



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América  
Facultad de Medicina Veterinaria  
Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria

**Evaluación de *Cryptosporidium parvum* como factor de  
riesgo en la presentación de diarrea neonatal en  
alpacas en el departamento de Puno**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

**AUTOR**

Daniel Antonio MOLINA MEZA

Lima, Perú

2007



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Molina, D. Evaluación de *Cryptosporidium parvum* como factor de riesgo en la presentación de diarrea neonatal en alpacas en el departamento de Puno [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2007.

---

A mi madre y mi abuela, por su amor, apoyo y paciencia;  
y por darme ejemplo de lucha y fortaleza ante las adversidades.

A mi hermano Ronald, a quien estimo  
y a mi sobrina Danielita, luz y alegría de mi hogar.

A la Dra. Teresa López y el Dr. Armando González  
por el apoyo y confianza depositados en mi  
para el desarrollo del presente trabajo.

A los doctores: Rosa Perales, Norma Noe,  
César Gavidia y Francisco Suárez  
por el apoyo y consejo brindados.

Al Dr. W. García, D. Pezo y personal técnico del IVITA-Marangani  
y al Sr. Julio Cuba, gerente de la EPS Rural Alianza,  
por las facilidades dadas.

A la Dra. Dora Yucra y el Dr. Rómulo Sapana  
por la ayuda y facilidades brindadas.

A Luis G. y Gianina E.  
por su ayuda y enseñanza.

A mis amigos y hermanos Luis R., Víctor P., Denisse V., Nilton P.  
por su apoyo y valiosa amistad en los momentos  
en los que más los necesité.

A Milagros M. y Amparo F.  
por su especial afecto y amistad.

A Lisset por iluminarme en momentos de oscuridad y  
hacerme sentir que una historia importante jamás se olvida.

## CONTENIDO

RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	4
1. SITUACIÓN ACTUAL DE LA ALPACA EN EL PERÚ.....	4
2. LA CRIPTOSPORIDIOSIS Y EL SÍNDROME DIARREICO NEONATAL.....	6
3. ETIOLOGÍA	
3.1 SITUACIÓN TAXONÓMICA DE <i>C. parvum</i> .....	11
3.2 LOCALIZACIÓN EN EL HOSPEDADOR.....	14
3.3 CICLO DE VIDA DE <i>C. parvum</i> .....	14
4. EPIDEMIOLOGÍA	
4.1 MODO DE TRANSMISIÓN Y FUENTES DE INFECCIÓN.....	17
4.2 PREVALENCIA DE LA CRIPTOSPORIDIOSIS.....	18
4.3 FACTORES EPIDEMIOLÓGICOS QUE INFLUYEN EN LA PRESENTACIÓN DE LA CRIPTOSPORIDIOSIS	
4.3.1 Factores dependientes del parásito.....	21
4.3.2 Factores dependientes del hospedador.....	22
4.3.3 Factores dependientes del ambiente.....	25
5. SIGNOS CLÍNICOS.....	26
6. LESIONES.....	28
7. PATOGÉNESIS.....	29
8. DIAGNÓSTICO.....	31
9. TRATAMIENTO.....	33
10. ASOCIACIÓN DE VARIABLES.....	36
10.1 Diseños transversales de tipo ecológico.....	36
10.2 Diseños epidemiológicos.....	36
10.2.1 Estudio Caso-Control.....	36
10.2.2 Estudio de cohortes.....	37

III. MATERIALES Y MÉTODOS	38
1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	38
2. LUGAR DE ESTUDIO.....	38
3. ANIMALES.....	39
4. TAMAÑO MUESTRAL.....	40
5. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....	41
6. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	41
7. TÉCNICA DE TINCIÓN PARA <i>Cryptosporidium sp.</i>	
7.1 Tinción de Ziehl-Neelsen Modificada (Henricksen y Pohlenz, 1981)	41
7.2 Lectura de las muestras.....	41
7.3 Criterios de diagnóstico.....	42
8. ANÁLISIS DE DATOS.....	42
IV. RESULTADOS	43
V. DISCUSIÓN	50
VI. CONCLUSIONES	53
VII. LITERATURA CITADA	54

## RESUMEN

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria de distribución cosmopolita que es causante de severos brotes de diarrea en los rumiantes domésticos neonatales. El presente trabajo es el primero que evaluó en campo el papel del *Cryptosporidium parvum* como factor de riesgo en la presentación de diarrea neonatal empleando el diseño epidemiológico de Caso-Control en alpacas del departamento de Puno. El muestreo se realizó entre los meses de Febrero y Marzo del 2006. Se recolectaron muestras fecales (n=487) directamente del recto de crías de alpacas entre 1 a 15 días de edad procedentes de las localidades de Antacalla, La Raya, Quimsachata y Macusani. Los frotis fecales fijados previamente en metanol, fueron procesados según la técnica de tinción de Ziehl-Neelsen Modificado. Se encontró que de los animales diarreicos, el 39 % (130/336) resultaron positivos a la infección por *C. parvum*. Por otro lado, el 23 % (35/151) de las alpacas sin diarrea estaban infectadas. El análisis de regresión logística demostró que el parásito no representó un factor de riesgo para diarrea neonatal en los animales estudiados (OR: 1.5, IC 95%: 0.9-2.4). Otras variables fueron también evaluadas junto a *C. parvum*, determinándose que la localidad de La Raya fue estadísticamente significativa (P < 0.05), representando un factor de riesgo para la presentación de diarrea neonatal (OR: 2.5, IC 95%: 1.1-6.1).

**Palabras clave:** Alpacas, *Cryptosporidium parvum*, diarrea neonatal, factor de riesgo



## ABSTRACT

Cryptosporidiosis is a world-wide distributed parasitary disease, being the cause of severe neonatal diarrhea outbreaks in domestic ruminants. This is the first study researching in field, the role of *Cryptosporidium parvum* as a risk factor for the occurrence of neonatal diarrhea using a case-control study design in alpacas from Puno department. The study was carried out between February and March 2006. Stool samples (n=487) were directly collected from rectum of 487 alpacas aged one to 15 days old in four regions: Antacalla, La Raya, Quimsachata and Macusani. The faecal smears were processed following Modified Ziehl-Neelsen stain. From animals with diarrhea, 39 % (130/336) were positives to *C. parvum* infection. Meanwhile, 23 % (35/151) of alpacas without diarrhea were infected. The logistic regression showed that parasite does not represent a risk factor for neonatal diarrhea in screened animals (OR: 1.5, IC 95%: 0.9-2.4). Other variables were also considered to *C. parvum*; finally we determined that La Raya had statistically significance (P < 0.05), where it represents a risk factor for occurrence of neonatal diarrhea (OR: 2.5, IC 95%: 1.1-6.1).

**Keywords:** Alpacas, *Cryptosporidium parvum*, neonatal diarrhea, risk factor

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b>	Existencia y distribución geográfica de alpacas en el Perú.	5
<b>TABLA 2.</b>	Especies válidas de <i>Cryptosporidium sp.</i> y rango de hospedadores.	12
<b>TABLA 3.</b>	Distribución de alpacas neonatales muestreadas según el lugar de origen.	46
<b>TABLA 4.</b>	Distribución de alpacas neonatales diarreicas según la presencia o no de <i>Cryptosporidium parvum</i> .	46
<b>TABLA 5.</b>	Distribución de alpacas neonatales diarreicas según la localidad de origen.	47
<b>TABLA 6.</b>	Distribución de alpacas neonatales diarreicas según el sexo.	48
<b>TABLA 7.</b>	Distribución de alpacas neonatales diarreicas según la raza.	48
<b>TABLA 8.</b>	Resultados del análisis de regresión logística para los predictores de diarrea en alpacas neonatales en el departamento de Puno.	49

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Ciclo biológico de *Cryptosporidium parvum*. 15
- FIGURA 2.** Microfotografía de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* 45  
con la técnica de Ziehl-Neelsen Modificado, a 400x.

## INTRODUCCIÓN

Los Camélidos Sudamericanos (CSA) son indispensables para la subsistencia de un amplio sector de la población alto andina de nuestro país. Representan una fuente importante de fibra, carne y pieles, además de ser usados, en el caso de la llama, como animales de carga. Su crianza se destaca por la eficiencia en el uso de la tierra en un ambiente adverso, como lo son las frágiles praderas de los páramos andinos (FAO, 2005). La alpaca y la llama son los camélidos sudamericanos domésticos más importantes desde el punto de vista social y económico, debido a que muchas familias de la región andina del sur del Perú se dedican a su crianza y explotación (Ortiz, 1988).

La crianza de los rumiantes domésticos, incluyendo la alpaca, se ve limitada en gran parte debido a diversos problemas sanitarios que pueden presentarse en las explotaciones. Estos problemas pueden desencadenar en la presentación de infecciones entéricas que generalmente son de carácter multifactorial y que afectan principalmente a los recién nacidos (Holland, 1990; O'Donoghue, 1995; De Graaf *et al.*, 1999a). Las enfermedades entéricas y su principal manifestación clínica, la diarrea, constituyen las principales causas de morbilidad y mortalidad en las primeras semanas de vida en los animales domésticos (Holland, 1990; Leguía, 1991; Ramírez, 1991; Ameghino y De Martini, 1991). Se debe considerar además que las comunidades campesinas y el pequeño productor altoandino se caracterizan por tener un tipo de crianza mixta, existiendo una convivencia entre bovinos, ovinos y alpacas (FAO, 2005). Esta situación favorece la difusión y transmisión de diversos agentes infecciosos y parasitarios (Ramírez, 1991), que pueden actuar generalmente en simultáneo, ocasionando diarrea (Troncoso, 1992).

La criptosporidiosis destaca entre las enfermedades que se caracterizan por producir diarrea en los animales neonatos. Esta enfermedad es producida por el protozoo *Cryptosporidium parvum* que afecta a un gran número de especies animales, incluidas las domésticas y al hombre (Holland, 1990; O'Donoghue, 1995; De Graaf *et al.*, 1999a; Acha y Szyfres, 2003; Xiao *et al.*, 2004). La infección se caracteriza por ocasionar pérdidas económicas en la industria pecuaria y por tratarse de una enfermedad zoonótica (O'Donoghue, 1995; De Graaf *et al.*, 1999a; Acha y Szyfres, 2003).

En las últimas décadas, se han realizado diversos estudios para dilucidar el papel que juega este parásito dentro del complejo entérico neonatal en los rumiantes domésticos. Asimismo, se han estudiado los mecanismos de acción por los cuales *Cryptosporidium parvum*, como único agente o en asociación con otros enteropatógenos, causa la presentación de la enfermedad (Holland, 1990; O'Donoghue, 1995; De Graaf *et al.*, 1999a; Whitehead y Anderson, 2006).

Los datos disponibles en la actualidad sobre la criptosporidiosis en alpacas en el Perú, consisten principalmente en estudios epidemiológicos y de aspectos clínicos y patológicos de la enfermedad. Dentro de los primeros, diversos estudios de prevalencia se han llevado a cabo en alpacas neonatales mostrando resultados comprendidos entre 10 a 26% para diferentes localidades en diversos departamentos del Perú. Asimismo, la asociación temporal entre diarrea y la presencia del parásito ha sido estudiada empleando un estudio ecológico de tipo transversal (López *et al.*, 1997; Romero, 1998).

