectado, como *Cryptosporidium parvum*. Esta última prueba, realizado en unas pocas muestras tomadas al azar. Así también, de las 102/205 muestras positivas a ZN, se seleccionaron al azar 58 para confirmar los diagnósticos mediante CR y todas resultaron también positivas. Diez muestras fecales ZN negativas, también fueron confirmadas como negativas mediante CR. La PCR género específica desarrollada, confirmó 37 de la 58 ZN positivas (64%) y dio negativa al 100% de las diez muestras CR negativas. La técnica molecular desarrollada fue capaz de

detectar muestras fecales con hasta  $10^4$  ooquistes/mL, en comparación con ZN que detectó hasta  $2 \times 10^4$  ooquistes/mL. Por último, la sensibilidad analítica de AU, ZN y PCR anidado género específico en muestras de agua inoculadas con el agente, demostraron que ambas tinciones tienen similar sensibilidad analítica, detectando aproximadamente ocho ooquistes/mL, mientras que el PCR anidado detectó hasta seis ooquistes/mL. Todos estos resultados permiten concluir que la criptosporidiosis bovina es una infección parasitaria de alta frecuencia en terneros recién nacidos con diarrea en predios lecheros en la Región Metropolitana (Santiago) de Chile; así también, se puede afirmar que desde el punto de vista diagnóstico, la combinación de ZN con IC permitiría reducir la desventaja de ZN de ser una prueba operador dependiente; que el desarrollo de un PCR anidado género específico, permitió incrementar el rendimiento de la PCR como prueba diagnóstica en las muestras de agua inoculada con el agente; y que los métodos diagnósticos en estudio, así como los protocolos de inoculación y recuperación de ooquistes, son eficaces para detección del parásito en agua, contribuyendo a la implementación de protocolos de diagnóstico estandarizados en muestras de agua ambientales.

Palabras clave: *Cryptosporidium*, diagnóstico, ternero, agua, Ziehl-Neelsen, Aureamina, PCR, Chile.

**SUMMARY**





**SUMMARY**

*Cryptosporidium* is an important protozoan parasite, globally distributed, that causes digestive disease in different animals, especially in neonates and young bovines, including humans. Excreted oocysts are immediately infective, resistant and contaminate water and soil, constituting a public health threat. Sensitive and fast methods to detect oocysts in water samples are necessary due to the small number of oocysts present in the environment and their low infectious dose. Therefore, the aim of this study was to contribute to the knowledge of the laboratory diagnosis of *Cryptosporidium* spp., both microscopic and molecular, in diarrheal stool samples from calves and water samples inoculated with the agent, through the implementation and standardization microscopic traditional protocols and gender-specific PCR. Fecal samples of 205 newborn calves with diarrhea were studied and used for comparing the efficiency of two microscopic staining methods for diagnosis of the parasite, the auramine (AU) and a modified Ziehl-Neelsen (ZN) procedure. For the first time in the country, an immunochromatographic and a molecular assay were used to confirm the microscopical observation of *Cryptosporidium* spp. oocysts in the bovine samples studied. Out of the 205 fecal samples, we detected oocysts in 115 (56.1%) with AU and 102 (49.8%) with ZN. Comparison of results obtained with the two microscopic techniques showed significant difference ( $p \leq 0.05$ ), AU being more sensitive. On the other hand, concordance between the two methods was almost perfect (kappa value of 0.83). The results with these two operator dependent methods were confirmed using an operator independent immunochromatographic (IC) method. The IC method also enabled us to determine the identity of the parasite species as that of *Cryptosporidium parvum*. Identification of the parasite species was further corroborated by performing a *Cryptosporidium* species-specific polymerase chain reaction (PCR) test on few samples taken at random. A total of 205 fecal samples were stained with acid-fast method (Ziehl Neelsen, ZN) and 102 (49.8%) were found to have parasite oocysts. From these ZN positive samples, 58 were randomly selected and were all confirmed positive by the immunochromatographic test (IC). Conversely, 10 ZN negative samples were all negative by using IC test. A genus-specific molecular assay (18S ribosomal RNA PCR) was designed and

