

Frecuencia e identificación molecular de *Cryptosporidium* spp en becerras lactantes mantenidas en confinamiento en Aguascalientes, México

Frequency and molecular identification of *Cryptosporidium* spp in confined suckling dairy calves in Aguascalientes, Mexico

César Castillo García^a, Carlos Cruz-Vázquez^a, Rubén López Revilla^b, Mireya Sánchez Garza^b, Rodrigo Rosario Cruz^c, Irene Vitela Mendoza^a, Leticia Medina Esparza^a

RESUMEN

Con el objeto de determinar la frecuencia de *Cryptosporidium* spp, y realizar la identificación de especie o genotipo de los ooquistes encontrados, en becerras lactantes mantenidas en confinamiento en establos lecheros de Aguascalientes, México, se tomaron muestras de excremento de 126 becerras de 8 a 14 días de edad provenientes de ocho establos, las cuales fueron procesadas mediante frotis fecal teñido con Kinyoun y por PCR anidada para amplificar la región 18S rARN del parásito (830 pb); las muestras positivas fueron clonadas en un vector pGEM-T y secuenciadas. La frecuencia de animales positivos a *Cryptosporidium* spp por microscopía fue de 75 % (95/126), con una escala entre establos de 25 a 100 %; en tanto que por técnicas moleculares fue de 67 % (85/126), con escala entre establos de 20 a 100 %, el resto de las muestras fueron negativas en ambas pruebas. Todas las muestras secuenciadas tuvieron una homología del 100 % con la región 18S rARN de *C. parvum*. Estos resultados confirman la importancia de *C. parvum* como principal agente de la criptosporidiosis en becerras lactantes y demuestra su amplia distribución en la zona; debido a que *C. parvum* es una especie zoonótica, debe de considerarse que las personas que manejan a las becerras se encuentran ampliamente expuestas a la infección.

PALABRAS CLAVE: *Cryptosporidium*, Frecuencia, Becerras lactantes, Genotipificación.

ABSTRACT

In order to determine the frequency of *Cryptosporidium* spp and to identify the species or genotype of oocysts found in confined, suckling lactating calves in Aguascalientes, Mexico dairies, fecal samples were collected from 8-14-d old-calves in eight different dairies. Samples were smeared, Kinyoun-stained and subjected to nested PCR in order to amplify parasite's 18S rRNA region (830 bp). Positive samples were cloned on a pGEM-T vector then sequenced. Frequency of animals positive to *Cryptosporidium* spp by microscopy was 75 % (95/126), with a 25 to 100 % range among dairies; even though, using molecular techniques the frequency of positive animals was 67 % (85/126), with a 20 to 100 % range among dairies. All other samples were negative to both tests. All samples sequenced had a 100 % homology with the 18S rRNA region of *C. parvum*. Results confirm the relevance of *C. parvum* as a major etiology of cryptosporidiosis in suckling dairy calves and show its broad distribution in the area. Given that *C. parvum* is a zoonotic species, calf managers should be considered as broadly exposed to the infection.

KEY WORDS: *Cryptosporidium*, Frequency, Suckling calves, Genotyping.

La Criptosporidiosis es una parasitosis interna causada por un protozooario del género *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporiidae), que coloniza las

Cryptosporidiosis is an internal parasite infection caused by protozoa of the *Cryptosporidium* genus (Apicomplexa: Cryptosporiidae), colonizing the

Recibido el 27 de febrero de 2009. Aceptado para su publicación el 18 de junio de 2009.

^a Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes, Apartado Postal 74-2, Administración Postal 2, Aguascalientes, 20041, Aguascalientes, México. cruva18 @ yahoo.com.mx. Correspondencia al segundo autor.

^b Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

^c Centro Nacional de Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

células epiteliales que se encuentran a lo largo del tracto digestivo de una amplia variedad de vertebrados, incluyendo animales domésticos, silvestres y al ser humano^(1,2). Actualmente, al menos trece especies así como varios genotipos han sido reconocidos en el género, empleando principalmente criterios morfológicos, moleculares y especificidad de huésped^(2,3). En el ganado bovino se han reconocido dos especies, *C. parvum*, que infecta el intestino de becerros neonatos, y *C. andersoni*, que infecta el abomaso de animales jóvenes y adultos^(4,5,6); en los últimos años se han identificado dos nuevas especies, *C. bovis* and *C. ryanae*, de igual manera, se han reportado numerosos subgenotipos de *C. parvum*⁽⁷⁻¹²⁾.

La criptosporidiosis es particularmente importante en becerros lactantes, en los que puede ser la principal responsable de severos cuadros diarreicos, tanto por su acción como agente etiológico único, o como oportunista en infecciones intestinales de origen bacteriano, viral o en animales inmuno comprometidos; además, el ganado adulto puede actuar como portador asintomático de este protozooario, representando una fuente de infección permanente para los animales jóvenes del hato; *C. parvum* es reconocido como una zoonosis^(2,13,14).