Ambos tipos de estudio, los de prevalencia como los estudios ecológicos de tipo transversal, son un primer paso en el estudio de cualquier tipo de enfermedad pero tienen limitantes. En ese sentido, los estudios ecológicos de tipo transversal sólo establecen una asociación temporal, que no es suficiente para determinar causalidad de una variable. Para que esto ocurra se requiere, entre otras cosas, temporalidad, es decir, que la causa ocurra primero. Bajo condiciones de campo la temporalidad es difícil de establecer, de ahí que se empleen diseños específicos tales como cohortes y caso-control.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la infección por *C. parvum* como factor de riesgo para la presentación de diarrea neonatal en alpacas no mayores de 15 días de edad mediante un diseño caso-control en el departamento de Puno. Además, se estudió la

importancia de la presencia de diarrea, asociada a diversos factores de interés epidemiológico y/o clínico, como la localidad de origen, el sexo, la edad y la raza de las alpacas neonatas muestreadas.

## II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 1. SITUACIÓN ACTUAL DE LA ALPACA EN EL PERÚ

En la actualidad, la alpaca (*Lama pacos*) es la especie de CSA más numerosa en el Perú y la más cotizada por la producción de fibra (FAO, 2005). Desde el punto de vista económico es considerado un animal de doble propósito, por su producción de fibra de gran valor textil y producción de carne de excelente calidad nutritiva, alto en proteína y baja en grasa (Bustinza, 2001a). A esto se puede agregar la producción de cueros y pieles para actividades artesanales, constituyendo una importante fuente de trabajo (Ortiz, 1988).

Existen dos razas de alpacas, la Suri y la Huacaya. Estas dos razas se diferencian claramente por sus características fenotípicas. La alpaca Suri presenta fibras de gran longitud que se organizan en rizos que caen por los costados del cuerpo, esto le da al animal una apariencia angulosa. En cambio la alpaca Huacaya presenta un vellón de apariencia esponjosa, con fibras de menor longitud, lo que le da una apariencia más voluminosa al animal (FAO 2005). Pese a la diferencia de aspecto, no hay diferencias marcadas en el peso de las crías al nacer (7.5 a 8.0 kg) ni en el peso vivo adulto entre individuos de las dos razas, que en promedio es de 65 kg en hembras y 70 kg en machos (FAO, 2005).

La distribución de la alpaca abarca de los 8 a 20° paralelos de latitud sur y 68 a 80° de longitud occidental (Bustinza, 2001a). La crianza de alpacas y llamas en el Perú se desarrolla particularmente en la sierra del centro y sur, a altitudes que van desde los 3,800

hasta más de 5,000 metros sobre el nivel del mar (Bustinza, 2001a). La crianza de alpacas y llamas, por lo general se realiza junto a la de otras especies animales y algunos cultivos y se realiza entre los 3,800 y 4,000 m de altitud. Sin embargo, por encima de los 4,000 m la actividad predominante es la crianza de camélidos, en particular alpacas (FAO, 2005).

La población de alpacas de las dos razas, así como su distribución en el territorio nacional se presenta en la tabla 1. Según un estimado del Consejo Nacional de Camélidos Sudamericanos (CONACS), en el año 2001 había en el Perú una población de 3 041,598 alpacas; lo que representa el 87% de la población mundial (FAO, 2005). El departamento de Puno es el que posee la mayor proporción de alpacas, 58% del total nacional. De este 58%, la población de la raza Huacaya es de 1 392,600 animales, que representan el 56.5% y la de Suri es de 289,319 animales, que representan el 66.6% (FAO, 2005). A Puno le siguen los departamentos de Cusco, Huancavelica y Arequipa.

**Tabla 1.** Existencia y distribución geográfica de alpacas en el Perú

<b>Región</b>	<b>Huacaya</b>	<b>%</b>	<b>Suri</b>	<b>%</b>	<b>Total</b>	<b>%</b>
Puno	1 392 600	56.5	289 319	66.6	1 681 919	58.0
Cusco	304 797	12.4	41 431	9.5	346 228	11.9
Junín	47 620	1.9	7 970	1.8	55 590	1.9
Arequipa	207 810	8.4	26 561	6.1	234 371	8.1
Ayacucho	113 332	4.6	16 174	3.7	129 506	4.5
Apurímac	66 744	2.7	18 204	4.2	84 948	2.9
Huancavelica	306 968	12.4	23 660	5.4	330 628	11.4
Lima	26 333	1.1	11 377	2.6	37 710	1.3
<b>TOTAL</b>	<b>2 466 204</b>	<b>100.0</b>	<b>434 696</b>	<b>99.9</b>	<b>2 900 900</b>	<b>100.0</b>

**Notas:** Junín incluye los departamentos de Pasco y Huanuco

Huancavelica incluye el departamento de Ica

Lima incluye Ancash, Cajamarca y La Libertad

Fuente: FAO (2005)

De acuerdo al III Censo Nacional Agropecuario 1994, el Perú registró 74,487 unidades criadoras de alpacas. Esta cifra constituye el 4% del total de unidades agropecuarias. De este total, se estima que un 85% de las alpacas y la totalidad de las llamas está en manos de pequeños productores con escaso o nulo uso de tecnología (Bustinza, 2001a). Asimismo, el 10% corresponde a medianos y pequeños productores con un nivel tecnológico



intermedio y sólo el 5% se encuentra en empresas asociativas y centros experimentales con uso de tecnología de punta (Bustanza, 2001a; FAO, 2005).

La alpaca constituye el mayor capital pecuario de los pobladores en el departamento de Puno. Más aún, en las zonas altas representa el principal o en muchos casos el único recurso económico. Su crianza permite el aprovechamiento y conservación de la pradera nativa en forma óptima, que no puede ser aprovechada por otras especies por las condiciones poco favorables que existen (FAO, 2005). Sin embargo, la producción alpacuna se ve afectada por las bajas tasas de fertilidad y natalidad (47%) además de una elevada mortalidad embrionaria y neonatal (27%) debido principalmente a causas de naturaleza infecciosa, en las que están involucradas las enfermedades parasitarias (Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez, 1991).

## 2. LA CRIPTOSPORIDIOSIS Y EL SÍNDROME DIARREICO NEONATAL

Los cuadros clínicos producidos en rumiantes neonatos por diversos enteropatógenos (*Salmonella sp.*, *Clostridium perfringens*, *E. coli* enterotoxigénica y otras estirpes, *rotavirus*, *coronavirus*, *Cryptosporidium sp.* y *Eimeria sp.*) no suelen ser específicos. En este sentido, es imposible distinguir el agente etiológico en base a la observación clínica de los individuos. De allí que la participación de estos agentes etiológicos en la presentación de procesos entéricos y su principal signo, la diarrea (Holland, 1990; Troncoso, 1992; O'Donoghue, 1995; Martín-Gómez, 2001), se consideren bajo el término de “síndrome de la diarrea neonatal de los rumiantes”. Este síndrome se ve influenciado a la vez por otros factores relacionados al animal, a condiciones del medio ambiente y al manejo (Troncoso, 1992; Whitehead y Anderson, 2006).

Los brotes de diarrea en rumiantes neonatos cursan con alta morbilidad y, en ocasiones, mortalidad, por lo que diversos autores han considerado a la diarrea neonatal como la principal causa de mortalidad en rumiantes menores de 30 días (Holland, 1990; Ameghino y De Martini, 1991; Whitehead y Anderson, 2006). Dado el gran número de agentes etiológicos involucrados en este cuadro, tanto de forma individual o asociada con uno o más agentes, la prevención, control y tratamiento de la diarrea neonatal es difícil (Troncoso, 1992).

En relación a la participación de los diferentes agentes etiológicos en brotes diarreicos en neonatos, es importante conocer el papel que desempeñan en este síndrome. Dentro de los de naturaleza bacteriana, *E. coli* enterotoxigénica (ECET) es considerada como uno de los agentes etiológicos bacterianos dominantes en cuadros diarreicos y pérdida neonatal (Holland, 1990; Troncoso, 1992).

La ECET con sus enterotoxinas termolábiles y/o termoestables y con factores de colonización, es reconocida en terneros como causa común de diarrea en animales menores de 3 días de edad (Troncoso, 1992). Esta dependencia relacionada a la edad se debe a una disminución de la adherencia de la ECET al enterocito después de los pocos días de vida (De Graaf *et al.*, 1999a). Se ha observado una prolongación del período de receptividad a la infección por ECET en infecciones concurrentes con otros enteropatógenos como virus entéricos y *C. parvum* (Holland, 1990).

Diversos estudios realizados durante brotes de diarrea en corderos y cabritos en España, encontraron entre los agentes etiológicos involucrados, en primer lugar a *C. parvum* seguido de *E. coli* enterotoxigénica. La ECET se encontró en el 61% de los brotes y en el 30% de los individuos y en cabritos en el 36% de los brotes y en el 22% de los individuos (De Graaf *et al.*, 1999a).

En CSA, la *E. coli* enteropatógena y enterotoxigénica son la segunda causa de enfermedad infecciosa en crías (Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez *et al.*, 1998) y su presentación en cuadros diarreicos se ha estimado en un 15% (Ramírez *et al.*, 1998). Ambas cepas producen cuadros entéricos en crías durante 3 a 8 días, pérdida de peso y se produce la muerte de algunas crías (Ramírez *et al.*, 1998). Se ha señalado que la colibacilosis suele presentarse por fallas en la ingestión de calostro en crías de alpaca (Ameghino y De Martini, 1991).

Otros agentes bacterianos como *Salmonella sp.* y *Clostridium perfringens* han sido incluidos en el síndrome diarreico neonatal. En brotes diarreicos en cabritos, en España, se determinó que *Clostridium perfringens* representó el 20% de los brotes y 11% de los individuos. Asimismo, se determinó que *Salmonella sp.* estaba presente en el 7% de los brotes y 3% de los individuos (De Graaf *et al.*, 1999a). Por otro lado, un estudio realizado en alpacas y llamas determinó que *Salmonella sp.* es un agente bacteriano poco frecuente

en los brotes de diarrea (Whitehead y Anderson, 2006). En este sentido, un estudio realizado en California, en 76 llamas para detectar la presencia de *Salmonella sp.* no arrojó ningún caso positivo (Rulofson *et al.*, 2001). Por su parte Cebra *et al.* (2003) en un estudio realizado en crías de alpaca y llama, no llegaron a aislar *Salmonella sp.* en ninguno de los 45 casos de diarrea estudiados.

La enterotoxemia es la enfermedad infecciosa más importante en crías de alpaca y llama, debido a que ocasiona elevadas tasas de mortalidad de hasta 70% (Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez *et al.*, 1998). El agente etiológico responsable de esta enfermedad es *Clostridium perfringens* tipo A y en menor grado es atribuido al tipo C (Ramírez *et al.*, 1998). Un estudio reciente evidenció principalmente a la toxina  $\alpha$ , así como  $\beta_2$  y  $\beta$  como participantes en la etiopatogénesis de la enterotoxemia en las alpacas (Pérez, 2006).