carried out in the study of the 58 ZN/IC positive and the 10 ZN/IC negative faecal samples for the detection of *Cryptosporidium* spp. 37 (64%) samples were confirmed positive by this genus-specific PCR assay while all the 10 ZN/IC negative samples yielded no amplification. Detection limit of the genus-specific PCR was compared with the ZN staining method. Fewer parasites were detected by PCR (104 oocysts/mL) when compared to ZN (2 x 10<sup>4</sup> oocysts/mL). Water was inoculated with oocysts using serial dilutions, and then a water filtration method was used to recover the parasite oocysts. The staining techniques had similar analytical sensitivity, detecting 8 oocysts/mL, while the nested PCR detected down to 6 oocysts/mL. Overall, the results showed a high number of infected animals suggesting the parasite *C. parvum* as a major parasitic disease agent of neonatal calves with diarrhea in dairy farms of the Metropolitan Region (Santiago) of Chile. The ZN stain method is extremely operator dependent, but this disadvantage can be reduced by combining ZN with the IC test. The nested PCR, would accomplish the requirement to detect low levels of oocysts in water samples, given the low infective dose and low oocyst burden present in environmental samples. All of these methods are effective for *Cryptosporidium* spp. detection in water samples, contributing to the implementation of standardized diagnostic methods for environmental water infectious agents.

*Key words:* *Cryptosporidium*, diagnosis, calves, water, Ziehl-Neelsen, Auramine, nested PCR, Chile.

**BIBLIOGRAFÍA**



**BIBLIOGRAFÍA**

- Abe N, Sawano Y, Yamada K. 2002. *Cryptosporidium* infection in dogs in Osaka, Japan. Vet. Parasitol. 108 (3): 185-193.
- Acha P, Szyfres B. 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. 3° edición. Vol. III. 23-27pp.
- Abramovich B, Lurá MC, Haye MA, Gilli MI, Vaira S, Contini L. 2000. Parásitos en aguas y su relación con indicadores químicos y microbianos de contaminación. Memorias del XVIII Congreso Nacional del Agua. Rio Hondo (Santiago del Estero), Argentina. 207-208pp
- Alcaíno H, Laval E, Gorman T, Pinochet L, Diaz I. 1989. Isosporosis y criptosporidiosis en cerdos de criaderos industriales de la Región Metropolitana de Chile. Arch. Med. Vet. 21: 131-135.
- Alcaíno H, Gorman T. 1999. Parásitos de animales domésticos en Chile. Parasitol. al Día. 23: 33-41.
- Alonso-Fresán MU, García-Álvarez A, Salazar-García F, Vázquez-Chagoyán JC, Pesacador-Salas N, Saltijeral-Oaxaca J. 2005. Prevalence of *Cryptosporidium* in asymptomatic sheep in family flocks from Mexico State. J. Vet. Med. 52: 482–483.

- Almeida A, Delgado M, Soares S, Castro A, Moreira M, Mendonca C, Canada N, Correira Da Costa J, Coelho, H. 2006. Genetic characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Northern Portugal. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53(S1):26-7.
- Arnedo I, Bracho M, Díaz-Suarez O, Botero L. 2008. Técnicas para la detección de *Cryptosporidium* spp. en sistemas de tratamiento de agua residual. *Kasmera.* 36:120-8.
- Atías A. 1998. *Parasitología Médica.* 1ª ed. Mediterráneo. Santiago, Chile. 146-151pp.
- Awad-el-Kariem F M, Robinson HA, Dyson DA, Evans D, Wright S, Fox MT, McDonald V. 1995. Differentiation between human and animal strains of *Cryptosporidium parvum* using isoenzyme typing. *Parasitology.* 110:129–132.
- Barriga O. 2002. *Las Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos en la América Latina.* 1ª ed. Germinal. Santiago, Chile. 119-121pp
- Balatbat B, Jordan G, Tang Y, Silva J. 1996. Detection of *Cryptosporidium parvum* ADN in human feces by nested PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34(7): 1769-1772.
- Björkman C, Lindström L, Oweson C, Ahola H, Troell K, Axén C. 2015. *Cryptosporidium* infections in suckler herd beef calves. *Parasitology.* 142(8): 1108–1114.

