



# Detección y caracterización molecular de *Cryptosporidium* spp. en terneros de lechería de la provincia de Valdivia, Chile

Javier Painean P<sup>1</sup> ; Eduardo Raffo C<sup>2</sup> ; Ruben Mercado<sup>3</sup> ;  
Sebastian Peña F<sup>3</sup> ; Pamela Muñoz A<sup>1\*</sup> .

<sup>1</sup>Universidad de Austral, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Patología Animal, Unidad Docente de Parasitología Veterinaria, Valdivia, Chile.

<sup>2</sup>Recursos Naturales Renovables, Servicio Agrícola y Ganadero, Valdivia, Chile.

<sup>3</sup>Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Unidad Docente de Parasitología, Santiago, Chile.

\*Correspondencia: [pamela.munoz@uach.cl](mailto:pamela.munoz@uach.cl)

Recibido: Septiembre 2020; Aceptado: Junio 2021; Publicado: Diciembre 2021.

## RESUMEN

**Objetivo.** Detectar ooquistes ácido-alcohol resistentes de *Cryptosporidium* spp. en terneros mediante tinción Ziehl-Neelsen (ZN) y caracterizar molecularmente las especies y subtipos presentes en la provincia de Valdivia, a través del uso de herramientas moleculares con los genes 18S *rARN* y *gp60* que codifica una glicoproteína de 60 kDa. **Materiales y métodos.** 275 muestras de heces de terneros pertenecientes a 15 predios lecheros de la provincia de Valdivia, fueron analizadas mediante tinción de ZN. Las muestras positivas a ZN, se analizaron por PCR mediante la amplificación de una región de los genes 18S *rARN* y *gp60*, con posterior secuenciación. **Resultados.** 30 muestras resultaron positivas a ZN, de las cuales el 46.6% (14/30) logró ser confirmado mediante PCR para 18S *rARN* y de estas, el 42.8% (6/14) fueron positivas a la PCR para *gp60*. La secuenciación arrojó la presencia de *C. parvum* en el 100% de las muestras y los subtipos IIaA15G2R1 (3/6), IIaA14G1R1 (2/6) y IIaA17G1R1 (1/6). **Conclusiones.** El subtipo IIaA15G2R1 predominó, encontrándose en dos comunas de la provincia. El subtipo IIaA14G1R1 fue encontrado en dos predios de una misma comuna y su hallazgo es el primero en bovinos en Chile y el continente. Finalmente, el subtipo IIaA17G2R1 ha sido encontrado esporádicamente en terneros, al igual que en esta investigación. Las tres variantes han sido reportadas en humanos, sin embargo, no hay registros de estudios que caractericen los subtipos de *C. parvum* en sistemas de crianza de terneros y trabajadores simultáneamente en Chile, por consiguiente, se debe indagar en el tema.

**Palabras clave:** Apicomplexa; terneros; *Cryptosporidium parvum*; reacción en cadena de la polimerasa (Fuentes: MeSH, USDA).

## ABSTRACT

**Objective.** Detect acid-fast oocysts of *Cryptosporidium* spp. using the Ziehl-Neelsen stain (ZN) and apply molecular tools with the 18S *rARN* (18S *rARN*) and 60 kDa glycoprotein (*gp60*) genes to characterize the species and subtypes present in Valdivia province. **Material and methods.**

### Como citar (Vancouver).

Painean J, Raffo E, Mercado R, Peña S, Muñoz P. Detección y caracterización molecular de *Cryptosporidium* spp. en terneros de lechería de la provincia de Valdivia, Chile. Rev MVZ Córdoba. 2022; 27(1):e2197. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2197>



©El (los) autor (es) 2021. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

275 samples of calves from 15 dairy farms from the Valdivia province were analyzed by ZN stain. Samples that showed positive results to ZN were then submitted to PCR processing aiming as target the 18S rARN and gp60 genes, with subsequent sequencing of the latter. **Results.** 30 samples were positive to ZN, of which 46.6% (14/30) were confirmed by PCR amplification for 18S rARN and from those, 42.8% (6/14) also amplified the gp60 target using PCR. Posterior sequencing of this gene showed the presence of *C. parvum* in 100% of the isolates and the subtypes IIaA15G2R1 (3/6), IIaA14G1R1 (2/6) and IIaA17G1R1 (1/6). **Conclusions.** Subtype IIaA15G2R1 was predominant, being found within two communes of the province. The subtype IIaA14G1R1 was found in two farms belonging to the same commune and to our knowledge represents the first time this subtype has ever been reported in cattle in Chile and the continent. Finally, subtype IIaA17G2R1 has been found sporadically in calves just like in the present study. Furthermore, all three variants have already been reported infecting humans, however during the development of this study, we found no other records of studies that aimed the characterization of the subtypes of *C. parvum* from calves raising systems and workers, to have ever been conducted in Chile. Therefore, it is important to promote further investigation on this subject.

**Keywords:** Apicomplexa; calves; *Cryptosporidium parvum*; polymerase chain reaction (Source: MeSH, USDA).

## INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento del género *Cryptosporidium* por Ernest Tyzzer en 1910, se ha considerado a este parásito como un agente protozoario de importancia para la medicina veterinaria, por sobre la medicina humana (1). El género *Cryptosporidium* posee una distribución mundial, afectando a un amplio rango de animales, entre ellos los mamíferos destacando los bovinos, los cuales son afectados comúnmente por cuatro especies, *C. andersoni*, *C. ryanae*, *C. bovis* y *C. parvum*, donde las tres últimas son consideradas potencialmente zoonóticas y *C. parvum* específicamente, una especie altamente prevalente en predios de lechería (2,3).

La infección y la cryptosporidiosis como tal, producida por *C. parvum* en rebaños lecheros, afecta principalmente al grupo etario más bajo (0–21 días de edad), con una alta morbilidad y mortalidad, ésta última de forma ocasional, lo que genera problemas productivos-económicos y sanitarios para el ganado (4). Las formas infectantes (ooquistes esporulados) de este agente protozoario se encuentran presentes en el suelo, alimentos y agua de bebida que han sido contaminados con material fecal de animales infectados, los cuales son consumidos posteriormente por un hospedero susceptible. Por otra parte, la cryptosporidiosis es considerada un problema de salud pública, donde personas relacionadas con el ámbito ganadero (productores, médicos veterinarios y trabajadores agrícolas) pueden ser infectados por medio del contacto directo con animales parasitados o material fecal de éstos, al

momento de su manejo sin tomar las medidas de bioseguridad e higiene (4).