La enterotoxemia es una enfermedad aguda que se ve en crías principalmente durante el primer mes de vida y puede observarse a partir de los 2-3 días de nacidos (Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez, 1991). Una característica peculiar de la enfermedad es que afecta principalmente a las crías en buenas condiciones (mientras que en la colibacilosis los animales afectados lucen pobres condiciones cárnicas) y la diarrea que produce puede durar varios días y producir finalmente la muerte (Ameghino y De Martini, 1991).

En lo que se refiere a los agentes virales, el *rotavirus* ha sido considerado como uno de los principales responsables de diarrea en terneros (Holland, 1990). La mayoría de los trastornos digestivos en terneros, que se dan entre los 4 días y 6 semanas de edad, pueden atribuirse a una variedad de virus. Entre los más importantes están el *rotavirus*, el *coronavirus* y el virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB) (De Graaf *et al.*, 1999a). Sin embargo, en un estudio llevado a cabo en España se demostró que los rotavirus juegan un papel menos importante en brotes de diarrea, después de *C. parvum* y *E. coli* enterotoxigénica, en corderos y cabritos (14% de los brotes y 22% de los individuos) (De Graaf *et al.*, 1999a).

Los *rotavirus* y *coronavirus* han sido identificados como causa de diarrea en llamas y alpacas neonatales. Así, en un estudio reciente en crías sin destetar, con edades comprendidas entre los 10 a 150 días de edad al tiempo del diagnóstico, el *coronavirus* fue uno de los patógenos más comunes causantes de diarrea. Se identificó al coronavirus en el

42% de los casos y afectó al 64% de los rebaños estudiados. Sin embargo, el *rotavirus* se detectó sólo en el 2% (1/45) de los casos (Cebra *et al.*, 2003).

La presencia de *rotavirus* y *coronavirus* se investigó en 2 centros de cautiverio de guanacos en la región de la Patagonia (Argentina). Ambos centros tuvieron brotes severos de diarrea, con una morbilidad del 100% y una mortalidad del 83% en animales entre 1 día y 2 meses de edad al tiempo de su captura. El *rotavirus* fue detectado en las heces de dos neonatos, uno de 2 y el otro de 7 días de edad (Parreño *et al.*, 2001). Por otro lado, en condiciones de campo se ha identificado la presencia de *rotavirus* y *coronavirus* en crías de CSA asociados a casos clínicos de diarrea, pero siempre en presencia de *E. coli* y a veces de *Cl. perfringens* (Ameghino y De Martini, 1991).

La importancia de *Cryptosporidium parvum* en el síndrome diarreico neonatal ha ido evolucionando con el transcurrir de las décadas. En la década de los setenta se describe la presencia del parásito en terneros, corderos y el hombre (O'Donoghue, 1995). En los rumiantes domésticos, su papel como agente patógeno primario permaneció sin aclarar hasta la década de los ochenta, en que se demostró la capacidad del parásito de producir diarrea en terneros infectados naturalmente y en ausencia de otros enteropatógenos. Además, se reprodujo experimentalmente el cuadro clínico en terneros y corderos (Ortega-Mora *et al.*, 1999). Ahora su papel como agente primario responsable de diarrea en diversos rumiantes, parece finalmente aclarado, tal como lo demuestran diversos estudios (Holland, 1990; O'Donoghue, 1995; De Graaf *et al.*, 1999a; López *et al.*, 2001a; Ramírez *et al.*, 2004; Whitehead y Anderson, 2006).

El *Cryptosporidium parvum* es más prevalente en bovinos menores de 30 días y está asociado con frecuencia, con el síndrome de diarrea neonatal de los becerros (O'Donoghue, 1995; De Graaf *et al.*, 1999a). Estudios experimentales y de campo revelan la importancia de este organismo como patógeno primario, responsable de severos cuadros de diarrea en terneros neonatos (Díaz, 2002), principalmente entre la primera y segunda semana de vida (Anderson, 1998).

Cada vez más el *Cryptosporidium* cumple un papel importante en el síndrome diarreico neonatal en corderos y cabritos. Actualmente está asociado con gran morbilidad y mortalidad, dependiendo de las condiciones ambientales y la presencia de otros patógenos

intestinales (De Graaf *et al.*, 1999a). Su papel como agente patógeno primario en el caso de corderos fue confirmado en los primeros años de los ochentas en estudios experimentales en ausencia de otros enteropatógenos (De Graaf *et al.*, 1999a). La infección en cabras ha sido diagnosticada en brotes de diarrea en cabritos en muchos países de Europa y es ahora considerado uno de los principales enteropatógenos en estos animales (Martín-Gómez, 1996; De Graaf *et al.*, 1999a).

La presencia de este protozoo en CSA fue reportada por Rojas *et al.* (1988) y en 1994 se determinó su asociación con procesos diarreicos en alpacas neonatas (López *et al.*, 1995). Asimismo, un estudio de infección experimental en alpacas neonatas, determinó su papel como patógeno primario (López *et al.*, 2001a) y en una infección de campo se reportó la muerte de 3 crías de alpaca de 9, 12 y 30 días debida a *C. parvum* al no encontrar otro enteropatógeno responsable del cuadro diarreico en estos animales (Bidewell y Catell, 1998). Asimismo, en un estudio realizado en 45 crías sin destetar de llamas y alpacas con cuadros diarreicos, *Cryptosporidium sp.* fue aislado en 9% (4/45) de los casos (Cebra *et al.*, 2003). Sin embargo, en un estudio en 354 llamas con edades entre 3 semanas y 23 años, no se encontraron ooquistes de *Cryptosporidium parvum* (Rulofson *et al.*, 2001).

El papel de otros protozoos intestinales como *Giardia sp.* en los rumiantes domésticos es controversial. La infección por este parásito es de diagnóstico común durante el primer mes de vida, pero su asociación con la producción de diarrea, no está del todo definida (De Graaf *et al.*, 1999a). La eliminación de quistes de *Giardia duodenalis* fue reportada en el 3.4% (12/354) de llamas asintomáticas, donde de las 12 muestras positivas, 10 pertenecieron a crías entre 1 y 4 meses (Rulofson *et al.*, 2001). No obstante, *Giardia* fue el patógeno responsable del 18% de 45 casos de diarrea en crías sin destetar de llamas y alpacas (Cebra *et al.*, 2003).

La coexistencia de infecciones por *C. parvum* y *Eimeria sp.* es frecuente en rumiantes de 20 a 25 días. Este tiempo coincide con el final de la patencia de la infección por *C. parvum* y el principio de la eliminación de determinadas *Eimeria* en corderos (Ortega-Mora *et al.*, 1999). López *et al.*, (2001a) al respecto señalan, que en alpacas desafiadas experimentalmente con *C. parvum*, al final del período de patencia se encontraron ooquistes de *E. punoensis*, tiempo que coincide con el período de pre patencia de la *Eimeria*.

Observaciones clínicas han sugerido que algunos organismos pueden actuar en sinergismo con el *Cryptosporidium*, amplificando y/o prolongando los signos clínicos de la enfermedad (O'Donoghue, 1995). Estudios experimentales han mostrado una acción sinérgica entre las infecciones por *C. parvum* y *Campylobacter jejuni* en ratones, habiéndose observado que esta asociación prolonga los signos clínicos en las infecciones por el protozoo, haciendo que el cuadro sea más severo (O'Donoghue, 1995).

### 3. ETIOLOGÍA DE LA CRIPTOSPORIDIOSIS

#### 3.1 TAXONOMÍA

Los organismos del género *Cryptosporidium* son protozoos que están asignados al Phylum Apicomplexa, Clase Sporozoa, Subclase Coccidia, Orden Eucoccidiida, Suborden Eimeriina, Familia Cryptosporidiidae, Género *Cryptosporidium* (Levine, 1980). Actualmente se han redefinido las bases para nombrar las especies pertenecientes a este género y nombrar las nuevas especies de *Cryptosporidium*. Estas son la morfología de los ooquistes, caracterización genética y la especificidad natural al hospedador (Xiao *et al.*, 2004). Tomando como referencia estas bases, la tabla 2 muestra las 14 especies del género *Cryptosporidium* válidas actualmente.

En los últimos años, la caracterización molecular de *Cryptosporidium* ha ayudado a aclarar la confusión existente respecto a la taxonomía de *Cryptosporidium* y validar la existencia de múltiples especies en cada clase de vertebrado. En este sentido, el género *Cryptosporidium* en mamíferos fue objeto de disputa desde 1980 y por un tiempo sólo 2 especies eran reconocidas, *C. parvum* como la forma intestinal y *C. muris* como la forma gástrica (Xiao *et al.*, 2004). *C. parvum* se diferencia de *C. muris* en el tamaño de los ooquistes y su localización única en la vellosidad del intestino delgado (Ortega-Mora, 1999; Xiao *et al.*, 2004). Posteriormente se determinó que *C. parvum* afecta el intestino de la mayoría de mamíferos, incluyendo al hombre y que *C. muris* y *C. andersoni* afectan el estómago de roedores y bovinos adultos respectivamente (Anderson, 1998; Xiao *et al.*, 2004).

**Tabla 2.** Especies válidas de *Cryptosporidium sp.* y rango de hospedadores

Especies	Hospedadores	Autor
<i>C. parvum</i> *	<i>Mus musculus</i> (ratón)	Tyzzler (1912)
	<i>Bos taurus</i> (bovino)	Pancieria <i>et al.</i> (1971)
	<i>Homo sapiens</i> (humanos)	Nime <i>et al.</i> (1976)
	<i>Sus scrofa</i> (cerdo)	Kennedy <i>et al.</i> (1977)
	<i>Ovis aries</i> (ovino)	Barker <i>et al.</i> (1974)
	<i>Capra hircus</i> (caprino)	Tzipori <i>et al.</i> (1981)
	<i>Equus caballus</i> (caballo)	Snyder <i>et al.</i> (1978)
<i>C. hominis</i>	<i>Homo sapiens</i> (humanos)	Morgan-Ryan <i>et al.</i> (2002)
<i>C. muris</i>	<i>Mus musculus</i> (ratón)	Tyzzler (1910)
	<i>Homo sapiens</i> (humanos)	Katsumata <i>et al.</i> (2000)
<i>C. nazorum</i>	<i>Naso lituratus</i> (pez)	Hoover <i>et al.</i> (1981)
<i>C. molnari</i>	<i>Sparus aurata</i> y <i>Dicentrarchus labrax</i> (pez)	Alvarez-Pellitero <i>et al.</i> (2002)
<i>C. meleagridis</i>	<i>Meleagris gallipavo</i> (pavo)	Slavin (1955)
	<i>Homo sapiens</i> (humanos)	Morgan <i>et al.</i> (2000)
<i>C. baylei</i>	<i>Gallus gallus</i> (pollo)	Current <i>et al.</i> (1986)
<i>C. serpentis</i>	<i>Ellaphe guttata</i> (serpiente)	Levine (1980)
	<i>E. subocularis</i> (serpiente)	
	Diferentes especies de lagartos	Xiao <i>et al.</i> (2004)
	<i>Sanzinia madagascarensis</i> (Boa de Madagascar)	
<i>C. wrairi</i>	<i>Cavia porcellus</i> (cuy)	Vetterling <i>et al.</i> (1971)
<i>C. felis</i>	<i>Felis cati</i> (gato)	Iseki (1979)
	<i>Homo sapiens</i> (humanos)	Pieniazek <i>et al.</i> (1999)
<i>C. canis</i>	<i>Canis familiaris</i> (perro)	Wilson (1983) Fayer <i>et al.</i> (2001)
	<i>Homo sapiens</i> (humanos)	Morgan <i>et al.</i> (2000)
<i>C. andersoni</i>	<i>Bos taurus</i> (bovino)	Lindsay (2000)
<i>C. saurophilum</i>	<i>Eumeces schneideri</i> (lagarto)	Koduella <i>et al.</i> (1998)
	Diferentes especies de lagartos	Xiao <i>et al.</i> (2004)
	Diferentes especies de serpientes	Xiao <i>et al.</i> (2004)
<i>C. bovis</i>	<i>Bos taurus</i> (bovino), <i>Ovis aries</i> (ovino)	Fayer <i>et al.</i> (2005)