- Blowey R, Weaver A. 2004. Atlas a color de enfermedades y trastornos del Ganado vacuno. 2a edición. Ed. Elsevier. Madrid, España. 14-20pp.
- Brook E, Christley R, French N, Hart C. 2008. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fresh and frozen cattle faeces. Comparison of three methods. Lett. Appl. Microbiol. 46:26-31.
- Botero D, Restrepo M. 2003. Parasitosis humanas. 4ª ed. Editorial CIB. Medellín, Colombia. 506 pp.
- Cacciò SM, Widmer L. 2014. *Cryptosporidium*: parasite and disease. Springer. 564pp.
- Cama VA, Bern C, Roberts J, Cabrera L, Sterling CR, Ortega Y, Gilman RH, Xiao L. 2008. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. Emerg. Infect. Dis. 14: 1567-1574.
- Campano S. 1997. La criptosporidiosis de los animales domésticos. Boletín Epizootiológico 6(1): 25-35.
- Carpenter C, Fayer R, Trout J, Beach M. 1999. Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*. Emerg. Infect. Dis. 579-84.
- Castro-Hermida J, González-Losada Y, Ares-Mazás E. 2002a. Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). Vet. Parasitol. 106: 1-10.



- Castro-Hermida J, González-Losada Y, Mezo-Menéndez M, Ares-Mazás E. 2002b. A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. *Vet. Parasitol.* 106: 11-17.
- Chen XM, O'Hara SP, Huang BQ, Splinter PL, Nelson JB, La Russo N. 2005. Localized glucose and water influx facilitates *Cryptosporidium parvum* cellular invasion by means of modulation of host cell membrane protrusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 6338-43.
- Choudhry N, Bajaj-Elliott M, McDonald V. 2008. The terminal sialic acid of glycoconjugates on the surface of intestinal epithelial cells activates excystation of *Cryptosporidium parvum*. *Infect Immun.* 76: 3735-41.
- Compañ MD, Llopis A, Morales MM. 1991. Consideraciones epidemiológicas sobre criptosporidiosis. *Rev. San. Hig. Púb.* 65: 363-370.
- Cordero del Campillo M, Rojo F, Martínez A, Sánchez C, Hernández S, Navarrete J, Díez P, Quiroz H, Carvalho M. 1999. *Parasitología Veterinaria*. 1ª ed. Mc Graw-Hill, Interamericana. Madrid, España. 968pp.
- Coris Bioconcept. *Crypto-Strip (C-1005)*. 2001. Test inmunocromatográfico in vitro para detectar oocistos de *Cryptosporidium parvum* en las materias fecales. [Manual de uso]. Belgium, Coris Bioconcept. 4pp.
- Current WL. 1985. Cryptosporidiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 187: 1334-1338.

- De La Fuente R, Luzón M, Ruiz-Santa-Quiteria JÁ, García A, Cid D, Orden JÁ, García S, Sanz R, Gómez-Bautista M. 1999. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. *Vet Parasitol.* 80(3): 179-185.
- De Quadros R, Marques S, Amendoeira C, De Souza L, Amendoeira P, Comparin C. 2006. Detection of *Cryptosporidium* oocysts by auramine and Ziehl Neelsen staining methods. *Parasitol. Latinoam.* 61:117-20.
- De Waele V, Berzano M, Speybroeck N, Berkvens D, Mulcahy GM, Murphy TM. 2012. Peri-parturient rise of *Cryptosporidium* oocysts in cows: new insights provided by duplex quantitative real-time PCR. *Vet. Parasitol.* 189(2-4):366-368
- Del Coco BF, Cordova 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. Argent. Microbiol.* 41: 185-196.
- Deng M, Rutherford MS, Abrahamsen MS. 2004. Host intestinal epithelial response to *Cryptosporidium parvum*. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 56: 869-84.
- Dillingham R, Lima A, Guerrant R. 2002. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microb. Infect.* 4:1059-66.

- DuPont H, Chappell C, Sterling C, Okhuysen P, Rose J, Jakubowsky W. 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. N. Engl. J. Med. 332:855-9.
- FAO. 2014. Identifican los diez principales parásitos transmitidos por los alimentos. En página web de la Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación la (FAO). <http://www.fao.org/news/story/es/item/237578/icode/> [Consulta octubre 2015]
- Fayer R, Morgan U, Upton S. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int. J. Parasitol. 30:1305-22.
- Fayer R. 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. Vet. Parasitol. 126:37-56.
- Fayer R, Xiao L. 2008. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2<sup>nd</sup> ed. USA: CRC Press. 560pp.
- Fayer R. 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. Exp. Parasitol. 124: 90–97
- Feng H, Nie W, Sheoran A, Zhang Q, Tzipori S. 2006. Bile acids enhance invasiveness of *Cryptosporidium* spp. into cultured cells. Infect. Immun. 74:3342–3346.
- Feng Y, Ortega Y, He G, Das P, Xu M, Zhang X, Fayer R, Gatei W, Cama V, Xiao L. 2007. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. Vet. Parasitol. 144: 1-9.