Actualmente, los métodos de diagnóstico clínico rutinario para la detección *C. parvum* son insuficientes para esclarecer la posible ruta de transmisión utilizada por este agente en un brote de la enfermedad (5). Por lo anterior, es que la epidemiología molecular de *C. parvum*, puede desempeñar un papel importante en el estudio de la cryptosporidiosis bovina, desarrollándose a lo largo del tiempo herramientas de genómica y biología molecular que han permitido responder las incógnitas de la enfermedad (6). Técnicas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus variaciones, y la secuenciación de los productos obtenidos a partir de genes como el gen 18S rARN y el gen gp60 que codifica la glicoproteína de 60 kDa (gp60), permiten genotipificar y subtipificar a los integrantes del género *Cryptosporidium*, dilucidando componentes epidemiológicos importantes en cuanto a su fuente de origen y vías de transmisión utilizadas (6,7).

En Chile, pocos estudios han logrado caracterizar molecularmente las especies y subtipos del género *Cryptosporidium* presentes en rebaños lecheros de la zona sur, con el propósito de conocer en parte la epidemiología de la cryptosporidiosis bovina en el ámbito local. Por lo anterior se establece como objetivo detectar ooquistes ácido-alcohol resistentes, pertenecientes al género *Cryptosporidium* en bovinos de lechería de la provincia de Valdivia, determinando además las especies y subtipos involucrados.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Recolección de muestras.** Se visitaron 15 predios del rubro lechero ubicados en la provincia de Valdivia (Región de Los Ríos, Chile) entre los meses de mayo 2015 y abril 2017. Las muestras se obtuvieron por palpación rectal a terneros menores de 2 meses que evidenciaban signología diarreica. Las heces fueron preservadas en etanol al 70%, manteniéndose a temperatura de refrigeración (4-6°C) (8). Los predios muestreados se les designó un código correspondiente a la comuna de origen (Mr: Mariquina; Mf: Máfil; Pl: Paillaco; LL: Los Lagos; V: Valdivia).

**Recuperación de ooquistes, tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) y determinación cualitativa de la intensidad de infección por *Cryptosporidium* sp.** Se realizó el pesaje de 5 gr de muestra de material fecal, los cuales fueron tamizados con la ayuda de una rejilla metálica de un poro aproximado de 36 µm, con el objetivo de separar el material grosero del resto de la deposición. Lo resultante del tamizaje fue introducido en un vaso precipitado de 250 mL de capacidad y se dejó sedimentar por un tiempo de 15 minutos. Luego, trascurrido dicho tiempo se eliminó el sobrenadante y el sedimento obtenido fue depositado en un tubo de vidrio adicionándole 1 mL de éter de petróleo. Esta mezcla se homogenizó para centrifugarse a 216 xg por 5 minutos con el objetivo de recuperar y concentrar los ooquistes presentes.

El producto fue sometido a la tinción de ZN según lo descrito por Muñoz et al (9,10). Posteriormente, se determinó la intensidad de infección a través de la observación de 10 campos de 1000X escogidos al azar basándose en el siguiente criterio propuesto por Muñoz et al (10): Muy baja: 1-3 ooquistes por campo, Baja (++) : 4-10 ooquistes por campo, Intermedia (+++) : 11-20 ooquistes por campo, Alta (++++): más de 20 ooquistes por campo. Se aplicó dicha clasificación después de calcular el promedio de los ooquistes de *Cryptosporidium* sp. observados en los 10 campos. Todas las muestras positivas, fueron almacenadas en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL con etanol al 70% a temperatura de congelación de -80°C, según lo sugerido por Lalonde y Gajadhar (8).

**Extracción de ADN.** Los tubos con muestra se descongelaron a temperatura ambiente y se tomaron 150 µL de esta para su extracción. Se utilizó un kit específico para material fecal

(Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Microprep, Zymo Research®, Irvine, California). El ADN obtenido fue cuantificado por espectrofotometría y guardado a -80°C hasta su posterior análisis molecular.

**Amplificación de gen 18S rARN y gen endogeno Citocromo b de bovino (*Cytb*) (housekeeping).** Para la amplificación del gen 18S rARN mediante la técnica de PCR convencional se utilizaron 49 µL de mezcla maestra (1 µL de cada primer a 20 ng/ µL, 5 µL de mezcla de dNTP 250 mM, 6 µL de MgCl 25 mM, 1 unidad de ADN Polimerasa Go Taq G2 Flexi, 10 µL de Buffer Green Go Taq Flexi y lo restante en agua libre de nucleasas) y 1 µL de ADN genómico de la muestra completando 50 µL totales. Los partidores empleados fueron género - específico para *Cryptosporidium* spp., forward 5'-GTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATC-3' y reverse 5'-CCTCCAATCTCTAGTTGGC-3' con un amplicón resultante de 522 pb (9). El ciclo de temperaturas estaba compuesto por una desnaturalización inicial realizada a 95°C por 5 minutos, luego 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, y 68°C durante 30 segundos. Después la mezcla se enfrió a 4°C, cargando 15 µL de producto de PCR en gel de agarosa al 2% (9).

Para el control de inhibición se utilizó un segmento del gen *Cytb*, donde la mezcla maestra presentaba la misma cantidad de cada componente que lo utilizado en la amplificación del gen 18S rARN. Los partidores empleados fueron, Citbf 5'-ATCATTTTGAGGTGCAACCG-3' y Citbr 5'-TCCTAACAGGTCAGGTGAGA-3', con un producto de PCR esperado de ~140 pb aproximadamente.

**Amplificación del gen *gp60* que codifica la glicoproteína de 60 kDa (*gp60*).** Posteriormente se llevó a cabo la amplificación mediante PCR convencional del gen *gp60* en las muestras positivas al gen 18S rARN, utilizando 47.5 µL de mezcla maestra (1 µL de cada primer a 20 ng/µL, 5 µL de mezcla de dNTP 250 mM, 6 µL de MgCl 25 mM, 1 unidad de ADN Polimerasa Go Taq G2 Flexi, 10 µL de Buffer Green Go Taq Flexi y lo restante en agua libre de nucleasas) y 2.5 µL de ADN templado completando 50 µL totales. Esto se realizó con el objetivo de identificar el subtipo correspondiente (5, 11), ocupando los partidores: forward gp15-ATG 5'-ATGAGATTGTCGCTCATTATC-3' y reverse gp15-STOP 5'-TTACAACACGAATAAGGCTGC-3. Como resultado de esto, se obtuvo un producto

de PCR de 1000 pb en el gel de agarosa. El protocolo de ciclos para la amplificación incluyó 35 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos, y 68°C durante 1 minuto. Se programó una temperatura de mantención de 14°C (11). Los productos de PCR (15 µL) obtenidos se separaron en un gel de agarosa al 2%.

