



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSGRADO y POSTÍTULO

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Cryptosporidium parvum* AISLADO EN BOVINOS CON DIARREA NEONATAL EN DOS REGIONES DE CHILE USANDO EL GEN *gp60*

SEBASTIÁN PEÑA FRÍAS

Tesis para optar al Grado
de Magister en Ciencias
Animales y Veterinarias,
Mención Ciencias
Animales

Santiago – Chile

2016



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSGRADO y POSTÍTULO

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Cryptosporidium parvum* AISLADO EN BOVINOS CON DIARREA NEONATAL EN DOS REGIONES DE CHILE USANDO EL GEN *gp60*

SEBASTIÁN PEÑA FRÍAS

Tesis para optar al Grado
de Magister en Ciencias
Animales y Veterinarias,
Mención Ciencias
Animales

Santiago – Chile

2016

Profesor Patrocinante: Dr. Rubén Mercado Pedraza, MSc, PhD

INFORME APROBACIÓN TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de Posgrado y Postítulo de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias que la Tesis de Magíster presentada por la (el) candidata (o)

Sebastián Peña Frías

Caracterización molecular de *Cryptosporidium parvum* aislado en bovinos con diarrea neonatal en dos regiones de Chile usando el gen *gp60*

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias, con Mención en en Examen de Defensa de tesis rendido el día del mes del año

PROFESOR PATROCINANTE:

Prof. Dr. Rubén Mercado P. _____

PROFESORES CONSEJEROS E INFORMANTES:

Prof. Dr. Fernando Fredes M. _____

Prof. Dr. Leonardo Sáenz I. _____

Fecha aprobación de Tesis:

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

La presente Tesis fue financiada en su totalidad a través de:

- Proyecto FONDECYT 1121035

El trabajo en laboratorio y los análisis realizados fueron realizados en el laboratorio de la Unidad Docente de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Las muestras utilizadas en los análisis fueron donadas por los profesores Dra. Pamela Muñoz del Laboratorio de Parasitología Veterinaria del Instituto de Patología Animal de la Universidad Austral de Chile y Dr. Mario Duchens del Departamento de Fomento de la Producción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

BIOGRAFÍA

Nacido en la ciudad de Santiago, Chile, el 17 de septiembre de 1980. Estudios primarios realizados en la Escuela Particular N°312 “F.D. Roosevelt” y estudios secundarios realizados en el Liceo de Aplicación, ambos en la ciudad de Santiago.

Ingresa a la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile en 2000 y egresa en 2006. Obtiene la Licenciatura en Ciencias Veterinarias y Pecuarias en 2007 y el título de Médico Veterinario en marzo 2010.

Desde finales de 2010 a mediados de 2011, se desempeñó como Gerente de Distrito en la empresa DeLaval S.A. en la ciudad de Osorno.

En agosto de 2011, ingresa al Programa de Posgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile como estudiante de Magister en Ciencias Animales y Veterinarias con mención en Ciencias Animales.

En septiembre de 2013 se desempeñó como ayudante de docencia en el curso internacional “Metagenomic of Parasitic Agents” como parte del proyecto Fondecyt 1121035. Este curso se realizó en las dependencias del laboratorio de la Unidad Docente de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y contó con la presencia del Dr. Luiz Shozo Ozaki de VCU (Virginia Commonwealth University), con el cual se han realizado, a partir de esta fecha, variados trabajos colaborativos incluido un trabajo en la revista internacional Parasitology Research en el año 2015 (Parasitol Res (2015) 114:1985-1988).

Como producto del trabajo de investigación entre los años 2011-2014, se han logrado múltiples presentaciones de resúmenes tanto en seminarios y congresos nacionales como internacionales, como también la asistencia al “Tenth Annual EuPathDB Workshop” realizado en las dependencias del Centro para Enfermedades Tropicales y Emergentes de la Universidad de Georgia (UGA) en, Athens, Georgia, USA, durante junio de 2015.

Desde marzo de 2013 se integra como docente a tiempo parcial en la Escuela de Nutrición y Dietética de la Universidad Santo Tomás en Santiago, Chile, como

profesor de Fisiología y Fisiopatología, además de realizar docencia en otras universidades como Universidad Mayor, Universidad Autónoma de Chile y Universidad del Pacífico.

DEDICATORIA

Para todos aquellos que desean un mundo mejor...

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres, Ana y José Luis, que gracias a sus consejos y enseñanzas, me encuentro finalizando mi primer proceso de post-grado.

En segundo lugar, a mis profesores de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, en especial a los profesores Dr. Fernando Fredes, quien me impulsó a seguir el camino de la parasitología y al prof. Dr. Mario Duchens, quien me impulsó a continuar mis estudios universitarios en especial en el ámbito de las ciencias animales. Como también agradezco, a los profesores y funcionarios de la Escuela de Posgrado y Postítulo de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile por su gran apoyo.

En tercer lugar, quisiera agradecer a los profesores y funcionarios de la Unidad Docente de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, por su gran acogida dentro del equipo y por hacerme sentir uno más dentro del laboratorio.

En cuarto lugar, quisiera agradecer al Prof. Dr. Luiz Shozo Ozaki, por sus consejos y colaboración en el desarrollo de mi tesis, como también por su ayuda para desenvolverme en el ámbito internacional a través de sus recomendaciones.

Finalmente, y no menos importante, agradezco al Prof. Dr. Rubén Mercado Pedraza por aceptarme como su alumno de posgrado. Gracias a sus consejos, enseñanzas y amistad, me siento parte de una comunidad científica importante y he adquirido una gran cantidad de conocimiento y experiencia docente como de laboratorio. Todo esto me ayudará para mi desarrollo profesional posterior como también transmitir sus importantes consejos en el laboratorio y en la sala de clases.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA	5
DEDICATORIA	7
AGRADECIMIENTOS	8
ÍNDICE DE CONTENIDOS	9
ÍNDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS	11
TABLAS	11
ILUSTRACIONES	11
RESUMEN	12
SUMMARY	14
INTRODUCCIÓN	16
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	18
HIPÓTESIS DE TRABAJO	27
OBJETIVOS	28
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
MUESTRAS	29
RECOLECCIÓN DE LA MUESTRAS	29
NÚMERO Y REGIÓN DE ORIGEN DE LAS MUESTRAS	29
PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	30
TÉCNICA DE TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN MODIFICADA	30
MÉTODO 1	31
MÉTODO 2	33
DESCRIPCIÓN ESTADÍSTICA DE LAS SECUENCIAS DE DNA GENERADAS	34
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
PRESENCIA DE CRYPTOSPORIDIUM MEDIANTE LA TÉCNICA DE ZIEHL NEELSEN MODIFICADO	43
PORCENTAJE DE POSITIVIDAD A LA PCR CONVENCIONAL DE SSU 18S rDNA .	43
PORCENTAJE DE POSITIVIDAD A LA PCR CONVENCIONAL DE UN FRAGMENTO DEL GEN DE LA GLICOPROTEÍNA DE 60 KDA	43

SECUENCIAMIENTO DE LOS PRODUCTOS DE LA PCR CONVENCIONAL DE LA GLICOPROTEÍNA DE 60 KDA.....	45
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS GENERADAS	45
CONCLUSIONES.....	50
RECOMENDACIONES	52
REFERENCIAS	54
ANEXO.....	73
ANEXO 1	73
ANEXO 2	74

ÍNDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS

TABLAS

Tabla 1 - Número de muestras para el estudio, dividido por región	30
Tabla 2 - Distribución geográfica por comuna de las muestras estudiadas	36
Tabla 3 – Resultados al examen microscópico de muestras extendidas y teñidas mediante ZNm (grado de parasitosis: + (bajo), ++ (mediano), +++ (alto)) y a la PCR convencional SSU 18S rDNA	37
Tabla 4 – Muestras positivas a PCR gp60 distribuidas por región de estudio del total de muestras positivas a PCR 18S.....	38
Tabla 5 – Secuencia de DNA del segmento polimérico del gen de gp60. Se observa subrayado y en negrita que este se encuentra circunscrito entre las secuencias GGGC por el extremo 5' y ACATCA por el extremo 3'	40
Tabla 6 – Subtipos de gp60 de las secuencias en estudio por región, comuna, especie, familia de subtipo y subtipo.....	41

ILUSTRACIONES

Ilustración 1 - Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> . Después de la ingestión por parte del hospedero, los oosquistes (a) eclosionan y los esporozoitos (b), salen a través de una estructura especial en la pared. A partir de los esporozoitos, en el sitio de infección del hospedero, se transforman en trofozoitos (c) de los cuales se producen 2 o 3 generaciones de merontes (d) de los cuales nacen merozoitos. La última generación de merontes (f) forma microgametocitos (g) y macrogametos (h), dando inicio a la fase sexual. Estos últimos, luego de la fertilización, forman el cigoto (i) y posteriormente el ooquiste (k), con lo cual el ooquiste puede salir al medio ambiente (j) o reinfectar las células del hospedero. Adaptado de (Fayer y Xiao, 2008).....	19
Ilustración 2 – Electroforesis en gel de agarosa TAE 1X al 1% de las muestras sometidas a control de amplificación de la Región Metropolitana (RM). 15=muestra 15; 16=muestra 16; 17=muestra 17; C+=control positivo a <i>Cryptosporidium</i> ; C-= control negativo; 100bp=marcador de peso molecular de 100 pares de bases	37
Ilustración 3 – Electroforesis en gel de agarosa TAE 1X al 1% de las muestras sometidas a control de amplificación de la Región de Los Ríos (RR). 21=muestra 21; 22=muestra 22; 25=muestra 25; 28=muestra 28 C+=control positivo a <i>Cryptosporidium</i> ; C-= control negativo; 100bp=marcador de peso molecular de 100 pares de bases.....	38

RESUMEN

La diarrea neonatal bovina provocada por *Cryptosporidium parvum*, es una enfermedad parasitaria que produce grandes pérdidas económicas en los rebaños lecheros del mundo. Su principal signo es la presentación de diarrea en bovinos neonatales, menores a 30 días de edad y se caracteriza a una profusa eliminación de ooquistes. El descubrimiento del gen que traduce para la glicoproteína de 60 kDa (*gp60*) de *C. parvum* que posee dentro de su genoma un segmento polimórfico hipervariable de codones que traducen para el aminoácido serina, ha servido para el desarrollo de herramientas de epidemiología molecular por su utilidad para caracterizar distintas subpoblaciones a través de la caracterización de distintos subtipos. En Chile no existen investigaciones basadas en esta glicoproteína y por lo tanto resultó interesante para este trabajo, determinar el o los subtipos presentes en una muestra de heces de bovinos neonatales que presentaron diarrea. Se utilizaron 36 muestras de heces pertenecientes a dos regiones biogeográfica del país: Región Metropolitana (RM) y Región de Los Ríos (RR); previamente diagnósticas como positivas a *Cryptosporidium* spp mediante tinción de Zielh-Neelsen modificado (ZNm). Las muestras presentaban distinto grado de parasitosis y fueron sometidas a una prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional (PCR) del gen *SSU 18S rDNA (18S)* para confirmar su positividad. Veinte y nueve (29/36) muestras resultaron positivas a *18S*. Las muestras negativas fueron sometidas a una PCR control de amplificación que resultó en la presencia de 5/7 muestras no amplificadas. Las 29 muestras positivas a *18S* fueron sometidas a una PCR para amplificar un fragmento del gen *gp60*, la cual resultó en 15/29 muestras positivas a este gen. Los amplicones producidos en la PCR *gp60*, fueron secuenciados y analizados mediante programas bioinformáticos. La caracterización molecular dio como resultado la presencia de un reducido número de subtipos de *C. parvum*: IlaA15G2R1 (13), IlaA17G2R1 (1) y IlaA17G4R1 (1). La presencia del subtipo IlaA15G2R1 concuerda con la literatura internacional en ser el mayormente representado, siendo el único subtipo presente en las muestras de la RR y estar presente en 3/5 de las muestras de la RM. El subtipo IlaA17G2R1 solo ha sido

mencionado en dos oportunidades en la literatura internacional en bovinos neonatales, haciendo que esta descripción sea la tercera a nivel mundial. El subtipo IlaA17G4R1 solo ha sido descrito en humanos en la literatura revisada y, por lo tanto, este trabajo haría su primera descripción en bovinos neonatales. Ambos subtipos solo se presentaron en la RM (2/5). Además este estudio confirma la utilidad de la técnica de ZNm al ser más sensible que la PCR 18S en detectar la presencia de *Cryptosporidium* spp. El presente trabajo fue el primero en determinar el subtipo de *C. parvum* mediante el secuenciamiento de fragmentos de *gp60* en el país y caracterización molecular a través de técnicas bioinformáticas.

Palabras claves: *Cryptosporidium*, *gp60*, subtipos, Chile.

SUMMARY

Neonatal calf diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum*, it is a parasitic disease that produce mayor economic loses in worldwide dairy herds. The principal sign is diarrhea in preweaned calves accompanied with profuse oocyst shedding. The discovering of the gene that traduce for the 60 kDa glycoprotein of *C. parvum* which have a polymorphic hypervariable serine codon fragment, has served for the development of molecular epidemiology tools because the utility in the characterization of subpopulations using different subtypes. There are not such investigations in Chile based in this gene and that was interesting for the author of this work to determine different subtype presents in a small sample of feces from neonatal calves. Using 36 samples from two biogeographical districts: Región Metropolitana (RM) and Región de Los Ríos (RR), previously modified Ziehl Neelsen (mZN) positive, distinct parasitic level was present in the samples and a conventional *SSU 18S rDNA (18S)* Polymerase Chain Reaction (PCR) was made to confirm *Cryptosporidium* spp. Twenty nine (29/36) samples was 18S positive. Negative samples was submitted to PCR amplification control that turned out in 5/7 not amplified samples. 18S positive samples, was submitted to *gp60* PCR that result in 15/29 positive samples. Amplicons produced, were sequenced and analyzed by bioinformatics suites. Molecular characterization of the amplicons shows a reduced number of *C. parvum* subtypes in the samples: IlaA15G2R1 (13), IlaA17G2R1 (1) y IlaA17G4R1 (1). Presence of the IlaA15G2R1 subtype it is accord with de international scientific communications, the most representative *C. parvum* subtype. This was confirming in RR, which was the unique subtype describe and in RM was present in 3/5 samples. Subtype IlaA17G2R1 only has mentioned twice in neonatal calf, turning this investigation in the third description of the subtype worldwide. Subtype IlaA17G4R1 only been divulgated once in humans, therefore, this investigation would be the first characterization in bovines worldwide. Both subtype was presents in RM but not in RR. Further, this scientific work confirms the utility of mZN over 18S in terms of sensibility. This actual investigation was the first in it type

to characterize *C. parvum* subtypes in Chile by the sequencing and analyzing of *gp60* gene fragments amplicons.

Key words: *Cryptosporidium*, *gp60* gene, subtypes, Chile.

INTRODUCCIÓN

La diarrea neonatal bovina es una enfermedad entérica multicausal que provoca grandes pérdidas económicas en la industria lechera mundial (Klein-Jöbstl *et al.*, 2014), principalmente ligada a una alta morbilidad y mortalidad durante la etapa de cría de los animales (Uetake, 2013). Uno de los agentes causales más importantes, es el parásito *Cryptosporidium parvum* (Protozoo, Apicomplexa), que afecta principalmente a bovinos menores a 3 semanas de edad (Ocampo *et al.*, 2012; Fitz-Sánchez *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2013; Muñoz *et al.*, 2014; Mercado *et al.*, 2015). Los cuadros diarreicos se relacionan con una profusa eliminación de ooquistes (Masood *et al.*, 2013; Izhaki, 2014). Además, la diarrea puede ser debilitante y detrimental, sobre todo si es acompañada de otros agentes como virus o enterobacteria (Cho y Yoon, 2014).