- Feng Y, Li N, Duan L, Xiao L. 2009. Cryptosporidium genotype and subtype in raw wastewater in Shanghai, China: evidence for possible unique Cryptosporidium hominis transmission. J. Clin. Microbiol. 47: 153-157.
- Fleiss JL. 1981. Statistical methods for rates and proportions. 2ª Ed. Wiley and Sons, New York. 212 – 218.
- Forney JR, Yang S, Healey MC. 1996. Protease activity associated with excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. J. Parasitol. 82:889–892.
- Fredes F, Raffo E, Muñoz P. 2007. First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in stool of Adelie penguin from the Antarctic using acid-fast stain. Antarct. Sci. 19: 437-438.
- Fredes F, Díaz A, Raffo E, Muñoz P. 2008. *Cryptosporidium* spp. oocysts detected using acid-fast stain in faeces of gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) in Antarctica. Antarct. Sci. 20: 495-496.
- García L, Bruckner DA. 1988. Diagnostic Medical Parasitology. Ed. ASM. Press. Washington.D.C., USA. 500pp.
- García L. 1999. Practical Guide to Diagnostic Parasitology. American Society Microbiology; 4<sup>th</sup> ed. Washington DC. 349pp.

- García L. 2001. Diagnostic Medical Parasitology. 4a ed. Ed. ASM. Press. Washington DC., USA. 1092 pp.
- Gardiner CH, Fayer R, Dubey JP. 1988. An atlas of protozoan parasites in animal tissues. US. Department of Agriculture, Agriculture Handbook Number 651. 83p.
- Gatei W, Greensill J, Ashford R, Cuevas L, Parry C, Cunliffe N, Beeching N, Hart CA. 2003. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom and Vietnam. J. Clin. Microbiol. 41(4): 1458-1462.
- Georgi J, Georgi M. 1990. Parasitology for Veterinarians. 5ª ed. Saunders Company. USA. 84-95pp.
- Geurden T, Goma FY, Siwila J, Phiri IGK, Mwanza AM, Gabriel S, Claerebout E, Vercruyse J. 2006. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* in three cattle husbandry systems in Zambia. Vet. Parasitol. 138: 217–222.
- Gómez-Couso H, Amar CFL, Mc Lauchlin J, Ares-Mazás E. 2005. Characterization of a *Cryptosporidium* isolate from water buffalo (*Bubalus bubalis*) by sequencing of a fragment of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene (COWP). Vet. Parasitol. 131: 139-144.
- Gookin JL, Nordone SK, Argenzio RA. 2002. Host responses to *Cryptosporidium* infection. J. Vet. Intern. Med. 16: 12-21

- Gorman T, Alcaino H, Weitz J. 1986. Hallazgo de *Cryptosporidium* en animales de Chile. Parasitol. al Día. 10: 31-32.
- Gorman T, Alcaino H, Santelices J. 1989. *Cryptosporidium* y otras coccidias intestinales en terneros de lechería. Región Metropolitana. Chile. Arch. Med. Vet. 21(1): 29-34.
- Guerrant RL. 1997. Cryptosporidiosis: An Emerging, Highly Infectious Threat. Emerg. Infect. Dis. 3:51-7.
- Hashim A, Clyne M, Mulcahy G, Akiyoshi D, Chalmers R, Bourke B. 2004. Host cell tropism underlies species restriction of human and bovine *Cryptosporidium parvum* genotypes. Infection and Immunity. 72 (10): 6125-6131.
- Henriksen SA, Pohlenz JF. 1981. Staining of Cryptosporidia by a modified ziehl neelsen technique. Acta. Vet. Scand. 22:594-96.
- Hunter P, Chalmers R, Syed Q, Hughes S, Woodhouse S, Swift I. 2003. Foot and mouth disease and Cryptosporidiosis: possible interaction between two emerging infectious diseases. Emerg. Infect. Dis. Vol. 9. No. 1. 109-111.
- Jaramillo H, Patiño R, Rodríguez J. 2006. Detección molecular por PCR de *Yersinia pseudotuberculosis* en materia fecal de cuyes (*Cavia porcellus*). Rev. Cen. Est. Salud. 1(8): 29-39.