La prevalencia en becerras lactantes de entre 1 a 30 días de edad, es generalmente elevada, observándose la mayor prevalencia entre los 8 a 14 días de edad^(13,15,16). En México, la enfermedad ha sido reconocida desde 1983, cuando se documentó su presencia en bovinos lactantes; posteriormente, se ha informado de esta parasitosis en hatos lecheros de los estados de México, Hidalgo, Jalisco, Querétaro y Guanajuato, entre otros^(17,18,19).

El diagnóstico de la infección por *Cryptosporidium*, se realiza generalmente por métodos de identificación morfológica de los ooquistes por microscopía, e inmunológicos, principalmente inmunofluorescencia indirecta e inmunoensayo enzimático (ELISA), los cuales pueden proporcionar información sobre la prevalencia, pero tienen como limitante su capacidad para identificar con precisión la especie o genotipo involucrado^(5,20,21); recientemente, las técnicas

epithelial cells lining the digestive tract of a broad variety of vertebrates, including domestic and wild animals, and humans^(1,2). So far, at least 13 species and several genotypes have been recognized within the genus using mostly morphological, molecular and host-specificity criteria^(2,3). Two species have been recognized in cattle i.e., *C. parvum*, affecting the intestines of neonatal calves; and *C. andersoni*, affecting the abomasum of young and adult cattle^(4,5,6). In recent years, two new species have been identified: *C. bovis* and *C. ryanae*. Likewise, several new *C. parvum* sub-genotypes have also been reported⁽⁷⁻¹²⁾.

Cryptosporidiosis is particularly important in suckling calves, causing severe scouring conditions either as a single etiology or as an opportunistic agent to bacterial or viral GI infections in immunocompromised animals. In addition, adult cattle can serve as non-symptomatic carriers of this protozoan representing an ongoing source of infection for young calves in the herd. *C. parvum* has been recognized as a zoonotic agent^(2,13,14).

Prevalence in suckling calves aging 1-30 d is typically high, with prevalence peaking between 8 and 14 d of age^(13,15,16). In Mexico, the disease has been recognized since 1983, when its presence was first documented in suckling cattle. The infection has later been reported among dairies in the States of Mexico, Hidalgo, Jalisco, Queretaro, Guanajuato and others^(17,18,19).

Cryptosporidium infections are typically diagnosed by microscopic morphological identification of oocysts, and by immunological methods, mostly indirect immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA), all of which can provide information about parasite prevalence but have limited ability to accurately identify the species or genotype involved^(5,20,21). More recently, polymerase chain reaction (PCR) has provided such identification with certainty^(2,7,22).

The purpose of this study was to determine the frequency of *Cryptosporidium* spp, and to identify the species or genotype of the oocysts found in confined suckling calves in Aguascalientes, Mexico dairies.

moleculares, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), han venido a proporcionar una herramienta que permite realizar esta identificación con certeza^(2,7,22).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la frecuencia de *Cryptosporidium* spp, y realizar la identificación de especie o genotipo de los ooquistes encontrados, en becerras lactantes mantenidas en confinamiento en establos lecheros de Aguascalientes, México.

Sitio de estudio: El trabajo se desarrolló en el estado de Aguascalientes, localizado en la región centro-norte de México, a una altitud promedio de 1,885 msnm. El estado cuenta con temperatura promedio de 16.9 °C y 475 mm de lluvia al año, la cual es estacional y se presenta en el verano⁽²³⁾.

Establos: Se eligieron por conveniencia⁽²⁴⁾, ocho establos lecheros ubicados en los municipios de San Francisco de los Romo, Pabellón de Arteaga, Rincón de Romos y El Llano, dos por cada uno de ellos, en función de que en los mismos se contara con cría de becerras y del interés de los productores por participar en el estudio; todos los establos seleccionados trabajan con ganado Holstein y las becerras lactantes se manejan confinadas en sala de crianza con becerreras metálicas elevadas y pisos de concreto.

Toma de muestras: Se colectaron por una sola ocasión, muestras de excremento directamente del recto de todas las becerras lactantes con edades entre 8 y 14 días de nacidas, intervalo de edad en el que son más susceptibles a *Cryptosporidium* spp⁽¹³⁾, que se encontraran presentes el día de la visita, sin tomar en cuenta si presentaban o no diarrea. En total se colectaron 126 muestras, y cada una de ellas fue identificada con el nombre del establo, número de arete de la becerro y su edad; las muestras se trasladaron en condiciones de refrigeración al laboratorio para su procesamiento.

Diagnóstico microscópico: En el laboratorio, para cada muestra, se tomaron 10 g de excremento y se diluyeron 1:1 con agua oxigenada para preparar una laminilla que contuviera seis frotis de la misma muestra, los cuales se dejaron secar a temperatura

Study site: The study was carried out in the state of Aguascalientes, central-north Mexico, at an altitude of 1,885 m asl. Average temperature is 16.9 °C with seasonal summer rains yielding 475 mm rainfall/yr⁽²³⁾.

