

P7. DINAMICA DE LA INFECCION DE TERNEROS CON CRYPTOSPORIDIUM PARVUM

Toledo J.¹, Tomazic M.L.¹, Lombardelli J.^{2,3}, Galarza R¹, Tiranti K.³, Garro C.J.¹, Florin-Christensen M.^{1,2,4} y Schnittger L.^{1,2,4}

¹Instituto Nacional de Tecnologías Agropecuaria (INTA),

²Consejo Nacional de Investigaciones y Científicas y Tecnológicas (CONICET)

³Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto

⁴Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad de Morón

Autor de correspondencia: schnittger.leonhard@inta.gov.ar

INTRODUCCION

Cryptosporidium sp. es un protozoo parásito que infecta a una gran variedad de vertebrados hospedadores. La especie *C. parvum* es el principal agente etiológico de la criptosporidiosis y representa una de las principales causas de diarrea neonatal bovina, además de ser potencialmente zoonótico. La vía de transmisión es fecal-oral, siendo el ooquiste, eliminado por las heces, el elemento infectante. El estudio longitudinal y la caracterización molecular permiten la evaluación de la dinámica de la infección, las causantes especies y subespecies, y su potencial zoonótico. En el presente trabajo se colectaron muestras fecales de terneros de un brote en un tambo durante diferentes etapas en sus primeros meses de vida con el objetivo de determinar la dinámica de infección y las especies y subtipos involucrados mediante técnicas moleculares.

MATERIAL Y METODOS:

Once terneros fueron muestreados cada dos semanas durante el primer mes y luego mensualmente hasta el décimo mes. Las muestras fueron diagnosticadas por microscopía utilizando la tinción de Ziehl-Neelsen modificada. De las muestras positivas se aislaron ooquistes mediante la técnica de flotación con sacarosa. Se realizó la ruptura de ooquistes mediante un procedimiento de lisis alcalina sumado a diez ciclos de congelado-descongelado. La extracción de ADN se realizó mediante el kit QIAamp DNA Stool (Qiagen). Para la determinación de la especie se utilizó la técnica de PCR-RFLP. Para ello se amplificó por PCR una región polimórfica del gen SSU rDNA con los primers P2Fy P2R¹. En los casos donde no se obtuvo amplificación por PCR convencional se realizó una PCR anidada (nPCR). En la primera amplificación, se utilizaron los primers P1Fy P1R¹ y en la segunda, se usaron P2F y P2R¹. Los amplicones finales fueron de aproximadamente 840 pb y fueron digeridos con las enzimas MbolI y SspI para detectar los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). El patrón de bandas fue visualizado por UV en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Para la subgenotipificación de *C. parvum* se amplificó la región polimórfica del gen GP60 utilizando los primers AL31F y AL35R². Los amplicones generados (aproximadamente 880 pb) fueron sometidos a secuenciación directa. Las secuencias nucleotídicas fueron editadas con el programa Vector NTI 8.0 para determinar el subtipo en base a la cantidad y tipo de repeticiones (TCA,TCG y ACATCA) de la región hipervariable. Adicionalmente, las secuencias nucleotídicas fueron alineadas con secuencias de referencia depositadas en la base de datos GenBank.

RESULTADOS:

El número de animales infectados comparado con los animales estudiados en cada período fue 10 de 11 (91%), 3 de 4 (75%), 8 de 11 (73%), 3 de 10 (30%), 0 de 7 (0%), 1 de 3 (33%), 2 de 7 (29%), 1 de 4 (25%), 1 de 6 (17%), 1 de 11 (9%) para la primera quincena, segunda quincena, segundo mes, tercer mes, cuarto mes, quinto mes, sexto mes, séptimo mes, noveno mes y décimo mes, respectivamente. Todos los terneros estuvieron infectados en al menos un periodo de determinación resultando en una tasa de infección acumulada de 100%. Todos los terneros comenzaron a excretar ooquistes entre el día 7 y el 13, a excepción de uno que comenzó el día 34. El pico máximo de excreción ocurrió entre el día 10 y el 16 correspondiendo con la edad de terneros determinado en un trabajo previo de nuestro grupo³. Se pudieron amplificar 21 de las 33 muestras diagnosticadas positivamente por microscopía (64%) y ninguna con un diagnóstico negativo. Todas las muestras amplificadas mostraron un patrón de bandas concordante con el de *C. parvum*⁴ y provenían de terneros del

primer mes de vida³ a excepción de una muestra perteneciente al segundo mes. Las nueve muestras diagnosticadas como positivas a *C. parvum*, pertenecientes a terneros diferentes, mostraron el subgenotipo IlaA20G1R1, indicando que se trata de un solo brote.

DISCUSION:

El elevado porcentaje de infección encontrado concuerda con la mayoría de los reportes en otras partes del mundo⁵, los cuales además establecen que la especie *C. parvum* es predominante en el primer mes de vida. Como en estudios anteriores de nuestro grupo de trabajo no se encontraron otras especies⁵. Si bien es posible que *C. parvum* sea la única especie infectante, los métodos de subgenotipificación basados en PCR tienden a ser insensibles a variantes minoritarias presentes en infecciones mixtas⁴. No obstante, es necesario continuar y profundizar los estudios, ya sea aumentando el número de terneros en estudio o bien mejorando la sensibilidad en la detección. Por otro lado, el subtipo encontrado, IlaA20G1R1, ha sido previamente reportado en humanos⁶, por lo cual se recomienda adoptar medidas preventivas al tomar contacto con terneros menores de un mes de vida, dada, además, la alta infección hallada.

Bibliografía

1. Xiao L et al. (1999). Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl Environ Microbiol.* 65: 1578-83.
2. Alves M et al. (2003). Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J Clin Microbiol.* 41: 2744-7.
3. Garro CJ et al (2016). Prevalence and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. oocysts in dairy calves of Buenos Aires province, Argentina. *Parasite Epidemiology and Control* 1: 36-41.
4. Tomazic ML, et al. (2013). Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from calves of Argentina. *Vet Parasitol.* 198: 382-86.
5. Rieux A et al. (2013). Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pre-weaned calves in western France in relation to age. *Vet Parasitol.* 197: 7-12.
4. Grinberg A, Widmer G. (2016). *Cryptosporidium* within-host genetic diversity: systematic bibliographical search and narrative overview. *Int J Parasitol.* 46: 465-7.
5. Zintl A et al (2011). Longitudinal and spatial distribution of GP60 subtypes in human cryptosporidiosis cases in Ireland. *Epidemiol Infect.* 139: 1945-55.

Financiamiento: FonCyt: PICT-2013-1708; INTA: PNSA-1115053; Fundación Universidad de Morón PID8-2015.