- Johnson D, Pieniazek D, Griffin W, Misener L, Rose J. 1995. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3849-55.
- Kvác M, Kouba M, Vítovec J. 2006. Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 137(1): 202-209.
- Kirby RM, Bartram J, Carr R. 2003. Water in food production and processing: quantity and quality concerns. *Food Control* 14: 283–299.
- Krewski D, Balbus J, Butler-Jones D, Haas CN, Isaac-Renton J, Roberts KJ, Sinclair M. 2004. Managing the microbiological risks of drinking water. *J Toxicol. Environ. Health A.* 67:1591–1617.
- Laurent F, McCole D, Eckmann L, Kagnoff MF. 1999. Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. *Microbes Infect.* 1: 141-8.
- LeChevallier M, Norton W, Lee R. 1991. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2610-16.
- Leng X, Mosier D, Oberst R. 1996. Simplified method for recovery and PCR detection of *Cryptosporidium* DNA from bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 643-647.
- Lippi E, Castro P. 2003. Aspectos epidemiológicos de la criptosporidiosis en becerros de rebaños lecheros. *Parasitol. Latinoam.* 58(3-4): 122-127.

- Lowery C, Moore J, Millar B, Burke D, McCorry K, Crothers E, Dooley JS. 2000. Detection and speciation of *Cryptosporidium* spp. in environmental water samples by immunomagnetic separation, PCR and endonuclease restriction. J Med. Microbiol. 49:779-85.
- Luna S, Reyes L, Chinchilla M, Catarinella G. 2002. Presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp en aguas superficiales de Costa Rica. Parasitol. Latinoam. 57: 63-65.
- Mac Kenzie W, Hoxie N, Proctor M, Gradus S, Blair K, Peterson D, Kazmierczak J, Addiss D, Fox K, Rose J, Davis J. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. N. Engl. J. Med. 331:161-7.
- Madore MS, Rose JB, Gerba CH, Arrowood MJ, Sterling CH. 1987. Occurrence of *Cryptosporidium* in sewage effluents and selected surface waters. J Parasitol. 73: 702-705.
- Mercado R, Buck G, Manque P, Ozaki L. 2007. *Cryptosporidium hominis* infection of the human respiratory tract. Emerg. Infect. Dis. 1 (3): 462-464
- Morgan UM, Xiao L, Fayer R, Lal AA, Thompson RCA. 1999. Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. Int. J. Parasitol. 29, 1733–1751.



- Morgan UM, Xiao L, Fayer R, Lal AA, Thompson RCA. 2000. Epidemiology and strain variation of *Cryptosporidium parvum*. *Contrib. Microbiol.* 6, 116–139.
- Morgan-Ryan U M, Fall A, Ward LA, Hijjawi N, Sulaiman I, Fayer R, Thompson RC, Olson M, Lal A, Xiao L. 2002. *Cryptosporidium hominis* n.sp. (Apicomplexa: Cryptosporidia) from *Homo sapiens*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49:433-440.
- Muccio J, Grooms D, Mansfield I, Wise A, Maes R. 2004. Evaluation of two rapid assays for detecting *Cryptosporidium parvum* in calf feces. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 225 (7): 1090-1092.
- Muñoz M, Alvarez M, Lanza I, Carmenes P. 1996. Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain. *Epidemiol. Infect.* 117: 203-211.
- Navarro-i-Martinez L, Del Águila C, Bornay-Llinares FJ. 2011. *Cryptosporidium*: un género en revisión. Situación en España. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 29(2):135–143
- Neira P. 2005. Acerca de *Cryptosporidium* spp en Chile. *Rev. Med. Chil.* 133: 847-849.
- Neira-Otero P, Muñoz-Saldías N, Sánchez-Moreno M, Rosales-Lombardo M. 2005. Molecular characterization of *Cryptosporidium* species and genotypes in Chile. *Parasitol. Res.* 97: 63-67.