Dairies: Eight dairies were selected for convenience⁽²⁴⁾, two in each of the following municipalities: San Francisco de los Romos, Pabellón de Arteaga, Rincón de Romos, and El Llano. All these dairies had rearing heifers, and producers showed interest in participating in the study. All herds included Holstein cattle and suckling calves are confined within starting facilities with raised metal hutches on concrete floors.

Sampling: Fecal samples were collected one single time directly from the rectum of all 8-14-d old calves present on that visit day, regardless of showing or not diarrhea (it should be remembered that at this age calves are most susceptible to *Cryptosporidium* spp infection)⁽¹³⁾. In total, 126 samples were collected and labeled with the name of the dairy, ear tag number and calf age then refrigerated and taken to the laboratory, to be processed.

Microscopic diagnosis: Once in the lab, 10 g from each fecal sample were taken and diluted 1:1 with hydrogen peroxide in order to prepare a slide containing six fecal smears of the same sample. Smears were air-dried at ambient temperature for 24 h then stained using the acid-resistant Kinyoun's technique^(25,26). Smears were observed under the microscope in the search of spherical, light pink-to-red *Cryptosporidium* spp. oocysts. In order to minimize false positive readings, a sample was considered as positive only when > 5 oocysts were observed after fully examining all six smears.

Sample cleaning/concentration: Fecal samples were processed using the technique suggested by Fayer *et al*⁽⁵⁾ with some modifications. Briefly, 15 g of each sample were homogenized in a 1:1 ratio with distilled water, filtered through a 45 µm screen, and the suspension was directly collected into centrifuge tubes, then centrifuged at 1,600 xg for 5 min. Supernatant was discarded and sediment

ambiente por 24 h, para posteriormente procesarlos por el método de tinción ácido-resistente de Kinyoun^(25,26), los frotis fueron observados al microscopio compuesto, los ooquistes de *Cryptosporidium* spp presentaron forma esférica y teñidos de color rojo a rosa pálido. Con objeto de minimizar las lecturas de falsos positivos, se consideró una muestra como positiva sólo cuando después de examinar completamente los seis frotis se hubieran observado ≥ 5 ooquistes.

Limpieza y concentración de las muestras: El excremento se procesó empleando la técnica sugerida por Fayer *et al*⁽⁵⁾, con algunas modificaciones. En resumen, 15 g de cada muestra se homogenizaron a una proporción 1:1 con agua destilada y se pasaron a través de un tamiz de 45 μm , colectándose la suspensión directamente en tubos de centrífuga, los cuales se sometieron a centrifugación a 1600 xg por 5 min. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con agua destilada homogenizando con vortex; se realizó una segunda centrifugación en las mismas condiciones, y el sedimento se resuspendió con 3 ml de solución saturada de glucosa, se mezclaron con vortex y se ajustó el volumen a 10 ml con solución saturada de glucosa. Los tubos se centrifugaron a 1,400 xg por 5 min, y se recuperaron 500 μl de la superficie del sobrenadante, los cuales se colocaron en un tubo de microcentrifuga de 1.5 μl , que debidamente identificado se conservó en refrigeración hasta su uso.

Extracción de ADN: Las muestras se sometieron a un protocolo de extracción por congelación-descongelación y lisis alcalina; para ello, se procedió a lavar los ooquistes para eliminar la solución saturada de glucosa colocando 500 μl del concentrado obtenido en el paso anterior en un tubo de microcentrifuga, adicionando 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos (SAF), paso seguido se centrifugó a 7,000 xg por 5 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 1 ml de SAF, sometiendo la muestra al procedimiento descrito anteriormente por cinco veces. El sedimento se resuspendió con 100 μl de solución de lisis "A" (50 mM glucosa, 25 mM Tris HCl pH 8, 10 mM EDTA), mezclando con vortex, enseguida se

was re-suspended in distilled water, then vortexed. A second centrifugation was performed under the same conditions, sediment was re-suspended in 3 ml saturated glucose solution then vortexed, and the volume was taken to 10 ml with saturated glucose solution. Tubes were centrifuged at 1,400 xg for 5 min, and 500 μl from the supernatant surface were harvested, transferred to a 1.5 μl micro-centrifuge tube, labeled, and stored refrigerated until used.