Globalmente, *C. parvum* ha sido estudiado a nivel de especie, genotipo y subgenotipo, caracterizándose las poblaciones y estableciendo las relaciones epidemiológicas en la transmisión del parásito (Xiao, 2010; Budu-Amoako *et al.*, 2012; Salyer *et al.*, 2012; Iqbal *et al.*, 2015). El descubrimiento de la glicoproteína de 60 kDa en *C. parvum*, ha supuesto un avance en este tema dado que además de estar relacionado con la motilidad, adhesión e invasión de la célula del hospedero (Strong *et al.*, 2000), se puede utilizar como herramienta epidemiológica para definir las poblaciones de *C. parvum* en término de subtipos (Sulaiman *et al.*, 2005) en donde se ha observado que existen diversas estructuras poblacionales y diferencias en las rutas de infección, rango de hospedero y patogenicidad (De Waele *et al.*, 2013). Esto cobra importancia dado que es un agente zoonótico que puede ser transmitido entre bovinos, humanos y otros animales (Widmer y Sullivan, 2012).

En Chile, no existen trabajos hasta la fecha basados en esta glicoproteína y solo se han realizado estudios basados principalmente en técnicas morfológicas y moleculares, que dan como resultado la identificación del parásito solo a nivel de género y especie (Neira-Otero *et al.*, 2005; Fredes *et al.*, 2007; Díaz-Lee *et al.*, 2011; Muñoz *et al.*, 2011; Muñoz *et al.*, 2014).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue caracterizar los subtipos *C. parvum* presente en muestras de heces de bovinos neonatales de la Región Metropolitana y la Región de Los Ríos, mediante el estudio molecular de un fragmento del gen la glicoproteína de 60 kDA.

Al caracterizar molecularmente los distintos subtipos de *C. parvum*, se podría dar inicio a otros estudios relacionado a investigar las fuentes y rutas de infección tanto en bovinos como otros animales incluido el humano. Con esta información se podrían realizar mejoras en los protocolos de prevención y control de esta enfermedad en bovinos, para así aumentar la productividad del ganado lechero y disminuir los costos asociados al tratamiento de la diarrea neonatal bovina.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La diarrea neonatal bovina es un síndrome multifactorial que afecta a terneros antes del mes de vida y que es resultado de una combinación entre los factores de riesgo propios del hospedador y de los agentes infecciosos que la provocan (Blanchard, 2012). Provoca grandes pérdidas económicas en la industria lechera mundial, siendo la diarrea por si sola la causante del 20% de las enfermedades reportadas entre los terneros solo en EE.UU (USDA, 2010; Walker *et al.*, 2012). Además, provoca pérdidas por disminución en la productividad de las terneras de reposición, uso de medicamentos y tratamientos de los animales enfermos (Smith, 2012). Dentro del conjunto de agentes causales que la provocan destacan: *C. parvum*, *Escherichia coli* enterotoxigénica, rotavirus y coronavirus (Cho y Yoon, 2014).

C. parvum (Protozoo, Apicomplexa) produce una infección parasitaria intestinal también conocida como cryptosporidiosis. Este parásito posee una distribución cosmopolita y es considerado dentro de los principales protozoos patógenos causantes de diarrea en humanos, bovinos y otros animales de importancia económica (Rossle *et al.*, 2012; Rahmouni *et al.*, 2013; Aniesona y Bamaiyi, 2014; Lassen *et al.*, 2014; Webb *et al.*, 2014; Painter *et al.*, 2015; Quihui-Cota *et al.*, 2015).

Ernest Edward Tyzzer fue la primera persona en reconocer, describir y publicar sobre este parásito que encontraba frecuentemente en las glándulas gástricas de una variedad domesticada de ratón común, describiendo las fases asexuadas y sexuadas (Tyzzer, 1907) (Ilustración 1) y en 1910 lo describe en gran detalle, proponiendo el nombre de *Cryptosporidium* dada sus características taxonómicas inciertas hasta ese momento (Tyzzer, 1910). En 1912, Tyzzer describe el parásito demostrando experimentalmente que solo se desarrollaba en el intestino delgado de ratones de laboratorio. A este parásito se le propone el nombre de *C. parvum* (Tyzzer, 1912).

Por décadas los parásitos del género *Cryptosporidium* no tuvieron importancia como patógenos causantes de enfermedades en bovinos, hasta que en 1971, se reportaron los primeros casos de cryptosporidiosis en una hembra bovina de 8

meses de edad, que presentó diarrea y debilidad, donde en un corte histológico de yeyuno, se encontraron varios estadios del parásito (Pancieria *et al.*, 1971). Así también, en la misma década, se realizó el primer reporte de esta parasitosis en humanos (Meisel *et al.*, 1976; Nime *et al.*, 1976).

Hasta el momento se han identificado y descrito 25 especies válidas y más de 60 genotipos de *Cryptosporidium*, esto dado principalmente a los avances de las últimas décadas en biología molecular, bioquímica e informática (Ryan *et al.*, 2014).

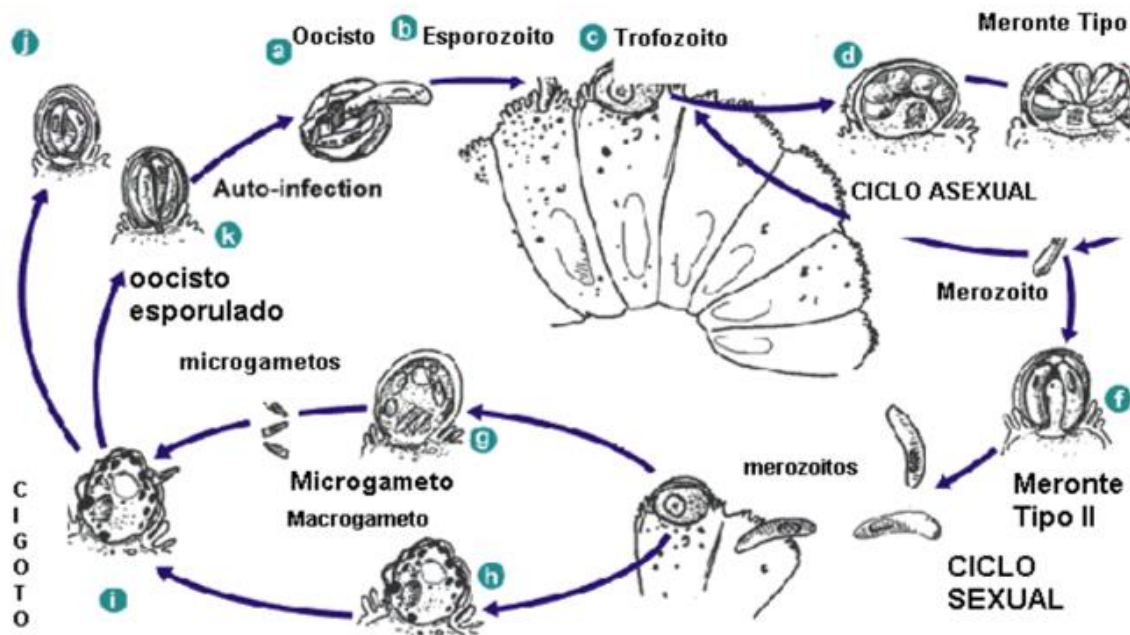


Ilustración 1 - Ciclo de vida de *Cryptosporidium*. Después de la ingestión por parte del hospedero, los oosquistes (a) eclosionan y los esporozoitos (b), salen a través de una estructura especial en la pared. A partir de los esporozoitos, en el sitio de infección del hospedero, se transforman en trofozoitos (c) de los cuales se producen 2 o 3 generaciones de merontes (d) de los cuales nacen merozoitos. La última generación de merontes (f) forma microgametocitos (g) y macrogametos (h), dando inicio a la fase sexual. Estos últimos, luego de la fertilización, forman el cigoto (i) y posteriormente el ooquiste (k), con lo cual el ooquiste puede salir al medio ambiente (j) o reinfectar las células del hospedero. Adaptado de (Fayer y Xiao, 2008)

Cryptosporidium parvum afecta principalmente a los bovinos, pero puede ser transmitido a otras especies incluido el hombre y por lo tanto es considerado zoonótico (Xiao, 2010).

En bovinos, la transmisión de la cryptosporidiosis se produce por el consumo de heces contaminadas y un animal susceptible contrae la enfermedad por el consumo de ooquistes (Al Mawly *et al.*, 2015). Estos animales pueden infectarse también por *C. andersoni*, *C. bovis* y *C. ryanae*, los cuales frecuentemente son encontrados en bovinos asintomáticos posterior al destete (Huang *et al.*, 2014; Shrestha *et al.*, 2014; Björkman *et al.*, 2015; Qi *et al.*, 2015; Wells *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015).

Cryptosporidium parvum afecta principalmente a terneros de 0 a 3 semanas de edad (Imre *et al.*, 2011; Rzezutka y Kaupke, 2013). Provoca diarrea asociada a una profusa eliminación de ooquistes en el orden de 3×10^{10} por gramo de heces (Zambriski *et al.*, 2013). La patogénesis de la infección no está estudiada totalmente, pero los signos clínicos pueden ser asociados a una disminución en la absorción y aumento de la secreción a nivel de íleon y las partes proximales del intestino grueso (Cacciò y Widmer, 2013). La enfermedad causa en estos animales, un variado grado de letargia, anorexia, fiebre y pérdida de la condición corporal, acompañada de deshidratación aguda, colapso y muerte, sobre todo si la infección es acompañada por *Escherichia coli* enterotoxigénica o rotavirus (Blanchard, 2012).

Además de la edad del animal, existen factores de riesgo asociados a esta enfermedad en el ganado y que son compartidos con otros agentes causantes de diarrea como por ejemplo el manejo de terneros durante el parto, inmunidad del ternero, estrés productivo y contaminación ambiental (Cho y Yoon, 2014).

La cryptosporidiosis en el ganado está bien documentada en el mundo (Santin *et al.*, 2008). La prevalencia a nivel de rebaño varía considerablemente y se ha reportado entre un 13-100%, variabilidad que se explica principalmente por el diseño experimental y la región donde se realizó el estudio (Del Coco *et al.*, 2014). En Chile, la cryptosporidiosis en terneros se ha documentado desde 1986 (Gorman *et al.*, 1986). En lecherías de la Región Metropolitana de Chile, se ha descrito *Cryptosporidium* en el orden de un 23% a un 49,8% (Gorman *et al.*, 1989; Muñoz *et*

al., 2011). Mientras que en lecherías de la Región de Los Ríos se ha descrito hasta un 57,9% de los animales estudiados y en un 100% de las lecherías en un estudio del año 2014 (Muñoz *et al.*, 2014).

La prevención y el control de la cryptosporidiosis en terneros se basan en la biología del parásito (Cho y Yoon, 2014), considerando que el ooquiste es resistente al ambiente y la mayoría de los desinfectantes utilizados (De Waele *et al.*, 2010). La prevención se realiza por medio de la disminución del contacto con ooquistes viables, principalmente con medidas higiénicas como limpieza de terneras, utensilios y del personal de manejo y disminuyendo el contacto con animales infectados (terneros o adultos asintomáticos) (Ollivett *et al.*, 2012). Además *Cryptosporidium*, es muy resistente a los tratamientos convencionales de agua, por ejemplo, los métodos de cloración son inefectivos para eliminar los ooquistes presentes (Fayer y Xiao, 2008). Más efectivos, son los métodos no tradicionales que involucran Ozono o radiación UV para el tratamiento del agua, que han demostrado ser eficiente desactivando los ooquistes de *Cryptosporidium* (Bridge *et al.*, 2010). Este método ha sido rápidamente adoptado por las agencias de protección ambiental y es el método de elección para el tratamiento de aguas superficiales y de consumo alrededor del mundo (WHO, 2011).

El tratamiento de la cryptosporidiosis en terneros requiere de rehidratación (oral o parenteral), antidiarréicos y farmacoterapia con drogas contra el agente. Esto último, mediante el uso de drogas como Halofuginona lactato (Halocur®, MSD Animal Health) que ha sido aprobada en algunos países para el tratamiento y la prevención de la cryptosporidiosis (De Waele *et al.*, 2010; Wyatt *et al.*, 2010; Baxter, 2013). El uso de nitazoxanida, también ha dado buenos resultados en forma experimental, disminuyendo la excreción de ooquistes en las heces de terneros con diarrea (Ollivett *et al.*, 2012).

El diagnóstico de laboratorio es necesario para la confirmación de casos de cryptosporidiosis. Este se puede realizar en muestras de heces mediante la detección de ooquistes, de antígenos de superficie del ooquiste o de DNA del parásito (Blanchard, 2012), aunque la examinación histológica de biopsia intestinal

también es posible (Wyatt *et al.*, 2010). El método de rutina, aunque esta técnica requiere de un operador experimentado, es la examinación microscópica de muestras de heces que se utiliza para la detección de ooquistes del parásito, los que son previamente concentrados y preservados en formalina (Cacciò y Widmer, 2013). A través de microscopio óptico, se pueden observar con dificultad los ooquistes de *Cryptosporidium*, ya que miden apenas entre 4 y 5 μm . Estos aparecen de pared gruesa, incoloros, esféricos o levemente ovoides y conteniendo cuatro esporozoitos en forma elongada (Masood *et al.*, 2013; Weyl-Fenstein *et al.*, 2014). La particularidad de que los ooquiste de *Cryptosporidium* sean incoloros presenta un desafío. Esta característica indeseada, puede ser subsanada al diagnóstico dado que estas estructuras son ácido-alcohol resistentes y son posibles de identificar mediante tinciones en extendidos de heces, como es la de Ziehl-Neelsen modificada (ZNm) (Henriksen y Pohlenz, 1981), que pasó a ser la prueba de laboratorio mayormente utilizada (Fayer y Xiao, 2008). Muchos de los ooquistes de las distintas especies del género *Cryptosporidium* son similares en forma y dimensiones, por ello la tinción de ZNm, es útil para diferenciarlos de otros objetos microscópicos, pero no para determinar especies (Fayer y Xiao, 2008). Mediante el diagnóstico microscópico, no es posible entender la transmisión de las infecciones por *Cryptosporidium* (Xiao, 2010), la cual si puede ser realizada a través de métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) (Morgan-Ryan *et al.*, 2002).

El diagnóstico molecular a través de PCR ha sido utilizado para detectar *Cryptosporidium* con gran sensibilidad bajo condiciones experimentales (Sturbaum *et al.*, 2001). Esta técnica está restringida principalmente a laboratorios especializados y su sensibilidad varía de acuerdo al tipo de estudio (Fayer y Xiao, 2008). La efectividad de la detección por medio de PCR, depende de la extracción del DNA, la cual se ve obstaculizada por la robustez de la pared del ooquiste (Jex *et al.*, 2008). Además, la sensibilidad de la amplificación se ve disminuida por la presencia de inhibidores orgánicos e inorgánicos de PCR, presentes en las muestras de heces. Inhibidores orgánicos como bilirrubina, sales biliares, y polisacáridos complejos (Fayer y Xiao, 2008) e inorgánicos como formalina (medio

de preservación de muestras) son potentes inhibidores (Zhang *et al.*, 2013). Por estos inconvenientes, los protocolos de extracción de DNA suelen requerir de una serie de pasos, que pueden incluir la disrupción de la pared del ooquiste con perlas de sílice, ciclos de congelamiento-calentamiento, calentamiento de la muestra y eliminación de inhibidores de PCR por tratamiento químico (Jex *et al.*, 2008).

Existen variados métodos de PCR, desde aquellos que permiten identificar el género del parásito, a los que están diseñados para la identificación por especie. Estos últimos pueden ser realizados por medio de una PCR por polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), por PCR en tiempo real o secuenciamiento de productos de PCR que, de acuerdo al laboratorio, son utilizadas como método referencial (Xiao, 2010).

