

CRYPTOSPORIDIUM SPP. EN GANADO BOVINO: SU POTENCIAL COMO CONTAMINANTE DE LOS RECURSOS HÍDRICOS

**MODINI, L.¹; OTERO, J. L.²; CARRERA, E.³;
ZERBATO, M.¹; ELIGGI, S.¹ & ABRAMOVICH, B.¹**

RESUMEN

Cryptosporidium es un protozoo que ha producido numerosos brotes de origen hídrico. La mayor concentración de ooquistes de este enteroparásito en aguas superficiales, se detectó en zonas con prácticas agrícolas ganaderas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en ganado. Se realizaron muestreos de materia fecal de 106 terneros de crianza artificial, divididos en dos etapas: en la primera (n1= 60) de edades comprendidas entre dos semanas y dos meses; y la segunda (n2 = 46), menores a dos semanas. Se concentraron las muestras por el método de Sheather y se aplicó la coloración de Kinyoun para la identificación de los ooquistes. Se halló un porcentaje total de 84 % de terneros con *Cryptosporidium* spp. Este elevado valor indica la alta potencialidad de contaminación de los recursos hídricos, a través de aguas de escorrentía que arrastran estiércol de ganado.

Palabras claves: *Cryptosporidium*, ganado, contaminación, recursos hídricos.

SUMMARY

***Cryptosporidium* spp: In cattle: Its potential as a contaminant of water resources.**

Cryptosporidium is a protozoan that has caused numerous waterborne disease outbreaks. The highest concentration of this enteroparasite in surface water was detected in areas with livestock farming practices. The aim of this work was to study the prevalence of *Cryptosporidium* spp in cattle. Samples were taken from stools of 106 artificially reared calves divided into two groups: the first (n1 = 60) aged between two weeks and two months, and the second (n2 = 46), less than two weeks old. Samples were concentrated by the Sheather's method and Kinyoun staining was applied for identification of oocysts. A total of 84% of calves were *Cryptosporidium* spp. positive. This high value indicates the high potential of contamination of water resources through runoff that carries cattle manure.

Key words: *Cryptosporidium*, cattle, contamination, water resources.

1.- Sección Aguas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL)

2.- Dpto. de Salud Pública. Facultad de Ciencias Veterinarias (UNL)

3.- Dpto. de Matemática. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL).

Subsidio CAI+D 2009. Universidad Nacional del Litoral. Proyecto de Investigación y Desarrollo. PI N° 8- 42.

Manuscrito recibido el 7 de septiembre de 2009 y aceptado para su publicación el 11 de mayo de 2010.

INTRODUCCIÓN

Cryptosporidium es taxonómicamente descrito como un protozoo coccideo, capaz de producir brotes de enfermedad de origen hídrico en humanos, tanto en naciones industrializadas como en países en desarrollo.

La naturaleza robusta de los ooquistes, la resistencia a la desinfección convencional por cloración, la capacidad de traspasar las barreras físicas en el tratamiento del agua y la baja dosis infecciosa, contribuyen a la persistencia de estos parásitos en el ambiente.

Si bien el riesgo de infección a través de alimentos no debe ser descartado es, sin dudas, el agua contaminada con heces humanas o animales, la vía más importante de transmisión ambiental (Abramovich *et al.*, 1999). Ha sido demostrada la amplia distribución espacial y temporal de enteroparásitos en aguas naturales (Abramovich *et al.*, 1996, 2001; Abramovich, 1998). En estos estudios se ha verificado la elevada prevalencia de ooquistes en aguas superficiales: 100 % en aguas de balnearios y 92 % de las obtenidas en fuentes utilizadas para potabilización.

El ganado vacuno produce 21 veces más residuos (materia fecal y orina) que el ser humano. A diferencia de una ciudad en donde la regulación le exige la instalación de una planta de tratamiento de efluentes cloacales, a un campo con ganado no se le impone habitualmente ningún tipo de tecnología para tratar sus residuos. En consecuencia, los mismos no son gerenciados correctamente terminando en el suelo y en el agua con la consiguiente contaminación, lo cual se traduce en un significativo daño al ambiente y problemas de salud para la población. Uno de los microorganismos más peligrosos que se conoce y que se transmite a través del agua es el enteroparásito *Cryptosporidium parvum*. Un gramo de materia fecal de ganado vacuno contiene aproximadamente un

millón de estos parásitos, los cuales se diseminan por el suelo y terminarán en el agua (Belloso, 2007).