\* Hospedadores comúnmente reportados

Fuente: Xiao *et al.* (2004)

Las diferencias fenotípicas fueron por muchos años tradicionalmente usadas para distinguir entre cepas de *C. parvum* aisladas de varias especies hospedadoras. Estudios de epidemiología molecular demostraron hacia finales de los noventa, la existencia de por lo menos dos únicos genotipos de *C. parvum*: humano (genotipo 1) y bovino (genotipo 2) (Sulaiman *et al.*, 1998; Ramírez *et al.*, 2004).

Los estudios de caracterizaciones moleculares, muestran que la adaptación de hospedadores en la evolución de *Cryptosporidium* viene extendiéndose. En este sentido, muchos mamíferos tienen genotipo de *Cryptosporidium* hospedador-adaptado, que se diferencian uno del otro en la secuencia de ADN e infectividad (Xiao *et al.*, 2004). Dentro de estos genotipos se incluye al *C. hominis*, recientemente reclasificado y previamente llamado genotipo humano o genotipo 1 (Morgan-Ryan *et al.*, 2002). Del mismo modo, se incluye a *C. parvum* (también llamado genotipo bovino o genotipo 2) y *C. canis* (genotipo del perro) (Xiao *et al.*, 2004).

Morfológicamente, las dos especies, *C. hominis* y *C. parvum* son casi indistinguibles. Sin embargo, estas dos especies se pueden distinguir mediante las diferencias genéticas que existen entre las dos (Sulaiman *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 1998a; Ramírez *et al.*, 2004; Tanriverdi y Widmer, 2006). Con respecto a la naturaleza del hospedador, *C. hominis* infecta a humanos, mientras la infección por *C. parvum* ha sido reportada en varias especies animales incluyendo bovinos, ovinos, caprinos, cerdos, ratones y humanos (Xiao *et al.*, 2004).

Las especies *C. parvum* y *C. hominis* han mostrado claramente patrones diferentes en la patología de la enfermedad en cerdos gnotobióticos y han fallado en el intercambio de material genético durante una infección dual (Pereira *et al.*, 2002). Cabe agregar que el nombre de *C. parvum* para el genotipo bovino, fue esencialmente validado por los estudios de Upton y Current en 1985, quienes realizaron una moderna descripción morfológica de los ooquistes y por Current y Reese en 1986, que estudiaron a profundidad el ciclo de vida y realizaron estudios de transmisión cruzada entre ratones y bovinos (Xiao *et al.*, 2004).

Los ooquistes del género *Cryptosporidium* son pequeños, de forma generalmente esférica, raramente ovoides. Los ooquistes maduros contienen 4 esporozoítos desnudos (sin esporoquiste), presentan un cuerpo residual oscuro y los esporozoítos presentan una



marcada refringencia (Ortega-Mora *et al.*, 1999). En particular, los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* presentan medidas en promedio de 4.5-5  $\mu\text{m}$  (Upton y Current, 1985; O'Donoghue, 1995; Ortega-Mora *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2004). Otros autores mencionan un rango más amplio para las medidas de los ooquistes, entre 4-6 $\mu\text{m}$  de diámetro (Muñoz *et al.*, 1993a; Weitz, 1994; Juranek, 2000; Fayer *et al.*, 2000; Bullock-Lacullo, 2001; Kosek *et al.*, 2001; Ramírez *et al.*, 2004).

### 3.2 LOCALIZACIÓN EN EL HOSPEDADOR

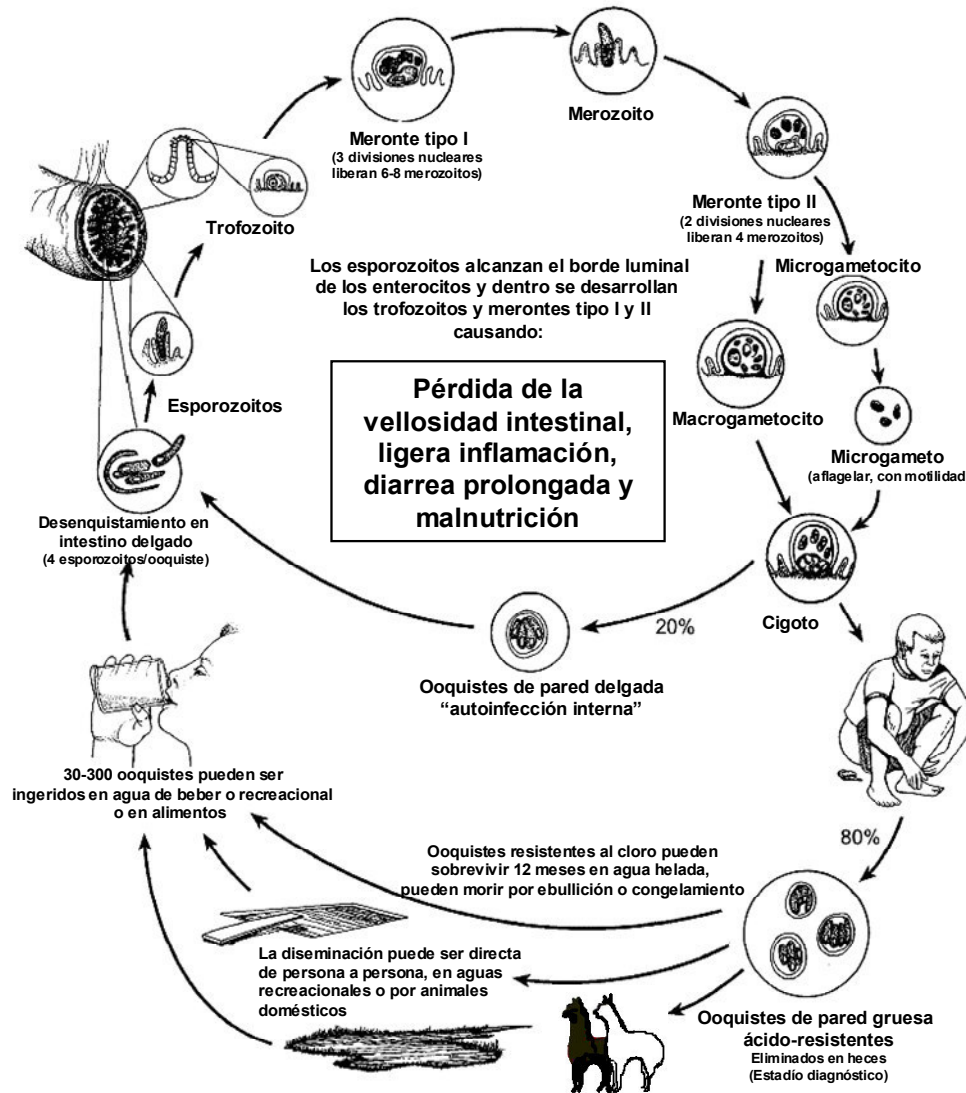
El *Cryptosporidium parvum* se localiza en el intestino delgado con especial predilección por las partes finales del yeyuno e íleon (Fayer y Ungar, 1986; Ortega-Mora *et al.*, 1999; Ramírez *et al.*, 2004). También puede afectar el intestino grueso, principalmente ciego y colon y, en determinados casos, parasita todo el tracto gastrointestinal (Heine *et al.*, 1984; Current y García, 1991; Ortega Mora *et al.*, 1999). Este parásito se desarrolla dentro de una vacuola parasitófora, en el borde apical de las células epiteliales del intestino, en una localización que se ha definido como intracelular pero extracitoplasmática (Fayer y Ungar, 1986; Ortega-Mora *et al.*, 1999; Kosek *et al.*, 2001).

En el hombre, se ha encontrado diferentes fases del ciclo biológico del parásito en otras localizaciones corporales como conductos biliares, conjuntiva, tráquea, útero, vías urinarias y respiratorias; aunque en rumiantes y en base a la experiencia deben considerarse como accidentales (Current y García, 1991; O'Donoghue, 1995). El parásito se ha encontrado también en el citoplasma de las células epiteliales de las Placas de Peyer y en macrófagos, intactos o lisados (Marcial y Madara, 1986; Chermette y Boufassa-Ouzrout, 1988).

Los estudios de microscopía electrónica han revelado la existencia de una zona electrodensa entre el parásito y el citoplasma celular. Por encima de esta zona existiría una estructura formada por pliegues de la membrana del parásito (organela de alimentación) que parece tener un importante papel en la nutrición de éste a partir de la célula hospedadora (Chermette y Boufassa-Ouzrout, 1988; Muñoz *et al.*, 1993a; Whitehead y Anderson, 2006).

### 3.3 CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico de *Cryptosporidium sp.* (Figura 1) es monoxeno y semejante al de otras coccidias (Holland, 1990). El ciclo puede ser dividido en 6 fases, en base a la descripción original de Tyzzer a principios del siglo pasado: desenquistamiento (liberación del esporozoíto), merogonia (replicación asexual), gametogonia (formación de gametos), fertilización, formación de la pared del ooquiste y esporogonia (formación del esporozoíto) (Tzipori, 1988; Current y García, 1991).



**Figura 1.** Ciclo biológico de *Cryptosporidium parvum*

Fuente: adaptado de Dillingham *et al.* (2002)

Los ooquistes de *C. parvum* salen esporulados del hospedador al ser eliminados en las heces (Ramírez *et al.*, 2004). Una vez ingeridos por un hospedador adecuado, se produce el desenquistamiento e inicio de la esquizogonia en el tracto gastrointestinal, liberándose del ooquiste 4 esporozoítos (Current y García, 1991; Ortega-Mora *et al.*, 1999).