**Purificación de productos de PCR, secuenciación y análisis filogenético.** Los amplicones fueron seleccionados y extraídos directamente de gel de agarosa al 2% para ser sometidas a purificación mediante un kit para esa matriz de muestra (Promega®, Madison, Wisconsin). Como resultado se obtuvieron aproximadamente 50 µL de ADN eluido purificado, del cual se extrajeron 2 µL para su cuantificación mediante espectrofotometría UV-VIS de barrido espectral.

La secuenciación fue por el método di-deoxiterminal. El análisis de las secuencias obtenidas y filogenia, se realizó a través de los softwares Chromas Pro2.1.5. (Technelysium®, South Brisbane, Australia) y MEGA7. La subtipificación se llevo a cabo según lo descrito por Sulaiman et al (12).

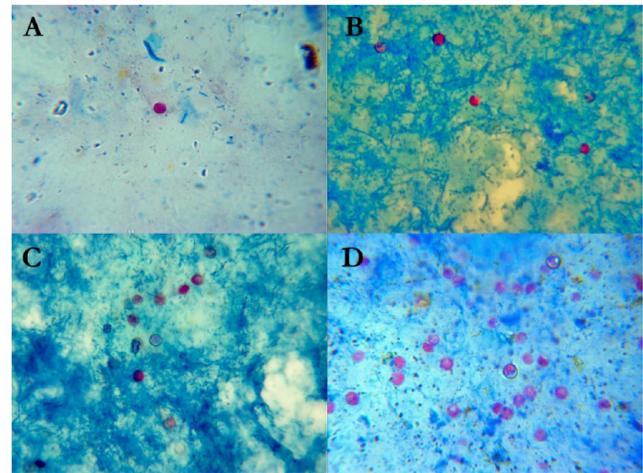
Los métodos Neighbor-Joining y Maximum Likelihood fueron los utilizados, aplicando 1000 replicaciones para cada construcción filogenética. Se ocuparon 22 secuencias del gen *gp60* descritas en bovinos por diferentes autores alrededor del mundo, 2 outgroups (*C. meleagridis* y *C. hominis*) y las secuencias obtenidas en este estudio.

## RESULTADOS

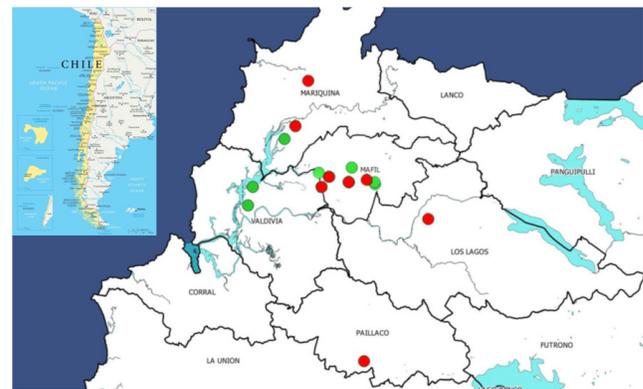
Del total de 275 muestras fecales diarreas de terneros provenientes de los 15 predios lecheros analizadas, un 11% (30/275) se observó al menos un ooquiste de *Cryptosporidium* spp., donde el 50% (15/30) presentó una intensidad de infección muy baja (+), el 36.6% (11/30) baja (++), un 6.7% (2/30) intermedia (+++), y por último otro 6.7% (2/30) intensidad alta (++++). (Figura 1).

La comuna de Paillaco presentó la mayor cantidad de muestras con una intensidad muy baja de ooquistes, no así la comuna de Valdivia, en la cual no se evidenció la presencia del agente. Muestras con intensidad intermedia sólo fueron

observadas en predio de la comuna de Paillaco, mientras que muestras con intensidad alta se presentaron en las comunas de Mariquina y Máfil. Para el caso de los predios de las comunas de Paillaco y Los Lagos, se observaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en un único predio, en cambio en Mariquina y Máfil, el 66.6% (2/3) y 50% (4/8) de los predios de cada comuna respectivamente se vieron afectados por este parásito (Tabla 1 y Figura 2).



**Figura 1.** Campos de observación de 1000x, donde se observan diferentes intensidades de infección, según la cantidad de ooquistes ácido-alcohol resistentes de *Cryptosporidium* spp. (A= intensidad muy baja, B= intensidad baja, C= intensidad intermedia y D= intensidad alta).



**Figura 2.** Mapa que indica los predios muestreados (n= 15) y la presencia de *Cryptosporidium* spp. en cada uno de ellos. Los círculos color "verde" indican la ausencia del parásito en el predio indicado y los círculos color "rojo" representan la presencia de este (Elaborado en QGIS 2.18).

**Tabla 1.** Tabla de frecuencia de muestras según comuna, predio e intensidad de infección de *Cryptosporidium* spp., en muestras de material fecal provenientes de terneros que pertenecen a predios lecheros de la Provincia de Valdivia entre los años 2015 – 2017.

Cod	Ausente	Intensidad de infección			
		+	++	+++	++++
<b>Mariquina</b>	<b>40</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
Mr1 (19)	17	2	0	0	0
Mr2 (7)	7	0	0	0	0
Mr3 (17)	16	0	0	0	0
<b>Máfil</b>	<b>132</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
Mf1 (22)	22	0	0	0	0
Mf2 (6)	6	0	0	0	0
Mf3 (51)	51	0	0	0	0
Mf4 (8)	8	0	0	0	0
Mf5 (25)	24	1	0	0	0
Mf6 (7)	4	2	1	0	0
Mf7 (8)	7	0	1	0	0
Mf8 (14)	10	0	3	0	1
<b>Paillaco</b>	<b>25</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
PI1 (39)	25	7	5	2	0
<b>Los Lagos</b>	<b>24</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
LI1 (28)	24	3	1	0	0
<b>Valdivia</b>	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
V1 (7)	7	0	0	0	0
V2 (17)	17	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>245</b>	<b>15</b>	<b>11</b>	<b>2</b>	<b>2</b>

Cod: ComunaCod. (número de predios)

El resultado del proceso de extracción fue cuantificado, arrojando la presencia de ADN en todas las muestras. Se realizó PCR a las muestras positivas a la tinción de ZN, de las cuales el 46.6% (14/30) lograron generar el producto de PCR esperado para el gen 18S *rARN* (Figura 3).