Los sitios de elección en el genoma (genes) para la identificación de *Cryptosporidium* por medio del secuenciamiento de sus fragmentos mediante PCR, han sido la sub-unidad ribosomal 18S (*SSU rDNA 18S*), *lib13*, *ML1* y *ML2*, *HSP70*, β -tubulina, *COWP* y el gen de la glicoproteína de 60 kDa (*gp60*) (Gatei *et al.*, 2003; Tanriverdi *et al.*, 2003; Pirestani *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2010; Burton *et al.*, 2010; Hadfield *et al.*, 2011). Todos son utilizados en mayor o menor medida, pero trabajos recientes han confirmado la utilidad de la secuenciación de un fragmento del gen de *gp60*, en el estudio de la estructura de la población y en la dinámica de la transmisión de la cryptosporidiosis (Ruecker *et al.*, 2011; Imre *et al.*, 2013; Navarro-I-Martinez *et al.*, 2013; Rieux *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2013; Wilkes *et al.*, 2013). Este gen codifica para una glicoproteína precursora de 330 aminoácidos, que se expresa durante la fase de merogonia, la cual es escindida proteolíticamente en dos glicoproteínas de 15 y 45 kDa, las que se localizan en la superficie de esporozoítos/merozoítos y guardan relación con la motilidad y con la adhesión a la célula intestinal del hospedero (Strong *et al.*, 2000).

Su aplicación como marcador genético, está dado por que es un gen único (Strong *et al.*, 2000), lo que disminuye la posibilidad de encontrar polimorfismo en la secuencia dentro de un mismo individuo, facilitando el análisis directo de la secuencia de DNA (Jex *et al.*, 2007). Además, contiene múltiples regiones las cuales

muestran una alta tasa de mutación, en especial, una región micro-satélite “hipervariable”, que comprende repeticiones de tres nucleótidos que codifican para serina (Strong *et al.*, 2000). El gen de *gp60* presenta niveles de variación nucleotídica mayor que el promedio general en el genoma del *Cryptosporidium* y sus alelos (subtipos) son utilizados para definir grupos dentro de la especie (familias de subtipos) (Abal-Fabeiro *et al.*, 2013). Estos son nombrados por medio de un prefijo especie-específico “II” para *Cryptosporidium parvum* (Xiao, 2010) y seguidos de una letra para identificar que cada subtipo corresponde a una familia de subtipos diferente de *gp60*, que se diferencian en las rutas de infección, rango de hospedero y patogenicidad (Cama *et al.*, 2008; Adamu *et al.*, 2010; Nazemalhosseini-Mojarad *et al.*, 2011). Hasta el año 2010 a nivel global, se habían identificado 11 familias de subtipo para *C. parvum* (Xiao, 2010).

La determinación de cada subtipo se realiza mediante el conteo de trinucleótidos para serina presente en la región repetitiva del gen. De acuerdo al tipo de repetición, se le asigna una letra (A=TCA, G=TCG y T=TCT), seguido por un número que indica cuantas repeticiones presenta. De la misma forma, si este posee repeticiones raras como ACATCA, se le asigna una R al final del subtipo (Sulaiman *et al.*, 2005). La determinación de cada especie/genotipo y/o subtipo es imprescindible para así entender la forma de transmisión y establecer las correspondientes relaciones epidemiológicas (Chalmers y Katzer, 2013). También debe tenerse en cuenta que *gp60* no amplifica para DNA de cualquier otra especie distante de *C. parvum* (Xiao, 2010).

Desde el punto de vista del hospedero y la patogenicidad, el análisis de *gp60* tiene importancia por su heterogeneidad y relevancia en la biología del parásito. Dado esto, es posible relacionarlo con las características propias del hospedero y la presentación clínica de la enfermedad (Xiao, 2010). Desde el punto de vista del hospedero, se ha reportado que la familia de subtipos de *C. parvum* IIa afecta principalmente a terneros, mientras que la familia de subtipos IIc afecta además a corderos y cabritos (Quilez *et al.*, 2008a; Quilez *et al.*, 2008b). Remarcablemente, la familia de subtipos IIc de *C. parvum*, solamente ha sido descrito en humanos

inmunocomprometidos (Alves *et al.*, 2003). Pero no se han encontrado relaciones entre las características clínicas de la enfermedad y las distintas familias de subtipos de *C. parvum* (Zhang *et al.*, 2013). En cambio, en otro parásito donde se ha aislado *gp60* como *C. hominis*, se han encontrado claras diferencias en la presentación clínica de la enfermedad entre distintas familias de subtipos en zonas endémicas. Pacientes humanos positivos al virus de la inmunodeficiencia humana, infectados con la familia de subtipo IId de *C. hominis*, se asocian de mayor forma con diarrea crónica que aquellos pacientes infectados con la familia de subtipos Ia (Cama *et al.*, 2007).

Existen diferencias geográficas en la presentación de subtipos de *C. parvum* en terneros, que pueden ser de ayuda para predecir la epidemiología de las infecciones por *Cryptosporidium* (Plutzer y Karanis, 2009). Aunque la mayoría de los estudios se han realizado en países desarrollados, los resultados indican que los terneros son frecuentemente infectados por la familia de subtipo de *C. parvum* Ila y un subtipo en especial (IlaA15G2R1) es el que mayormente afecta a estos animales (Xiao, 2010). Una subpoblación de este subtipo es que causaría la mayoría de los casos de *Cryptosporidiosis* en el mundo, dada sus características epidémicas (Feng *et al.*, 2013). Otros subtipos, sin embargo, predominan más regionalmente, el IlaA16G1R1 en Hungría, Slovenia, Belgrado, Serbia, Montenegro y el IlaA18G3R1 en el Reino Unido y Australia (Xiao, 2010). También, se ha reportado que todos los subtipos de *gp60* caracterizados en Australia y Europa solo tienen 1 copia de la secuencia de repetición rara ACATCA (R1), mientras que en Estados Unidos tienen 2 copias de esta secuencia (R2) (Xiao *et al.*, 2007). Por otro lado, la familia de subtipos de *C. parvum* IId ha sido encontrada en terneros de Europa (Xiao, 2010) y es la predominante en China y Egipto (Amer *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). En bovinos de Latinoamérica solamente se han realizado estudios en Argentina y Brasil, donde predominan los subtipos de *C. parvum* de la familia Ila como IlaA14G2R1, IlaA18G1R1, IlaA19G2R2, IlaA20G1R1, IlaA20G2R2, IlaA22G1R1 (Couto *et al.*, 2013; Tomazic *et al.*, 2013; Del Coco *et al.*, 2014; Heckler *et al.*, 2015).

No hay consenso al respecto de que patrón evolutivo (panmixia, clonal o una combinación de ambos) se presenta en el gen de *gp60* en la población (Robinson y Chalmers, 2012). Investigaciones que se han enfocado en lecherías con historial de diarrea, han mostrado que las estrategias de manejo del rebaño pueden afectar la distribución de los subtipos de *C. parvum* (Cacciò y Widmer, 2013). Panmixia podría seguir en aquellas regiones del mundo donde la enfermedad es más prevalente, con alta densidad de animales y frecuente movimiento de ganado entre distintas zonas, permitiendo el apareamiento al azar de la población de *C. parvum* dentro del hospedero (De Waele *et al.*, 2013). En estas zonas con alto movimiento animal, se pueden encontrar una discreta cantidad de subtipos de *C. parvum* en la población general, pero varios de estos pueden estar presentes en un rebaño (Cacciò y Widmer, 2013). En cambio, en zonas con un bajo movimiento animal, puede existir en conjunto una estructura de expansión clonal y algún intercambio genético dentro de la población, explicando un bajo índice de asociación entre los distintos subtipos de *C. parvum*, pero una alta diversidad (Drumo *et al.*, 2012). Esto explica la presencia de una amplia cantidad de subtipos en la población general, pero la presencia de un subtipo por rebaño que puede persistir a través del tiempo (Cacciò y Widmer, 2013).

Hasta el presente no existen estudios sobre la diversidad de subtipos de *C. parvum* en Chile ni epidemiológicos moleculares basados en este gen tanto en terneros como humanos. En cuanto a la riqueza de estos subtipos posiblemente, dada las características geográficas de nuestro país y de perfil productivo, se podrían encontrar una discreta cantidad de subtipos.

De realizarse estos estudios será posible establecer que subtipos de *C. parvum* involucrados en la transmisión, como también variables importantes en la epidemiología de la cryptosporidiosis que puedan ser de ayuda en su control y la prevención de la enfermedad, que causa grandes pérdidas en la industria ganadera nacional como también mundial.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La cryptosporidiosis en bovinos neonatales de dos regiones biogeográficas de Chile es causada por un reducido número de subtipos de *Cryptosporidium parvum*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el subtipo de *Cryptosporidium parvum*, que afecta a una muestra de ganado neonatal con cuadros diarreicos de dos regiones biogeográficas de Chile.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Secuenciar un fragmento del gen de *gp60* en muestras de heces que contengan ooquistes de *Cryptosporidium parvum* al examen microscópico.
2. Identificar el subtipo de *gp60* en las secuencias generadas desde las muestras de heces.
3. Comparar los subtipos de *gp60* identificados de dos regiones biogeográficas de Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS

Para la realización de esta investigación, se utilizaron tres grupos de muestras que fueron recolectadas entre los años 2007-2013. Dos grupos de muestras pertenecían a dos estudios previos: 1- Título: Sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tinción de Ziehl-Neelsen y Crypto-strip en el diagnóstico de laboratorio de la cryptosporidiosis humana y bovina en Chile. Año de inicio: 2007, Año de finalización: 2009. Financiado por VID, Universidad de Chile y 2- Título: Creación de un sistema de información geográfica para el diagnóstico del protozoo zoonótico *Cryptosporidium* mediante dos pruebas diagnósticas (ZN y AU) en terneros de la provincia de Valdivia, Chile. Proyecto DID S-2010 19 financiado por la Universidad Austral de Chile. El último grupo de muestras, fue donado en el año 2013 por el Prof. Dr. Mario Duchén A. del Departamento de Fomento de la Producción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRAS

Las muestras fueron recolectadas desde terneras diarreicas de menos de 1 mes de vida, según protocolo (Anexo 1), directamente del recto de cada animal y se depositaron en tubos tapa rosca de 50 ml con etanol al 70%. Los tubos fueron transferidos desde su ubicación inicial hacia el laboratorio de la Unidad Docente de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y se encontraban bajo refrigeración a 4°C.

NÚMERO Y REGIÓN DE ORIGEN DE LAS MUESTRAS

Para los estudios comparativos 36 muestras fueron elegidas de dos regiones de Chile con perfiles productivos lecheros (Tabla 1). La elección del número de muestra fue por conveniencia y se basó en la cantidad de ooquistes presentes en ellas. Solo se eligieron las que presentaban algún grado de parasitosis al examen de ZNm realizados por los investigadores responsables de dichos estudios.

Tabla 1 - Número de muestras para el estudio, dividido por región

Región	N
Metropolitana	18
De los Ríos	18
Total	36

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

TÉCNICA DE TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN MODIFICADA

Para cumplir los objetivos propuestos y para verificar el grado de parasitosis de las muestras, en forma individual, cada uno de los tubos en los cuales estaban contenidas (n=36) fueron centrifugados a 5000 g por 5 minutos y del sedimento posterior a la centrifugación, se tomó una pequeña cantidad con la que se realizó un extendido de 1 cm de largo por 0,5 cm de ancho en un portaobjeto y se dejó en secado a temperatura ambiente.

Realizado el extendido inicial, se vació fucsina básica sobre el portaobjeto hasta cubrir completamente. Luego de esto las láminas se colocaron sobre un mechero y se elevó la temperatura de estas hasta la emisión de vapores, sin hervir el colorante. Se dejó actuar este último por 20 minutos. Luego se lavó el portaobjeto con agua corriente hasta eliminar todo exceso de fucsina. Posteriormente, se vació sobre este alcohol-ácido, hasta cubrir completamente el extendido. Se mantuvo el reactivo durante 30 segundos y luego se lavó con agua corriente, eliminando todo exceso de este producto. Después, las láminas se cubrieron en su totalidad con azul de metileno, el cual se dejó actuar por 2 a 5 minutos. Finalmente se lavó la placa bajo el agua corriente, eliminando todo exceso de colorante, para finalmente dejar secar a temperatura ambiente.

Los portaobjetos teñidos fueron observados bajo microscopio óptico directamente con objetivo 100X en aceite de inmersión. Las muestras se clasificaron mediante un sistema de 3 cruces indicando el tenor de parasitismo de las muestras (+=leve; ++=medio, +++=alto). Para una correcta lectura de las muestras bajo el microscopio

óptico, fue utilizado un control positivo correspondiente a una muestra de heces bovinas infectada con *Cryptosporidium* spp. de 3 cruces (+++).

Una vez que las muestras fueron verificadas de acuerdo a su grado de parasitosis por medio de la técnica de tinción de ZNm, estas fueron procesadas mediante 2 métodos: método 1 que corresponde a la extracción del DNA desde las muestras de heces y PCR de *gp60* del DNA extraído de cada una de las muestras y método 2 que corresponde al secuenciamiento de cada una de las muestras positivas a la PCR *gp60* y posterior análisis informático de las secuencias generadas.

MÉTODO 1

EXTRACCIÓN DEL DNA

Para el objetivo 1, se extrajo DNA mediante el kit comercial ZR Fecal DNA MiniPrep™ (Zymo Research, California, USA) diseñado específicamente para obtener DNA libre de inhibidores, desde muestras de heces conservadas en etanol al 70% (Anexo 2).

AMPLIFICACIÓN DEL GEN SSU 18S rDNA

Obtenido el DNA del paso anterior, se realizó una PCR convencional para amplificar un segmento del gen de la subunidad pequeña 18S rDNA (Small Subunit 18S ribosomal DNA o SSU 18S rDNA por sus siglas en inglés). Se utilizó como templado 1 µl del producto de extracción directa de heces con los partidores forward CR18S3543F (5' GTT AAG TAT AAA CCC CTT TAC AAG TAT C 3') y reverse CR18S31078R (5' CCT CCA ATC TCT AGT TGG C-3') (Mercado y Ozaki, comunicación personal, 2010 y citados por Muñoz *et al.*, 2011) que dan como resultado un amplicón de 522 pares de bases (pb). Los productos de PCR resultantes serán observados en gel de agarosa TAE 1X al 1%. Además, para la reacción de la PCR convencional se utilizó el siguiente protocolo:

- 1 µl de mezcla de dNTP's 2,5 mM (RBC Bioscience, Taiwan, Rep. De China)
- 1 µl de cada uno de los partidores (20 ng/µl) (Invitrogen, California, USA)
- 0,1 µl de HotMaster® Taq Polimerasa (5 UI/ul) (5Prime, Maryland, USA)
- 2 µl de HotMaster® 10X Reaction Buffer (5Prime, Maryland, USA)

- UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water hasta completar 15 µl (Invitrogen, California, USA)

AMPLIFICACION DEL GEN CYB BOVINO (CONTROL DE AMPLIFICACIÓN)

En aquellas muestras que resultaron negativas a la PCR convencional del gen de 18S, se realizó una PCR control de amplificación. En esta amplificación se utilizó como templado 5 µl del producto de extracción directa de heces, con los partidores forward CYB1 (5' CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA 3') y reverse CYB2 (5' GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA 3') (Estrada-Chávez *et al.*, 2004). Estos partidores dan como resultado un amplicón de 480-500 pb. Para la reacción de la PCR se utilizó el siguiente protocolo. Por cada tubo de PCR de 15 µl totales se utilizó además:

- 1 µl de mezcla de dNTP's 2,5 mM (RBC Bioscience, Taiwan, Rep. De China)
- 2 µl de mezcla de partidores F y R (20 ng/µl) (Invitrogen, California, USA)
- 0,1 µl de HotMaster® Taq Polimerasa (5 UI/ul) (5Prime, Maryland, USA)
- 2 µl de HotMaster® 10X Reaction Buffer (5Prime, Maryland, USA)
- UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water hasta completar 15 µl (Invitrogen, California, USA)

AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE GP60

De las muestras positivas a la PCR SSU 18S rDNA, con el DNA obtenido en la extracción de heces, se realizó una PCR convencional para amplificar solo un segmento del gen de *gp60*.