Según diversos autores (Bodley Tickell *et al.*, 2002; Solarte *et al.*, 2006; Mons *et al.*, 2009) la mayor concentración de ooquistes en aguas superficiales se detectó en zonas con alta influencia de la ganadería. Durante 2005 se notificaron 7960 casos de criptosporidiosis declarados en 16 países de Europa. En varios de ellos al realizar la investigación epidemiológica y ambiental, se detectaron prácticas agrícola-ganaderas en los alrededores a la fuente proveedora de agua, que pueden haber provocado su contaminación con estiércol animal (Semenza & Nichols, 2007). Particularmente importante fue el brote de criptosporidiosis en la ciudad de Milwaukee en 1993 con 403.000 enfermos y cerca de un centenar de muertes. Uno de los factores tenido más en cuenta fueron las intensas lluvias que arrastraron considerable cantidades de ooquistes de origen animal en las aguas de escurrimiento, llegando así a las plantas de potabilización (Mac Kenzie *et al.*, 1994).

Altas concentraciones de mamíferos en granjas ganaderas representan, por lo tanto, un alto riesgo de contaminación con ooquistes de las aguas de escurrimientos agrícolas (Bodley Tickell *et al.* 2002). La mayor prevalencia se presenta en terneros de 1-3 semanas de vida. Generalmente los terneros positivos a *Cryptosporidium* spp. sufren una leve diarrea asociada a la eliminación de ooquistes, pero virtualmente ninguno padece una seria patología; siendo innecesario tratamiento alguno (Anderson, 1998).

Reconocido el aporte ambiental que significan los ooquistes provenientes del ganado, se planteó como objetivo estudiar la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en terneros provenientes de zonas de la Cuenca Lechera Santafesina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los muestreos se realizaron en dos etapas con dos grupos diferentes: El primero (G1) de tamaño muestral $n_1=60$ y el segundo (G2) con tamaño $n_2=46$. El primer grupo estaba integrado por terneros de edades comprendidas entre 2 semanas y 2 meses, mientras que en el segundo eran menores a dos semanas de edad. Ambos grupos estaban compuestos por terneros provenientes de una unidad de crianza artificial de terneros en sistema de "estaca", del Departamento Las Colonias, provincia de Santa Fe. Esta unidad de crianza artificial reunía terneros provenientes de diversos tambos. Se la seleccionó en base a esa característica, con el criterio de realizar un estudio preliminar. Se los criaba en base a alimento balanceado y sustituto lácteo. Las muestras de materia fecal se tomaron por la maniobra de estimulación del esfínter anal, recogién dose aproximadamente 50 gramos de cada animal. En todos los casos fueron inactivadas con solución de formol 5 % por razones de bioseguridad, siendo luego almacenadas y refrigeradas hasta su análisis en el laboratorio.

DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Las muestras de materia fecal fueron concentradas por el método de Sheather (Shore García, 2007). Para aplicar esta técnica, previamente se filtraron las muestras a través de gasa doble y el filtrado se centrifugó 5 minutos a 3000 rpm. Luego, 1 volumen (aproximadamente 10 ml) del sedimento obtenido se agregó a 3 volúmenes de solución de Sheather y se centrifugó 10 minutos a bajas revoluciones (2000 rpm). Se extrajo la capa superior y se procedió a su lavado por adición de agua destilada y centrifugación. Con el sedimento obtenido se realizaron extendidos y se colorearon con el método de

Kinyoun (Henriksen and Pohlenz, 1981). Se observó al microscopio óptico, utilizando aumentos de 45 x y 100 x. La identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se realizó teniendo en cuenta, características morfológicas y coloración (Fayer, 1997).

MÉTODO ESTADÍSTICO

Se calcularon las proporciones de criptosporidiosis de los dos grupos (G1 y G2), hallándose la proporción conjunta para el lote constituido por los animales de ambos, mediante la fórmula:

$$\hat{p} = \frac{n_1\hat{p}_2 + n_2\hat{p}_1}{n_1 + n_2}$$

\hat{p} = proporción correspondiente al total $n_1 + n_2$

\hat{p}_1 = proporción de criptosporidiosis en el G_1 ; n_1 tamaño del G_1

\hat{p}_2 = proporción de criptosporidiosis en el G_2 ; n_2 tamaño del G_2

Se calculó el intervalo de confianza del 95% para estimar la posible prevalencia de *Cryptosporidium* spp. y se realizó un contraste de hipótesis entre el valor conjunto de la proporción hallada por la fórmula anterior con los datos muestrales y los publicados en la bibliografía consultada, seleccionando un nivel de significancia $\alpha = 0,05$ (Altman, 1997; Sokal & Rolf, 1999).

RESULTADOS

La consistencia de las heces era líquida-semilíquida en el 52 % de las muestras en G1 y en el 43 % en G2.