Las muestras que no evidenciaron el producto de PCR esperado a la amplificación del gen 18S *rARN*, se sometieron a un control de inhibición mediante un PCR convencional para el gen endógeno *Cytb*, en donde se dilucidó que el 75% (12/16) de éstas, fueron inhibidas al momento de realizar la técnica para el gen antes mencionado (Figura 4).

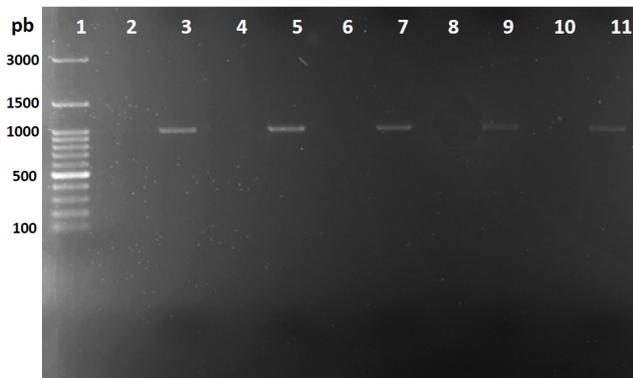


**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa 2%. PCR para gen 18S *rARN* de muestras positivas a *Cryptosporidium* spp. por ZN. Carril 1. Marcador de peso molecular de 100 pb; Carril 2. Control negativo correspondiente a "mastermix" sin ADN; Carril 3. Control positivo correspondiente a muestra de *C. parvum* confirmada por secuenciación previa; Carriles 4-12. Muestras positivas a ZN; Carril 13. Control negativo correspondiente a "mastermix" sin ADN. Carriles del 5 al 8, 10 y 11 corresponde a muestras positivas.



**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa 2%, PCR para gen *Cytb* ("housekeeping") en muestras negativas a gen 18S *rARN*. Carril 1 contiene un marcador de peso molecular de 100 pb; Carril 2 Control negativo correspondiente a "mastermix" sin ADN; Carriles 3 al 18 contiene muestras negativas a la ronda de PCR para el gen 18S *rARN*; Carril 19 posee control negativo correspondiente a "mastermix" sin ADN. Los carriles 7, 14, 15 y 17 contienen muestras positivas a la amplificación del gen *Cytb*.

Las muestras que generaron un producto de PCR para el gen *18S rARN*, fueron sometidas a una segunda amplificación, pero esta vez dirigida al gen *gp60*. El 42.8% (6/14) de las muestras, generaron el amplicón esperado (Figura 5).

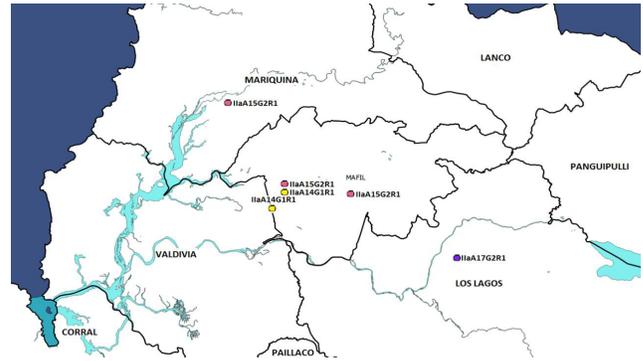


**Figura 5.** Electroforesis en gel de agarosa 2%, ronda PCR para gen *gp60* de muestras positivas al gen *18S rARN* de *Cryptosporidium* spp. El carril 1 contiene un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb), el carril 2 contiene control negativo correspondiente a "mastermix" sin ADN, el carril 3, 5, 7, 9 y 11 contienen muestras positivas a la amplificación del gen *gp60*, y por último los carriles 4, 6, 8 y 10 se encuentran vacíos.

Todas las muestras que evidenciaron la presencia de ADN del parásito en la PCR para ambos genes diana, se purificaron y cuantificó el material genético presente. En dicho proceso, tres muestras de producto de PCR del gen *18S rARN*, no arrojaron resultados concluyentes al momento de la secuenciación, por lo tanto, sólo el 78.5% (11/14) terminaron exitosamente el proceso.

Las secuencias alineadas mostraron entre un 99–100% de identidad con otras secuencias de *Cryptosporidium*, específicamente con la especie *C. parvum*, con un "e-value" igual a 0.00. Por otro lado, como resultado de la subtificación por medio del segmento del gen *gp60*, se obtuvieron

los subtipos IIa A15G2R1 (3/6), IIa A14G1R1 (2/6) y IIa A17G2R1 (1/6) (Figura 6, Tabla 2).

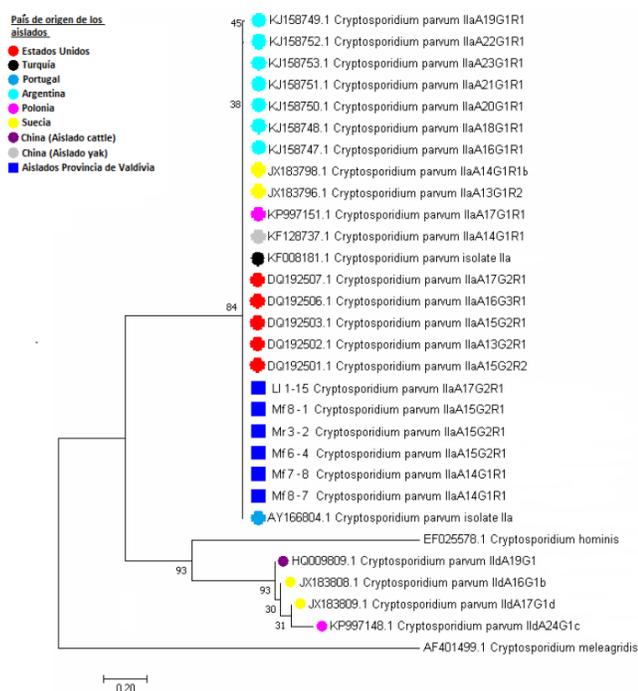


**Figura 6.** Mapa provincia de Valdivia, que ilustra la distribución geográfica de los subtipos de *Cryptosporidium parvum* encontrados en los predios lecheros muestreados. Óvalos de color rosado, corresponden a subtipo IIaA15G2R1, óvalos color amarillo a IIaA14G1R1 y óvalo color lila, son indicativos de la presencia del subtipo IIaA17G2R1 (Elaborado en QGIS 2.18).