La temperatura corporal de los mamíferos (37° C), sales biliares, y posiblemente, la tripsina son los factores que más influyen en ésta fase (Muñoz *et al.*, 1993a; Ortega-Mora *et al.*, 1999). Al respecto, Current y Haynes (1984) demostraron *in vitro*, que el desenquistamiento de los ooquistes requiere la acción combinada de tripsina y sales biliares.

Una vez liberados, los esporozoítos alcanzan el borde luminal de los enterocitos mediante movimientos de contracción-extensión y deslizamiento. Allí se invagina a manera de “dedo de guante”, siendo englobados por la membrana de la célula hospedadora que encapsula al parásito en el interior de una vacuola parasitófora (Fayer y Ungar, 1986; Holland, 1990; Ortega-Mora *et al.*, 1999). En la vacuola, los esporozoítos maduran a trofozoítos que luego de desarrollar y madurar sufren 3 divisiones nucleares para formar los merontes de tipo I (Kosek *et al.*, 2001).

Al romperse el enterocito, los merontes de tipo I liberan entre 6 a 8 merozoítos. Estos merozoítos liberados invaden las células epiteliales intestinales adyacentes y pueden madurar nuevamente a merontes tipo I (una fuente interna de autoinfección con amplificación de la carga parasitaria) o formar merontes tipo II a partir del cual se desarrollarán los macro o microgametocitos (Fayer y Ungar, 1986; Holland, 1990; Kosek *et al.*, 2001).

Los merozoítos del tipo II, en su mayoría, al entrar en las células del hospedador van a formar macrogamontes. Por otro lado, unos pocos formarán los microgamontes, que contienen 16 microgametos en su interior (Fayer y Ungar, 1986; Tzipori 1988). Los microgametos poseen gránulos de polisacáridos (amilopectina) en la parte basal y cuerpos formadores de la pared en la periferia. Posteriormente, se produce la fertilización la cual se acompaña de la penetración del microgameto a través de la vacuola parasitófora y de la membrana del microgameto (Tzipori, 1988; Ortega-Mora *et al.*, 1999).

La formación del cigoto (fase de esporogonia) resulta en el desarrollo de 2 tipos de ooquistes. Un tipo de ooquistes presentan una pared delgada (aproximadamente el 20% del total de ooquistes formados), los cuales representan una segunda fuente de autoinfección (Current y García, 1991; Ortega-Mora *et al.*, 1999). El otro tipo de ooquistes presentan una pared gruesa (80% restante) siendo eliminados al medio ambiente junto con las heces y son causantes de la transmisión de la enfermedad a otros hospedadores incluido el hombre (Fayer y Ungar, 1986; Tzipori, 1988; Current y García, 1991; Kosek *et al.*, 2001).

#### 4. EPIDEMIOLOGÍA

Se sabe que bajo condiciones de campo, la presentación de cuadros diarreicos en el ganado alpacuno neonatal está asociado con infecciones mixtas (*E. coli*, *Clostridium perfringens*, *rotavirus* y *Eimeria*) (Ameghino y De Martini, 1991). Sin embargo, en las últimas décadas *C. parvum* ha tomado un papel importante en la presentación de la diarrea neonatal, inclusive en muchas ocasiones, es el principal agente etiológico implicado. Además, son escasas las investigaciones que han intentado aclarar la influencia de diversos factores de interés epidemiológico sobre esta enfermedad y su importancia dentro del aspecto sanitario, en lo que a crianza de alpacas se refiere (Leguía y Casas, 1999).

##### 4.1 MODO DE TRANSMISIÓN Y FUENTES DE INFECCIÓN

En los rumiantes domésticos, la principal fuente de infección de *C. parvum* son las heces excretadas por los animales neonatos con diarrea (O'Donoghue, 1995; De Graaf *et al.*, 1999a; Ortega-Mora *et al.*, 1999; Acha y Szyfres, 2003). También hay que considerar la eliminación de ooquistes por los animales adultos que actúan como portadores asintomáticos (Requejo-Fernández *et al.*, 1995; Ortega-Mora *et al.*, 1999; Acha y Szyfres, 2003; Ramírez *et al.*, 2004), especialmente cuando hay incremento de la eliminación de ooquistes alrededor del parto (Faubert y Litvinsky, 2000; Castro-Hermida *et al.*, 2005).

El concepto de transmisión horizontal por ingestión de ooquistes de pared gruesa eliminados con las heces es el comúnmente aceptado (Muñoz *et al.*, 1993b). La transmisión indirecta a través de los alimentos y el agua no debe olvidarse, sobretodo desde el punto de vista de la salud pública. Cada vez son más frecuentes los hallazgos de

*Cryptosporidium* en aguas para consumo y su asociación con brotes de diarrea en distintas poblaciones (Muñoz *et al.*, 1993b; Juranek, 2001; Acha y Szyfres, 2003; Fayer, 2004). Respecto a lo último, cabe mencionar que el mayor y más severo brote de criptosporidiosis a través del agua en la historia de los Estados Unidos ocurrió en Milwaukee (Wisconsin) en 1993, donde más de 400,000 personas fueron infectadas (Ramírez *et al.*, 2004; Fayer, 2004).

La infección en humanos por consumo de alimento contaminado es poco común pero ha sido asociada con el consumo de jugo de manzana, leche sin pasteurizar, embutidos sin cocer y ensaladas (Chalmers y Casemore, 2004). En varios mercados de un barrio en Lima se encontraron ooquistes de *Cryptosporidium* en albahaca, calabaza, apio, culantro, cebolla, lechuga, perejil y hierba buena (Fayer *et al.*, 2000).

Los artrópodos coprófagos son otra probable fuente de transmisión, aunque en menor importancia que las anteriores. Cucarachas, moscas caseras y escarabajos estercoleros han sido objeto de estudio como potenciales vectores de diseminación de *Cryptosporidium parvum* (Fayer *et al.*, 2000; Dillingham *et al.*, 2002; Szostakowska *et al.*, 2004).

#### 4.2 PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR *C. parvum* EN ALPACAS Y OTROS RUMIANTES DOMÉSTICOS

Varios estudios de prevalencia se han llevado a cabo en rumiantes domésticos, confirmando la alta participación de *C. parvum* en brotes de diarrea tanto en animales neonatos como en adultos. Hay que considerar que el conocimiento de la tasa de prevalencia de la infección en los rebaños de las especies domésticas es de gran interés para el establecimiento de programas sanitarios en estas especies, sobretodo, teniendo en cuenta la importancia de las diarreas dentro de las causas de mortalidad y morbilidad neonatal en los rumiantes domésticos (Holland, 1990; Troncoso, 1992; O'Donoghue, 1995; Martín-Gómez; 1996) incluida la alpaca (Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez, 1991).

En bovinos, la excreción de *C. parvum* ocurre con relativa frecuencia en becerros de rebaños lecheros, en los cuales, la alta concentración de animales generaría condiciones favorables para su transmisión (Díaz, 2002). En un estudio llevado a cabo en 1103

explotaciones lecheras de Estados Unidos, se reportó que el 22% de los terneros estuvieron infectados (Garber *et al.*, 1994). Prevalencias del 25% y 27.8% fueron observadas en terneros en explotaciones lecheras de México y Brasil respectivamente (Maldonado-Camargo *et al.*, 1998; Díaz, 2002). En Venezuela, el hallazgo de *C. parvum* en el ganado de leche, revela una prevalencia del 18% en bovinos de 2 a 12 semanas de edad y del 4% entre 13 y 20 semanas (Díaz, 2002).

En España, la presencia de *C. parvum* en el ganado bovino fue reportado por primera vez en 1987, y la importancia de la enfermedad ha sido objeto de diversos estudios en diferentes áreas españolas desde entonces (Martín-Gómez, 2001). En Castilla y León, la prevalencia de rebaño reportada fue de 47%, con un 17% de los terneros infectados por este parásito (Martín-Gómez *et al.*, 1995). En Aragón (noreste de España) se encontró un 44.4% de terneros infectados entre 3-4 días, pero la tasa de infección tuvo un pico de 76.7% entre los 6 a 15 días de edad. La prevalencia también fue alta en terneros destetados, terneros de engorde, vaquillas y adultos. Sin embargo, *Cryptosporidium* sólo estuvo estadísticamente asociado con diarrea en terneros lactantes (De Graaf *et al.*, 1999a). Otro estudio llevado a cabo en Galicia (noroeste de España) reportó una prevalencia de 47.9% en terneros menores de 3 semanas de edad (Castro-Hermida *et al.*, 2002).

En la zona oeste de Holanda, se encontró la eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en todos los estratos etéreos evaluados (0-2 años), siendo el estrato de 1 a 3 semanas de edad el más alto con una prevalencia de 39.1% (Huetink *et al.*, 2001). Otros estudios de prevalencia son los realizados en Hokkaido, Japón, donde se halló una prevalencia de 12% en terneros de 0 a 2 meses (Sakai *et al.*, 2003), mientras que en granjas lecheras en Canadá se encontró una prevalencia de 59% en terneros entre 0 y 24 semanas de edad (Olson *et al.*, 1997).

En el ganado de carne también se han realizado diversos estudios, que al igual que en el ganado de leche, han dado resultados variados. En varias regiones de California, se encontró un rango de prevalencia de excreción de *C. parvum* entre 0% y 13% en bovinos de 1 a 11 meses de edad, correspondiendo el mayor porcentaje a terneros de 2 meses (Díaz, 2002). Otro estudio realizado en el mismo estado, en 25 rebaños de ganado adulto de carne se encontró una prevalencia de 1.1% (Hoar *et al.*, 2001). Por otro lado, en Manitoba,

Canadá, el 18% de los terneros de carne con historia de diarrea neonatal se encontraron positivos a dicho parásito (Díaz, 2002).

En lo que respecta a ovinos, en un estudio realizado en las provincias de Castilla y León (España), el 47% de los 22 brotes de diarrea analizados fueron causados por *C. parvum* (Martín-Gómez, 2001). En otro estudio realizado en las mismas provincias, se encontró una prevalencia del rebaño de 52% (Martín-Gómez, 1996). En el mismo trabajo, en el ganado caprino, la criptosporidiosis fue diagnosticada en 14% de los cabritos en el 42% de las explotaciones estudiadas (Martín-Gómez, 1996). Otro estudio realizado en la provincia de León, en 97 granjas de ovinos y 31 granjas de caprinos, todos elegidos al azar, correspondió un total de 2204 corderos y 367 cabritos menores de 5 semanas de edad. La prevalencia del rebaño fue 47 y 36% y la prevalencia individual fue 15 y 11% para corderos y cabritos, respectivamente (De Graaf *et al.*, 1999a). Estudios realizados en rebaños de cabritos en Francia y Hungría, se reportó a *C. parvum* como el agente etiológico predominante en cabritos con procesos diarreicos (De Graaf *et al.*, 1999a).

Estudios de prevalencia realizados en alpacas menores de 15 días de edad en la facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) son los realizados por Fernández (1995) en La Raya donde se obtuvo una prevalencia de  $9.96 \pm 3.76\%$  y Caman (1996) en Marangani con  $10.4 \pm 2.66\%$ ; ambos en el departamento de Cusco. Por su parte, Morales (1996) obtuvo una prevalencia de  $26.1 \pm 3.3\%$  en Puno; Wanda (1996) en Cochas-Junín obtuvo  $18.9 \pm 3.43\%$ ; Tribeño (1997) en Caylloma-Arequipa obtuvo  $10.5 \pm 1.97\%$  y Romero (1998) en la Sierra Central obtuvo  $16.8 \pm 1.6\%$ .