La proporción de terneros positivos a *Cryptosporidium* spp. fue de 85% y 83 % en el primero y segundo grupo, respectivamente. La proporción conjunta de ambas mues-

tras arrojó un porcentaje aproximado al 84 %. Con una confianza del 95 % la prevalencia de terneros positivos de *Cryptosporidium* spp. estaría comprendida entre el 74 % y el 91 %. Realizada la comparación entre el valor hallado en este trabajo para los 106 terneros y el valor máximo hallado en la bibliografía internacional (Sischo *et al.*, 2000), la diferencia entre ambas proporciones resultó altamente significativa ($Z_{obs} = 6,99$ -p menor a $10 \exp -6$).

DISCUSIÓN

La presencia de *Cryptosporidium* spp. en ganado se ha reportado en muchos países (Laberge *et al.*, 1996; Sischo *et al.*, 2000; Bodley Tickell *et al.*, 2002) y es altamente prevalente en los terneros, sobre todo los de menor edad (1-3 semanas). Estudios realizados por United States Departments of Agriculture, Animal Plant Health Inspection Service and Veterinary Services en 1993 (Sischo *et al.*, 2000) estimaron que estos parásitos están presentes en el 90 % de las granjas lecheras de Estados Unidos, siendo la prevalencia máxima detectada, cercana al 50 %.

En Argentina también ha sido descrita la presencia de *Cryptosporidium* spp. en terneros de tambos, pero con rangos de prevalencia notablemente menores: 29,6 % (Bellinzoni *et al.*, 1990) y 17 % (Del Cocco *et al.*, 2008).

No se pudo determinar si los aislamientos corresponden a la especie de *Cryptosporidium* descrita como la de potencial zoonótico, ya que la identificación de *C. parvum* sólo puede hacerse por caracterización molecular. Sin embargo, se ha reportado que las infecciones en los bovinos son edad - dependientes. *Cryptosporidium parvum* ha sido encontrado en el 85% de las

infecciones por *Cryptosporidium* en terneros previo al destete y es casi completamente reemplazado por otros, como *C. andersoni*, *C. bovis*, y el genotipo ciervo "deer-like" en terneros destetados y animales de mayor edad (Santin *et al.*, 2004; Fayer *et al.*, 2006, 2007; Thompson *et al.*, 2007). Por ello, se puede asumir que los ooquistes encontrados corresponderían a *C. parvum* ya que los terneros neonatos son los considerados como la fuente mas importante de la transmisión zoonótica (Xiao *et al.*, 2007, Coklin *et al.*, 2007), previa contaminación del agua.

Se destacan los elevados valores hallados en este estudio, que conducen a la necesidad de hacer otros relevamientos, en un mayor número de establecimientos, a fin lograr una estimación más precisa.

CONCLUSIONES

El control de *Cryptosporidium* spp. representa un desafío para los organismos encargados de la potabilización del agua, ya que no existen métodos disponibles para eliminar eficazmente o inactivar este enteroparásito del agua para consumo. El uso de desinfectantes para el tratamiento potabilización de agua ha sido insuficiente para inactivarlo completamente. Debido a la severidad de la enfermedad en la comunidad inmunocomprometida, y a los brotes epidémicos de origen hídrico de criptosporidiosis reportados, es sumamente importante impedir que este coccideo llegue al agua de bebida para humanos. Lógicamente, el primer paso para el logro de este objetivo es identificar la principal fuente de contaminación, a fin de elaborar estrategias para reducir la carga de ooquistes en las aguas superficiales. Además de monitorear su presencia en las fuentes de agua y optimizar el tratamiento de

potabilización con el objetivo de lograr su remoción, es esencial tomar medidas para inactivar ooquistes en las fuentes de mayor aporte, es decir en el estiércol de ganado, tal como parece demostrar la alta proporción de de terneros positivos a *Cryptosporidium* spp.