DNA extraction: Samples were subjected to a freezing/thawing and alkaline lysis extraction protocol. For this purpose, oocysts were washed to remove the saturated glucose solution by placing 500 μl of the concentrate from the previous step into a microcentrifuge tube. One milliliter (1 ml) phosphate buffer solution (PBS) was added then centrifuged at 7,000 xg for 5 min. Supernatant was discarded and sediment was re-suspended with 1 ml PBS. Sample was subjected five times to the above-described procedure. Sediment was re-suspended with 100 μl of lysis solution "A" (50 mM glucose; 25 mM Tris HCl, pH 8; 10 mM EDTA), mixed on a vortex, then incubated at 90 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min and immediately frozen at -70 $^{\circ}\text{C}$. This procedure was repeated five times. Two hundred microliters (200 μl) lysis solution "B" (0.2N NaOH, 1% w/v sodium dodecyl sulfate, SDS) were added, mixed by inverting the tube and ice-incubated for 5 min. Finally, 150 μl solution "C" (5M CH_3COOK 60 ml, CH_3COOH 11.5 ml, dH_2O 28.5 ml) were added, mixed by inverting the tube and ice-incubated for 5 min to be then centrifuged at 7,000 xg for 5 min at 4 $^{\circ}\text{C}$. Supernatant was transferred to a clean micro-centrifuge tube, 2 volumes of absolute ethanol were added, vortexed and incubated at ambient temperature for 2 min, centrifuged at 7,000 xg for 10 min. Supernatant was discarded and tube was drained upside down on a paper towel. One milliliter (1 ml) 70% ethanol was added, centrifuged at 7,000 xg for 2 min at 4 $^{\circ}\text{C}$, supernatant discarded and sediment was centrifuged once again at 7,000 xg for 10 min, then allowed to dry at ambient temperature. DNA was diluted in 50 μl TE (1 mM Tris, 0.1 mM EDTA), incubated at 99 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min and finally stored at -20 $^{\circ}\text{C}$, until used.

incubaron a 90 °C por 5 min e inmediatamente se congelaron a -70 °C, este proceso se repitió cinco veces. Posteriormente se adicionaron 200 µl de solución de lisis "B" (0.2N NaOH, 1% p/v SDS), mezclando por inversión, para luego incubar en hielo por 5 min. Finalmente se adicionaron 150 µl de la solución "C" (5M CH₃COOK 60 ml, CH₃COOH 11.5 ml, dH₂O 28.5 ml), mezclando por inversión, y se incubó en hielo 5 min, para posteriormente centrifugar a 7,000 xg por 5 min a 4 °C. El sobrenadante fue transferido a un tubo de micro centrifuga limpio agregando dos volúmenes de etanol absoluto, se mezclaron con vortex y se incubó a temperatura ambiente por 2 min, se centrifugó a 7,000 xg por 10 min, removiendo el sobrenadante y colocando el tubo en posición invertida sobre una toalla de papel. Posteriormente se adicionó 1 ml de etanol al 70%, se centrifugó a 7,000 xg por 2 min a 4 °C, el sobrenadante se descartó y el sedimento se centrifugó otra vez a 7,000 xg por 10 min, se dejó secar a temperatura ambiente. El ADN se diluyó en 50 µl de TE (1 mM Tris, 0.1 mM EDTA), se sometió a 99 °C por 5 min y finalmente se conservó a -20 °C hasta su uso.

Amplificación: Se amplificó un fragmento de la región 18S rARN del gen del protozoo, utilizando una PCR anidada de dos pasos, utilizando los iniciadores descritos por Xiao *et al.*⁽³⁾, 5'-TTCTA GAGCTAATACATGCG-3' y 5'-CCCTAATCC TTCGAAACAGGA-3' (para la PCR primaria), y 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAG ATAAAG-3' y 5'-AAGGAGTAAGGAACAACC TCCA-3' (para la PCR secundaria), así como las condiciones de reacción y amplificación para ambas PCR recomendadas por Santín *et al.*⁽⁷⁾. Los productos de las amplificaciones se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, en TAE (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA), se tiñeron con bromuro de etidio 0.5 ug/ml (Promega) y fueron analizados en un transiluminador con luz ultravioleta empleando el fotodocumentador Chemidoc-EQ (Bio-Rad). El tamaño de los productos de amplificación se determinó con el programa Quantity One (Bio-Rad). Las muestras se consideraron positivas a *Cryptosporidium* spp cuando se apreciaba la amplificación de una banda de 830 pb; las muestras positivas se clonaron y secuenciaron como se describe enseguida.

Amplification: One fragment of the protozoan 18S rRNA gene region was amplified using a 2-step nested PCR with the primers described by Xiao *et al.*⁽³⁾; 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' and 5'-CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3' (for primary PCR), and 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAG-3' and 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3' (for secondary PCR), as well as using Santín *et al.*-recommended reaction/amplification conditions for both primary and secondary PCR procedures⁽⁷⁾. Amplification products were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis in TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA), stained with 0.5 ug/ml ethidium bromide (Promega) and analyzed with a UV transilluminator, using a Chemidoc-EQ photodocumentor (Bio-Rad). Amplification product sizes were determined using the Quantity One software (Bio-Rad). Samples were considered as *Cryptosporidium* spp-positive when a 830 bp band amplification was seen. Positive samples were cloned then sequenced as follows.