Uno de los últimos estudios epidemiológicos de gran envergadura llevado a cabo en el Perú en alpacas neonatales, fue el realizado por López (1997). El estudio se realizó en 5,163 crías de alpacas entre 0 a 15 días de edad procedentes de diversas regiones y en donde se encontró un rango de prevalencias que fue del 6 a más del 20% de los animales muestreados. Las mayores prevalencias se encontraron en los departamentos con el mayor número de animales por rebaño y se determinó que el hallazgo de *C. parvum* estaba estrechamente relacionado con la presencia de diarrea.

## 4.3 FACTORES EPIDEMIOLÓGICOS QUE INFLUYEN EN LA PRESENTACIÓN DE LA CRIPTOSPORIDIOSIS

### 4.3.1 Factores dependientes del parásito

#### *Resistencia de los ooquistes*

Los ooquistes de *C. parvum* pueden permanecer infectivos en el suelo, agua y las heces por un tiempo mayor a 12 semanas, a una temperatura comprendida entre  $-4^{\circ}\text{C}$  y  $4^{\circ}\text{C}$  (Olson *et al.*, 2004). En un estudio efectuado en pilas de estiércol de ganado que se mantuvieron a temperaturas entre  $35^{\circ}\text{C}$  y  $50^{\circ}\text{C}$ , se observó que la infectividad de los ooquistes declinó significativamente en un período de 70 días (Olson *et al.*, 2004).

Los ooquistes de *Cryptosporidium* pueden ser inactivados por congelamiento a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora y a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, pero pueden permanecer viables por encima de las 8 semanas cuando se almacenan a  $-5^{\circ}\text{C}$  (Fayer *et al.*, 2000). Por el contrario, el calentamiento de los ooquistes a  $55^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos y a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 15 segundos (Olson *et al.*, 2004) ocasionan una pérdida de su infectividad y pueden morir a una temperatura de  $71.7^{\circ}\text{C}$  en un período de 5 segundos (Harp *et al.*, 1996). Del mismo modo, la desecación es letal para los ooquistes de *C. parvum*. Así, se ha observado que sólo el 3% de los ooquistes permanecen viables después de 2 horas de desecación y que el 100% muere luego de 4 horas (Robertson *et al.*, 1992; Fayer *et al.*, 2000).

Los ooquistes de *Cryptosporidium* son muy resistentes a la mayoría de desinfectantes usados en la limpieza de las explotaciones, y la cloración del agua de bebida a dosis normales no es suficiente para prevenir la infección (Ortega-Mora *et al.*, 1999; Dillingham *et al.*, 2002; Olson *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2006). Los ooquistes pueden ser más resistentes al ozono (30 veces) y a la cloración (14 veces) que los quistes de otro enteropatógeno, la *Giardia duodenalis*, expuestos a las mismas condiciones (Ortega-Mora *et al.*, 1999). Se ha demostrado también que los ooquistes de *C. parvum* pueden soportar el proceso de fermentación en silos (Olson *et al.*, 2004).

#### *Dosis infectante*



En humanos y animales susceptibles la dosis mínima infectante puede ser de un sólo ooquiste (Ortega-Mora *et al.*, 1999; Dillingham *et al.*, 2002; Tzipori y Ward, 2002; Pereira *et al.*, 2002). Hay que considerar que durante el período de máxima eliminación los neonatos infectados pueden excretar entre  $10^6$ - $10^7$  ooquistes por gramo de heces (Troncoso, 1992; Martín-Gómez, 1996; Ortega-Mora *et al.*, 1999). Tomando en cuenta esta información y que la masa fecal diaria excretada por un animal es de 150 gramos aproximadamente, el potencial infectivo de los ooquistes eliminados en un solo día es suficiente para infectar a más de 100 millones de animales (Martín-Gómez, 2001).

### *Características del ciclo biológico*

Una característica que diferencia a *Cryptosporidium* de otros coccidios es su habilidad para persistir dentro de un hospedador debido a las repetidas merogonias de primera generación y la producción de ooquistes esporulados de pared delgada (Current y García, 1991; Tzipori y Ward, 2002). Esto explica, en parte, por qué se producen infecciones severas con independencia de la dosis infectante en hospedadores susceptibles (Troncoso, 1992; Romero, 1998).

#### 4.3.2 Factores dependientes del hospedador

##### *Especie hospedadora*

La presencia de signos clínicos acompañando a la infección por *C. parvum* no es constante en todas las especies hospedadoras. En los rumiantes y en el hombre la infección suele ir acompañada de signos clínicos, mientras que en los roedores y lagomorfos sólo se pone de manifiesto por la eliminación de ooquistes, sin presentación de sintomatología (Current y García, 1991; O'Donoghue, 1995; Ortega-Mora *et al.*, 1999).

##### *Edad del hospedador*

Los animales neonatos son los más susceptibles a la infección, observándose menor receptividad y aparición de resistencia del animal a medida que aumenta la edad (Holland, 1990; O'Donoghue, 1995; Ortega-Mora *et al.*, 1999; Acha y Szyfres, 2003). En rumiantes domésticos, donde *C. parvum* es común en el ambiente de crianza, es razonable pensar que los animales están expuestos constantemente al parásito desde el

nacimiento (Faubert y Litvinsky, 2000; Díaz *et al.*, 2002), por lo tanto es difícil separar los efectos de la inmunidad adquirida a través de la exposición natural de los efectos de resistencia no inmunológica relacionada con la edad (Harp *et al.*, 1990; Troncoso, 1992).

En terneros, la infección es más frecuente entre los 4 a 15 días de edad (Fayer y Ungar, 1986; Ortega-Mora *et al.*, 1999), eliminándose ooquistes hasta los 3 meses de edad acompañado de cuadros diarreicos (Harp *et al.*, 1990). La prevalencia baja en animales menores de 4 días de edad es atribuida al ciclo de vida del parásito, puesto que se requieren entre 2 y 4 días desde la infección hasta la eliminación de ooquistes en las heces (Troncoso, 1992).

En condiciones naturales, el binomio infección-diarrea se presenta con mayor frecuencia en la segunda semana de vida. Se ha observado una notable atenuación de la sintomatología en corderos y cabritos infectados al mes, pasando la infección desapercibida en animales infectados con dos meses (Troncoso, 1992; Ortega-Mora *et al.*, 1999; De Graaf *et al.*, 1999a). En corderos, las infecciones producidas durante las 24 primeras horas de vida tienen como consecuencia períodos de incubación más cortos, patencias más largas y un cuadro clínico más grave que las realizadas en la segunda, tercera o cuarta semana de vida (Troncoso, 1992; Ortega-Mora y Wright, 1994; O'Donoghue, 1995).

Se ha reportado altas prevalencias y excreción de hasta  $1,8 \times 10^4$  ooquistes por gramo de heces en vacas aparentemente sanas (Díaz, 2002), por lo que no se desestima el papel potencial de los bovinos adultos como reservorios de esta especie (O'Donoghue, 1995; De Graaf *et al.*, 1999a; Ortega-Mora *et al.*, 1999) especialmente durante el parto y período de lactación (Faubert y Litvinsky, 2000; Díaz *et al.*, 2002; Castro-Hermida *et al.*, 2005). Al igual que en los bovinos, se ha demostrado también que los ovinos y caprinos adultos son refractarios a la enfermedad y representan una fuente de infección para sus crías (Foreyt, 1990; Troncoso, 1992; Requejo-Fernández *et al.*, 1995), especialmente en el período del periparto donde se incrementa la eliminación de ooquistes de *C. parvum* (Castro-Hermida *et al.*, 2005).

Estudios en alpacas, bajo condiciones experimentales (López *et al.*, 2001a) y en estudios de prevalencia (Fernández, 1995; López *et al.*, 1995; Caman, 1996; Morales, 1996; Wanda, 1996; Tribeño, 1997; Romero, 1998), se ha observado que las crías permanecen susceptibles durante los primeros 15 días de edad. La enfermedad se torna asintomática a medida que aumenta la edad similarmente a lo que sucede en otros rumiantes. Sin embargo, se ha reportado mortalidad en crías de 30 días (Bidewell y Catell, 1998).

#### *Estado inmunitario/ingestión de calostro*

En el hombre existe una clara relación entre el estado inmunitario y la evolución de la infección por *C. parvum*: diarrea pasajera y eliminación de la infección en individuos inmunocompetentes, y diarrea persistente con infección crónica en individuos inmunocomprometidos (Chermette y Boufassa-Ouzrout, 1988; Ortega-Mora *et al.*, 1999; Juranek, 2000; Chen *et al.*, 2002; Riggs, 2002). En los rumiantes domésticos, la importancia del estado inmunitario es difícil de separar de otros factores, como la edad (Ortega-Mora *et al.*, 1999).

Los anticuerpos neutralizantes presentes en el calostro y leche de las madres, se cree que reducen la infectividad por inmovilización del parásito, inhibición de la adhesión a la célula hospedadora o por actividad citotóxica directa a esporozoítos de *Cryptosporidium* (Olson *et al.*, 2004). En animales, la inmunización pasiva por consumo de calostro materno no confiere la debida protección de la infección por *C. parvum* (Holland, 1990; Anderson, 1998), pero pueden reducir severamente la enfermedad en términos de número de ooquistes eliminados y la duración del período de diarrea (Anderson, 1998). Resultados de un estudio mostraron que el calostro hiperinmune obtenido de una vaca inmunizada con ooquistes de *C. parvum* redujeron la duración del cuadro diarreico y la eliminación de ooquistes en terneros desafiados (Holland, 1990; Olson *et al.*, 2004).

En terneros de carne, el consumo de la leche de la madre puede resultar ser protectora siempre y cuando haya tenido exposición previa al parásito. Los terneros de leche usualmente consumen leche con bajas concentraciones de anticuerpos o leche de reemplazo sin ningún tipo de anticuerpos que no brindan una protección adecuada contra el parásito (Olson *et al.*, 2004).

### 4.3.3 Factores dependientes del ambiente

#### *Tamaño del rebaño*

Estudios conducidos con la finalidad de identificar los factores que están asociados con el riesgo de infección por *C. parvum* en el ganado bovino, revelan una asociación positiva entre el número de animales del rebaño y el riesgo de infección (Garber *et al.*, 1994; Martín-Gómez, 1996; Mohammed *et al.*, 1999; Ortega-Mora *et al.*, 1999; Díaz, 2002). Éste es mayor en aquellas explotaciones ganaderas, con alta carga animal donde el hacinamiento favorece la transmisión del parásito. Un rebaño numeroso, contaría con mayor número de terneros, los cuales, son particularmente susceptibles a la infección (O'Donoghue, 1995; De Graaf *et al.*, 1999a). Además, podría suceder, que las instalaciones y los pastizales permanezcan ocupados por más tiempo, favoreciendo la continua acumulación de ooquistes y contribuyendo a incrementar la contaminación del ambiente (De Graaf *et al.*, 1999a; Ortega-Mora *et al.*, 1999; Díaz, 2002).