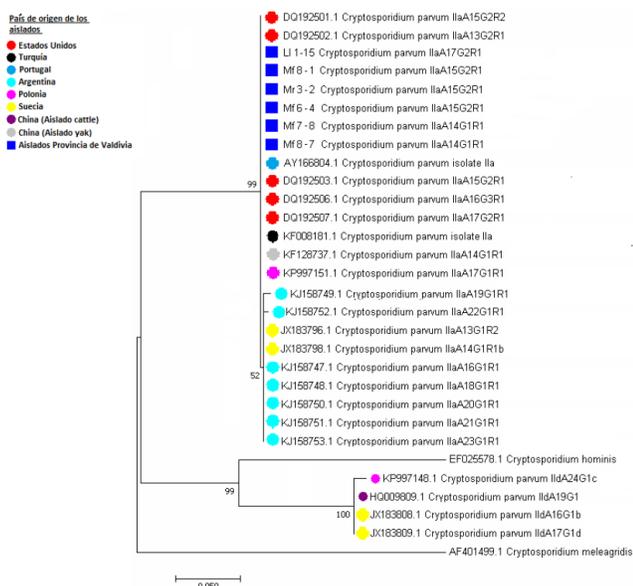
Las secuencias obtenidas en el actual estudio agruparon con el resto de las secuencias de la familia alélica IIa de origen bovino y de yak (*Bos grunniens*), animal miembro de la familia Bovidae y habitante de los Himalayas. El clado que agrupa los parásitos obtenidos en la provincia de Valdivia, fue apoyado por un valor de bootstrap del 84% en el método de Neighbor-Joining y del 99% en el método de Maximum Likelihood. En ambos árboles generados, las secuencias obtenidas se encuentran alejadas de los subtipos pertenecientes a la familia alélica IIId (Figura 7 y 8). Mediante el análisis realizado a través del método Maximum Likelihood, se dividen en dos clados las secuencias de *C. parvum* IIa obtenidas (bootstrap 99%), donde las provenientes de Argentina y Suecia se agrupan en un clado respaldado por un bootstrap del 52%. De igual forma, topográficamente ambos análisis filogenéticos son similares.

**Tabla 2.** Tabla de resultados obtenidos según análisis: Ziehl-Neelsen (ZN), PCR gen *18S rARN*, *gp60* y secuenciación de segmento *gp60* amplificado (N= 275).

N	ZN (Muestras +/-total analizadas)	18S rARN (+/-total muestras analizadas)	gp60 (+/-total muestras analizadas)	Secuenciación gen gp60 (cantidad de muestras)
275	30/275	14/30	6/14	<i>C. parvum</i> IIaA15G2R1 (3) <i>C. parvum</i> IIaA14G1R1 (2) <i>C. parvum</i> IIaA17G2R1 (1)



**Figura 7.** Análisis filogenético a través del método Neighbor-Joining, entre secuencias de nucleótidos del gen *gp60* de *Cryptosporidium parvum* proveniente de bovinos de diferentes partes del mundo (GenBank) y del presente estudio.



**Figura 8.** Análisis filogenético a través del método de Maximum Likelihood, basado en el modelo Kimura de 2-parámetros, entre secuencias de nucleótidos del gen *gp60* de *Cryptosporidium parvum* proveniente de bovinos de diferentes partes del mundo (GenBank) y del presente estudio.

## DISCUSIÓN

El porcentaje de muestras de animales diarreicos, positivos a *Cryptosporidium* sp. en este estudio mediante la tinción de ZN (11%, 30/275), fue menor a los descrito por otros estudios en el ámbito nacional (9, 10), en donde se obtuvo entre 49.8% y 57.9% de animales parasitados de un total de 205 y 221 terneros de lecherías de la Región Metropolitana y Los Ríos, respectivamente. La diferencia observada se puede deber a que productores y médicos veterinarios asesores de los predios muestreados en este estudio, han implementado medidas de control y prevención de cuadros diarreicos en terneros, como por ejemplo la separación temprana de la madre, el consumo de calostro garantizado por parte del recién nacido, la permanencia de terneros neonatos en jaulas individuales, el establecimiento de un numerado adecuado de animales por jaula colectiva evitando hacinamiento y la disponibilidad de principios activos farmacológicos (halofuginona) indicados para el tratamiento de la criptosporidiosis bovina, han colaborado de forma directa e indirecta a disminuir la trasmisión de este protozoo entre individuos del mismo recinto predial. Por otro lado, las causas de diarrea neonatal en terneros son variadas y pueden sufrir variaciones que dependen de la ubicación geográfica del predio, el tamaño del rebaño y manejo de éste, lo que conlleva a que agentes bacterianos, virales y/o parasitarios (*Eimeria* sp. por ejemplo) sean más prevalente en un área que en otra (13). Por lo tanto, se presume que animales con muestras diarreicas negativas a ZN puedan estar siendo afectados por otro agente infeccioso diferente a *Cryptosporidium* sp. o por causas no infecciosas, las cuales no fueron evaluadas en la presente investigación.

Del punto de vista analítico la sensibilidad de la tinción de ZN es variable, ya que se ha establecido como limite inferior de detección 8 y 22813 ooquistes/mL, en agua destilada inoculada artificialmente con ooquistes de *Cryptosporidium* sp. y material fecal de terneras diarreicas respectivamente (9, 14). Con base en lo anterior, la alta proporción de individuos con cargas muy baja (50%) y baja (36.6%) presente pudo no haber sido detectada generando la aparición de falsos negativos.

Mediante la amplificación de un segmento del gen 18S *rARN*, fue posible confirmar en un 46.6% (14/30) de las muestras positivas a ZN, la presencia de material genético correspondiente a

*Cryptosporidium*. Por lo tanto, el 53.4% (16/30) restante no generó el producto de PCR esperado. Una situación similar se observó en el estudio realizado por Ghaffari et al (15), quien también presentó una inhibición de la PCR en el 41.1% (14/34) de las muestras sometidas inicialmente a la técnica de Auramina Fenol y posteriormente a PCR 18S *rARN*. Lo anterior, puede deberse a una degradación o bajas concentraciones de ADN del parásito en la muestra o a la inhibición de la PCR, ocasionada por la presencia de altas concentraciones de inhibidores orgánicos (sales biliares) o inorgánicos, como por ejemplo calcio y ácido fítico, siendo este último uno de los más importantes en este aspecto, ya que es un componente natural de semillas de cereales y oleaginosas de consumo animal, manteniendo niveles constantes de este ácido a nivel gastrointestinal (16, 17). Esto indica la importancia de la naturaleza de la muestra al momento de extraer el ADN, donde la presencia de inhibidores puede sesgar los resultados y provocar la aparición de falsos negativos.