- Neira P, Weitzel T, Mehlhorn H. 2013. Criptosporosiasis. *In* Parasitología Humana. Apt W. McGraw-Hill / Interamericana editors, México. 167-174pp.
- Nikaeen M, Mesdaghinia AR, Jeddi M, Rezaeian M, Makimura K. 2005. A nested-PCR assay for detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water samples. Iranian. J. Publ. Health. 34:13-8.
- Okhuysen P, Chappell C, Crabb J, Sterling C, DuPont H. 1999. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. J. Infect. Dis. 180:1275-8.
- Okhuysen PC, Chappell CL. 2002. *Cryptosporidium* virulence determinants-are we there yet? Int. J. Parasitol. 32: 517-25.
- Ortega-Mora LM, Requejo-Fernandez JA, Pilar-Izquierdo M, Pereira-Bueno J. 1999. Role of adult sheep in transmission of infection by *Cryptosporidium parvum* to lambs: Confirmation of periparturient rise. Int. J. Parasitol. 29, 1261–1268.
- Pantenburg B, Dann SM, Wang HC, Robinson P, Castellanos-Gonzalez A, Lewis DE, White C. 2008. Intestinal immune response to human *Cryptosporidium* sp. infection. Infect. Immun. 76: 23-9.
- Peng MM, Wilson ML, Holland RE, Meshnick SR, Lal AA, Xiao L. 2003. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. Parasitol. Res. 90:175-180.

- Pereira SJ, Ramirez NE, Xiao L, Ward LA. 2002. Pathogenesis of human and bovine *Cryptosporidium parvum* in gnotobiotic pigs. *J. Infect. Dis.* 186:715-718.
- Pintar KDM, Fazil A, Pollari F, Charron DF, Walter-Toews D, Mcewen SA. 2010. A risk assessment model to evaluate the role of fecal contamination in recreational water on the incidence of cryptosporidiosis at the community level in Ontario. *Risk. Anal.* 30: 49-53.
- Ralston BJ, McAllister TA, Olson ME. 2003. Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. *Vet. Parasitol.* 114(2):113–122
- Ramirez N, Sreevatsan S. 2006. Development of a sensitive detection system for *Cryptosporidium* in environmental samples. *Vet. Parasitol.* 136:201-13.
- Remington RD, Schork MA. 1970. Chi-square Test for frequency data. *In* *Statistics with applications to the biological and healthy sciences*. Englewood Cliffs, N.J. Prentice-Hall. 240-244.
- Robertson LJ, Campbell AT, Smith HV. 1993. In vitro excystation of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology.* 106:13–19.
- Rochelle P, De León R, Stewart M, Wolfe R. 1997. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:106-14.

- Rodríguez-Salinas E, Aragón AJ, Allue M, López M, Jiménez M, Domínguez MJ. 2000. Brote de criptosporidiosis en Guadarrama (Comunidad Autónoma de Madrid). Rev. Esp. Salud Publica. 74 (5-6):527-536.
- Sasahara T, Maruyama H, Aoki M, Kikuno R, Sekiguchi T, Takahashi A, Satoh Y, Kitasato H, Takayama Y, Inoue M. 2003. Apoptosis of intestinal crypt epithelium after *Cryptosporidium parvum* infection. J. Infect. Chemother. 9: 278-81.
- Sánchez C, Quílez J, Del Cacho E, Gallego M, Bernad L, Estrada A. 2009. Diarreas neonatales de los pequeños rumiantes: criptosporidiosis. PR 10 (1): 23-29. [http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/enfermedades\\_caprinos/34-criptosporidiosis.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_caprinos/34-criptosporidiosis.pdf) [Consulta noviembre 2015]
- Santín M, Trout J, Xiao L, Zhou L, Greiner E, Fayer R. 2004. Prevalence and age related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. Vet. Parasitol. 122: 103-117.
- Schalm OW, Jain NC, Carroll E.J. 1981. Hematología Veterinaria. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 857p.
- Scorza AV, Brewer MM, Lappin MR. 2003. Polymerase chain reaction for the detection of *Cryptosporidium* spp. in cat feces. J. Parasitol. 89(2): 423-426.