DNA sequence analysis: Amplified fragments were cloned on a pGEM-T (pGEM-T Kit Vector System, Promega) as per manufacturer's directions then inserted into *E. coli* Top10 F'. White colonies cultured on solid LB medium (Difco) with 100 ug/ml carbenicilline (Geopen, Pfizer), 1 mM isopropyl-B-D-Thiogalactopyranoside (IPTG) (Amersham Life Science) and 40 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactoside substrate, X-Gal (Invitrogen) were selected, and re-seeded. Plasmid DNA was extracted from pure colonies using the UltraClean 6-minute Mini Plasmid Prep Kit (MoBio), as recommended by the manufacturer. Presence of the fragment of interest was confirmed by PCR using the above-mentioned primers and conditions^(3,7). The amplified fragment was purified using Wizard plus SV Gel and PCR Clean-up System package (Promega), following manufacturer's directions. Afterwards, each sample was subjected to 2-way sequencing using the above-mentioned primers with the BigDye Terminator Cycle Sequencing system on a 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) at in Mexico's National Genomics Laboratory (CINVESTAV), Irapuato City Unit. Sequences were obtained for *C. parvum* (accession: AFO93490),

Análisis de la secuencia de ADN: Los fragmentos amplificados fueron clonados en un vector pGEM-T (Kit pGEM-T Vector System, Promega), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, e introducido en *E. coli* Top10 F'; se seleccionaron las colonias de color blanco cultivadas en placas de medio LB sólido (Difco) con Carbenicilina 100 µg/ml (Geopen, Pfizer), 1 mM de isopropil-B-D-Thiogalactopiranosido (IPTG) (Amersham Life Science) y 40 µg del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolyl--D-galactosido X-Gal (Invitrogen), éstas se sembraron y partir de colonias puras se realizó la extracción del ADN plasmídico utilizando el paquete UltraClean 6 minute Mini Plasmid Prep Kit (MoBio), de acuerdo a lo recomendado por el fabricante. Se confirmó la presencia del fragmento de interés mediante una PCR utilizando los iniciadores y condiciones descritas anteriormente^(3,7). El fragmento amplificado fue purificado utilizando el paquete Wizard plus SV Gel and PCR Clean-up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente cada muestra fue secuenciada en ambos sentidos, utilizando los iniciadores citados previamente, con el sistema de secuenciación BigDye Terminator Cycle Sequencing utilizado en el equipo 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), en el Laboratorio Nacional de Genómica (CINVESTAV-Unidad Irapuato). Se obtuvieron las secuencias para *C. parvum* (accesión AF093490), y de *C. andersoni* (accesión AF093496), utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tools)²⁷. Las secuencias obtenidas en el estudio fueron alineadas y comparadas por homología con las de *C. parvum* y *C. andersoni* utilizando los programas de bioinformática BioEdit 7.0.8.⁽²⁸⁾ y Mega 3.1.⁽²⁹⁾, respectivamente.

Análisis de la información: Se calculó la frecuencia de animales positivos a ooquistes de *Cryptosporidium* en el total de la muestra y por establo incluido en el estudio, considerando los resultados obtenidos tanto por microscopía como por técnicas moleculares.

La prueba parasitológica de frotis fecal teñido por el método de Kinyoun permitió identificar 95 muestras positivas a *Cryptosporidium* spp entre las

and *C. andersoni* (accesión: AF093496), using the BLAST software (Basic Local Alignment Search Tools)²⁷. Sequences obtained in the study were lined up and compared by homology with those of *C. parvum* and *C. andersoni* using both bioinformatics' BioEdit 7.0.8⁽²⁸⁾ and Mega 3.1⁽²⁹⁾ software packages, respectively.

Information analysis: Frequency of animals positive to *Cryptosporidium* oocysts was calculated on both per-total-sample and per-dairy bases, considering the results obtained by both microscopy and molecular techniques.

The fecal smear protozoan test using Kinyoun's stain led us to identify 95 *Cryptosporidium* spp-positive samples from the total 126 samples taken from 8-14-day-old suckling calves in eight dairies located in four different Aguascalientes municipalities. Frequency in the total sample was 75 % (range: 25 to 100 %). At least one animal positive was present in all dairies. From the total samples collected, 85 were positive to both microscopy and nested PCR. Nevertheless, 10 samples that resulted positive to microscopic examination were negative to PCR. All remaining samples were negative to both tests (Table 1).

Species identification in all nested PCR-positive samples that were sequenced later, showed 100 % homology with *C. parvum* (GenBank accession No: AF093490). No other species or genotypes were identified in our samples. This way, 85 out of the 126 samples collected were positive to *C. parvum* for a total sample frequency of 67 % (range: 20 to 100 %). Only one dairy resulted negative to the parasite (Table 1).