Para establecer la presencia de inhibidores de la PCR se realizó la amplificación de un segmento del gen *Cytb*, en el cual se evidenció que el 75% (12/16) de las muestras negativas a la PCR del gen 18S *rARN* sufrió inhibición de la reacción. A su vez, se observó que las muestras que no fueron inhibidas en la PCR gen *Cytb* (25%; 4/16) poseían intensidades de infección muy bajas o bajas, por consiguiente, se infiere que la cantidad de ooquistes/mL material fecal contenidos en las muestras, posiblemente no fueron suficientes para ser detectado su material genético en la primera reacción (PCR gen 18S *rARN*). Lo anterior, fue comprobado por Muñoz et al (9), quien determinó que el límite de detección de esta técnica molecular es de aproximadamente 11406 ooquistes/mL de heces terneros diarreicos. Por lo tanto, se presume que las muestras tratadas en el presente estudio evidenciaban una cantidad menor al límite de detección descrito.

De acuerdo con los resultados obtenidos por PCR para el gen 18S *rARN*, el 46.6% (14/30) amplificó el segmento del gen. Solo en 11 muestras se logró mediante secuenciación y alineamiento determinar que se trataba de una infección monoespecífica por la especie *C. parvum*. Esto coincide con otros estudios realizados en terneros pre-destete de diferentes partes del mundo, que catalogan a la especie *C. parvum* como la predominante del género en esta etapa etaria (3). En Estonia, un estudio

realizado por Santoro et al (18) determinó prevalencias de un 95.5% de un total de 224 muestras positivas a *C. parvum*, donde el 3.6% y 0.9% restante correspondieron a *C. bovis* y *C. ryanae* respectivamente. Kváč et al (19) en República Checa, también evidenciaron una alta prevalencia de un 87.2% (159/182) de *C. parvum* en terneros de hasta 2 meses de edad. Cabe mencionar, que en ambos estudios se utilizó un segmento del gen 18S *rARN* como gen diana al igual que la presente investigación. Por otra parte, la presencia única de *C. parvum* en los individuos estudiados, se vio influenciado principalmente por la edad de éstos, ya que las especies *C. ryanae*, *C. bovis* y *C. andersoni* son comunes en animales de grupos etarios superiores (3,20).

Sólo seis muestras amplificaron el producto de PCR para *gp60*, correspondiente al 42.8% de las muestras positivas al gen 18S *rARN* (6/14), evidenciándose una discrepancia en la cantidad de muestras que generaron un producto de PCR para ambos marcadores moleculares. Esta diferencia también se ha presentado en otros estudios (21), la cual está relacionada con el intercambio de genes que puede ocurrir durante la fase de gametogonia (reproducción sexual) entre diferentes poblaciones de *C. parvum* presentes dentro de un mismo hospedador, pudiendo generar recombinaciones genéticas en su secuencia génica (22).

Con la subtipificación de *C. parvum* a través del gen *gp60*, se determinó que todos los subtipos encontrados pertenecieron a la familia alélica IIa, distribuidos en tres comunas de la provincia de Valdivia. Esta familia, está ampliamente identificada a nivel mundial, tanto en bovinos como en humanos, debido a su carácter zoonótico (23,24). El subtipo IIaA15G2R1 fue encontrado en 3/6 muestras provenientes de tres granjas ubicadas en dos comunas diferentes (Mariquina y Mafil), en cambio los subtipos IIaA14G1R1 (2/6) y IIaA17G2R1 (1/6), se encontraron en una sola comuna, Mafil y Los Lagos respectivamente. Esta variación de distribución regional o nacional de los subtipos ha sido analizada anteriormente, este es el caso de Ng et al (25), quienes describieron la distribución de los subtipos de *C. parvum* en Australia, donde se estudiaron seis granjas lecheras pertenecientes a dos estados (Oeste de Australia y Nueva Gales del Sur), la variante IIaA17G2R1 fue ubicada ampliamente en la única granja estudiada del estado de Nueva Gales del Sur en 16 individuos, en cambio en la granjas del Oeste de Australia, solo se encontró en un

aislado. El subtipo IIaA15G2R1 encontrado en el presente estudio, es el más prevalente en el ámbito mundial en terneros de sistemas productivos lecheros (5,19,26,27), el cual fue observado en tres predios diferentes. El subtipo IIaA17G2R1 aislado, ha sido descrito en forma esporádica (25), por lo que se puede concluir que este subtipo juega un rol minoritario en la etiología de la criptosporidiosis bovina. Por último, el subtipo IIaA14G1R1 observado en dos oportunidades (2/6) no ha sido reportado en mamíferos de América, incluyendo bovinos domésticos. Aquel, sólo ha sido diagnosticado en terneros de sistemas productivos lecheros en Suecia (28), además de otro reporte aislado emitido por Mi et al (29) en China, quienes encontraron este subtipo en yak (*Bos grunniens*), especie bovina salvaje habitante de los Himalayas que fue domesticada para la producción de leche, lana, carne y hueso.

Tanto las variantes IIaA15G2R1 y IIaA14G1R1 de *C. parvum*, fueron localizadas simultáneamente en dos predios pertenecientes a la comuna de Máfil (Figura 6). Resultado relacionado con la dinámica de transmisión, que a su vez está fuertemente arraigada a las condiciones geográficas del área de estudio, donde los cuerpos de agua presentes pertenecen a la cuenca del río Valdivia, originando fuentes de agua superficiales de menor envergadura (riachuelos, esteros y entre otros) que bañan a los predios ganaderos presentes en la comuna, formando una amplia red hidrográfica. Esto, conjugado con el manejo de purines llevado cabo por las actividades agrícola-pecuarias, permite una comunicación microbiológica, debido a la contaminación de cuerpos de aguas superficiales e incluso subterráneas (30). El transporte mediante cursos de agua superficiales es útil para formas infectantes de *Cryptosporidium*, las cuales son resistentes a las condiciones dulceacuícolas de ríos (1). Otra forma de traslado de agentes microbiológicos como *Cryptosporidium*, es la introducción de animales de predios infectados a uno susceptible. Lo que implicaría que subtipos presentes en otros sistemas productivos locales, nacionales o extranjeros, puedan expandirse a otros rebaños libres de este agente parasitario. Sin embargo, los predios muestreados poseían sistemas cerrados de crianza, generando sus propios animales para reemplazos sin tener la necesidad de recurrir a la compra de animales. Por lo tanto, la detección de tres subtipos diferentes (IIaA15G2R1, IIaA14G1R1 y IIaA17G1R1) puede deberse a la segregación geográfica existente,

ocasionada por un reducido movimiento animal entre predios del área (31).

