

EXCRECIÓN DE OOQUISTES DE *CRYPTOSPORIDIUM* EN EL GANADO CAPRINO DE LA PROVINCIA DE ALMERÍA

LAURA SANZ CEBALLOS⁽¹⁾, PILAR ILLESCAS GÓMEZ⁽²⁾, M^a REMEDIOS SANZ SAMPelayo⁽¹⁾
⁽³⁾, FRANCISCA GIL EXTREMERA⁽¹⁾, MATILDE RODRÍGUEZ OSORIO⁽¹⁾

RESUMEN

Entre los animales de granja, el ganado caprino es uno de los más afectados por cryptosporidiosis, la que además de la incidencia en la salud humana y animal, causa a los ganaderos pérdidas económicas considerables. Teniendo en consideración lo anterior, el objetivo del presente estudio ha estado centrado en determinar la prevalencia de *Cryptosporidium parvum*, en heces de 582 cabras, de cuatro granjas seleccionadas al azar en la provincia de Almería. La toma de muestras se realizó en los años 2004 y 2005, durante la paridera de primavera y otoño. Las muestras se agruparon según edad, de la siguiente manera: grupo I, animales de 1-15 días, grupo II, > 15 días < 2 meses y, grupo III, > 2 meses a 9 años. Las muestras fueron tomadas al azar, directamente del recto y marcadas para su identificación. Individualmente, cada muestra fue concentrada, realizada su extensión y sometida a tinción ácida modificada por Ziehl-Neelsen. La superficie total de la extensión fue examinada bajo microscopía y objetivo de inversión. Ooquistes del parásito fueron detectados en todas las granjas. De un total de 582 cabras examinadas, en 111 se encontró el parásito, siendo por tanto la prevalencia del 19.1%. El valor obtenido para la granja nº 1 (10,1%) fue el más bajo y estadísticamente diferente ($P < 0,05$) que el obtenido para la granja nº 2 (26,2%) y la 4 (26,5%). La presencia de *Cryptosporidium* en los tres grupos de edad considerados, fue de 10,4%, 13,4% y del 25,2% para los grupos I, II y III, respectivamente. El grupo

⁽¹⁾ Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Estación Experimental del Zaidín, Unidad de Nutrición Animal, Profesor Albareda, 1. 18008 Granada

⁽²⁾ Laboratorio de Producción Animal. Junta de Andalucía. Granada

⁽³⁾ De la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental

III resultó ser estadísticamente diferente del grupo I y II ($P < 0,05$). Con respecto a los resultados obtenidos analizados según estación, no encontramos diferencias significativas ($P > 0,05$). Al mismo tiempo, en 222 muestras fecales de las total investigadas, se ensayó un test comercial inmunocromatográfico, disponible para humanos. La sensibilidad del mismo, fue del 2,3%, diferente estadísticamente ($P < 0,05$) del 10,4% detectado por microscopía. En conclusión, los resultados del presente estudio indican una alta prevalencia de la infección por *Cryptosporidium* en cabras. Esta especie puede considerarse un importante reservorio para el hombre y otros animales de granja. El uso del kit comercial para el diagnóstico de cryptosporidiosis en humanos, no es recomendable para el ganado caprino.

INTRODUCCIÓN

Para las regiones áridas y semiáridas de la zona mediterránea, su uso ganadero basado en explotaciones extensivas o semiextensivas, se ha propuesto como la opción con mayores posibilidades productivas, basado en razas autóctonas, integradas en el medio natural, dentro de lo que se entiende por agricultura sostenible. En este sentido, la cabra se señala como especie de elección por su excelente adaptación a las condiciones climáticas, así como por el alto valor de sus producciones, leche y carne, a las que se les reconoce una alta calidad, tanto desde un punto de vista nutritivo como saludable (Boza, 2005). La cabra es uno de los animales de granja mas afectado por la cryptosporidiosis, sufriendo los ganaderos importantes perdidas económicas producidas directa e indirectamente por este parasitismo.