- Sestak K, Ward LA, Sheoran A, Feng X, Akiyoshi DE, Ward HD, Tzipori S. 2002. Variability among *Cryptosporidium parvum* genotype 1 and 2 immunodominant surface glycoproteins. *Parasite Immunol.* 24:213-219.
- Slapeta J. 2009. Centenary of the Genus *Cryptosporidium*. In *Giardia and Cryptosporidium* from molecules to diseases. (Eds G. Ortega-Pierres, S. M. Cacciò, R. Fayer, T. G. Mank, H. V. Smith and R. C. Thompson). UK: CAB International. 502 pp
- Smith HV, Nichols RA, Grimason AM. 2005. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends Parasitol.* 21:133–142.
- Smith HV, Cacciò SM, Cook N, Nichols RA, Tait A. 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet. Parasitol.* 149: 29-40.
- Smith H, Nichols R. 2010. *Cryptosporidium*: Detection in water and food. *Exp. Parasitol.* 124:61-79.
- Soulsby E. 1987. *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 7a edición. Nueva editorial Interamericana. Mexico, DF. 823pp
- Sulaiman IM, Xiao L, Yang C, Escalante L, Moore A, Beard CB, Arrowood MJ, Lal AA. 1998. Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Emerg. Infect. Dis.* 4:681-685.
- Sunnotel O, Snelling X, Moule K, Moore J, Cherie Millar B, Dooley J, Lowery CJ. 2006. Rapid and sensitive detection of single *Cryptosporidium* oocysts from archived glass slides. *J. Clin. Microbiol.* 44:3285-91.

- Sturdee AP, Bodley-Tickel AT, Archer A, Chalmers RM. 2003. Long-term study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. *Vet Parasitol.* 116: 97-113.
- Sturbaum G, Reed C, Hoover P, Jost H, Marshall M, Sterling C. 2001. Species-specific, nested PCR-restriction fragment length polymorphism detection of single *Cryptosporidium parvum* oocysts. *App. Environ. Microbiol.* 67(6): 2665-2668.
- Tee GH, Moody AH, Cooke AH, Chiodini PL. 1993. Comparison of techniques for detecting antigens of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in faeces. *J. Clin. Pathol.* 46: 555-558.
- Thompson RCA, Olson ME, Zhu G, Enomoto S, Abrahamsen MS, Hijjawi NS. 2005. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Adv. Parasitol.* 59: 77-139.
- Thrusfield M. 2005. *Veterinary Epidemiology*. Third edition. Blackwell Publishing. UK. 584pp.
- Ungar BLP. 1990. Cryptosporidiosis in humans (*Homo sapiens*). In Dubey, J.P.; Speer, C.A. Fayer, R. Eds. *Cryptosporidiosis of man and animals*. Boca Ratón, FL. CRC press: 59-82.
- Ungar BLP. 1994. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. In *Textbook of AIDS Medicine*. Broder S, Merigan TC, Bolognesi D. (Eds). Williams & Wilkins, Baltimore, MD. 951pp.

- Vallat, B. sf. Un mundo, una salud. Página web de la Organización Mundial de Salud Animal (OIE). Sf. <http://www.oie.int/es/para-los-periodistas/editoriales/detalle/article/one-world-one-health/> [Consulta octubre 2015]
- Weber R, Bryan R, Bishop H, Wahlquist S, Sullivan J, Juraneck D. 1991. Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. J. Clin. Microbiol. 29:1323-27.
- Weitz JC, Tassara R. 1989. Diagnóstico de la cryptosporidiosis: Estudio comparativo de las tinciones Ziehl-Neelsen y Safranina. Rev. Med. Chil. 117: 899-902.
- Wiedenmann A, Kruger P, Botzenhart K. 1998. PCR detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental samples-a review of published protocols and current developments. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 21:150-66.
- WHO. 2009. Risk assessment of *Cryptosporidium* in drinking water. WHO/HSE/WSH/09.04. 134pp.
- Xiao L, Herd RP, McClure KE. 1994. Periparturient rise in the excretion of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts as a source of infection for lambs. J. Parasitol. 80: 55–59.
- Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. 2004. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. Clin. Microbiol. Rev. 17: 72-97.

- Xiao L, Ryan UM. 2004. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17: 483-90.
- Xiao L. 2010. Molecular Epidemiology Of Cryptosporidiosis: An Update. *Exp. Parasitol.* 124: 80-89.
- Yoder J, Beach M. 2010. *Cryptosporidium* surveillance and risk factors in the United States. *Exp. Parasitol.* 124: 31-39.
- Zanaro NL, Garbossa G. 2008. *Cryptosporidium*: cien años después. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 42 (2): 195-201
- Zarlenga D, Trout J. 2004. Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. *Vet. Parasitol.* 126:195-217.
- Zhou R, Li G, Xiao S, Xia Y, Guo Y. 2007. PCR amplification and sequence analyses of ITS-1 rDNA from *Cryptosporidium andersoni* in dairy cattle. *Parasitol. Res.* 100: 1135-1138.