Es importante mencionar, que el hallazgo de dos subtipos de *C. parvum* (IIaA15G2R1 y IIaA14G1R1) en un mismo predio podría deberse a la presencia de una infección mixta dentro del rebaño muestreado, sin embargo, se ben realizar técnicas de clonamiento o secuenciación masiva (NGS) (11, 32, 33), para así identificar la heterogeneidad del gen *gp60* y la diversidad de subtipos de *C. parvum* presentes dentro de un mismo hospedero.

Por otra parte, las tres variantes de *C. parvum* encontradas han sido reportadas en humanos, postulándose una posible transmisión zoonótica. En primer lugar, el subtipo IIaA15G2R1, ha sido reportado por Raehmouni et al (27) en muestras de deposiciones tanto en seres humanos como en bovinos de granja pertenecientes a un sector rural de Túnez, colocando en evidencia un posible intercambio de este subtipo en las dos especies, lo cual también ha sido respaldado por otros autores con otros subtipos (23). En el caso del subtipo IIaA17G2R1 se ha comprobado epidemiológicamente su transmisión zoonótica en un brote ocurrido en un campamento de verano en Carolina del Norte (Estados Unidos), donde individuos se vieron infectados por la ingesta de alimentos y el estrecho contacto con individuos infectados, que estuvieron junto a terneros de crianza en el lugar (34). El subtipo IIaA14G1R1 ha sido diagnosticado en tres pacientes VIH positivo en Malasia y en un paciente inmunocompetente proveniente de Eslovaquia (35,36), no obstante, su potencial carácter zoonótico (25,26) o antropozoonótico (37) aún no está determinado debido a la escases de estudios que indiquen su presencia simultánea en humanos y animales domésticos de la misma área geográfica. En el presente estudio, se observó una carencia de normas de bioseguridad internas, tales como el no uso de guantes desechables al momento de manipular los animales, práctica que genera un alto riesgo de exposición de los trabajadores al agente.

En conclusión, a través de la tinción de ZN se logró detectar ooquistes de *Cryptosporidium* en un 11% (30/275) de las muestras pertenecientes a los predios georreferenciados de la provincia de Valdivia, colaborando con los estudios de epidemiológicos de este parásito y su distribución dentro de la provincia y en el ámbito nacional. La amplificación de los genes *18S rARN* y *gp60* de *Cryptosporidium* fue exitosa solo en el 46,6%

y 42,8% desde las muestras positivas a ZN y desde las muestras que generaron un producto de PCR para el gen 18S *rARN*, respectivamente, debido al uso genes polimórficos como gen diana (como el gen *gp60*) y a la recombinación genética que pueden realizar estos agentes, entre sus diferentes variantes o poblaciones (19, 32). Por otro lado, a través de la secuenciación, se logró el hallazgo de *C. parvum* y los subtipos IIaA15G2R1, IIaA17G2R1 y IIaA14G1R1. La descripción de un nuevo subtipo en Sudamérica (IIaA14G1R1) que afecta a los rebaños lecheros, marca un precedente para futuros estudios de esta índole que se desarrollen dentro o fuera del continente, en especies tanto domésticas

como silvestres, e incluso en seres humanos. Esto último, deja en evidencia la importancia de dilucidar la especie y más aún, los subtipos presentes dentro de un área determinada, ya que permite dilucidar el origen y la posible ruta de transmisión que ha tomado *Cryptosporidium* spp. o en su defecto *C. parvum*, ayudando a su vez en la instauración y creación de planes de contingencia en brotes de la enfermedad en sistemas de crianza bovina.

### Conflictos de interés

Ningún conflicto de interés fue reportado por los autores.

## REFERENCIAS

- Rossle N, Latif B. Cryptosporidiosis as threatening health problem: A review. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2013; 3(11):916-924. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60179-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60179-3)
- Cui Z, Wang R, Huang J, Wang H, Zhao J, Luo N, et al. Cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium parvum* subtype IIaA15G1 at a dairy farm in Northwestern China. *Parasit Vectors.* 2014; 7(529):1-4. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0529-z>
- Thomson S, Hamilton C, Hope J, Katzer F, Mabbott N, Morrison L, et al. 2017. Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. *Vet Res.* 2017; 48(42):1-16. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0447-0>
- Dixon B, Parrington L, Cook A, Pintar K, Pollari F, Kelton D, et al. The potential for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from beef and dairy cattle in Ontario, Canada. *Vet Parasitol.* 2011; 175(1-2):20-26. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.032>
- Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Exp Parasitol.* 2010; 124(1):80-89. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.018>
- Souza F, Peralta J, Saramago R. New insights the detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* with emphasis in Brazilian studies: a review. *Rev Inst Med Trop.* 2019; 61(28):1-12. <http://doi.org/10.1590/S1678-9946201961028>
- Khan A, Shaik J, Grigg M. Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. *Acta Trop.* 2018; 184:1-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.023>
- Lalonde L, Gajadhar A. Effect of storage, temperature, and time on preservation of *Cryptosporidium parvum* oocysts for PCR analysis. *Vet Parasitol.* 2009; 160(3-4):85-189. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.11.022>
- Muñoz P, Fredes F, Diaz-Lee A, Mercado R, Ozaki L. 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.* 2011; 43(2):111-116. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2011000200003>