En la amplificación se utilizó como templado 2,5 µl del producto de la extracción directa de heces, con los partidores forward gp15-ATG (5' ATG AGA TTG TCG CTC ATT ATC 3') y reverse gp15-STOP (5' TTA CAA CAC GAA TAA GGC TGC 3') (Strong *et al.*, 2000) que dan como resultado un amplicón de 900-1000 pb. Los productos de la PCR convencional generados, fueron preservados en congelador a -20°C. Para la reacción de PCR se utilizó el siguiente protocolo. Por cada tubo de PCR de 15 µl totales se utilizó:

- 1,6 µl de mezcla de dNTP's 2,5 mM (RBC Bioscience, Taiwan, Rep. De China)
- 1,6 µl de mezcla de partidores F y R (20 ng/µl) (Invitrogen, California, USA)
- 0,3 µl de HotMaster® Taq Polimerasa (5 UI/ul) (5Prime, Maryland, USA)
- 1,6 µl de HotMaster® 10X Reaction Buffer (5Prime, Maryland, USA)
- UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water hasta completar 15 µl (Invitrogen, California, USA)

El resultado de la PCR convencional se verificó mediante la observación del amplicón producido, en gel de agarosa TAE 1X al 1%. Para el cumplimiento del objetivo 1, dada la producción de un fragmento de buena calidad (peso esperado, sin bandas inespecíficas), fue enviado a secuenciamiento.

MÉTODO 2

SECUENCIAMIENTO DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Las muestras fueron procesadas mediante secuenciamiento di-deoxiterminal en un servicio externo (Macrogen Inc., Seúl, República de Corea), que asegura un correcto tratamiento de las muestras enviadas. Este servicio se encargó de purificar las muestras, secuenciar y subir sus resultados a una base de datos para su posterior análisis.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS DE DNA GENERADAS

Para el cumplimiento del objetivo 2, se analizó cada secuencia para establecer género, especie y subtipo de cada una de las muestras.

Para establecer la especie y familia de subtipo, se utilizó la herramienta bioinformática en línea, B.L.A.S.T. (Basic Local Alignment Search Tool) del Centro Nacional de Información Biotecnológica de Estados Unidos (National Center for Biotechnology Information, NCBI en sus siglas en inglés), la cual mediante el alineamiento múltiple de cada una de las secuencias generadas encontró similitudes entre las secuencias presentes en la base de datos Genbank® del NCBI. La especie del parásito en cada muestra se estableció mediante la comparación de aquellas secuencias obtenidas mediante PCR convencional con las secuencias de

la base de datos, a través de su porcentaje de identidad (IDENTITY) y valor esperado (E-value). En términos comparativos se utilizaron solo las 10 primeras secuencias obtenidas que cumplían con identidad igual o mayor al 98%. ($\geq 98\%$) y un valor esperado $E \leq 1 \times 10^{-6}$.

Para establecer el subtipo de cada muestra, se utilizó la metodología propuesta por Sulaiman *et al.*, en 2005. El conteo de cada triplete que codifica para serina de la región microsatélite hipervariable (tramo de serina), se realizó en el programa bioinformático Sequencher® 5.1 (Gene Codes Corporation, Miami, USA). Mediante este programa se buscó una secuencia específica del gen que antecede al tramo de serina. Esta metodología se utilizó para realizar el conteo de los codones que traducen para el aminoácido. Los codones TCA, TCG, TCT y las repeticiones raras que pueden aparecer, se codificaron mediante las letras A, G, T y R respectivamente. Luego se asignó un número que corresponde al número total de estos codones en el segmento polimérico de serinas.

Posteriormente toda la información obtenida del análisis bioinformático se agrupó en una tabla que contenía la identificación, la región de origen, género-especie y subtipo de las muestras.

DESCRIPCIÓN ESTADÍSTICA DE LAS SECUENCIAS DE DNA GENERADAS

Se presentaron los resultados mediante estadística descriptiva utilizando medidas resumen y tablas de frecuencias. Se utilizó el estadígrafo Chi-cuadrado para comparar muestras no relacionadas.

RESULTADOS

Un total de 36 muestras de heces de ternero diarreicos fueron estudiadas. Los tubos de 50 ml que las contenían, presentaban distinta cantidad de heces cada uno, pero suficiente para realizar las pruebas moleculares propuestas en la metodología. Las heces se presentaron acuosas y sin contenido vegetal. El color variaba de verde oscuro a blanquecino. El 100% de las muestras correspondió a terneros no destetados, la edad de los cuales fluctuaba entre 0 y 30 días de nacido. Las muestras provinieron de dos regiones biogeográficas de Chile: Región Metropolitana de Santiago (RM) y Región de los Ríos (RR) que en proporción correspondiendo a un 50% (18/36) de las muestras pertenecientes a la RM y un 50% (18/36) perteneciente a la RR.

Para cada región biogeográfica de estudio, las muestras provenían de diversas divisiones administrativas. En la RM, se estudiaron muestras provenientes de dos comunas, correspondiendo un 66.7% (12/18) a una lechería ubicada en la comuna de El Monte en la provincia de Talagante y un 33.3% (6/18) a una lechería ubicada en la comuna de Melipilla en la provincia de Melipilla. En la RR, las muestras provenían de en 4 lecherías correspondientes respectivamente un 16,7% (3/18) a la comuna de Máfil, un 22,2% (4/18) a la comuna de Mariquina, un 22,2% a la comuna Valdivia todas en la provincia de Valdivia y un 38,9% (7/18) a la comuna Río Bueno en la provincia de Ranco. La distribución biogeográfica de la totalidad de las muestras se observa en el Tabla 2.

Tabla 2 - Distribución geográfica por comuna de las muestras estudiadas

Región	Comuna	n	%
RM	El Monte	12	33,30%
	Melipilla	6	16,70%
RR	Máfil	3	8,30%
	Mariquina	4	11,10%
	Río Bueno	7	19,40%
	Valdivia	4	11,10%
Total		36	100%

El total de las muestras fueron procesadas de acuerdo a la metodología propuesta. Las muestras de heces fueron extendidas en un portaobjeto y luego teñidas mediante la técnica de ZNm, obteniéndose que en un 75% (27/36) de las muestras poseían un bajo grado de presencia de parásitos al examen microscópico, mientras que un 11,1% (4/36) y un 13,9% (5/36) poseían un mediano y alto grado de presencia de parásitos al examen microscópico, respectivamente (Cuadro 3). Posteriormente las muestras fueron procesadas para extracción de DNA según protocolo. El DNA resultante fue utilizado para realizar una PCR convencional 18S para determinar si existía DNA del género *Cryptosporidium* en la muestra el cual produjo un amplicón de 520 pb. En la totalidad de las muestras estudiadas se obtuvo que un 80,6% (29/36) fueron positivas (Tabla 3). El porcentaje de muestras positivas por región biogeográfica muestra que en la RM, un 83,3% (15/18) resultaron positivas y en la RR un 77,4% (14/18) fueron positivas a las PCR 18S (Tabla 3).

Tabla 3 – Resultados al examen microscópico de muestras extendidas y teñidas mediante ZNm (grado de parasitosis: + (bajo), ++ (mediano), +++ (alto)) y a la PCR convencional SSU 18S rDNA

Región	ZNm			Total	18S
	+	++	+++		Positivas* (%)
RM	16	1	1	18	15 (83,3%)
RR	11	3	4	18	14 (77,4%)
Total	27	4	5	36	29 (80,5%)

*SSU 18S rDNA Negativas (RM 3/18; RR 4/18)

Las muestras negativas a la PCR 18S (7/36), se sometieron a una PCR de control de amplificación y esta resultó negativa en 5/36 (Ilustraciones 2 y 3)

Ilustración 2 –

Electroforesis en gel de agarosa TAE 1X al 1% de las muestras sometidas a control de amplificación de la Región Metropolitana (RM). 15=muestra 15; 16=muestra 16; 17=muestra 17; C+=control positivo a *Cryptosporidium*; C-=control negativo; 100bp=marcador de peso molecular de 100 pares de bases

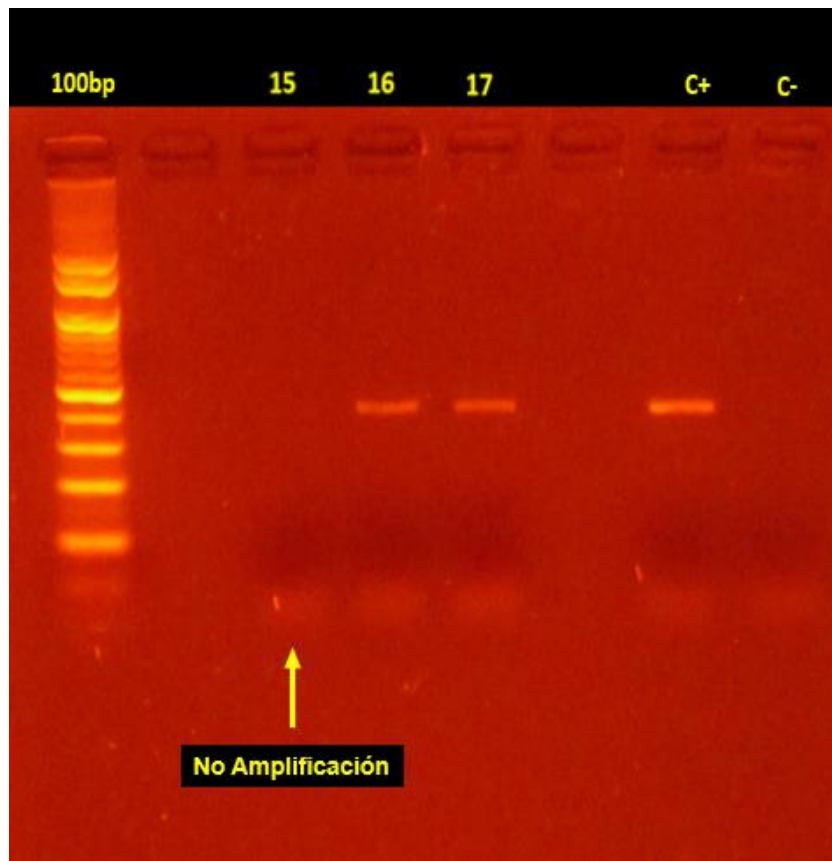
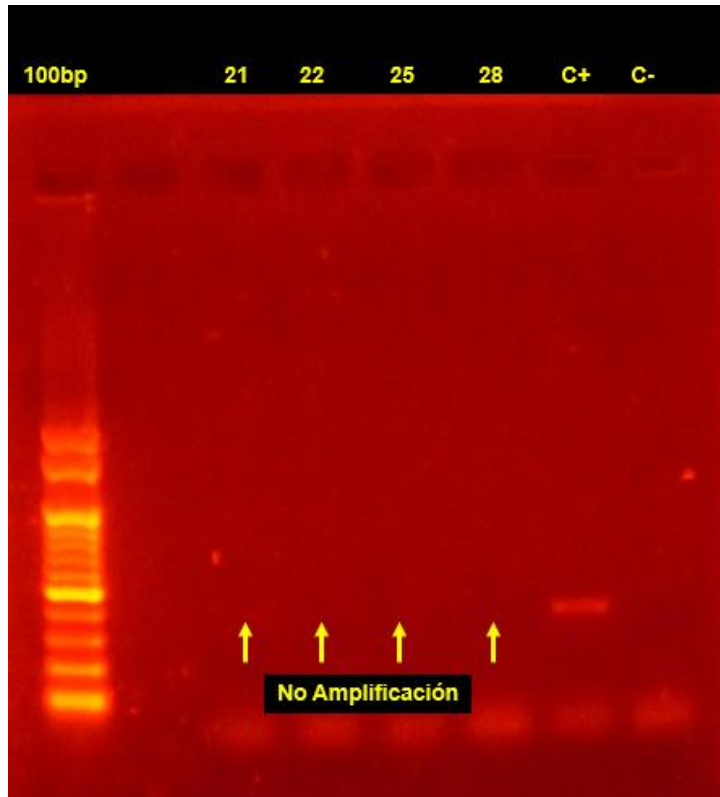


Ilustración 3 – Electroforesis en gel de agarosa TAE 1X al 1% de las muestras sometidas a control de amplificación de la Región de Los Ríos (RR). 21=muestra 21; 22=muestra 22; 25=muestra 25; 28=muestra 28 C+=control positivo a *Cryptosporidium*; C-=control negativo; 100bp=marcador de peso molecular de 100 pares de bases



Las 29 muestras positivas a la PCR SSU 18S rDNA fueron procesadas para la PCR *gp60* de acuerdo los protocolos de la investigación. Esta PCR arroja un amplicón de alrededor de 900 pb. De estas 29 muestras, un 51,7% (15/29) resultaron positivas. La distribución de positividad a PCR *gp60* por región del total de muestras y de las muestras positivas a PCR 18S se observa en la Tabla 4.

Tabla 4 – Muestras positivas a PCR *gp60* distribuidas por región de estudio del total de muestras positivas a PCR 18S

Región	% (n) Positividad a PCR <i>gp60</i>
RM	33,3% (5/15)
RR	71,4% (10/14)*

*Chi-Cuadrado 2,821, $p > 0,05$, no significativo

Los productos resultantes de la amplificación del gen de *gp60* fueron enviados a una empresa externa (Macrogen Inc., Seúl, República de Corea) con el fin de obtener su secuencia de nucleótidos a través del procedimiento Sanger (di-

deoxiterminal). Los resultados obtenidos de la secuenciación de DNA fueron cargados en la base de datos de la empresa secuenciadora para su posterior descarga a través de internet. Cada una de las secuencias poseía 4 archivos informáticos (*.ab1, *.phd.1, *.pdf y *.txt), de los cuales el archivo *.ab1 resultó de utilidad para la totalidad de las pruebas bioinformáticas utilizadas, dado que en este tipo de archivo se pueden observar la secuencia de DNA como también su cromatograma.

El primer análisis bioinformático que se realizó fue para establecer la especie del parásito investigado. Esto se realizó mediante la herramienta bioinformática B.L.A.S.T. Se creó un archivo masivo [*.fasta] con todas las secuencias editadas, este archivo se subió a la plataforma bioinformática para realizar un alineamiento múltiple de cada una de las secuencias con aquellas que se encuentran en la base de datos del NCBI.

Luego de que las secuencias fueron identificadas como *C. parvum*, se procedió a examinar la secuencia de nucleótidos en busca de un segmento repetitivo de codones que codifican para serinas para realizar la subgenotipificación. Este segmento se encuentra en el extremo 5' de la secuencia de DNA. Para su búsqueda, se utilizó un programa bioinformático (Sequencher® 5.1) el cual permite buscar secuencias de nucleótidos específicas. En *C. parvum*, el segmento repetitivo de *gp60* se encuentra precedido de una secuencia única de nucleótidos que se caracteriza por presentar 3 guaninas y 1 citosina (5' GGGC 3') y que es única en el gen de *gp60*. Esta secuencia se pudo observar en el 100% de los fragmentos (Tabla 5). Además este segmento polimérico repetitivo se encuentra circunscrito en el extremo 3' por una secuencia de seis nucleótidos, ACATCA que marca el fin del segmento polimérico y que también se pudo observar en el 100% de las secuencias estudiadas (Tabla 5). Además, este segmento es único en todas las secuencias repetitivas de la familia de subtipos IIa de *gp60* de *C. parvum* (Xiao 2010).

