

PRIMER REPORTE DE *Cryptosporidium parvum* EN TERNEROS HOLSTEIN (*Bos taurus*) DE MANIZALES, CALDAS, COLOMBIA

R. J. Ocampo¹*, F. A. Rivera¹, G. A. López¹, M. E. Álvarez¹, L.A. Cardozo¹, J. E. Pérez

Artículo recibido: 24 de abril de 2012; aprobado: 10 de octubre de 2012

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue identificar especies o genotipos del protozoario parásito *Cryptosporidium* presentes en heces colectadas de terneros Holstein del municipio de Manizales, Departamento de Caldas, Colombia. El ADN fue extraído a 80 muestras de materia fecal, de las cuales 11 fueron diagnosticadas positivas para *Cryptosporidium* spp., mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El análisis PCR-RFLP del locus 18S ADNr, identificó la presencia de *Cryptosporidium parvum* en todas las muestras positivas analizadas. Este hallazgo sugiere que el ganado puede ser una fuente potencial de infección por *Cryptosporidium* en humanos y se constituye en el primer reporte publicado de *C. parvum* en bovinos de Manizales, Caldas.

Palabras clave: *Cryptosporidium* spp., 18S ADNr, PCR-RFLP.

FIRST REPORT OF *Cryptosporidium parvum* IN HOLSTEIN CALVES (*Bos taurus*) FROM MANIZALES, CALDAS, COLOMBIA

ABSTRACT

The objective of this study was to identify species or genotypes of *Cryptosporidium* parasite present in feces collected from Holstein calves in Manizales city, Caldas Department, Colombia. DNA was extracted from 80 fecal samples, which 11 were diagnosed positive for *Cryptosporidium* spp., by the Polymerase Chain Reaction method. PCR-RFLP analysis of 18S rDNA locus identified the presence of *Cryptosporidium parvum* in all samples tested positive. This finding suggests that cattle may be a potential source of human infection by *Cryptosporidium*, and it becomes the first published report of *C. parvum* in cattle in Manizales, Caldas.

Key words: *Cryptosporidium* spp., 18S rDNA, PCR-RFLP.

¹ Grupo de Investigación en Genética, Biodiversidad y Fitomejoramiento, Gebiome, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas. Edificio Orlando Sierra Hernández Cll. 65 nro. 26-10, Manizales (Colombia).

* Autor para correspondencia: ricardopv70@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Los protozoos del género *Cryptosporidium* son parásitos obligados que infectan un amplio rango de hospederos incluyendo humanos, animales de compañía, fauna silvestre y doméstica de todo el mundo (Fayer *et al.* 2006).

Tradicionalmente, las especies de *Cryptosporidium* fueron clasificadas por las características morfológicas de los ooquistes y por su habilidad de infectar a un único huésped específico. Sin embargo, la especificidad del huésped como criterio de especiación parece mal fundamentada ya que algunas especies carecen de tal especificidad (Fayer y Xiao 2008). La definición de especie y la identificación de este género están en constante cambio con la adición de nuevas especies basada primordialmente en criterios moleculares. Hasta el momento, el género abarca 18 especies válidas y más de cuarenta genotipos que aún no poseen denominación (Fayer y Xiao 2008).

La transmisión usualmente se presenta a través de la vía fecal-oral o, indirectamente, por la contaminación de las aguas y alimentos con ooquistes provenientes de heces. El potencial zoonótico de transmisión de *Cryptosporidium* spp., particularmente en lo que respecta al ganado y vida silvestre, ha generado considerable interés en los últimos años (Caccio *et al.* 2005; Feltus *et al.* 2006; O'Handley 2007).

Estudios recientes en Norte América y Europa sugieren que el ganado puede infectarse por lo menos con cuatro especies o genotipos de *Cryptosporidium*: *C. parvum*, *C. bovis*, *C. suis*, *C. andersoni* y *Cryptosporidium* genotipo ciervo (Santin *et al.* 2008; Feng *et al.* 2007; Langkjaer *et al.* 2007; Plutzer y Karanis 2007; Thompson *et al.* 2007; Fayer *et al.* 2006). Estas especies de *Cryptosporidium* en el ganado vacuno

muestran una asociación de susceptibilidad con el grupo etéreo involucrado: *C. parvum* predomina en terneros neonatos, *C. bovis* y *Cryptosporidium* genotipo ciervo en terneros destetados y *C. andersoni* en novillos y bovinos adultos (Fayer *et al.* 2006; Santin *et al.* 2004), aunque *C. parvum*, se ha detectado en individuos de todas las edades (Feng *et al.* 2007).