Cryptosporidium parvum ha sido reconocido como un enteropatógeno ubicuo en humanos y animales de granja. La infección por *Cryptosporidium* en animales de granja, llega a tener un importante impacto económico que incide en los ganaderos a causa de la alta morbilidad y, en ocasiones, mortalidad de los animales. (Casemore et al., 1997), incrementándose esta última cuando se asocia con infecciones concurrentes, o deficiencias en la nutrición y/o en el manejo (de Graaf et al., 1999). Además, los ooquistes excretados con las heces de los animales infectados, pueden ser una fuente de infección para los humanos, constatándose una alta incidencia en el caso de pacientes con SIDA, frente a la cual no hay tratamiento efectivo (Tzipori, 1998). La mayoría de los datos publicados sobre la prevalencia de la infección por *Cryptosporidium* en animales de granja, son referentes el ganado vacuno, siendo minoritarios los llevados a cabo en el ganado ovino y caprino (Casemore et al., 1997). En cabras, la primera denuncia de la infección se realizó en Australia, en un cabrito de dos semanas de edad

con diarrea (Mason et al., 1981). Desde entonces la infección ha sido diagnosticada en varias epidemias en cabritos, en diferentes países de Europa (Majewska et al., 2000). En España, la primera denuncia en pequeños rumiantes fue realizada por Rojo Vázquez et al. (1985), desde entonces la infección ha sido descrita en diferentes áreas geográficas (Rojo Vázquez et al., 1987; Matos Fernández et al., 1993; Castro Hermida et al., 2007), considerándose hoy uno de los principales enteropatógenos de estos animales (Muñoz-Fernández et al., 1996). En este sentido los estudios realizados en Andalucía resultan aún muy limitados (Llamas Trujillo et al., 1994).

Por todo lo anteriormente citado y relevancia del tema, tanto desde su aspecto sanitario como económico, el objetivo del presente estudio ha estado dirigido a estimar la prevalencia de la infección por *Cryptosporidium*, en cabras de granjas seleccionadas al azar situadas en la provincia de Almería.

Por otra parte, es de interés el poder disponer de una técnica de diagnóstico fácil de usar en condiciones de campo. En la actualidad se ha desarrollado un kit comercial para el diagnóstico humano, y hemos comparado la sensibilidad del examen microscópico fecal con la del citado kit.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio se ha llevado a cabo en 4 granjas de la provincia de Almería. El hecho distintivo de esta localización geográfica es la escasez de precipitaciones, que hace de esta zona el área más seca de toda Europa. Las explotaciones 1 y 2 estaban situadas en Níjar y Tabernas respectivamente, zona árida templada, con lluvias no superiores a los 200 mm, y la 3 y 4, en la comarca de Los Vélez, zona húmeda fría con lluvias medias anual de 350 mm.

Animales y diseño experimental

Los animales fueron cabras de raza Murciano-Granadina y Malagueña, mantenidas bajo condiciones semi-extensivas de explotación, de edad comprendida entre mayores de 1 día y hasta 9 años. Hemos examinado muestras fecales de 582 cabras mediante microscopía y 222 por microscopía y técnica inmunocromatográfica (Crypto-Strip, Coris Bioconcept, Namur, Bélgica). Las muestras fueron obtenidas durante los años 2004 y 2005, en la época de paridera de primavera y otoño. Un cuestionario

sobre condiciones higiénico-sanitarias de las instalaciones, mantenimiento y edad de los animales se cumplimentó en cada caso. Los animales en cada granja, fueron distribuidos en tres grupos: grupo I (1-15 días) grupo II (> 15 días-2 meses) grupo III (> 2 meses-9 años). El número de animales muestreados de cada grupo en ningún caso fue menor del 10% del número existente en cada grupo y granja en el momento de la recogida de las muestras, durante las dos parideras estudiadas.

Examen parasitológico

Las 582 muestras fueron recogidas de animales seleccionados al azar, directamente del recto, usando guantes estériles y, en animales pequeños (grupos I y II) mediante hisopo rectal estéril. Para cada animal, las muestras fueron depositadas en tubos e identificadas con la fecha de la toma, origen y edad, transportadas al laboratorio en nevera a 4°C, para su procesamiento. El tiempo transcurrido hasta su análisis no fue superior a 24 horas. Las muestras fecales, 1,0 g o 0,3 g en el caso de las obtenidas mediante hisopo rectal, fueron emulsionadas (en tampón fosfatos con formol 10%), filtradas por dos capas de gasa (tamaño de 150 μm a 45 μm), agitadas vigorosamente con éter etílico (1/1, vol/vol) y concentradas por centrifugación a 1000 g durante 5 minutos. Las tres capas resultantes se decantaban, realizándose a continuación una extensión de 25 μl de sedimento, procediéndose a su tinción mediante el método de Ziehl-Neelsen modificado por Heriksen y Pohlenz (1981). La superficie total de la preparación se observaba bajo objetivo de inmersión.