Tabla 5 – Secuencia de DNA del segmento polimérico del gen de gp60. Se observa subrayado y en negrita que este se encuentra circunscrito entre las secuencias GGGC por el extremo 5' y ACATCA por el extremo 3'

Muestra	Presencia de segmento 5' GGGC 3' y 5' ACATCA 3'
1	<u>GGGC</u> TCATCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATCATCATCA TCATCATCA <u>ACATCA</u>
3	<u>GGGC</u> TCATCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATCATCATCA TCATCATCA <u>ACATCA</u>
7	<u>GGGC</u> TCATCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATCATCATCA TCATCATCA <u>ACATCA</u>
13	<u>GGGC</u> TCATCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATCATCATCA TCATCATCATCATCA <u>ACATCA</u>
18	<u>GGGC</u> TCATCATCGTCATCGTCATCGTCATCGTCATCATCATCA TCATCATCATCATCATCA <u>ACATCA</u>
19	<u>GGGC</u> TCATCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATCATCATCA TCATCATCA <u>ACATCA</u>
24	<u>GGGC</u> TCATCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATCATCATCA TCATCATCA <u>ACATCA</u>
26	<u>GGGC</u> TCATCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATCATCATCA TCATCATCA <u>ACATCA</u>
29	<u>GGGC</u> TCATCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATCATCATCA TCATCATCA <u>ACATCA</u>
30	<u>GGGC</u> TCATCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATCATCATCA TCATCATCA <u>ACATCA</u>
32	<u>GGGC</u> TCATCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATCATCATCA TCATCATCA <u>ACATCA</u>
33	<u>GGGC</u> TCATCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATCATCATCA TCATCATCA <u>ACATCA</u>
34	<u>GGGC</u> TCATCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATCATCATCA TCATCATCA <u>ACATCA</u>

35	GGGC TCATCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATCATCATCA TCATCATCA ACATCA
36	GGGC TCATCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATCATCATCA TCATCATCA ACATCA

Siguiendo esta metodología se ubicó dentro de las secuencias el fragmento repetitivo polimérico (Tabla 5), el cual fue utilizado para subtipificar cada una de ellas según la metodología descrita por Sulaiman *et al.*, 2005. La subtipificación dio como resultado el panorama observado en el Tabla 6.

Tabla 6 – Subtipos de gp60 de las secuencias en estudio por región, comuna, especie, familia de subtipo y subtipo

Muestra	Región	Comuna	Especie	Familia Subtipo	Subtipo
1	RM	El Monte	<i>C. parvum</i>	Ila	A15G2R1
3	RM	El Monte	<i>C. parvum</i>	Ila	A15G2R1
7	RM	Melipilla	<i>C. parvum</i>	Ila	A15G2R1
13	RM	El Monte	<i>C. parvum</i>	Ila	A17G2R1
18	RM	El Monte	<i>C. parvum</i>	Ila	A17G4R1
19	RR	Río Bueno	<i>C. parvum</i>	Ila	A15G2R1
24	RR	Valdivia	<i>C. parvum</i>	Ila	A15G2R1
26	RR	Valdivia	<i>C. parvum</i>	Ila	A15G2R1
29	RR	Mariquina	<i>C. parvum</i>	Ila	A15G2R1
30	RR	Mariquina	<i>C. parvum</i>	Ila	A15G2R1
32	RR	Río Bueno	<i>C. parvum</i>	Ila	A15G2R1
33	RR	Río Bueno	<i>C. parvum</i>	Ila	A15G2R1
34	RR	Río Bueno	<i>C. parvum</i>	Ila	A15G2R1
35	RR	Río Bueno	<i>C. parvum</i>	Ila	A15G2R1
36	RR	Río Bueno	<i>C. parvum</i>	Ila	A15G2R1

Estos resultados muestran que en la RR el 100% de las muestras estudiadas presentaron el subtipo IlaA15G2R1, mientras que en la RM tres de las muestras estudiadas presentaron el subtipo IlaA15G2R1, y otras dos presentaron los subtipos IlaA17G2R1 y IlaA17G4R1, respectivamente (Tabla 6).

Los subtipos de *C. parvum* fueron caracterizados de acuerdo a su comuna de origen. Para la RM, en la comuna de El Monte se observaron 3 subtipos distintos: IlaA15G2R1, IlaA17G2R1 y IlaA17G4R1. Mientras que la lechería de la localidad de Melipilla solo aportó 1 muestra identificada por el subtipo IlaA15G2R1. En la RR solo se observó un solo subtipo, el IlaA15G2R1 en el 100% de las muestras de todas las comunas estudiadas (Tabla 6 6).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

PRESENCIA DE CRYPTOSPORIDIUM MEDIANTE LA TÉCNICA DE ZIEHL NEELSEN MODIFICADO

Un 75% de las muestras presentó una baja presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* al examen microscópico. Este hallazgo es similar a lo observado en un estudio realizado por (Heckler *et al.*, 2015) en el cual observaron que el porcentaje de muestras que presentaban una baja cantidad de ooquistes (medido en una escala de 5 grados: bajo, medio, moderado, alto y severo), fue de 81,48% y 12,96% para los grados bajo y medio. Estos porcentajes, pueden ser explicados dado que el límite de detección de esta prueba es bajo (Smith, 2012), lo que lleva a que independiente del número de ooquistes excretados por el animal, la detección de ellos puede ser menor, dada la baja sensibilidad y especificidad de la técnica (Jex *et al.*, 2008).

PORCENTAJE DE POSITIVIDAD A LA PCR CONVENCIONAL DE SSU 18S rDNA

De las 36 muestras estudiadas, en la RM y RR se observó un porcentaje de amplificación de un 83,3% y 77,4% respectivamente, alcanzando a un total general de 80,6%. Este porcentaje es esperable en muestras previamente diagnosticadas como positivas mediante ZNm (Heckler *et al.*, 2015). La sensibilidad de la PCR 18S es menor que la prueba de ZNm. (Muñoz *et al.*, 2011) al comparar la sensibilidad de la prueba de ZNm con la PCR 18S, observaron que el porcentaje de muestras positivas a la PCR 18S fue de un 64% de 58 muestras positivas a ZNm, porcentaje menor al observado en el presente trabajo. Esto hace suponer que el diagnóstico a través de ZNm es preferible que a través de PCR convencional, a pesar que la tinción de las muestras y la posterior observación bajo microscopio, es observador dependiente (Cassió y Widmer, 2013).

PORCENTAJE DE POSITIVIDAD A LA PCR CONVENCIONAL DE UN FRAGMENTO DEL GEN DE LA GLICOPROTEÍNA DE 60 KDA

Un 51,7% (15/29) de las muestras positivas a la PCR convencional de 18S resultaron positivas a la PCR convencional de un fragmento del gen de gp60 (33,3%

5/15 de las muestras de la RM y 71,4% 10/14 de las muestras de la RR). Este porcentaje es esperado dado que el gen es de copia única en el genoma de *C. parvum* (Strong *et al.*, 2000) con respecto al gen de 18S que posee 5 copias en el genoma de *C. parvum* (Le Blancq *et al.*, 1997) lo que daría una menor probabilidad al gen de gp60 de amplificarse por PCR. De la misma forma, el gen de gp60 amplificado por los partidores utilizados en este estudio (Strong *et al.*, 2000) da como resultado un amplicón de 980 pb en comparación con el gen de 18S que por medio de los partidores utilizados (Muñoz *et al.*, 2011) da un amplicón de 520 pb, lo que hace disminuir también las probabilidades de amplificar el gen de gp60 al ser un amplicón de mayor tamaño (Dieffenbach y Dveksler, 2003).

Además, este porcentaje menor de aislamiento se puede explicar porque los partidores utilizados son género-específico. El marcador 18S amplifica para *Cryptosporidium* spp, lo que significa que el amplicón producido puede ser de una amplia variedad de especies del género *Cryptosporidium*. Los bovinos antes del destete son los más susceptibles a la infección en especial por *C. parvum*, pero se ha observado que en otras regiones del mundo *Cryptosporidium bovis* es el responsable de la mayoría de las infecciones (Cassiò y Widmer, 2013). Además, existen otras especies de *Cryptosporidium* que afectan a los bovinos como *C. ryane* y *C. andersoni*, pero solo se les reconoce un papel infectante solo en adultos (Xiao, 2010). En Chile no se ha descrito hasta el momento la presencia de las otras especies de *Cryptosporidium* que afectan al ganado, lo que no quiere decir que no estén presentes y contaminando el ambiente como lo hace *C. parvum*. Esto lleva a que probablemente, a pesar de que el marcador 18S sea amplificado por la prueba, gp60 al ser específico de *C. parvum* (y otras especies más relacionadas genéticamente) (Strong *et al.*, 2000) no amplifique para estas especies. Por lo tanto, la menor tasa de aislamiento por gp60 se deba a un conjunto de factores relacionados con las características del gen de gp60. Estos resultados son similares a los observados por Koinari *et al.* (2014), en 12 positivas al gen 18S solo 6/12 resultaron positivas a gp60. Este desbalance a favor del gen SSU 18S rDNA, aunque más cercano, fue observado por Ghaffari y Kalantari (2014) quienes en 76

muestras positivas al gen 18S amplificaron un 67,1% de muestras positivas a gp60 (51/76) lo cual confirmaría este fenómeno observado en la presente investigación.

SECUENCIAMIENTO DE LOS PRODUCTOS DE LA PCR CONVENCIONAL DE LA GLICOPROTEÍNA DE 60 KDA

Los productos resultantes de la PCR convencional de *gp60* fueron secuenciados. El cromatograma resultante fue analizado con el fin de determinar si era posible de utilizar para las siguientes pruebas bioinformáticas. El 100% de las muestras enviadas (15/15) resultó positiva en términos de calidad de secuencia al cromatograma. Estos resultados son mayores a los observados por Shrestha *et al.* (2014), quienes solo pudieron observar este panorama en un 80% (12/15) de sus muestras. La calidad del cromatograma para una buena y segura interpretación de cada base debe presentar, según Papparini *et al.* (2015), señales (peaks) altas y estrechas, pero de todas formas si presentar bajos niveles de ruido en el fondo del cromatograma, aún puede ser utilizado con la precaución de que este ruido puede representar algún tipo de variante genética. Para obtener secuencias de DNA de calidad y que presenten un cromatograma que permita una segura interpretación, se utilizan vectores de clonamiento en conjunto con la PCR convencional. Mediante esta técnica se asegura una correcta lectura de la secuencia de DNA para un posterior análisis bioinformático (Molloy y McManus, 2015). Además, se pueden observar variantes genéticas dentro de una misma muestra (Gringberg *et al.*, 2013; Mercado *et al.*, 2015). Pero para efecto de este estudio, no se realizó dado que se escapaban de los objetivos de este trabajo.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS GENERADAS

Los archivos editados fueron posteriormente analizados siguiendo y adaptando las recomendaciones de Nilsson *et al.* (2012) quienes recomiendan una serie de reglas para obtener datos más fiables como por ejemplo establecer de que los datos provienen del marcador genético buscado, que su orientación sea 5' a 3', que se produzca alineamiento de la secuencia en la mayoría de su longitud, que no existan errores técnicos en la secuencia y que la identidad de las especies resultantes (notación taxonómica) tenga sentido. Este último punto, tiene marcada relación con los datos obtenidos de cada alineamiento múltiple en el momento que se estableció

el género y especie del parásito, dado que a pesar de obtener un porcentaje de identidad $\geq 98\%$ y que correspondía a *C. parvum*, se observó dentro de la lista de resultados (hits) de B.L.A.S.T. también a la especie *Cryptosporidium felis* con un porcentaje de identidad también $\geq 98\%$. Este dato no fue tomado en consideración, ya que se consideró un error taxonómico. Los errores dentro de estos repositorios de secuencia son comunes, donde se ha estimado que 1 de cada 20 secuencias de 16S contiene este tipo de errores, por ejemplo. (Ashelford *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2013).

Las 15 secuencias estudiadas poseían valores de E-value menores a 10^{-6} y su porcentaje de identidad variaba entre el 98% y 100%. Según (Claverie y Notredame, 2011) valores de E-value menores a 10^{-4} y porcentajes de identidad $>70\%$ para secuencias de DNA, asegura que existe homología entre la secuencia buscada y los resultados encontrados en B.L.A.S.T. Esto es interesante, dado que el criterio de E-value para la búsqueda de las secuencias generadas en este estudio, fue más estricto que el recomendado. De las 15 secuencias estudiadas, 12 poseían un 100% de identidad con *C. parvum* y solo 3 presentaron un 98% de identidad.

Luego de este análisis, se obtuvo que el 100% de las secuencias estudiadas correspondía finalmente a *C. parvum*. Este resultado es esperado dado que se ha descrito que en bovinos neonatales de <30 días, es la especie que predomina en las infecciones intestinales por este parásito (De Waele *et al.*, 2011; Al Mawly *et al.*, 2015). Kaupke y Rzezutka (2015) recientemente también describieron que la única especie de *Cryptosporidium* que infecta a terneros de lechería en Polonia, fue *C. parvum*. En relación a otras especies de *Cryptosporidium* descritas en terneros de menos de un mes, Fayer y Xiao (2008) comunicaron que *C. bovis*, "*Cryptosporidium deer-like genotype*" y *C. andersoni* se pueden detectar en bajos niveles en algunos bovinos de esta edad. Por su parte Cacciò y Widmer (2013) mencionan que a nivel mundial, *C. parvum* es la especie que causaría infecciones en sobre el 80% de los terneros menores de 2 meses de edad, aunque excepcionalmente en algunas regiones de países como: Canadá, China y Suecia, *C. bovis* sería la especie mayormente aislada en estos animales.

La subgenotipificación dio como resultado que el 100% de las secuencias poseían dentro de su secuencia de nucleótidos la presencia de los segmentos 5' GGGC 3' y 5' ACATCA 3', entre los cuales e incluyendo a este último, se encuentra el fragmento de serinas. Este resultado concuerda con los observados por Grinberg *et al.* (2013) que en un análisis bioinformático a través de herramientas de secuenciación de segunda generación muestran que el inicio del fragmento de serina perteneciente a *C. parvum* se encuentra precedido de la secuencia de nucleótidos 5' TGTTGAGGGC 3' y con Xiao (2010) quien en un revisión sistemática muestra que en el extremo 3' del fragmento de serinas de la familia de subtipos Ila de *C. parvum*, se encuentra la secuencia 5' ACATCA 3'. Esto último tiene alta relevancia en el desarrollo de este estudio, ya que con esto se confirma que el 100% de las muestras pertenecen además a la familia de subtipos Ila de *C. parvum*. Estos datos concuerdan con la literatura internacional hasta el momento, donde el subtipo Ila predomina en la región en países como Argentina y Brasil (Tomazic *et al.*, 2013; Couto *et al.*, 2014; Del Coco *et al.*, 2014; Heckler *et al.*, 2015).

El análisis bioinformático de los fragmentos de serinas encontrados dio como resultado que el subtipo mayormente representado en este conjunto de muestras fue el IlaA15G2R1, que concuerda con la mayoría de los estudios internacionales en ser el más representativo en el ganado y humanos a nivel mundial en países industrializados (Xiao, 2010; Feng *et al.*, 2013). En el 2015 Kaupke y Rzezutka describieron en Polonia que el subtipo IlaA15G2R1 se determinó en 9/25 terneros menores de 1 mes y correspondió a 1 de los 11 subtipos detectados en terneros no diarreicos. En los terneros que presentaban cuadros diarreicos, este subtipo fue aislado en 1 de 28 animales estudiados y fue 1 de los 7 subtipos aislados en ellos. Esto sugiere que en Polonia el subtipo IlaA15G2R1 se aislaría con mayor frecuencia en terneros no diarreicos. En el presente estudio, este subtipo se observó en el 100% de las muestras de terneros diarreicos de la RR y no se detectó otro subtipo, por su parte, en la RM fue 1 de los 3 subtipos detectados también en muestras de terneros con cuadros diarreicos. Es necesario hacer más estudios que permitan fehacientemente relacionar los subtipos con la patogenicidad de las infecciones causadas por *Cryptosporidium* en este grupo etario de animales.