Los estudios sugieren que *C. parvum* es la especie que se presenta con mayor frecuencia en terneros y adultos, provocando enteritis y diarrea, lo que conlleva a la pérdida de peso del animal y una reducción en la producción lechera de los individuos adultos (Olson *et al.* 2004; Santin *et al.* 2004), además de ser considerada la única especie del parásito presente en el ganado que puede infectar a los humanos a través del contacto directo con sus heces o por la contaminación de las fuentes de agua para consumo humano con ooquistes (Thompson *et al.* 2007).

Debido a la dificultad para diferenciar las distintas especies de *Cryptosporidium* mediante los caracteres morfológicos de los ooquistes, las técnicas moleculares se han convertido en una herramienta útil para determinar las distintas especies y genotipos del parásito, y así poder evaluar los riesgos de infección en humanos y el potencial zoonótico (Fayer *et al.* 2006).

Algunos estudios previos de criptosporidiosis en Colombia mostraron una prevalencia del parásito entre 2,5% y 4% en personas con diarrea y entre el 32 y 42% de personas inmunosuprimidas (Botero y Restrepo 1998). Sin embargo, la prevalencia de la enfermedad asociada a genotipos zoonóticos de *Cryptosporidium* provenientes del ganado no ha sido investigada y el grado de transmisión zoonótica de los sistemas ganaderos en Colombia es aún desconocido.

El objetivo de este estudio fue identificar molecularmente especies o genotipos de *Cryptosporidium* presentes en heces de ganado colectadas en el área urbana de la ciudad de Manizales con el fin de determinar su potencial zoonótico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras fecales de 80 terneros de la raza Holstein (*Bos taurus*) con una edad entre 1 y 20 semanas, procedentes de haciendas ganaderas de la ciudad de Manizales (Sector Gallinazo) entre los meses de agosto y noviembre del año 2009. Las muestras fueron colectadas en frascos nuevos para coprológicos y transportadas en neveras de icopor con pilas refrigerantes al Laboratorio de Genética de la Universidad de Caldas para ser procesadas el mismo día de la colecta. Las muestras fueron concentradas por el método de formol éter (Ritchie 1948) y mantenidas a 4°C para su posterior análisis molecular.

Extracción de ADN

Después de tres lavados con buffer PBS para remover el formol, el ADN total de todas las muestras fue extraído por el método del fenol cloroformo alcohol isoamílico (Gonçalves *et al.* 2008) y almacenado en buffer TE a una temperatura de -20°C. Cada muestra se procesó individualmente en cámara de bioseguridad clase IIA. La cantidad de ADN extraído se determinó con la ayuda de un espectrofotómetro Nano Vue (General Electric - serie 110482) a una absorbancia de 260/280 nm.

Amplificación por PCR del gen de la subunidad pequeña ribosomal (SSU) de *Cryptosporidium*

Se utilizó PCR anidada para amplificar un fragmento de 1323 pb correspondientes al gen de la subunidad pequeña ribosomal (SSU-ADNr) usando un juego de cebadores (5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3') y (5'-CCCATTTTCCTTCGAACAGGA-3'). La mezcla de reacción se ajustó a un volumen de 20 µl, la cual contenía 2,0 µl de ADN genómico, buffer de PCR 10X, 6 mM de MgCl₂, 200 µM de cada uno de los cuatro dNTPs, 100 nM de cada *primer* (*forward* y *reverse*), 2,5 U de Taq polimerasa y agua libre de nucleasas para ajustar al volumen final. La mezcla de reacción fue inicialmente incubada a 94°C por tres min para la desnaturalización inicial y posterior a esto un total de 35 ciclos fueron realizados con denaturalización a 94°C por 45 seg, anillamiento de los cebadores a 55°C por 45 seg y extensión a 72°C por 1 min. La extensión final fue hecha a 72°C por 10 min. Para la segunda PCR, 2 µl del producto de la primera PCR fue usado como molde y se utilizaron los cebadores (5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3') y (5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3') para amplificar un producto de 826-864 pb (el número de pares de bases depende de la especie del parásito). Las condiciones de PCR fueron idénticas a las de la primera PCR, excepto que 3 mM de MgCl₂ fueron usados en la segunda PCR (Xiao *et al.* 1999).