Cryptosporidiosis affects mostly suckling calves, 8-14 d of age^(1,13). Prevalence in this age group is typically high, even though several factors including season, animal immune status, environmental factors and management practices can also play a role⁽²⁰⁾. Using different diagnostic tools, studies have documented the prevalence of cryptosporidiosis in suckling calves i.e., Spain, 47.9 %⁽¹⁵⁾; France, 17 %⁽³⁰⁾; Brazil, 45 %⁽³¹⁾; Canada, 30 %⁽³²⁾; and England, 28 %⁽¹⁶⁾. In our

FRECUENCIA E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp EN BECERRAS LACTANTES

Cuadro 1. Frecuencia de *Cryptosporidium* spp y *C. parvum*, en becerras lactantes de ocho establos de Aguascalientes, México, detectados mediante microscopía y por técnicas moleculares, respectivamente

Table 1. Frequency of *Cryptosporidium* spp and *C. parvum*, in suckling calves from eight different Aguascalientes (Mexico) dairies, detected by microscopy and molecular techniques, respectively

Dairy	Municipality	Examined (No.)	<i>Cryptosporidium</i> spp (No.)	Frequency (%)	<i>C. parvum</i> (No.)	Frequency (%)
R1	El Llano	18	14	78	13	72
R2	El Llano	5	3	60	1	20
R3	S. Francisco	4	1	25	0	0
R4	S. Francisco	6	6	100	6	100
R5	Pabellón	48	36	75	34	71
R6	Pabellón	12	7	58	6	50
R7	Rincón	23	18	78	15	65
R8	Rincón	10	10	100	10	100
Total		126	95	75	85	67

126 tomadas de becerras lactantes de 8 a 14 días de edad, en ocho establos lecheros de cuatro municipios de Aguascalientes. La frecuencia en el total de la muestra fue de 75 %, con una escala de 25 al 100 %; en todos los establos hubo al menos un animal positivo. Del total de muestras colectadas, 85 resultaron positivas por microscopía y por la prueba de PCR anidado, mientras que diez muestras positivas por microscopía no lo fueron en la prueba de PCR anidado, el resto de las muestras fueron negativas en ambas pruebas (Cuadro 1).

La identificación de la especie presente en las muestras que resultaron positivas en la prueba de PCR anidada, y que posteriormente fueron secuenciadas, mostraron una homología del 100 % para *C. parvum* (accesión GenBank número: AF093490), no fue posible identificar alguna otra especie o genotipo en las muestras. De esta forma, 85 muestras de las 126 colectadas en el estudio, fueron positivas a *C. parvum*, lo que significó una frecuencia en el total de la muestra de 67 %, con una escala de 20 a 100 %; sólo un establo resultó negativo al parásito (Cuadro 1).

La criptosporidiosis afecta principalmente a becerras lactantes, siendo el rango de edad de 8 a 14 días el de mayor riesgo a sufrir la infección^(1,13). La prevalencia en esta escala de edad por lo general

study, we observed a frequency of positive animals within the total sample in excess of 60 %, and frequency within the positive dairies was ≥ 20 % (Table 1). In Mexico, other authors using one single sampling reported prevalence levels ranging from 22 to 67 %, depending on the rearing system^(18,19), grossly matching our results. The difference observed (i.e., less frequent positive results with molecular techniques than by microscopic observation) could be attributed to both human error at microscopic diagnosis⁽²⁵⁾ and to the fact that PCR is a more sensitive test^(2,22).

Cryptosporidium spp transmission occurs by ingestion of oocysts excreted in the feces from infected animals. Being that the case, contamination of water or feed is very likely to occur, mainly when the calf-rearing systems facilitate this condition. As mentioned, age is the main risk factor for *Cryptosporidium* spp infection, but other major risk factors have also been identified including calving facilities, cow/calf contact at birth, poor colostrum management, calf-to-calf contact, feeding devices, cleaning/disinfection practices, suckling calf managers, etc.^(18,33-35). The presence of a high number of *Cryptosporidium*-positive calves seen in this study, could be attributed to the interaction of different risk factors such as those mentioned above. This can reflect poor management practices

es elevada, aunque diversos factores tales como la época del año, el estado inmunológico de los animales y otros ambientales y de manejo, pueden causar fluctuaciones en la misma⁽²⁰⁾. Diversos estudios han documentado la prevalencia en becerras lactantes utilizando diferentes técnicas de diagnóstico, por ejemplo, en España 47.9 %⁽¹⁵⁾, en Francia 17 %⁽³⁰⁾, en Brasil 45 %⁽³¹⁾, en Canadá 30 %⁽³²⁾, y 28 % en Inglaterra⁽¹⁶⁾. En el presente estudio, se observó una frecuencia de animales positivos en el total de la muestra por arriba de 60 %, y en los establos positivos ≥ 20 % (Cuadro 1). En México, otros autores han informado de prevalencias que, dependiendo del sistema de crianza, van de 22 a 67 %, estimadas a partir de un solo muestreo^(18,19), lo que coincide en lo general con los resultados obtenidos en el presente estudio. La diferencia observada, que resultó menor cuando fue diagnosticada mediante técnicas moleculares, se pudo deber a que algunas muestras fueran erróneamente diagnosticadas como positivas por microscopía⁽²⁵⁾ y la PCR es una técnica más sensible^(2,22).