BIBLIOGRAFÍA

- ABRAMOVICH, B. L.** 1998. Parásitos en agua potable: un desafío de nuestro tiempo. Rev. Ing. Sanit. y Amb. 40: 18- 20.
- ABRAMOVICH, B. L.; LURA, M. C.; GILLI, M. I.; & HAYE, M. A.** 1999. *Cryptosporidium* y agua. Rev. Arg. de Microbiol. 31: 97- 105.
- ABRAMOVICH, B. L.; LURA, M.C.; HAYE, M.A.; NEPOTE, A. & ARGANARA, M.F.** 1996. Detección de *Cryptosporidium* en agua de consumo de origen subterráneo. Rev. Arg. Microbiol. 28: 73-77.
- ABRAMOVICH, B. L.; GILLI, M. I.; HAYE, M. A.; CARRERA, E.; LURA, M. C.; NEPOTE, A.; VAIRA, S. & CONTINI, L.** 2001. *Cryptosporidium* y *Giardia* en aguas superficiales. Rev. Arg. de Microbiol. 33: 167- 176.
- ALTMAN, D. G.** 1997. Practical statistics for medical research. Ed. Chapman and Hall. London. 589 pp.
- ANDERSON, B. C.** 1998. Cryptosporidiosis in Bovine and Human Health. J. Dairy Sc. 81: 3036- 3041.
- BELLINZONI, R. C.; BLACKHALL, J.; TERZOLO, H. R.; MOREIRA, A. R.; AUZA, N.; MATTION, N.; MICHEO, G. L.; LA TORRE, J. L. & SCODELLER, E.A.** 1990. Microbiology of diarrhoea in young beef and dairy calves in Argentina. Rev. Argent. Microb. 22 (3), 130-136.
- BELLOSO, C.** 2007. Accesible en http://www.Taller.Org.ar/Agua/Humedales/Contaminación_islas_exp_ganadera.Pdf
- BODLEY TICKLEY, A. T.; KITCHEN, S. E. & STURDEE, A. P.** 2002. Occurrence of *Cryptosporidium* in agricultural surface waters during annual farming cycle in lowland UK. Wat. Res. 36: 1880- 1886.
- COKLIN, T.; FARBER, J.; PARRINGTON, L. & DIXON, B.** 2007. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. Vet. Parasitol. 150, 297-305.
- DEL COCO, V. F.; CÓRDOBA, M.A. & BASUALDO, J. A.** 2008. *Cryptosporidium* infection in calves from a rural area of Buenos Aires, Argentina. Vet. Parasitol. 158, 31-35.
- FAYER, R.** (Ed.) 1997. *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. CRC Press Inc. Boca Raton, FL, pp. 1-42.
- FAYER, R.; SANTIN, M.; TROUT, J. M. & GREINER, E.** 2006. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1 to 2-year old dairy cattle in the eastern United States. Vet. Parasitol. 135, 105-112.
- HENRIKSEN, S.A. & POHLENZ, J.F.L.** 1981. Staining of *Cryptosporidia* by a modified Ziehl-Neelsen technique. Acta Vet. Scand. 22, 594-596.
- LABERGE, I. & GRIFFITHS, M. W.** 1996. Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. Int. J. of Food Microbiol. 31: 1-26.
- MAC KENZIE, J. J.; HOXIE, N. J.; PROCUTOR, M. E.; GRADUS, M. S.; BLAIR, K.A. & ROSE, J.** 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. New Eng. J. Med. 331: 161- 167.
- MONS, C.; DUMETRE, A.; GOSSELIN, S.; GALLIOT, Ch. & MOULIN, L.** 2009. Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* river contamination in Paris area. Wat. Res. 43: 211- 217.
- SANTIN, M.; TROUT, J.M.; XIAO, L.; ZHOU,**

- L.; GREINER, E. & FAYER, R.** 2004. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet. Parasitol.* 122, 103-117.
- SEMENZA, J. C. & NICHOLS G.** 2007. Cryptosporidiosis surveillance and water-borne outbreaks in Europe. *Euro Surveill.* 12 (5). Available online: <http://www.eurosurveillance.org/em/v12n05/1205-227.asp>.
- SHORE GARCIA, L.** 2007. Diagnostic medical parasitology. Ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 1202 pp.
- SISCHO, W. M.; ATWILL, E. R.; LANYON, L. E. & GEORGE, J.** 2000. Cryptosporidia on dairy farms and the role these farms may have in contaminating surface water supplies in the northeastern United States. *Prev. Veterin. Medic.* 43: 253- 267.
- SOKAL, R. R. & ROLF, F. J.** 1999. Introducción a la Bioestadística. Ed. Reverté SA. Mexico. 357 pp.
- SOLARTE, Y.; PEÑA, M. & MADERA, C.** 2006. Transmisión de protozoarios patógenos a través del agua para consumo humano. *Colomb. Med.* 37: 74-82.
- THOMPSON, H. P.; DOOLEY, J. S.; KENNY, J.; MCCOY, M.; LOWERY, C. J.; MOORE, J. E. & XIAO, L.** 2007. Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland. *Parasitol. Res.* 100, 619-624.
- XIAO, L.; ZHOU, L.; SANTIN, M.; YANG, W. & FAYER, R.** 2007. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States. *Parasitol. Res.* 100, 701-706.