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio y geles de poliacrilamida al 6% teñidos con nitrato de plata.

Análisis PCR-RFLP

Para el análisis por PCR del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) fueron usados 10 µl del producto de la segunda PCR para digestión por separado con las enzimas de restricción *SspI* y *VspI* por un período de tres horas. Los 20 µl de mezcla de reacción contenían 10 µl del producto de la segunda PCR, buffer de restricción 10X, 10 UI de las enzimas (*SspI*/*VspI*) (Xiao *et al.* 1999). La confirmación de la digestión de los productos fue realizada por medio de electroforesis sobre geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio al 2% y sobre poliacrilamida teñida con nitrato de plata al 6%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En 11 de las 80 muestras de materia fecal examinadas por PCR se observó la amplificación de un producto específico de 826-864 pb, correspondiente a lo reportado en la literatura para el gen SSU-ADNr, confirmando así la presencia

de *Cryptosporidium* spp. Los resultados del análisis PCR-RFLP del producto de la PCR anidada de las 11 muestras positivas, utilizando la enzima de restricción *SspI*, mostró la presencia de tres bandas de 449, 268 y 116 pb (Figura 1), mientras que cuando se utilizó la enzima de restricción *VspI* se observó la presencia de dos bandas que correspondían a 628 y 104 pb, lo cual corresponde a los productos esperados para el gen SSU-DNAr publicados anteriormente (Xiao *et al.* 1999); ello demuestra claramente la presencia de *Cryptosporidium parvum* en todas las muestras analizadas.

La presencia exclusiva de *Cryptosporidium parvum* en los terneros analizados concuerda con los estudios realizados en otros países por distintos autores (Santin *et al.* 2008; Trotz-Williams *et al.* 2006; Santin *et al.* 2004), los cuales han reportado a *Cryptosporidium parvum* como la especie más común en terneros, seguida por *Cryptosporidium bovis* (Coklin *et al.* 2007; Santin *et al.* 2004). Sin embargo, debido al bajo número de muestras ana-

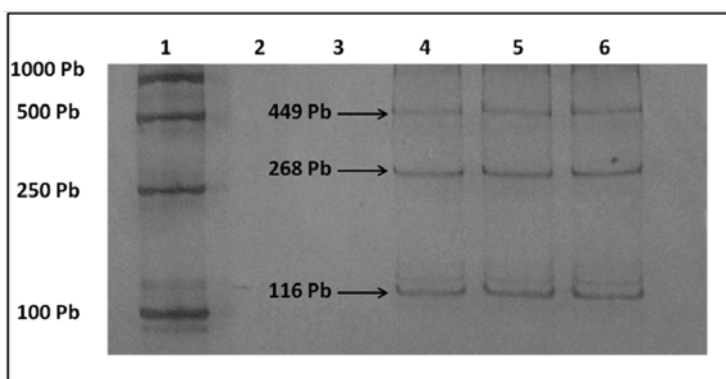


FIGURA 1. Diagnóstico molecular de *Cryptosporidium* spp. por PCR-RFLP anidada del gen SSU-ADNr: Línea 1. Marcador de peso molecular (Easy Ladder 1). Línea 2. Control de Reacción (CR). Línea 3. Control negativo (CN). Líneas 4, 5 y 6. Diagnóstico de *Cryptosporidium parvum* en terneros Holstein por digestión con la enzima de restricción *SspI* del producto de la PCR anidada.

lizadas en este estudio, no es posible descartar la presencia de otras especies y genotipos del parásito en el ganado de la región. Esta es la primera vez que se han analizado por métodos moleculares aislados de *Cryptosporidium* en Caldas y este estudio constituye el primer reporte de *Cryptosporidium parvum* en bovinos del Departamento de Caldas.