#### *Condiciones higiénico-sanitarias*

El período neonatal resulta el más crítico para la exposición a la criptosporidiosis, por ello, las condiciones higiénico-sanitarias de las áreas frecuentadas por los animales recién nacidos, pueden afectar el riesgo de infección (O'Donoghue, 1995; De Graaf *et al.*, 1999a; Barwick *et al.*, 2003). Diversos estudios de factores de riesgo relacionados con la diseminación de la criptosporidiosis en rumiantes neonatos, han demostrado que el método de limpieza, el tipo de piso y la frecuencia de limpieza son factores significantes (Garber *et al.*, 1994; Maldonado-Camargo *et al.*, 1998; Mohammed *et al.*, 1999; Martín-Gómez, 2001; Castro-Hermida *et al.*, 2002; Barwick *et al.*, 2003).

La baja prevalencia de *C. parvum* reportada en alpacas en relación con otros rumiantes se debe a las condiciones de manejo de los lugares de estudio. En estos lugares, se practicaba la rotación periódica de dormideros, ingestión de calostro después del parto, tratamientos con antibióticos para prevenir la enterotoxemia y la colibacilosis, disminuyendo el riesgo de infección (Fernández, 1995; Caman, 1996).

#### *Estacionalidad de la criptosporidiosis*

Los brotes de criptosporidiosis en rumiantes se han reportado generalmente durante el invierno y principios de la primavera y en menor frecuencia, en otoño. Este hecho ha servido para conceder un cierto carácter estacional a la presentación de la criptosporidiosis en estos animales (Martín-Gómez, 1996; Ortega-Mora *et al.*, 1999).

Los meses de primavera e invierno coinciden con la temporada de parición produciéndose con frecuencia hacinamiento de los animales, que conjuntamente con la humedad y el frío, constituyen en importantes factores que agravan el proceso (Ortega-Mora *et al.*, 1999). La criptosporidiosis en alpacas también es estacional (Enero-Marzo) la que concuerda con el inicio de la temporada de lluvias y parición, otros factores de riesgo incluyen el tipo de manejo del rebaño y el pastor encargado (López *et al.*, 1995).

## 5. SIGNOS CLÍNICOS

El intervalo de tiempo entre la infección y la eliminación de ooquistes, período prepatente, es de 2 a 7 días en terneros y entre 2 a 5 días en corderos, coincidiendo en su duración con el período de incubación (Troncoso, 1992). Por otro lado, el período prepatente en cabritos es de aproximadamente 4 días (De Graaf *et al.*, 1999a), mientras que, en alpacas neonatas infectadas experimentalmente, se halló que el período prepatente fue de 72-96 horas (López, 1997; López *et al.*, 2001a). En humanos inmunocompetentes, este período va desde 2 a 14 días (Juraneck, 2000; Fahey, 2003). Así mismo, el período de la diarrea coincide con el de la eliminación de ooquistes en heces (Troncoso, 1992; López, 1997; Ortega-Mora *et al.*, 1999).

El período de tiempo que dura la eliminación de ooquistes, período patente, varía según la especie animal, y se encuentra entre 1 a 12 días en terneros (Troncoso, 1992) y entre 11 a 14 días en alpacas neonatas (López *et al.*, 2001a). En humanos inmunocompetentes, puede durar más de 30 días (Fayer y Ungar, 1986) y en individuos inmunocomprometidos (pacientes con VIH) más de 2 meses (Clark, 1999).

En los rumiantes domésticos y en el hombre, la criptosporidiosis no presenta signos clínicos específicos que permitan diferenciarlo de otros procesos causados por otros enteropatógenos. Sin embargo, la manifestación clínica más común de la enfermedad es la

diarrea, la cual es profusa y persistente (Troncoso, 1992; Holland, 1990; O'Donoghue, 1995; Ortega-Mora *et al.*, 1999; De Graaf *et al.*, 1999a).

La diarrea presenta un olor pestilente, color que puede variar de amarillento a verdoso y de consistencia líquida a mucosa, pudiendo durar de dos a 14 días en la mayoría de casos (Chermette y Boufassa-Ouzrout, 1988; Martín-Gómez, 2001). La diarrea va acompañada de tenesmo, anorexia, emaciación, depresión del sistema nervioso central, fiebre, deshidratación y, en casos prolongados, de malnutrición (Holland, 1990; Troncoso, 1992; Martín-Gómez, 1996; Díaz, 2002; Olson *et al.*, 2004). En humanos, se ha observado que la diarrea generalmente contiene mucus pero raramente sangre o leucocitos (O'Donoghue, 1995; Kosek *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002).

La criptosporidiosis en rumiantes es típicamente sintomática en los jóvenes. La infección en terneros de leche es la más comúnmente detectada (vía eliminación fecal de ooquistes) entre los 8 a 15 días de edad, mientras que en terneros de carne ocurre mayormente entre 1 a 2 meses de edad (Ramírez *et al.*, 2004). La infección ocurre frecuentemente en asociación con otros agentes del complejo de diarrea neonatal. En estos casos de infección múltiple, los enteropatógenos pueden actuar en forma sinérgica incrementando la morbilidad y mortalidad (Holland, 1990; Troncoso, 1992; De Graaf *et al.*, 1999a).

Los corderos neonatos son los más susceptibles a la infección natural. La diarrea, signo más característico, dura entre 2 a 12 días y algunas veces es acompañada por anorexia, pobre crecimiento, rigidez, marcha lenta y depresión (Fayer y Ungar, 1986). En el caso de las alpacas, el pico de eliminación de ooquistes ocurre entre 7 y 10 días post-infección (López *et al.*, 2001a). Los signos clínicos duran una a dos semanas y son similares a los descritos para terneros y corderos. Se presenta como una enteritis con diarrea profusa, depresión grave, emaciación, deshidratación y elevación de la temperatura corporal (López *et al.*, 2001a).

Los animales adultos son considerados refractarios a la infección y los signos clínicos están asociados a la inmunidad a la enfermedad (Foreyt, 1990; Troncoso, 1992; Ortega-Mora *et al.*, 1999; Fahey, 2003; Castro-Hermida *et al.*, 2005). Se ha mencionado el rol que bovinos y ovinos adultos pueden representar como fuentes de infección para terneros y corderos (Requejo-Fernández *et al.*, 1995; De Graaf *et al.*, 1999a), especialmente alrededor

del parto, cuando hay incremento de la eliminación de ooquistes *de C. parvum* (Faubert y Litvinsky, 2000). Este incremento está probablemente relacionado a un cambio en la inmunorreactividad de los rumiantes domésticos durante la gestación y lactancia; y ha sido demostrado en vacas y borregas (Castro-Hermida *et al.*, 2005).

## 6. LESIONES

### *Lesiones macroscópicas*

En la mayoría de los rumiantes neonatos infectados se producen diversos grados de caquexia y deshidratación. En la cavidad abdominal se ha observado atrofia de la grasa mesentérica e infarto de los ganglios regionales (Ortega-Mora *et al.*, 1999). En la necropsia de terneros infectados se puede encontrar el intestino delgado y/o grueso distendido con gas y con contenido acuoso amarillento (Fayer y Ungar, 1986). El abomaso normalmente está distendido, tiene coagulada la leche y el intestino está repleto de líquido. La mucosa intestinal, particularmente del intestino delgado, está intensamente hiperémica pero no hemorrágica (Troncoso, 1992). En ovinos se puede encontrar sangre o fluido mucoide en el colon y heces acuosas amarillentas. Tanto el intestino delgado como el grueso aparecen moderadamente hiperémicos (Fayer y Ungar, 1986).

En alpacas neonatas infectadas experimentalmente, a la necropsia se encontró edema e hiperemia de los ganglios linfáticos mesentéricos. Casi todo el intestino delgado y parte del grueso mostraban marcada congestión y dilatación con presencia de líquido y gases. Al abrir las distintas porciones del intestino se pudo observar una severa hiperemia y alteración de la superficie de la mucosa, además de la presencia de abundante mucus (López *et al.*, 2001a). Estas lesiones coinciden con las observadas por diversos autores en infecciones experimentales y de campo en crías de alpaca (Bidewell y Catell, 1998; Palacios, 2004) y otros rumiantes (Fayer y Ungar, 1986; Holland, 1990; Troncoso, 1992).

### *Lesiones microscópicas*

En terneros y lechones se ha observado que las lesiones están en estrecha relación con el desarrollo de las formas endógenas del parásito, siendo el yeyuno e íleon las partes más

afectadas (Troncoso, 1992; Ortega-Mora *et al.*, 1999). En terneros las lesiones histológicas incluyen inflamación de las criptas, disminución de la altura de la mucosa, atrofia de las vellosidades y fusión de las mismas (Holland, 1990; Troncoso, 1992). Las lesiones del colon son focales y se caracterizan por disminución e irregular altura de los pliegues de la mucosa, disminución de las células caliciformes e hiper celularidad mononuclear de la lámina propia (Palacios, 2004).

En ovinos las lesiones histológicas incluyen acortamiento, fusión y vellosidades con epitelio columnar bajo o epitelio cuboidal y vasos congestionados en la lámina propia con células mononucleares e infiltrado de neutrófilos (Fayer y Ungar, 1986; Troncoso, 1992).

En alpacas, el estudio histopatológico del intestino delgado, demostró hiperemia de los vasos, una fuerte infiltración linfocitaria de la lámina propia y en menor proporción del epitelio. Así mismo, descamación del epitelio y atrofia de vellosidades. El parasitismo fue más notorio en el intestino delgado en todos sus tramos, que en el intestino grueso (López *et al.*, 2001a).

## 7. PATOGÉNESIS

*Cryptosporidium parvum* infecta la parte distal del intestino delgado y colon, donde realiza la fase asexual y sexual. El parásito se localiza en la superficie apical de las células epiteliales del intestino, donde puede ser observado microscópicamente sobre la superficie luminal (Holland, 1990). La invasión de los enterocitos por el parásito daña y destruye las células absorbentes y ocasiona su extensión al lumen intestinal (Holland, 1990; Ortega-Mora *et al.*, 1999). Esta colonización produce atrofia parcial de las vellosidades y fusión de éstas, quedando la superficie de absorción claramente disminuida (Troncoso, 1992; Ortega-Mora *et al.*, 1999).

Estos procesos originan una mala absorción que puede hacerse evidente incluso antes de que se produzca la atrofia de vellosidades, debido a la reducción de las enzimas unidas a membrana, fundamentalmente la lactasa (Ortega-Mora *et al.*, 1999). Se ha encontrado que los terneros infectados presentan falta de lactasa y malabsorción de xilasa. Además, se ha observado que tanto la lactasa como la fosfatasa alcalina, dos enzimas que se encuentran



en las microvellosidades, se reducen significativamente en ratas infectadas con *Cryptosporidium* (Zu *et al.*, 1992).