Técnica inmunocromatográfica

En 222 animales seleccionados al azar de los 582 que habían intervenido en el estudio, se recogieron las muestras por duplicado, una para la realización del diagnóstico parasitológico por microscopía, y la segunda para la realización del diagnóstico por la técnica inmunológica. Siguiendo las instrucciones indicadas por la casa comercial para la realización de la técnica, las muestras no se trataban con tampón fosfatos conteniendo formaldehído ni ningún derivado. La muestra fecal se diluía en una solución tampón, la que era suministrada con el test. Las tiras de nitrocelulosa estaban sensibilizadas con un anticuerpo monoclonal específico, producido en ratón frente a antígenos de membrana de ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, y conjugado con oro coloidal responsable de la especificidad del test. Como control del ensayo, cada tira contiene adsorbido, un segundo reactivo, un anticuerpo anti-IgG de ratón. La

técnica consiste en sumergir la tira en cada solución de muestra diluida en el tampón en una relación 1/5 (vol/vol) durante 5-10 minutos (máximo 15 minutos), apareciendo una línea roja en caso positivo. La solución sigue migrando hasta encontrarse con el segundo reactivo (anti-IgG de ratón) al que se fija el exceso de conjugado, generando otra banda oscura (validación del ensayo).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos, han sido analizados mediante el test de igualdad de porcentajes, con objeto de establecer las posibles diferencias de parasitación entre granjas, grupos de edad y parideras (Rodríguez Osorio et al., 2003).

RESULTADOS

Observación microscópica

De las 582 cabras examinadas, *Cryptosporidium* ha sido detectado en 111, obteniéndose una prevalencia del 19,1%. En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en los tres grupos de edad considerados, explotaciones y parideras.

Tabla 1. Prevalencia de la infección por *Cryptosporidium parvum* en cabras naturalmente infectadas, en relación con la edad, granja y paridera. Resultados del análisis estadístico

Edad	Muestras examinadas	Positivas
0-15 días	134	14 (10.4%) ^a
16-60 días	134	18 (13.4%) ^a
61 días -9 años	314	79 (25.2%) ^b
Granja		
1	148	15(10.1%) ^a
2	130	34(26.2%) ^b
3	168	26(15.5%) ^{a,b}
4	136	36(26.5%) ^b
Paridera		
Primavera	303	54 (17.8%)
Otoño	279	57 (20.4%)

Para una misma comparación, valores afectados por distintas letras^{a,b}, son diferentes ($P < 0.05$).

Respecto a la edad, la más alta prevalencia la hemos encontrado en el grupo III, diferente estadísticamente de los valores encontrados en los grupos I y II ($P < 0,05$).

Con respecto a los porcentajes de parasitación entre las distintas granjas, el correspondiente a la explotación n° 1, fue significativamente más bajo que los encontrados en las granjas 2 y 4 ($P < 0,05$). Los datos agrupados por parideras (primavera y otoño) fueron: 54 positivos (17,8%) para la paridera de primavera y 57 (20,4%) para la de otoño, no siendo los porcentajes de parasitación estadísticamente significativos ($P > 0,05$).

Comparación de la observación microscópica y test inmunocromatográfico

Los resultados de las muestras de las 222 cabras examinadas por las dos técnicas (Tabla 2) han demostrado que la eficacia de los dos métodos es diferente ($P < 0,05$), obteniéndose un porcentaje de positivos por observación microscópica, del 10,4% frente al 2,3% para la inmunocromatográfica. Todas las muestras que fueron positivas mediante el test comercial (Crypto-Strip) lo fueron por observación microscópica, no detectándose ninguna positiva de las negativas por microscopía.

Tabla 2. Resultados obtenidos mediante observación microscópica de las muestras fecales y test inmunocromatográfico. Análisis estadístico

	Muestras examinadas	Positivas	Negativas
Detección microscópica	222	23 (10,4%) ^a	199
Detección inmunocromatográfica	222	5 (2,3%) ^b	217

^{a,b} ($P < 0,05$).