La identificación de *Cryptosporidium parvum* en terneros de la región soporta la idea de que los bovinos pueden representar un riesgo para los criadores de animales y agricultores a través del contacto directo con heces de animales infectados y, posiblemente, a la población humana en general, a través de la contaminación de las aguas de consumo humano con ooquistes provenientes por la escorrentía de aguas de desecho de la ganadería (Trotz-Williams *et al.* 2006; Xiao *et al.* 2007).

Los resultados de este análisis pueden proporcionar información útil sobre la epidemiología de *Cryptosporidium* spp. en las poblaciones humanas y ganaderas del departamento de Caldas, razón por la cual el personal de salud pública, los profesionales e investigadores deben ser conscientes de que el ganado vacuno se puede constituir en una causa potencial de casos de criptosporidiosis en humanos de la ciudad de Manizales.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se registró la presencia de parásitos del género *Cryptosporidium* en terneros de la raza Holstein en Manizales, Caldas. Los análisis moleculares por PCR-RFLP del gen SSU del ADNr para las 11 muestras fecales diagnosticadas como positivas para *Cryptosporidium* spp., identificaron la presencia única de la especie *Cryptosporidium parvum* en todas

ellas, lo cual sugiere que el ganado bovino puede constituir en un riesgo de salud pública por la transmisión zoonótica de *Cryptosporidium parvum* a los seres humanos. Este trabajo representa el primer reporte de *Cryptosporidium parvum* en terneros en el municipio de Manizales, Caldas, Colombia.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los propietarios de haciendas ganaderas del sector de Gallinazo (Manizales, Caldas), por su colaboración en la colecta de las muestras utilizadas en el estudio. Este trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones y Postgrados de la Universidad de Caldas.

REFERENCIAS

1. Botero D, Restrepo M. 1998. Otros protozoos intestinales. En: Botero D, Restrepo M, eds. Parasitosis humanas. 3ª ed. Medellín: [CIB] Corporación para Investigaciones Biológicas. p. 69-72.
2. Caccio SM, Thompson RCA, McLauchlin J, Smith HV. 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* 21: 430-437.
3. Coklin T, Farber J, Parrington L, Dixon B. 2007. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. *Vet. Parasitol.* 150: 297-305.
4. Fayer R, Xiao L. 2008. *Cryptosporidium* y criptosporidiosis. 2da ed. New York: CRC Press. 564 p.
5. Fayer R, Santin M, Trout JM, Greiner E. 2006. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Vet. Parasitol.* 135: 105-112.
6. Feltus DC, Giddings CW, Schneck BL, Monson T, Warshauer D, McEvoy JM. 2006. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium*

- ridium* spp. in Wisconsin. J. Clin. Microbiol. 44: 4303–4308.
7. 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.
 8. Gonçalves EMN, Araújo RS, Orban M, Matté GR, Matté MH, Corbett CEP. 2008. Protocol for DNA extraction of *Cryptosporidium* spp. oocysts in fecal samples. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 50: 165–167.
 9. Langkjaer RB, Vigre H, Enemark HL, Maddox-Hittel C. 2007. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. Parasitology. 134: 339–350.
 10. O’Handley RM. 2007. *Cryptosporidium parvum* infections in cattle: are current perceptions accurate? Trends Parasitol. 23: 477–480.
 11. Olson ME, O’Handley RM, Ralston BJ, McAllister TA, Thompson RCA. 2004. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. Trends Parasitol. 20: 185–191.
 12. Plutzer J, Karanis P. 2007. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. Vet. Parasitol. 146: 357–362.
 13. Ritchie LS. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. 1948. Bull U.S Army Med. 8: 326.
 14. Santin M, Trout JM, Fayer R. 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. Vet. Parasitol. 155: 15–23.
 15. Santin M, Trout JM, 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.
 16. Thompson HP, Dooley JSG, Kenny J, McCoy M, Lowery CJ, Moore JE, Xiao LH. 2007. Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland. Parasitol. Res. 100: 619–624.
 17. Trotz-Williams LA, Martin DS, Gatei W, Cama V, Peregrine AS, Martin SW, Nydam DV, Jamieson F, Xiao L. 2006. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. Parasitol. Res. 99: 346–352.
 18. Xiao L, Zhou L, Santin M, Yang W, Fayer R. 2007. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States. Parasitol. Res. 100, 701–706.
 19. Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, Fayer R, Lal AA. 1999. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1578–1583.