10. Muñoz P, Mercado R, Morales G, Bravo V, Raffo E. *Cryptosporidium* spp., comparative diagnosis and geospatial distribution in diarrheic calves from dairy farms, Valdivia, Chile. *Rev MVZ Córdoba*. 2014; 19(1):3954-3961. <https://doi.org/10.21897/rmvz.115>
11. Mercado R, Peña S, Ozaki L, Fredes F, Godoy J. Multiple *Cryptosporidium parvum* subtypes detected in a unique isolate of a Chilean neonatal calf with diarrhea. *Parasitol Res*. 2015(5); 114:1985-1988. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4364-8>
12. Sulaiman I et al. Unique Endemicity of Cryptosporidiasis in Children in Kuwait. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(6):2805-2809. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.6.2805-2809.2005>
13. Cho Y, Yoon K. An overview of calf diarrhea infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J Vet Sci*. 2013; 15(1):1-17. <http://dx.doi.org/10.4142/jvs.2014.15.1.1>
14. Diaz-Lee A, Molina R, Dougnac C, Mercado R, Retamal P, Fredes F. Analytical sensitivity of staining and molecular techniques for the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts isolated from bovines in water samples: a preliminary study. *Arch Med Vet*. 2015; 47(1):91-96. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2015000100015>
15. Ghaffari S, Kalantari N, Hart C. A Multi-Locus Study for Detection of *Cryptosporidium* Species Isolated from Calves Population, Liverpool, UK. *Int J Mol Cell Med*. 2014; 3(1):35-42. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3927392/pdf/ijmcm-3-035.pdf>
16. Scharder C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*. 2012; 113(5): 1-13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
17. Thornton C, Passen S. Inhibition of PCR amplification by phytic acid, and treatment of bovine fecal specimens with phytase to reduce inhibition. *J Microbiol Meth*. 2004; 59(1):43-52. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.06.001>
18. Santoro A, Dorbek-Kolin E, Jeremejeva J, Tummler L, Orro T, Jokelainen P, et al. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* spp. in calves in Estonia: high prevalence of *Cryptosporidium parvum* shedding and 10 subtypes identified. *Parasitology*. 2018; 146(2):261-267. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001348>
19. Kváč M, Hromadová N, Kvetonová D, Rost M, Sak B. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. In pre-weaned dairy calves in the Czech Republic: Absence of *C. ryanae* and management-associated distribution of *C. andersoni*, *C. bovis* and *C. parvum* subtypes. *Vet Parasitol*. 2011; 177(3-4):378-382. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.048>
20. Aberg M, Emanuelson U, Troell K, Björkman C. Infection dynamics of *Cryptosporidium bovis* and *Cryptosporidium ryanae* in a Swedish dairy herd. *Vet Parasitol X*. 2019; 1:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.vpoa.2019.100010>
21. Heckler R, Lino D, Barbieri F, Vilalba M, Silva L, Lordelo J, et al. First genetic identification of *Cryptosporidium parvum* subtype IIaA14G2R1 in beef cattle in Brazil. *Prev Vet Med*. 2015; 121(3-4):391-394. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.08.016>
22. Avendaño C, Amaya A. Molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* GP60 subtypes worldwide. *Rev MVZ Córdoba*. 2017; 22(3):6339-6354. <http://dx.doi.org/10.21897/rmvz.1138>
23. Ng J, Eastwood K, Walker B, Durrheim D, Massey P, Porigneaux P, et al. Evidence of *Cryptosporidium* transmission between cattle and humans in northern New South Wales. *Exp Parasitol*. 2012; 130(4):437-441. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.01.014>
24. Kaupke A, Rzezutka A. Emergence of novel subtypes of *Cryptosporidium parvum* in calves in Poland. *Parasitol Res*. 2015; 114(12):4709-4716. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4719-1>

25. Ng J, Yang R, McCarthy S, Gordon C, Hijjawi N, Ryan U. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in pre-weaned calves in Western Australia and New South Wales. *Vet Parasitol.* 2011; 176(2-3):145–150. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.056>
26. Feng Y, Torres E, Li N, Wang L, Bowman D, Xiao L. Population genetic characterization of dominant *Cryptosporidium parvum* subtype IIaA15G2R1. *Int J Parasitol.* 2013; 43(14):1141–1147. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.09.002>
27. Raehmouni I, Essid R, Aoun K, Bouratbine A. Glycoprotein 60 diversity in *Cryptosporidium parvum* causing human and cattle Cryptosporidiosis in the rural region of Northern Tunisia. *Trop Med Hyg.* 2014; 90(2):346–350. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0522>
28. Silverlas C, Bosaeus-Reineck H, Näslund K, Björkman C. Is there a need for improved *Cryptosporidium* diagnostics in Swedish calves?. *Int J Parasitol.* 2013; 43(2):155–161. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.009>
29. Mi R, Wang X, Li C, Huang Y, Zhou P, Li Z, et al. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* in Yaks in Qinghai Province of China. *Plos One* 2013;8(9):1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074985>
30. Valenzuela E, Godoy R, Almonacid L, Barrientos M. Calidad microbiológica del agua de un área agrícola ganadera del centro sur de Chile y su posible implicancia en la salud humana. *Rev Chilena Infectol.* 2012; 29(6):628–634. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000700007>
31. Del Coco V, Córdoba M, Bilbao G, Almeida A, Basualdo J, Fayer R, et al. *Cryptosporidium parvum* GP60 subtypes in dairy cattle from Buenos Aires, Argentina. *Res Vet Sci.* 2014; 9(2):311–314. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.12.010>
32. Grinberg A, Widmer G. *Cryptosporidium* within – host genetic diversity: systematic bibliographical search and narrative overview. *Int J Parasitol.* 2016; 46(8):465–471. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.03.002>
33. Zahedi A, Gofton A, Jian F, Papparini A, Oskam C, Ball A, et al. Next Generation Sequencing uncovers within-host differences in the genetic diversity of *Cryptosporidium* gp60 subtypes. *Int J Parasitol.* 2017; 47(10-11):601–607. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.03.003>
34. Collier S, Smith S, Lowe A, Hawkins P, McFarland P, Salyers M, et al. Cryptosporidiosis outbreak at a summer camp North Carolina 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 60:918–922. <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm6027.pdf> \_
35. Iqbal A, Lim Y, Surin J, Sim B. High diversity of *Cryptosporidium* subgenotypes identified in Malaysian HIV/AIDS individuals targeting gp60 gene. *Plos One.* 2012; 7:1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031139>
36. Hatalová E, Valenčáková A, Luptáková L, Špalková M, Kalinová J, Halánová M, et al. The first report of animal genotypes of *Cryptosporidium parvum* in immunosuppressed and immunocompetent humans in Slovakia. *Transbound Emerg Dis.* 2019; 66:243–249. <https://doi.org/10.1111/tbed.13009>
37. Messenger A, Barnes A, Gray G. Reverse zoonotic transmission (Zooanthroponosis): A systematic review of seldom-documented human biological threats to animal. *Plos One.* 2014; 9(2):1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089055>