La transmisión de *Cryptosporidium* spp se realiza por ingestión de oocistos en el excremento de animales infectados, siendo así, la diseminación del parásito y las posibilidades de que se contamine el agua o el alimento es altamente factible, mas aún cuando los sistemas de crianza faciliten esta situación; como ya se ha mencionado, la edad es el principal riesgo de infección a *Cryptosporidium* spp, pero se han identificado otros factores de riesgo importantes, tales como el local de parición, el contacto de la madre-becerra al parto, la deficiente administración de calostro, el contacto entre becerras, los utensilios de alimentación, las actividades de limpieza y desinfección y a los manejadores de los animales en lactancia, entre otros^(18,33-35). La presencia de un elevado número de animales positivos a *Cryptosporidium*, como el observado en el presente estudio, puede deberse a una interacción de diversos factores de riesgo como los previamente mencionados, lo cual puede reflejar condiciones de manejo deficientes en uno o más de estos factores; sin embargo, es necesario estudiar con detalle estos y otros posibles factores de riesgo en las unidades de crianza de Aguascalientes para

impacting one or more of these factors. Nevertheless, these and other potential risk factors should be analyzed in detail among Aguascalientes rearing units in order to determine their roles on the presence of *Cryptosporidium*.

Molecular identification of *C. parvum* as the sole species present in the samples included in this study matches previous reports that *C. parvum* affects primordially suckling calves. Given that only suckling calves were included in this study, we were not able to detect other genotypes typically affecting weaned or adult cattle^(7,9,13,22). *C. parvum* oocysts have been microscopically identified elsewhere in suckling calves in Mexico⁽¹⁸⁾. Other studies have reported the identification of *C. parvum* by molecular techniques⁽¹⁹⁾.

In conclusion, results from this study show a high frequency of *C. parvum*-positive animals within the sample studied, thus confirming the importance of this protozoan as the principal causative agent of cryptosporidiosis in animals within this age group, and show its broad distribution in the area. *C. parvum* is the only zoonotic *Cryptosporidium* species in cattle, so that calf handlers are broadly exposed to the infection. Studies should be performed to learn about the epidemiology of this parasitic infection with preventative purposes, as well as to know more about the consequences that it can imprint on the health and development of replacement heifers.

ACKNOWLEDGEMENTS

Gratitude is expressed to participating cattle producers for their cooperation to conduct this study. This project was financed by DGEST-SEP (755.05-P).

End of english version

tener elementos que permitan determinar su influencia en la presencia de *Cryptosporidium*.

La identificación molecular de *C. parvum* como única especie presente en las muestras incluidas en

el estudio, coincide con los informes existentes que indican que esta especie afecta primordialmente a becerros lactantes; debido a que se incluyeron exclusivamente animales de esta condición, no fue posible detectar genotipos que generalmente afectan animales destetados o adultos^(7,9,13,22). En México, se han identificado ooquistes de *C. parvum* mediante microscopía en becerros lactantes⁽¹⁸⁾, y en otros estudios se menciona la identificación de esta especie por métodos moleculares⁽¹⁹⁾.

En conclusión, los resultados del presente trabajo muestran una elevada frecuencia de animales positivos a *C. parvum* en la muestra estudiada, lo que confirma la importancia de esta especie como agente principal de la criptosporidiosis en este grupo de animales y demuestra su amplia distribución en la zona. *C. parvum* es la única especie de carácter zoonótico en el ganado bovino, por lo que las personas que manejan a las becerros se encuentran ampliamente expuestas a la infección. Es conveniente llevar a cabo estudios que permitan conocer ampliamente la epidemiología de esta parasitosis con el objetivo de prevenir su presencia, así como las consecuencias que pueda tener en la salud y desarrollo de los animales de reemplazo.

AGRADECIMIENTOS

A los ganaderos participantes en el estudio por las facilidades brindadas para llevarlo a cabo. Este proyecto fue financiado por la DGEST-SEP (755.05-P).