Feng *et al.* (2013) describió que el subtipo IlaA15G2R1 presentaría una alta tasa de transmisibilidad como una característica adaptativa.

Además, en el conjunto de secuencias se observaron otros dos subtipos: IlaA17G2R1 y IlaA17G4R1. El subtipo de *C. parvum* IlaA17G2R1 ha sido descrito en diferentes hospederos en Australia, China, Francia, Estados Unidos.(Nolan *et al.*, 2009; Collier *et al.*, 2011; Koehler *et al.*, 2013; Mi *et al.*, 2014; Certad *et al.*, 2015). En bovinos ha sido observado en Australia en 124/268 muestras de terneros neonatales en condiciones de pastoreo, confirmando que el subtipo IlaA17G2R1 puede ser encontrados en bovinos neonatales (Nolan *et al.*, 2009). Kaupke y Rzezutka (2015) describen este subtipo tanto en animales sintomáticos como sin síntomas digestivos. Con respecto al subtipo IlaA17G4R1 solo ha sido descrito en humanos (Waldron *et al.*, 2009; 2011a; 2011b) en casos de cryptosporidiosis en Australia. Este subtipo se describe por primera vez en bovinos neonatales menores a 30 días. El subtipo IlaA17G4R1 también fue detectado a través de clonamiento del fragmento de *gp60* mediante PCR (Mercado *et al.*, 2015).

Con respecto a la distribución de los subtipos a nivel regional, se observó que en la RM existía la presencia de 3 subtipos en las 5 muestras positivas: IlaA15G2R1 (3), IlaA17G2R1 (1) y IlaA17G4R1 (1). Mientras que en la RR solo se observó la presencia del subtipo IlaA15G2R1 en 10 muestras.

A pesar de observar que la diversidad de subtipos dentro de las muestras estudiadas, fue mayor en la RM que la RR, es complicado establecer algún tipo de relación causal dado que se trabajó como un solo marcador genético (*gp60*). Widmer y Sullivan (2012), advierten que para establecer relaciones epidemiológicas es necesario estudiar más de un gen ya que puede existir recombinación genética dentro de la población de parásitos. Más aun, proponen que una población o subpoblación definida a través solamente por el marcador genético *gp60* puede no existir en la naturaleza.

Gp60 es útil para establecer diferencias en la transmisión de la enfermedad, principalmente a nivel espacial o georreferencial (Alves *et al.*, 2003). En la RR, solo un subtipo se observó dentro del subconjunto de muestra, lo que vuelve a corroborar

que ese subgenotipo presenta características altamente infectivas (Feng *et al.*, 2013) y que sea el causante de la mayoría de las diarreas neonatales en los terneros de lechería de esta región y que puede ser consecuencia de las características biogeográficas de la región en estudio. Un posible explicación sería que en la provincia de Valdivia principalmente, existiría un alto nivel de infección de *C. parvum* (57,9%) medido a través de ZNm y estos resultados serían causados por las características edafoclimática de la región, que presenta gran cantidad de cursos de agua superficiales (Muñoz *et al.*, 2014). Pero estos datos no son concluyentes, dado que el estudio de Muñoz *et al.* (2014) no entregan información con respecto a la presencia de distintos subtipos en la región. Aun así, la relación entre la presencia de subtipos de *C. parvum* y los cursos de agua está bien revisada en la literatura (Mahmoudi *et al.*, 2015; Ng-Hublin *et al.*, 2015; Wells *et al.*, 2015).

En la RM el panorama sería distinto y la presencia de 3 subtipos podría estar explicado por un fenómeno biológico como la presencia de recombinación genética, que permitiría la presencia de variados subtipos pero con la perpetuación de uno o más por rebaño (Drumo *et al.*, 2012, Cacció y Widmer, 2013).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren una confirmación de la hipótesis planteada, ya que se demostró que la cryptosporidiosis en los bovinos neonatales estudiados en dos regiones biogeográficas de Chile fue causada por un discreto número de subtipos de *Cryptosporidium parvum*. La presencia de estos subtipos en muestras de heces diarreicas en bovinos neonatales es la primera descripción que se realiza en Chile.

Conjuntamente, la observación microscópica de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. como método diagnóstico fue más sensible que la PCR convencional SSU 18S rDNA, aun utilizando kits de extracción de DNA, que permiten la eliminación de inhibidores de la PCR convencional, los que disminuyen la sensibilidad de esta prueba molecular. Se pudo determinar que un porcentaje de muestras extraídas mantienen un estatus de inhibición.

Se observó que en la Región Metropolitana hubo más subtipos de *C. parvum* que en la Región de Los Ríos, y que el subtipo mayormente representado en el conjunto de muestras de ambas regiones fue IlaA15G2R1, que también concuerda con el subtipo mayormente representado en la literatura internacional en nuestro conocimiento en bovinos y humanos. La presencia de este subtipo de *C. parvum* en Chile es un riesgo potencial de infección para los humanos como por ejemplo: los trabajadores de predios lecheros, médicos veterinarios y estudiantes de medicina veterinaria, etc. Se puede afirmar que en Chile está presente el riesgo zoonótico de adquirir la cryptosporidiosis.

La presencia del subtipo de *C. parvum* IlaA17G2R1, a diferencia del subtipo IlaA15G2R1, solo ha sido comunicado una vez en la literatura internacional en bovinos neonatales, haciendo que la observación de este en el presente estudio, sea la segunda descripción relacionado a diarreas en bovinos neonatales. Además, ha sido descrito en humanos, ovinos y caprinos.

En literatura revisada la presencia del subtipo de *C. parvum* IlaA17G4R1 ha sido comunicada únicamente en humanos, haciendo que esta divulgación en bovinos neonatales diarreicos en Chile requiera ser cuidadosamente confirmada con nuevos estudios.

Nuestros resultados sugieren que los subtipos detectados al estar relacionados con los cuadros diarreicos en los bovinos neonatales estudiados los hace potenciales agentes de enfermedad en humanos.

RECOMENDACIONES

El presente trabajo de investigación tenía como objetivo describir la diversidad de subtipos de *Cryptosporidium parvum* en muestras de heces diarreicas de bovinos neonatales en dos regiones biogeográficas de Chile.

La sola presencia del subtipo de *C. parvum* IIaA15G2R1, el cual ha sido reconocido en la literatura internacional como un subtipo altamente contagioso y que los resultados de esta investigación mostraron que predomina en la mayoría de las muestras procesadas, debería llevar a nuevas investigaciones para determinar su rol en la prevalencia de las infecciones a nivel nacional. Su alta infectividad está relacionada a la proteína que traduce el gen de *gp60* (movilización y adhesión a la célula intestinal) y por tanto es recomendable abrir paso a nuevas investigaciones como por ejemplo la creación de nuevos tratamientos farmacológicos o inmunoprofilaxis.

La descripción de subtipos de *C. parvum* infectando ganado neonatal bovino en nuestro país, no solo debe ser utilizada para generar medidas de control de la infección en el rebaño, sino que además dada su utilidad como marcador molecular de posible rutas de infección, puede ser usado como herramienta de investigación epidemiológica ya sea en rebaño cercanos que comparten cursos de agua como también en posible infecciones zoonóticas.

La utilización de herramientas moleculares y bioinformáticas fueron de gran utilidad para la descripción de los subtipos presente en las muestras de heces usadas en esta investigación y su aplicación en eventuales estudios de un mayor número de animales, predios y regiones biogeográficas permitirían observar un panorama más global en términos de subtipos así como la presencia de estos en infecciones mixtas en el ganado, las cuales pueden ser las causantes de la aparición de nuevos subtipos de *C. parvum* a través de recombinación genética.

Finalmente es necesario que los médicos veterinarios especialistas en animales de producción, como también los dedicados a la salud pública tomen conciencia que

C. parvum está presente en el ganado y que es un agente zoonótico que puede infectar otros animales además del bovino como también a los humanos. Se deben mejorar las medidas preventivas que se utilizan en el ganado para evitar la presencia de diarreas en bovinos neonatales, para así evitar futuras pérdidas en la producción por disminución de la productividad de los animales. Además, se debe divulgar este tipo de conocimiento tanto a productores, médicos veterinarios y público en general para establecer más e mejores planes de prevención y control de este tipo de enfermedades.

REFERENCIAS

- Abal-Fabeiro, J.; Maside, X.; Bello, X.; Llovo, J.; Bartolome, C.** 2013. Multilocus patterns of genetic variation across *Cryptosporidium* species suggest balancing selection at the *gp60* locus. *Molecular Ecology* 22(18):4723–4732. <http://doi.org/10.1111/mec.12425>
- Adamu, H.; Petros, B.; Hailu, A.; Petry, F.** 2010. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Ethiopia. *Acta Tropica* 115(1-2):77–83. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.02.003>
- Ahmed, W.; Vieritz, A.; Goonetilleke, A.; Gardner, T.** 2010. Health risk from the use of roof-harvested rainwater in Southeast Queensland, Australia, as potable or nonpotable water, determined using quantitative microbial risk assessment. *Applied and Environmental Microbiology* 76(22):7382–7391. <http://doi.org/10.1128/AEM.00944-10>
- Al Mawly, J.; Grinberg, A.; Prattley, D.; Moffat, J.; Marshall, J.; French, N.** 2015. Risk factors for neonatal calf diarrhoea and enteropathogen shedding in New Zealand dairy farms. *The Veterinary Journal* 203(2):155–160. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.01.010>
- Al Mawly, J.; Grinberg, A.; Velathanthiri, N.; French, N.** 2015. Cross sectional study of prevalence, genetic diversity and zoonotic potential of *Cryptosporidium parvum* cycling in New Zealand dairy farms. *Parasites & Vectors* 8(1):240. <http://doi.org/10.1186/s13071-015-0855-9>
- Alves, M.; Xiao, L.; Sulaiman, I.; Lal, A.; Matos, O.; Antunes, F.** 2003. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *Journal of Clinical Microbiology* 41(6):2744–7. <http://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2744>

- Amer, S.; Honma, H.; Ikarashi, M.; Tada, C.; Fukuda, Y.; Suyama, Y.; Nakai, Y.** 2010. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in dairy calves in Egypt. *Veterinary Parasitology* 169(3-4):382–386. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.017>
- Aniesona, A. y Bamaiyi, P.** 2014. Retrospective Study of Cryptosporidiosis Among Diarrhoeic Children in the Arid Region of North-Eastern Nigeria. *Zoonoses and Public Health* 61(6):420–426. <http://doi.org/10.1111/zph.12088>
- Ashelford, K.; Chuzhanova, N.; Fry, J.; Jones, A.; Weightman, A. J.** 2005. At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Applied and Environmental Microbiology* 71(12):7724–7736. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.12.7724-7736.2005>
- Baxter, K.** 2013. Diarrhoea in young dairy calves. *Livestock* 18(1):25–26. <http://doi.org/10.1111/j.2044-3870.2012.00172.x>
- Björkman, C.; Lindström, L.; Oweson, C.; Ahola, H.; Troell, K.; Axén, C.** 2015. *Cryptosporidium* infections in suckler herd beef calves. *Parasitology* 142(8):1108-1114. <http://doi.org/10.1017/S0031182015000426>
- Blanchard, P.** 2012. Diagnostics of Dairy and Beef Cattle Diarrhea. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 28(3):443–464. <http://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.07.002>
- Bridge, J.; Oliver, D.; Chadwick, D.; Charles, H.; Godfray, J.; Louise Heathwaite, A.; Kay, D.; Maheswaran, R.; McGonigle D.; Nichols, G.; Pickup, R.; Porter, J.; Wasting, J.; Banwart, S.** 2010. Engagin with the water sector for public health benefits: waterborne pathogens and diseases in developed countries. *Bulletin of the World Health Organization* 88:873–875.

- Budu-Amoako, E.; Greenwood, S.; Dixon, B.; Sweet, L.; Ang, L.; Barkema, H. W.; McClure, J.** 2012. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and Giardia in humans on Prince Edward Island, Canada: evidence of zoonotic transmission from cattle. *Zoonoses And Public Health* 59(6):424–433. <http://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01474.x>
- Burton, A.; Nydam, D.; Dearen, T.; Mitchell, K.; Bowman, D.; Xiao, L.** 2010. The prevalence of *Cryptosporidium*, and identification of the *Cryptosporidium* horse genotype in foals in New York State. *Veterinary Parasitology* 174(1-2):139–144. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.019>
- Cacciò, S. y Widmer, G.** 2013. *Cryptosporidium: parasite and disease*. Springer Vienna. 546 pp.
- Cama, V.; Bern, C.; Roberts, J.; Cabrera, L.; Sterling, C.; Ortega, Y.; Gilman, R.; Xiao, L.** 2008. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerging Infectious Diseases* 14(10):1567–1574. <http://doi.org/10.3201/eid1410.071273>
- Cama, V. ; Ross, J.; Crawford, S.; Kawai, V.; Chavez-Valdez, R.; Vargas, D.; Vivar, A.; Ticona, E.; Navincopa, M.; Williamson J.; Ortega, Y.; Gilman, R.; Xiao, L.** 2007. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *The Journal of Infectious Diseases* 196(5):684–691. <http://doi.org/10.1086/519842>
- Certad, G.; Dupouy-Camet, J.; Gantois, N.; Hammouma-Ghelboun, O.; Pottier, M.; Guyot, K.; Benamrouz, S.; Osman, M.; Delaire, B.; Creusy, C.; Viscogliosi, E.; Dei-Cas, E.; Aliouat-Denis, C.; Follet, J.** 2015. Identification of *Cryptosporidium* Species in Fish from Lake Geneva (Lac Lemman) in France. *PloS One* 10(7):e0133047. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0133047>
- Chalmers, R. M. y Katzer, F.** 2013. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends in Parasitology* 29(5):237–251. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2013.03.001>

- Chen, F.; Huang, K.; Qin, S.; Zhao, Y.; Pan, C.** 2007. Comparison of viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in potassium dichromate solution and chlorinated tap water. *Veterinary Parasitology* 150(1-2):13–7. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.09.001>
- Cho, Y. y Yoon, K.** 2014. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *Journal of Veterinary Science* 15(1):1–17. <http://doi.org/10.4142/jvs.2014.15.1.1>
- Claverie, J. y Notredame, C.** 2011. *Bioinformatics For Dummies*. Wiley. 564 pp.
- Collier, S.; Smith, S.; Lowe, A.; Hawkin, P.; McFarland, P.; Salyers, M.; Rocco, P.; Bumby, G.; Maillard, J.; Williams, C.; Fleischauer, A.; Radke, V.; Roberts, J.; Hightower, A.; Bishop, H.; Mathison, B.; da Silva, A.; Carpenter, J.; Hayden, A.; Hlavsa M.; Xiao, L.; Roberts, V.; Brunkard, J.; Beach, M.; Hill, V.; Yoder, J.; Dumbar, E.; Dearen, T.; Bopp, C.; Humphrys, M.; Phillips, G; Chang, L.; Meites, E.** 2011. Cryptosporidiosis outbreak at a summer camp--North Carolina, 2009. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 60(27):918–922.
- Couto, M.; Lima, M.; Bomfim, T.** 2013. New *Cryptosporidium parvum* subtypes of Ila subfamily in dairy calves from Brazil. *Acta Tropica* 130C:117–122. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.002>
- De Waele, V.; Berzano, M.; Berkvens, D.; Speybroeck, N.; Lowery, C.; Mulcahy, G.; Murphy, T.** 2011. Age-stratified Bayesian analysis to estimate sensitivity and specificity of four diagnostic tests for detection of *Cryptosporidium* oocysts in neonatal calves. *Journal of Clinical Microbiology* 49(1):76–84. <http://doi.org/10.1128/JCM.01424-10>
- De Waele, V.; Speybroeck, N.; Berkvens, D.; Mulcahy, G.; Murphy, T.** 2010. Control of cryptosporidiosis in neonatal calves: Use of halofuginone lactate in two different calf rearing systems. *Preventive Veterinary Medicine* 96:143–151.