DISCUSIÓN

En el área geográfica considerada, éste es el primer estudio realizado sobre la prevalencia de esta protozosis en cabras. En España la prevalencia de cryptosporidiosis es alta. Nuestros resultados han mostrado que de las 582 cabras examinadas, en 111 (19,1%) encontramos ooquistes de *Cryptosporidim* en heces. El parásito estuvo presente en todas las granjas incluidas en este estudio; estando nuestros resultados de acuerdo con los encontrados por otros autores. Así en León, Matos Fernández et al. (1993), sobre 367 cabritos de 5 semanas de edad, procedentes de 31 granjas, elegidas al azar, encontraron que el 36% de las granjas y el 11% de los animales muestreados, estaban infectados por *Cryptosporidiun*. Llamas Trujillo et al. (1994), examinaron 47 cabritos muertos de 1-10 días de edad, pertenecientes a granjas de la provincia de Granada, encontrando que el 20,78% de los animales presentaban ooquistes en sus heces o en la mucosa del epitelio intestinal. En Galicia, Castro Hermida et al. (2007), denunciaron que en 116 cabras, el 7,7% estaban parasitadas.

Desde el punto de vista económico, no solo hay que considerar las pérdidas ocasionadas por la muerte de los animales más pequeños, sino también las debidas a la pérdida de peso en los animales afectados, gastos derivados de su tratamiento veterinario y manipulación de los animales y sus instalaciones, factores que inciden negativamente en la economía del ganadero. Las deficientes condiciones higiénicas favorecen el mantenimiento y diseminación de este parasitismo (de Graaf et al., 1999). En nuestro caso, el mayor número de animales parasitados se obtuvo en la granja 4 que era la que mantenía peores condiciones sanitarias. Respecto a los grupos de edad considerados, el mayor porcentaje de animales infectados fue el que comprendía animales de 60 días a 9 años. Se ha sugerido que la eliminación de ooquistes por estos portadores es uno de los mecanismos del mantenimiento de la infección en rumiantes. Estos ooquistes emitidos, son capaces de transmitir la infección a los animales recién nacidos altamente vulnerables, y debido a su alto poder de multiplicación, pueden ejercer su poder contaminante medioambiental, incidiendo en la epidemiología de esta enfermedad (Noordeen et al., 2001). Por otra parte, estos adultos asintomáticos constituyen un alto riesgo para los humanos, especialmente para los afectados por inmunosupresión, tales como los que padecen SIDA, debido a su potencial efecto zoonótico (Tzipori, 1998). En este sentido, en la primavera de 1998, hubo en la Sierra de Guadarrama, una epidemia de gastroenteritis causada por *Cryptosporidium*, con 21 niños afectados, encontrándose el parásito en 9 de ellos (43%) (Rodríguez-Salinas et al., 2000), indicando estos mismos autores la importancia de este parasitismo como enfermedad emergente.

Respecto a la incidencia en las parideras aquí estudiadas (primavera y otoño) no hemos encontrado diferencias significativas en la prevalencia de la infección, resultados que se muestran de acuerdo con los indicados por Noordeen et al. (2001). Este hecho puede ser debido a las condiciones climáticas de la zona estudiada, caracterizada por presentar lluvias poco frecuentes.

El kit comercial aquí empleado, ha sido desarrollado para el diagnóstico humano. En el estudio realizado por Llorente et al. (2001), se encontró una especificidad del 100% y una alta sensibilidad. De acuerdo con esto, pensamos que el citado kit podría ser una herramienta útil por su facilidad de ejecución y rapidez en la obtención de resultados, para el diagnóstico de la cryptosporidiosis en cabras. Los resultados que hemos obtenido con este kit han demostrado que es menos sensible que la observación microscópica de las heces. Esta baja sensibilidad puede ser debida al hecho de que el kit comercial es capaz de detectar ooquistes a una concentración de 1.000 ooquistes/ml lo cual es equivalente a 1.000 ooquistes/gr de heces (indicaciones del kit), y en

nuestras muestras, en algunos casos, estos podrían estar presentes en menor concentración, o bien que los inmunoreactivos del kit fueran obtenidos con *Cryptosporidium* de diferente genotipo al presente en las muestras que hemos analizado. En este sentido, Widmer (1998) ha demostrado la existencia de dos subgrupos genéticos en *Cryptosporidium parvum*: genotipo H o 1, encontrado solamente en infecciones humanas, y los pertenecientes al genotipo C o 2, encontrado en humanos y animales.

En conclusión, los resultados del presente estudio revelan una alta prevalencia de *Cryptosporidium* en cabras en la zona estudiada. Esta especie debería ser considerada un reservorio de interés para otros animales de granja y humanos. El kit comercial desarrollado para diagnóstico humano, no es recomendable para el diagnóstico de la cryptosporidiosis caprina.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por la Consejería de Innovación Ciencia y Empresa. Junta de Andalucía. (Proyecto CO3-177).