LITERATURA CITADA

- Fayer R, Speer CS, Dubey JP. The general biology of *Cryptosporidium*. In: *Cryptosporidium* and Criptosporidiosis. Fayer R, editor. Boca Raton (FL): CRC Press; 1997:1-42.
- Ramirez NE, Ward LA, Sreevatsan S. A review of biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes Infect* 2004;(6):773-785.
- Xiao L, Morgan U, Limor J, Escalante A, Arrowood M, Shulaw W, Thompson RCA, Fayer R, Lal AA. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl Environ Microbiol* 1999;(65):3386-3391.
- Anderson BC. Cryptosporidiosis in bovine and human health. *J Dairy Sci* 1998;(81):3036-3041.
- Fayer R, Trout JM, Gracyk TD, Lewis EJ. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on three Maryland farms. *Vet Parasitol* 2000;(93):103-112.
- Lindsay DS, Upton SJ, Owens DS, Morgan UM, Mead JR, Blagburn BL. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa:Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J Eukaryot Microbiol* 2000;(47):91-95.
- Santín M, Trout MJ, Xiao L, Zhou L, Greiner E, Fayer R. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet Parasitol* 2004;(122):103-117.
- Fayer R, Santin M, Xiao L. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa:Cryptosporiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J Parasitol* 2005;(91):624-629.
- Slapeta J. *Cryptosporidium* species found in cattle: a proposal for a new species. *Trends Parasitol* 2006;(22):469-474.
- Brook E, Hart CA, French N, Christley R. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. *Vet J* 2008. (doi:10.1016/j.tvjl.2007.10023).
- Wielinga PR, de Vries A, van der Goot TH, Mank T, Mars MH, Kortbeek LM, van der Giessen JW. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. *Int J Parasitol* 2007;(38):809-817.
- Fayer R, Santín M, Trout JM. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa :Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet Parasitol* 2008;156:191-198.
- De Grafft D, Vanopdenbosch E, Ortega-Mora L, Abbasi H, Peeters J. A review of the importance of Cryptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasitol* 1999;(29):1269-1287.
- Xiao L, Feng Y. Zoonotic Cryptosporidiosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;(52):309-323.
- Castro-Hermida JM, González-Losada YA, Mezo-Menéndez M, Ares-Mazás E. A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. *Vet Parasitol* 2002;(106):11-17.
- Brook E, Hart CA, French N, Christley R. Prevalence and risk factors for *Cryptosporidium* spp infection in young calves. *Vet Parasitol* 2008;(152):46-52.
- González MC, Gómez ES, Aluja AS. Criptosporidiosis en bovinos lactantes (histopatología, microscopía electrónica de transmisión y de barrido). *Vet Mex* 1983;(14):12-22.
- Maldonado CS, Atwill ER, Saltijeral OJ, Herrera AL. Prevalence and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in Holstein Freisian dairy calves in central Mexico. *Prev Vet Med* 1998;(36):95-107.
- Vázquez-Flores S. Criptosporidiosis en bovinos. En: *Temas Selectos de Parasitología*. Ibarra VF, Quiroz RH, editores. México, DF: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2000;(II):1-18.
- Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*; transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* 2000;(30):1305-1322.
- Egyed Z, Sréter T, Széll Z, Varga I. Characterization of *Cryptosporidium* spp. –recent developments and future needs. *Vet Parasitol* 2003;(111):103-114.
- Tzipori S, Widmer G. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends Parasitol* 2008;(24):184-189.

23. García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Copen. 4ª. Ed. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México; 1988.
24. Thrusfield M. *Veterinary epidemiology*. 2nd ed. London: Blackwell Science; 1995.
25. Bernal RRM, Hernández SG, Ramírez HE, Gámez AA, Martínez ML. Protozoos emergentes. Comparación de tres métodos de identificación. *Rev Mex Patol Clin* 1998;(45):193-199.
26. Arrowood MJ. Diagnosis. In: *Cryptosporidium* and Criptosporidiosis. Fayer R, editor. Boca Raton (FL): CRC Press; 1997:43-64.
27. Stephen AF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;(25):3389-3402.
28. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999;(41):95-98.
29. Kumar S, Dudley J, Nei M, Tamura K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings Bioinform* 2008;(9):299-306.
30. Lefay D, Naciri M, Poirer P, Chermette R. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in calves in France. *Vet Parasitol* 2000;(89):1-9.
31. Ortolani ER, Soares PC. Aspectos epidemiológicos de la criptosporidiosis en becerros de rebaños lecheros. *Parasitol Latinoam* 2003;(58):122-127.
32. Trotz -Williams LA, Wayne MS, Kenneth EL, Duffield T, Nydam DV, Peregrine AS. Association between management practices and within-herd prevalence of *Cryptosporidium parvum* shedding on dairy farms in southern Ontario. *Prev Vet Med* 2008;(83):11-23.
33. Mohamed HO, Wade SE, Schaff S. Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in dairy cattle in southeastern New York state. *Vet Parasitol* 1999;(83):1-13.
34. Castro-Hermida HJ, González LY, Ares ME. Prevalence and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). *Vet Parasitol* 2002;(106):1-10.
35. Kvác M, Kouba M, Vitovec J. Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. *Vet Parasitol* 2006;(137):202-209.