- De Waele, V.; Van den Broeck, F.; Huysse, T.; McGrath, G.; Higgins, I.; Speybroeck, N.; Berzanom M.; Raleigh, P.; Mulcahy, G.; Murphy, T.** 2013. Panmictic structure of the *Cryptosporidium parvum* population in Irish calves: influence of prevalence and host movement. *Applied and Environmental Microbiology* 79(8):2534–2541. <http://doi.org/10.1128/AEM.03613-12>
- Del Coco, V.; Cordoba, M.; Bilbao, G.; de Almeida Castro, A.; Basualdo, J.; Fayer, R.; Santin, M.** 2014. *Cryptosporidium parvum* GP60 subtypes in dairy cattle from Buenos Aires, Argentina. *Research in Veterinary Science* 96(2):311–314. <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.12.010>
- Díaz-Lee, A.; Mercado, R.; Onuoha, E. O.; Ozaki, L. S.; Muñoz, P.; Muñoz, V.; Martínez, F.; Fredes, F.** 2011. *Cryptosporidium parvum* in diarrheic calves detected by microscopy and identified by immunochromatographic and molecular methods. *Veterinary Parasitology* 176(2-3):139–144. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.001>
- Dieffenbach, C y Dveskler, G.** 2003. PCR Primer: A Laboratory Manual – Second Lab Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 520 pp.
- Drumo, R.; Widmer, G.; Morrison, L.; Tait, A.; Grelloni, V.; D’Avino, N.; Pozio, E.; Caccio, S.** 2012. Evidence of host-associated populations of *Cryptosporidium parvum* in Italy. *Applied and Environmental Microbiology* 78(10):3523–3529. <http://doi.org/10.1128/AEM.07686-11>
- Estrada-chávez, C.; Díaz, F.; Arriaga, C.; Villegas-Sepúlveda, N.; Pérez, R.; Gonzalez, D.** 2004. Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Vet. Mex.* 35 (3): 225-236.
- Fayer, R. y Xiao, L.** 2008. *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis, Second Edition.* CRC Press. United States, 576 pp.
- Feng, Y.; Torres, E.; Li, N.; Wang, L.; Bowman, D.; Xiao, L.** 2013. Population genetic characterisation of dominant *Cryptosporidium parvum* subtype IlaA15G2R1. *International Journal for Parasitology* 43(14):1141–7. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.09.00>

- Fitz-Sánchez, E.; Rosario-Cruz, R.; Hernández-Ortiz, R.; Hernández-Castro, E.; Rodríguez-Bataz, E.; García-Vázquez, Z.** 2013. *Cryptosporidium parvum*: prevalence and risk factors in calves of the municipality of Cuajinicuilapa, Guerrero, México. / *Cryptosporidium parvum*: prevalencia y factores de riesgo en becerros del municipio de Cuajinicuilapa, Guerrero, México. *Veterinaria Y Zootecnia* 7(1):49–61.
- Fredes, F.; Raffo, E.; Muñoz, P.** 2007. Short Note: First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in stool of Adélie penguin from the Antarctic using acid-fast stain. *Antarctic Science* 19(04):437–438. <http://doi.org/10.1017/S0954102007000429>
- Gatei, W.; Greensill, J.; Ashford, R.; Cuevas, L.; Parry, C.; Cunliffe, N.; Beeching, N.; Hart, A.** 2003. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology* 41(4):1458–1462.
- Ghaffari, S. y Kalantari, N.** 2014. A multi-locus study of cryptosporidium parasites isolated from patients living in iran, Malawi, Nigeria, the United kingdom, and Vietnam. *Iranian Journal of Parasitology* 9(1):79–89.
- Gorman, T.; Alcaíno, H.; Santelices, J.** 1989. *Cryptosporidium* y otras coccidias intestinales en terneros de lechería. Region Metropolitana. Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria* 21:29-34.
- Gorman, T.; Alcaíno, H.; Weitz, J.** 1986. Hallazgo de *Cryptosporidium* en animales de Chile. *Parasitología la Día* 10(1):31–32.
- Grinberg, A.; Biggs, P.; Dukkupati, V.; George, T.** 2013. Extensive intra-host genetic diversity uncovered in *Cryptosporidium parvum* using Next Generation Sequencing. *Infection, Genetics and Evolution* 15:18–24. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.08.017>

- Hadfield, S.; Robinson, G.; Elwin, K.; Chalmers, R.** 2011. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 49(3):918–924. <http://doi.org/10.1128/JCM.01733-10>
- Hawash, Y.** 2014. DNA Extraction from Protozoan Oocysts / Cysts in Feces for Diagnostic PCR. *Korean Journal of Parasitology* 52(3):263–271. <http://doi.org/10.3347/kjp.2014.52.3.263>
- Heckler, R.; Borges, D.; Bacha, F.; Onizuka, M.; Teruya, L.; Neves, J.; Lordelo, J.; Brito, C.; Amaral, R.; Meireles, M.; Borges, F.** 2015. First genetic identification of *Cryptosporidium parvum* subtype IlaA14G2R1 in beef cattle in Brazil. *Preventive Veterinary Medicine* 121(3-4):391–394. <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.08.016>
- Henriksen, S. y Pohlenz, J.** 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica* 22(3-4):594–596.
- Huang, J.; Yue, D.; Qi, M.; Wang, R.; Zhao, J.; Li, J.; Shi, K.; Wang, M.; Zhang, L.** 2014. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Ningxia, northwestern China. *BMC Veterinary Research* 10(1):1–5. <http://doi.org/10.1186/s12917-014-0292-6>
- Imre, K.; Lobo, L. M.; Matos, O.; Popescu, C.; Genchi, C.; Darabus, G.** 2011. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from pre-weaned calves in Romania: is there an actual risk of zoonotic infections? *Veterinary Parasitology* 181(2-4):321–324. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.042>
- Imre, K.; Luca, C.; Costache, M.; Sala, C.; Morar, A.; Morariu, S.; Ilie, M.; Imre, M.; Darabus, G.** 2013. Zoonotic *Cryptosporidium parvum* in Romanian newborn lambs (*Ovis aries*). *Veterinary Parasitology* 191(1-2):119–122. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.08.020>
- Iqbal, A.; Sim, B.; Dixon, B.; Surin, J.; Lim, Y.** 2015. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in HIV/AIDS patients in Malaysia. *Tropical Biomedicine* 32(2):310–322.

- Izhaki, I.** 2014. Short communication: effect of pomegranate-residue supplement on *Cryptosporidium parvum* oocyst shedding in neonatal calves. *Journal of Dairy Science* 97:5800-5805 <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7136>
- Jex, A.; Smith, H.; Monis, P.; Campbell, B.; Gasser, R.** 2008. *Cryptosporidium* - Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnology Advances* 26(4):304–317. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.02.003>
- Jex, A.; Ryan, U.; Ng, J.; Campbell, B.; Xiao, L.; Stevens, M.; Gasser, R. B.** 2007. Specific and genotypic identification of *Cryptosporidium* from a broad range of host species by nonisotopic SSCP analysis of nuclear ribosomal DNA. *Electrophoresis* 28(16):2818–2825. <http://doi.org/10.1002/elps.200600772>
- Jiang, J.; Alderisio, K. A.; Singh, A.; Xiao, L.** 2005. Development of Procedures for Direct Extraction of *Cryptosporidium* DNA from Water Concentrates and for Relief of PCR Inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology* 71(3):1135–1141. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1135>
- Kaupke, A.; Rzezutka, A.** 2015. Emergence of novel subtypes of *Cryptosporidium parvum* in calves in Poland. *Parasitology Research* 114(12):4709–4716. <http://doi.org/10.1007/s00436-015-4719-1>
- Klein-Jöbstl, D.; Iwersen, M.; Drillich, M.** 2014. Farm characteristics and calf management practices on dairy farms with and without diarrhea : a case-control study to investigate risk factors for calf diarrhea. *Journal of Dairy Science* 97:5110–5119.
- Koehler, A.; Bradbury, R.; Stevens, M.; Haydon, S.; Jex, A.; Gasser, R.** 2013. Genetic characterization of selected parasites from people with histories of gastrointestinal disorders using a mutation scanning-coupled approach. *Electrophoresis* 34(12):1720–1728. <http://doi.org/10.1002/elps.201300100>
- Koinari, M.; Lymbery, A.; Ryan, U.** 2014. *Cryptosporidium* species in sheep and goats from Papua New Guinea. *Experimental Parasitology* 141:134–137. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.03.021>

- Kvá, M. y Kv, D.** 2007. Viability staining and animal infectivity of *Cryptosporidium andersoni* oocysts after long-term storage. *Parasitology International* 100:213–217. <http://doi.org/10.1007/s00436-006-0272-2>
- Lalonde, L. y Gajadhar, A.** 2009. Effect of storage media , temperature , and time on preservation of *Cryptosporidium parvum* oocysts for PCR analysis. *Veterinary Parasitology* 160:185–189.
- Lassen, B.; Ståhl, M.; Enemark, H.** 2014. Cryptosporidiosis - an occupational risk and a disregarded disease in Estonia. *Acta Veterinaria Scandinavica* 56(1):36. <http://doi.org/10.1186/1751-0147-56-36>
- Le Blancq, N.; Khrantsov, F.; Zamani, S.; Upton, T.; Wu, W.** 1997. Ribosomal RNA gene organization in *Cryptosporidium parvum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 90(2):463-478.
- Lima, R.; Aquino, M.; Inácio, S.; Viol, M.; Zucatto, A.; Silveira, L.; Oliveira, B.; Vasconcelos, E.; Bresciani, K.; Oliveira, G.; Costa, A.** 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in calves (*Bos taurus* and *Bos indicus*) in the Formiga city, Minas Gerais - Brazil. *Semina: Ciências Agrárias (Londrina)* 34(6 Suppl. 2):3747–3754.
- Mahmoudi, M.; Nazemalhosseini-Mojarad, E.; Kazemi, B.; Haghghi, A.; Mirzaei, A.; Mohammadiha, A.; Jahantab, S.; Xiao, L.; Karanis, P.** 2015. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes distribution in river water in Iran. *Journal of Water and Health* 13(2):600–606. <http://doi.org/10.2166/wh.2014.234>
- Masood, S.; Maqbool, A.; Anjum, A.; Rashid, M.; Choudhary, Z.** 2013. Prevalence of cryptosporidium oocysts in bovine at different livestock farms by conventional microscopic and molecular techniques. *JAPS, Journal of Animal and Plant Sciences* 23(6):1588–1594.
- Meisel, J.; Perera, D.; Meligro, C.; Rubin, C.** 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a cryptosporidium in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 70(6):1156–1160.

- Mercado, R.; Peña, S.; Ozaki, L.; Fredes, F.; Godoy, J.** 2015. Multiple *Cryptosporidium parvum* subtypes detected in a unique isolate of a Chilean neonatal calf with diarrhea. *Parasitology Research* 114(5):1985–1988. <http://doi.org/10.1007/s00436-015-4364-8>
- Mi, R.; Wang, X.; Huang, Y.; Zhou, P.; Liu, Y.; Chen, Y.; Chen, J.; Zhu, W.; Chen, Z.** 2014. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in goats across four provincial level areas in China. *PloS One* 9(10):e111164. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0111164>
- Molloy, B. y McManus, R.** 2015. Cloning Gene Variants and Reporter Assays. *Methods in Molecular Biology* 1326:117-130. http://doi.org/10.1007/978-1-4939-2839-2_12
- Morgan-Ryan, U.; Fall, A.; Ward, L.; Hijjawi, N.; Sulaiman, I.; Fayer, R.; Andrew Thompson, R.; Olson, M.; Lal, A.; Xiao, L.** 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49(6):433–440. <http://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2002.tb00224.x>
- Muñoz, P.; Fredes, F.; Díaz-Lee, A.; Mercado, R.; Ozaki, L.** 2011. Detección de *Cryptosporidium* spp. en terneras de lecherías de la Región Metropolitana mediante Ziehl Neelsen y confirmada por inmunocromatografía y ensayo molecular. *Archivos de Medicina Veterinaria* 43(2):111–116. <http://doi.org/10.4067/S0301-732X2011000200003>
- Muñoz P.; Mercado R.; Morales G.; Bravo V.; Raffo E.** 2014. *Cryptosporidium* spp., comparative diagnosis and geospatial distribution in diarrheic calves from dairy farms, Valdivia, Chile. *Revista MVZ Córdoba* 19(1):3954–3961.

- Navarro-I-Martinez, L.; da Silva, A.; Llovo Taboada, J.; Del Aguila, C.; Pieniazek, N.; Bornay-Llinares, F.** 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated in humans in two different locations in Spain. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 31(8):506–510. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.11.005>
- Nazemalhosseini-Mojarad, E.; Haghghi, A.; Taghipour, N.; Keshavarz, A.; Mohebi, S.; Zali, M.; Xiao, L.** 2011. Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* isolates from humans and cattle in Iran. *Veterinary Parasitology* 179(1-3):250–252. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.051>
- Neira-Otero, P.; Muñoz-Saldías, N.; Sanchez-Moreno, M. Rosales-Lombardo, M.** 2005. Molecular characterization of *Cryptosporidium* species and genotypes in Chile. *Parasitology Research* 97(1):63–67. <http://doi.org/10.1007/s00436-005-1391-x>
- Ng-Hublin, J.; Hargrave, D.; Combs, B.; Ryan, U.** 2015. Investigation of a swimming pool-associated cryptosporidiosis outbreak in the Kimberley region of Western Australia. *Epidemiology and Infection* 143(5):1037–1041. <http://doi.org/10.1017/S095026881400106X>
- Nilsson, H.; Tedersoo, L.; Abarenkov, K.; Ryberg, M.; Kristiansson, E.; Hartmann, M.; Schoch, C.; Nylander, J.; Bergsten, J.; Porter, T.; Jumpponen, A.; Vaishampayan, P.; Ovaskainen, O.; Halleberg, N.; Bengtsson-Palme, J.; Eriksson, K.; Larsson, K.; Larsson, E.; Koeljalg, U.** 2012. Five simple guidelines for establishing basic authenticity and reliability of newly generated fungal ITS sequences. *MycKeys* 4(0):37–63. <http://doi.org/10.3897/mycokeys.4.3606>
- Nime, F.; Burek, J.; Page, D.; Holscher, M.; Yardley, J.** 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70(4):592–598.