BIBLIOGRAFÍA

- Boza, J. 2005. Papel del ganado caprino en las zonas desfavorecidas. XXX Jornadas Científicas y IX Internacionales de la SEOC. Conferencia Inaugural. Granada.
- Casemore, D.P., Wright, S.E., Coop, R.L. 1997. Cryptosporidiosis: human and animal epidemiology. En *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. Fayer R. (Ed). CRC Press Boca Raton. FL. USA, pp. 65-92.
- Castro-Hermida, J.A., Almeida, A., González-Warleta, M., Correira da Costa, J., Rumbo-Lorenzo, C., Mezo, M. 2007. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* in healthy adult domestic ruminants. *Parasitol. Res.* 10: 1443-1448.
- de Graaf, D.C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L.M., Abbasi, H., Peeters, J.F. 1999. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int. J. Parasitol.* 29: 1269-1287.
- Henriksen, S.A., Pohlenz, J. 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Act. Vet. Scand.* 22: 594-596.
- Llamas Trujillo, R., Illescas Gómez, P., Ardy Del Hoyo, L., Llamas Cruz, A. 1994. Criptosporidiosis en ovinos y caprinos en la provincia de Granada. *ACVAO* 7: 255-263.
- Llorente, M.T., Clavel, A., Varea, M., Olivera, S., González Asún, V., Castillo, F.J., Rubio, M.C., Gómez Lus, R. 2001. Evaluación de un test de inmunocromatografía (Crypto-Strip) para la detección de *Cryptosporidium parvum* en muestras fecales. *Acta Parasitol. Portuguesa.* 8: 2.
- Majewska, A.C., Werner, A., Sulima, P., Luty, T. 2000. Prevalence in sheep and goats bred on five farms in west-central region of Poland. *Vet. Parasitol.* 89: 269-275.
- Mason, R.W., Hartley, W.J., Til, L. 1981. Intestinal cryptosporidiosis in a kid goat. *Aust. Vet. J.* 57: 386-388.
- Matos-Fernández, M.J., Pereira-Bueno, J., Ortega-Mora, L.M., Pilar-Izquierdo, M., Ferre, I., Rojo Váz-

- quez, F.A. 1993. Prevalencia de la infección por *Cryptosporidium parvum* en corderos, cabritos y terneros en la provincia de León. Acta Parasitol. Portuguesa.1: 211.
- Muñoz-Fernández, 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.
- Noordeen, F., Maizal, A.C.M., Rajapakse, R.P.V.J., Horadagoda, U.N., Arulkanthan, A. 2001. Excretion of *Cryptosporidium* oocysts by goats in relation to age and season in dry zone of Sri Lanka. Vet. Parasitol. 99: 79-85.
- Rodríguez Osorio, M., Gómez García, V., Benito, R., Gil, J., 2003. *Trichinella britovi* human infection in Spain: Antibody response to surface, excretory/secretory and somatic antigens. Parasite, 10, 159-164.
- Rodríguez-Salinas, Pérez, E., Aragón-Peña, A.J., Allue Tango, M., López Pérez, M., Jiménez Maldonado, M., Domínguez Rodríguez, M.J., 2000. Brote de Crisptosporidiosis en Guadarrama. Rev. Esp. Salud Pública, 74: 527-536.
- Rojo Vázquez, F., Gass, A., Alunda, J.M. 1985. Denuncia en España de la criptosporidiosis ovina. IV Congreso Nacional de Parasitología. Tenerife, p. 166.
- Rojo Vázquez, F., Gass, A., Izquierdo, M., Ortiz Menéndez, J.C. 1987. Estudio de la criptosporidiosis de los pequeños rumiantes (ovinos y caprinos) en España. Med. Vet. 4: 263-270.
- Tzipori, S. 1998. Cryptosporidiosis: laboratory investigations and chemotherapy. In: Baker, J.R., Muller, R., Rollinson, D. (Eds), Opportunistic Protozoa in Humans. Adv. Parasitol. Academic Press. San Diego. AC. USA. 40: 187-221.
- Widmer, G. 1998. Genetic heterogeneity and PCR detection of *Cryptosporidium parvum*. Adv. Parasitol. 40: 223-239.