- Nolan, M.; Jex, A.; Mansell, P.; Browning, G.; Gasser, R.** 2009. Genetic characterization of *Cryptosporidium parvum* from calves by mutation scanning and targeted sequencing--zoonotic implications. *Electrophoresis* 30(15):2640–2647. <http://doi.org/10.1002/elps.200900071>
- Ocampo, R.; Rivera, F.; López, G.; Álvarez, M.; Cardozo, L.; Pérez, J.** 2012. First report of *Cryptosporidium parvum* in Holstein calves (*Bos taurus*) from Manizales, Caldas, Colombia. / Primer reporte de *Cryptosporidium parvum* en terneros Holstein (*Bos taurus*) de Manizales, Caldas, Colombia. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria Y de Zootecnia* 59(3):159–164.
- Ollivett, T.; Nydam, D.; Linden, T.; Bowman, D.; Van Amburgh, M.** 2012. Effect of nutritional plane on health and performance in dairy calves after experimental infection with *Cryptosporidium parvum*. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 241(11):1514–1520.
- Painter, J.; Hlavsa, M.; Collier, S.; Xiao, L.; Yoder, J.** 2015. Cryptosporidiosis Surveillance — United States , 2011 – 2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 64(3):2011–2012.
- Pancier, R.; Thomassen, R.; Garner, F.** 1971. Cryptosporidial Infection in a Calf. *Veterinary Pathology Online* 8 (5-6):479–484.
- Paparini, A.; Gofton, A.; Yang, R.; White, N.; Bunce, M.; Ryan, U.** 2015. Comparison of Sanger and next generation sequencing performance for genotyping *Cryptosporidium* isolates at the 18S rRNA and actin loci. *Experimental Parasitology* 151-152:21–27. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.02.001>
- Pirestani, M.; Sadraei, J.; Dalimi-Asl, A.; Zavvar, M.; Vaeznia, H.** 2008. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from human and bovine using 18S rRNA gene in Shahriar county of Tehran, Iran. *Parasitology Research* 103(2):467–472. <http://doi.org/10.1007/s00436-008-1008-2>

- Plutzer, J. y Karanis, P.** 2009. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: An update. *Veterinary Parasitology* 165(3-4):187–199. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.003>
- Qi, M.; Wang, H.; Jing, B.; Wang, D.; Wang, R.; Zhang, L.** 2015. Occurrence and molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves in Xinjiang, Northwestern China. *Veterinary Parasitology* 2–5. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.07.002>
- Quihui-Cota, L.; Lugo-Flores, C.; Ponce-Martínez, J.; Morales-Figueroa, G.** 2015. Cryptosporidiosis: a neglected infection and its association with nutritional status in schoolchildren in northwestern Mexico. *The Journal of Infection in Developing Countries* 9(08):878-883. <http://doi.org/10.3855/jidc.6751>
- Quilez, J.; Torres, E.; Chalmers, R.; Hadfield, S.; Del Cacho, E.; Sanchez-Acedo, C.** 2008a. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in lambs and goat kids in Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 74(19):6026–6031. <http://doi.org/10.1128/AEM.00606-08>
- Quilez, J.; Torres, E.; Chalmers, R. M.; Robinson, G.; Del Cacho, E.; Sanchez-Acedo, C.** 2008b. *Cryptosporidium* species and subtype analysis from dairy calves in Spain. *Parasitology* 135(14):1613–1620. <http://doi.org/10.1017/S0031182008005088>
- Rahmouni, I.; Essid, R.; Aoun, K.; Bouratbine, A.** 2013. Glycoprotein 60 Diversity in *Cryptosporidium parvum* Causing Human and Cattle Cryptosporidiosis in the Rural Region of Northern Tunisia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 90(2):346–350. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0522>
- Rieux, A.; Paraud, C.; Pors, I.; Chartier, C.** 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned kids in a dairy goat farm in western France. *Veterinary Parasitology* 192(1-3):268–272. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.008>

- Robinson, G. y Chalmers, R.** 2012. Assessment of polymorphic genetic markers for multi-locus typing of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Experimental Parasitology* 132(2):200–215. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.06.016>
- Rossle, N.; Latif, B.; Malik, A.; Fadzli, F.; Abu, N.** 2012. Cryptosporidiosis among children with diarrhea admitted to hospital Selayang and hospital Sungai Buloh, Selangor, Malaysia. *Journal of Tropical Medicine & Parasitology* 35(2):55–62.
- Ruecker, N.; Hoffman, R.; Chalmers, R.; Neumann, N.** 2011. Detection and resolution of *Cryptosporidium* species and species mixtures by genus-specific nested PCR-restriction fragment length polymorphism analysis, direct sequencing, and cloning. *Applied and Environmental Microbiology* 77(12):3998–4007. <http://doi.org/10.1128/AEM.02706-10>
- Ryan, U.; Fayer, R.; Xiao, L.** 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology* 141(13):1667–1685. <http://doi.org/10.1017/S0031182014001085>
- Rzezutka, A. y Kaupke, A.** 2013. Occurrence and molecular identification of *Cryptosporidium* species isolated from cattle in Poland. *Veterinary Parasitology* 196(3-4):301–306. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.009>
- Salyer, S.; Gillespie, T.; Rwego, I.; Chapman, C.; Goldberg, T.** 2012. Epidemiology and molecular relationships of *Cryptosporidium* spp. in people, primates, and livestock from western Uganda. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6(4):e1597–e1597.
- Santin, M.; Trout, J.; Fayer, R.** 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Veterinary Parasitology* 155(1-2):15–23. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.04.018>

- Shabihkhani, M.; Lucey, G.; Wei, B.; Mareninov, S.; Lou, J.; Vinters, H.; Singer, E.; Cloughesy, T.; Yong, W.** 2014. The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings. *Clinical Biochemistry* 47(4-5):258–66. <http://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.01.002>
- Sharma, P.; Sharma, A.; Sehgal, R.; Malla, N.; Khurana, S.** 2013. Genetic diversity of *Cryptosporidium* isolates from patients in North India. *International Journal of Infectious Diseases* 17(8):e601–5. <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2012.12.003>
- Shen, Y.; Chen, X.; Murphy, R.** 2013. Assessing DNA Barcoding as a Tool for Species Identification and Data Quality Control. *PLoS ONE* 8(2):e57125. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0057125>
- Shrestha, R.; Grinberg, A.; Dukkipati, V.; Pleydell, E.; Prattley, D.; French, N.** 2014. Infections with multiple *Cryptosporidium* species and new genetic variants in young dairy calves on a farm located within a drinking water catchment area in New Zealand. *Veterinary Parasitology* 202(3-4):287–291. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.034>
- Smith, D. R.** 2012. Field Disease Diagnostic Investigation of Neonatal Calf Diarrhea. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 28(3):465–481. <http://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.07.010>
- Strong, W.; Gut, J.; Nelson, R. G.** 2000. Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. *Infection and Immunity* 68(7):4117–4134. <http://doi.org/10.1128/IAI.68.7.4117-4134.2000>

- Sturbaum, G.; Reed, C.; Hoover, P.; Helen, B.; Marshall, M.; Sterling, C.; Jost, B.** 2001. Species-Specific , Nested PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Detection of Single *Cryptosporidium parvum* Oocysts. Applied and environmental Microbiology 67(6):2665–2668. <http://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2665>
- Sulaiman, I.; Hira, P.; Zhou, L.; Al-Ali, F.; Al-Shelahi, F.; Shweiki, H.; Iqbal, J.; Khalid, N.; Xiao, L.** 2005. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. Journal of Clinical Microbiology 43(6):2805–2809. <http://doi.org/10.1128/JCM.43.6.2805-2809.2005>
- Tanriverdi, S.; Arslan, M.; Akiyoshi, D.; Tzipori, S.; Widmer, G.** 2003. Identification of genotypically mixed *Cryptosporidium parvum* populations in humans and calves. Molecular and Biochemical Parasitology 130(1):13–22.
- Tomazic, M. ; Maidana, J.; Dominguez, M.; Uriarte, E.; Galarza, R.; Garro, C.; Florin-Christensen, M.; Schnittger, L.** 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from calves in Argentina. Veterinary Parasitology 198(3-4):382–386. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.09.022>
- Tyzzar, E. E.** 1907. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. Experimental Biology and Medicine 5(1):12–13. <http://doi.org/10.3181/00379727-5-5>
- Tyzzar, E. E.** 1910. An extracellular Coccidium, *Cryptosporidium* Muris (Gen. Et Sp. Nov.), of the gastric Glands of the Common Mouse. The Journal of Medical Research 23(3):487–510.3.
- Tyzzar, E. E.** 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Archiv für Protistenkunde 26:394-412.
- Uetake, K.** 2013. Newborn calf welfare : A review focusing on mortality rates. Animal Science Journal 84:101–105. <http://doi.org/10.1111/asj.12019>

- USDA.** 2010. Dairy 2007, Heifer calf health and Management practices on U.S. Operations, 2007. USDA:APHIS:VS, CEAH, United States, 550 pp.
- Waldron, L.; Dimeski, B.; Beggs, P.; Ferrari, B.; Power, M.** 2011. Molecular Epidemiology, Spatiotemporal Analysis, and Ecology of Sporadic Human Cryptosporidiosis in Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 77(21):7757–7765. <http://doi.org/10.1128/AEM.00615-11>
- Waldron, L.; Ferrari, B.; Cheung-Kwok-Sang, C.; Beggs, P.; Stephens, N.; Power, M.** 2011. Molecular epidemiology and spatial distribution of a waterborne cryptosporidiosis outbreak in Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 77(21):7766–71. <http://doi.org/10.1128/AEM.00616-11>
- Waldron, L.; Ferrari, B.; Power, M. L.** 2009. Glycoprotein 60 diversity in *C. hominis* and *C. parvum* causing human cryptosporidiosis in NSW, Australia. *Experimental Parasitology* 122(2):124–127. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.02.006>
- Walker, W.; Epperson, W.; Wittum, T.; Lord, L.; Rajala-Schultz, P.; Lakritz, J.** 2012. Characteristics of dairy calf ranches: morbidity, mortality, antibiotic use practices, and biosecurity and biocontainment practices. *Journal of Dairy Science* 95(4):2204–14. <http://doi.org/10.3168/jds.2011-4727>
- Wang, R.; Wang, H.; Sun, Y.; Zhang, L.; Jian, F.; Qi, M.; Ning, C.; Xiao, L.** 2011. Characteristics of *Cryptosporidium* transmission in preweaned dairy cattle in Henan, China. *Journal of Clinical Microbiology* 49(3):1077–1082. <http://doi.org/10.1128/JCM.02194-10>
- Webb, L.; Tubach, S.; Hunt, D.** 2014. Outbreak of Cryptosporidiosis Among Responders to a Rollover of a Truck Carrying Calves — Kansas , April 2013. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 63(50):1185-1188.

- Wells, B.; Shaw, H.; Hotchkiss, E.; Gilray, J.; Ayton, R.; Green, J.; Katzer, F.; Wells, A.; Innes, E.** 2015. Prevalence, species identification and genotyping *Cryptosporidium* from livestock and deer in a catchment in the Cairngorms with a history of a contaminated public water supply. *Parasites & Vectors* 8:66. <http://doi.org/10.1186/s13071-015-0684-x>
- Weyl-Fenstein, S.; Markovics, A.; Eitam, H.; Orlov, A.; Yishay, M.; Agmon, R.; Izhaki, I.; Shabtay, A.** 2014. Short communication : effect of pomegranate-residue supplement on *Cryptosporidium parvum* oocyst shedding in neonatal calves. *Journal of Dairy Science* 97:5800–5805.
- WHO.** 2011. Guidelines for Drinking-Water Quality Fourth Edition. WHO. Switzerland, 541 pp.
- Widmer, G. y Sullivan, S.** 2012. Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. *Parasite Immunology* 34(2-3):61–71. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01301.x>
- Wilkes, G.; Ruecker, N.; Neumann, N.; Gannon, V.; Jokinen, C.; Sunohara, M.; Topp, E.; Pintar, K.; Edge, T.; Lapen, D.** 2013. Spatiotemporal analysis of *Cryptosporidium* species/genotypes and relationships with other zoonotic pathogens in surface water from mixed-use watersheds. *Applied and Environmental Microbiology* 79(2):434–448. <http://doi.org/10.1128/AEM.01924-12>
- Wyatt, C.; Riggs, M.; Fayer, R.** 2010. Cryptosporidiosis in Neonatal Calves. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 26(1):89–103. <http://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.10.001>
- Xiao, L.** 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Experimental Parasitology* 124(1):80–89. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.018>

- Xiao, L.; Zhou, L.; Santin, M.; Yang, W.; Fayer, R.** 2007. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States. *Parasitology Research* 100(4):701–706. <http://doi.org/10.1007/s00436-006-0337-2>
- Zambriski, J.; Nydam, D.; Wilcox, Z.; Bowman, D.; Mohammed, H.; Liotta, J.** 2013. *Cryptosporidium parvum*: determination of ID₅₀ and the dose-response relationship in experimentally challenged dairy calves. *Veterinary Parasitology* 197(1-2):104–12. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.04.022>
- Zhang, W.; Wang, R.; Yang, F.; Zhang, L.; Cao, J.; Zhang, X.; Ling, H.; Liu, A.; Shen, Y.** 2013. Distribution and genetic characterizations of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned dairy calves in Northeastern China's Heilongjiang Province. *Plos One* 8(1):e54857–e54857. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0054857>
- Zhang, X.; Tan, Q.; Zhou, D.; Ni, X.; Liu, G.; Yang, Y.; Zhu, X.** 2015. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle, northwest China. *Parasitology Research* 114(7):2781–2787. <http://doi.org/10.1007/s00436-015-4537-5>.

ANEXO

ANEXO 1

PROTOCOLO TOMA DE MUESTRAS DE HECES DE TERNEROS DIARREICOS

1. Tomar muestra directamente del ano del animal, en tubo de 50 mL con alcohol (una muestra por tubo)
2. Identificar cada muestra, escribiendo en cada tubo el número de ternero que corresponde.
3. Llenar datos solicitados en Tabla de registro con: Número de ternero, fecha de nacimiento y fecha de toma de muestra.
4. Enviar las muestras al Laboratorio de Parasitología de FAVET, U. de Chile. A nombre de Dr. Fernando Fredes.

ANEXO 2

EXTRACCIÓN DE DNA A TRAVÉS DE KIT DE EXTRACCIÓN ZR FECAL DNA MINIPREP™ DE ZYMO RESEARCH

CONTENIDO DEL KIT

- ZR BashingBead™ Lysis Tubes (Tubos de lisis)
- Lysis Solution (Solución de Lisis)
- Fecal DNA Binding Buffer (Buffer de unión)
- DNA Pre-Wash Buffer (Buffer de pre-lavado)
- DNA Wash Buffer (Buffer de lavado)
- DNA Elution Buffer (Buffer de elusion)
- Zymo-Spin™ IV Spin Filters (Tubos tapa naranja)
- Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filter (Tubos tapa verde)
- Zymo-Spin™ IIC Columns (Tubos IIC)
- Collection Tubes (Tubos colectores)

ANTES DE COMENZAR CON EL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN SE DEBE PREPARAR UN TUBO TAPA VERDE

1. Sacar del tubo tapa verde del tubo colector
2. Cortar la base del tubo tapa verde
3. Volver a colocar en el tubo colector
4. Centrifugar el tubo tapa verde por exactamente a 8000 g por 3 minutos

PROTOCOLO

1. En el tubo de lisis, se agregan 250 ul de muestra de heces desde el fondo del tubo y se agregan 750 ul de solución de lisis
2. Asegurar el tubo de lisis (cerrar bien) y colocar en vortex a máxima velocidad por 5 minutos
3. Pasado los 5 minutos, centrifugar el tubo de lisis a ≥ 10000 g por 1 minuto
4. Posterior a la centrifugación, del sobrenadante del tubo de lisis se transfieren 400 ul a un tubo tapa naranja con tubo colector
5. Centrifugar el tubo tapa naranja con tubo colector a 7000 g por 1 minuto
6. Sacar el tubo de la centrifuga, desechar el tubo tapa naranja sin el tubo colector, y en este último, agregar 1200 ul del Buffer de unión al filtrado
7. Mezclar por pipeteo suave
8. Pasar solo 800 ul de la mezcla del tubo colector del paso anterior, a un tubo IIC con tubo colector
9. Centrifugar el tubo IIC a 10000 g por 1 minuto
10. Sacar el tubo de la centrifuga, descartar el filtrado del tubo colector y repetir el paso 8 y 9
11. Agregar 200 ul de Buffer de pre-lavado al tubo IIC con un nuevo tubo colector
12. Centrifugar a 10000 g por 1 minuto
13. Agregar 500 ul de Buffer de lavado al mismo tubo IIC con tubo colector
14. Centrifugar a 10000 g por 1 minuto
15. Sacar de la centrifuga y colocar el tubo IIC en un tubo de micro centrifuga de 1.5 ml y agregar 100 ul de Buffer de elución directamente en la columna del tubo
16. Centrifugar a 10000 g por 30 segundos

17. Del tubo de micro centrifuga de 1.5 ml del paso anterior, se transfiere todo el contenido a un tubo tapa verde (ya preparado) con un nuevo tubo de micro centrifuga de 1.5 ml
18. Centrifugar exactamente a 8000 g por 1 minuto
19. Desechar el tubo tapa verde y el DNA filtrado del tubo de micro centrifuga de 1.5 ml se encuentra preparado para cuantificación y/o amplificación