Tras la pérdida de enterocitos de la superficie apical de la vellosidad, el epitelio es sustituido por una población celular inmadura similar a la que existe en las criptas intestinales, con baja capacidad absorptiva y enzimática, siendo además secretoras de iones de cloro (Troncoso, 1992). Además, puede existir una alteración de la permeabilidad del epitelio intestinal por modificación de los puentes de unión celulares (Ortega-Mora *et al.*, 1999).

Existe una respuesta del hospedador consistente en la infiltración de la lámina propia por células inflamatorias. Se ha sugerido que los macrófagos podrían producir  $\alpha$ -TNF (factor de necrosis tumoral) que estimula la producción de prostaglandinas (PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>) por parte de los fibroblastos u otras células de la lámina propia (Ortega-Mora *et al.*, 1999; Laurent *et al.*, 1999). Al respecto, Laurent *et al.*, (1998) demostraron que la infección por *C. parvum* activa directamente la expresión de prostaglandina H sintasa-2 y la producción de prostaglandina E<sub>2</sub> y F<sub>2</sub> $\alpha$  en células epiteliales intestinales en humanos. Estos eventos provocan la secreción de cloro e inhibe la absorción de cloruro de sodio; produciéndose una diarrea de tipo secretoria (Ortega-Mora *et al.*, 1999; Laurent *et al.*, 1999). Además, el incremento en los niveles de gamma interferón (IFN- $\gamma$ ) producidos durante la infección por *C. parvum*, pueden incrementar la permeabilidad intestinal y disminuir la función de barrera epitelial (Laurent *et al.*, 1999).

Los polimorfonucleares neutrófilos también podrían activar la síntesis de prostaglandinas u otros productos que estimulan la secreción. La respuesta hipersecretora se ha relacionado con la activación de diversos mediadores de la inflamación celular (bradiquinina y prostaglandinas) y también se ha relacionado con el efecto de las sales biliares en el colon, que al no ser absorbidas en el íleon dañarían el epitelio del colon y estimularían la secreción de fluidos y electrolitos por activación del AMP cíclico (Ortega-Mora *et al.*, 1999). La infección por *C. parvum* en un modelo porcino, mostró que la absorción de sodio estimulado por glucosa es inhibida y este daño paralelamente se extiende a las vellosidades y células epiteliales (Laurent *et al.*, 1999).

La diarrea secretora que presentan las personas inmunodeficientes con criptosporidiosis sugiere una hipersecreción intestinal mediada por una toxina (Zu *et al.*, 1992; Troncoso, 1992). Aunque se han detectado sustancias con actividad enterotóxica en cultivos celulares de este parásito, se trata de un hecho que no ha sido confirmado por otros autores (Zu *et al.*, 1992; Laurent *et al.*, 1999).

El intestino grueso no es completamente funcional después del nacimiento, por tanto la infección en este órgano, al menos inicialmente, puede no estar involucrado directamente en la fisiopatología de la diarrea (Troncoso, 1992). Además, los cambios histológicos en él inducidos son focales y poco extensivos. La acumulación y subsecuente fermentación de los nutrientes no absorbidos dentro del intestino grueso contribuye a una catarsis osmótica, la cual es una causa parcial en la inducción de la diarrea (Holland, 1990).

## 8. DIAGNÓSTICO

Hasta inicios de la década de los ochenta, el diagnóstico etiológico de la criptosporidiosis se basaba en el estudio de preparados histopatológicos o utilización de la microscopía electrónica procedentes de biopsias de intestino o de casos de necropsia, intentando localizar los estadios endógenos del parásito en el borde apical de la mucosa intestinal (Ortega-Mora *et al.*, 1999; Clark, 1999; Palacios, 2004). Sin embargo, el carácter invasivo, demanda de tiempo y escasa sensibilidad llevó a que esta técnica deje de emplearse (Ortega-Mora *et al.*, 1999).

En el curso de la infección por *C. parvum* se excreta un gran número de ooquistes en las heces. Es por ello que se han desarrollado un gran número de técnicas para detectar al parásito en muestras fecales que pueden clasificarse en tres tipos: tinción de extensiones de heces en láminas portaobjetos; el segundo tipo corresponde a las técnicas de concentración, que en ocasiones se aplican con algunas de las técnicas de tinción; y el tercer tipo corresponde a las técnicas inmunológicas (Ortega-Mora *et al.*, 1999).

Entre las técnicas de tinción se encuentran la tinción de Giemsa (en desuso por su falta de especificidad) (MacPherson y McQueen, 1993; Ortega-Mora *et al.*, 1999), tricrómico (Fayer y Ungar, 1986; Bullock-Lacullo, 2001), azul de metileno-safranina (Fayer *et al.*, 2000) y la tinción negativa de Heine. También se ha empleado técnicas basadas en la

captación de fluorocromo por parte del parásito, siendo la auramina-rodamina (Fayer y Ungar, 1986; MacPherson y McQueen, 1993; Clark, 1999; Bullock-Lacullo, 2001) y naranja de acridina las más usadas (Fayer y Ungar, 1986; Ortega-Mora *et al.*, 1999). Debe mencionarse que muchas de estas técnicas de tinción requieren de determinada experiencia por parte del microscopista y pueden resultar laboriosas (Fayer y Ungar, 1986; Fayer *et al.*, 2000).

Las tinciones para microorganismos ácido-resistentes como dimetilsulfóxido carbol-fucsina (Ortega-Mora *et al.*, 1999; Fayer *et al.*, 2000); Kinyoun (García *et al.*, 1983; Kehl *et al.*, 1995; Clark, 1999; Fayer *et al.*, 2000) y Ziehl-Neelsen modificado (Henriksen y Pholenz, 1981; Weitz y Astorga, 1993; Clark, 1999) han sido ampliamente usadas porque demandan poco costo y son de simple metodología. La técnica presenta una especificidad del 100% y una sensibilidad del 86.9 %, considerada como alta (Weitz y Astorga, 1993). Sin embargo, otros autores estiman que la sensibilidad de la prueba es más bien baja (Ramírez *et al.*, 2004).

La tinción de Ziehl-Neelsen modificada, entre otras ventajas tiene las de ser simple, segura, confiable, fácil de leer, ofreciendo buen contraste de coloración entre el *Cryptosporidium*, levaduras y materia fecal (Chermette y Boufassa-Ouzrout, 1988). Sin embargo, las técnicas de Ziehl-Neelsen y Heine tienen dificultades en la detección de concentraciones inferiores a  $1.5 \times 10^5$  ooquistes por gramo de heces (Troncoso, 1992).

Entre los distintos métodos de concentración destacan los que utilizan la flotación en soluciones de densidad variable, como la solución de sacarosa de Sheather, sulfato de Zinc y el cloruro sódico (Current y García, 1991; Ortega-Mora *et al.*, 1999). También se ha utilizado la sedimentación en formol-éter, formol etil-acetato, entre otros (Ortega-Mora *et al.*, 1999; Juranek, 2000). Algunos trabajos no hallaron diferencias entre estos métodos, mientras que otros encontraron que formol-éter y cloruro sódico fueron los más sensibles. Otros trabajos encontraron que la solución sacarosa de Sheather da iguales o mejores resultados que los obtenidos por formol-éter o formol etil-acetato (Current y García, 1991). Tras la concentración, los ooquistes del parásito pueden observarse directamente al microscopio de contraste de fase o por microscopía óptica convencional, aplicando alguna de las técnicas de tinción antes descritas o bien utilizando alguna técnica inmunológica (Ortega-Mora *et al.*, 1999).

En los últimos años las técnicas inmunológicas han adquirido relevante importancia para la detección de ooquistes en las heces. Entre ellas se encuentran la reacción aglutinación en látex, la inmunofluorescencia (IF) utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales, el ELISA de inmunocaptura de antígenos parasitarios en heces (Clark, 1999; Fayer *et al.*, 2000) y la inmunocromatografía cualitativa de fase-sólida (Fayer *et al.*, 2000). De todos los métodos señalados es la inmunofluorescencia la que presenta una mayor sensibilidad y especificidad y es la técnica más frecuentemente empleada en el diagnóstico en el hombre (Ortega-Mora *et al.*, 1999). En los rumiantes domésticos, los métodos de detección de anticuerpos han mostrado presentar reacción cruzada con otros microorganismos (por ejemplo *Eimeria spp.*) debido a la falta de especificidad de la prueba (Ortega-Mora *et al.*, 1999; Fayer *et al.*, 2000).

Una variedad de pruebas de PCR ofrecen alternativas a los métodos de diagnóstico convencionales de la criptosporidiosis tanto para muestras clínicas como ambientales (Johnson *et al.*, 1995; Fayer *et al.*, 2000). Aunque el PCR es rápido, muy específico y sensible (Clark, 1999; Fayer *et al.*, 2000; Ramírez *et al.*, 2004), presenta varias limitaciones además de su costo (Fayer *et al.*, 2000). Falsos positivos pueden resultar de la detección de ácidos nucleicos desnudos, microorganismos no viables, y contaminación dentro del laboratorio (Fayer *et al.*, 2000). Un estudio comparativo (Morgan *et al.*, 1998b) demostró que el PCR fue más sensible y fácil de interpretar que la microscopía convencional (técnica de Ziehl-Neelsen), pero requería más tiempo para su ejecución por parte del operador y ser más cara. Sin embargo, puede adaptarse para el procesamiento de gran número de muestras, reduciendo su costo.

El PCR en combinación con el análisis de secuencias genéticas pueden ser herramientas útiles que permiten discriminar entre las especies de *Cryptosporidium* (genotipificación). De esta manera se ayuda a determinar la fuente más probable de una infección, distinguir patógenos humanos de patógenos animales y los riesgos reales a los que están expuestos tanto humanos y animales (Clark, 1999; Ramírez *et al.*, 2004).

## 9. TRATAMIENTO

Muchos agentes quimioterapéuticos han sido ensayados tanto *in vitro* como *in vivo* para el tratamiento de la criptosporidiosis, pero pocos han mostrado ser eficientes. Drogas como

paromomicina y decoquinato reducen el período patente, disminuyen la eliminación de ooquistes, así como, la frecuencia y severidad de la diarrea en terneros y corderos infectados con *C. parvum* (De Graaf *et al.*, 1999a; Viu *et al.*, 2000; Olson *et al.*, 2004). Una combinación de paromomicina y azitromicina ha sido también propuesta para el tratamiento de la criptosporidiosis con resultados relativamente buenos (Clark, 1999; Fahey, 2003).

La halofuginona lactato y el lasalocid son drogas que han demostrado cierta eficacia. La halofunginona ha sido registrada en Europa como agente quimioterapéutico para el tratamiento de la criptosporidiosis en el ganado. Este agente ha mostrado una reducción de la incidencia y severidad de la diarrea, pero no previene la eliminación de ooquistes (Villacorta *et al.*, 1991; Naciri *et al.*, 1993; Olson *et al.*, 2004). Por otro lado, el lasalocid también parece ser eficaz en el tratamiento de la criptosporidiosis en terneros, pero a dosis elevadas que resultan ser tóxicas (Ortega-Mora *et al.*, 1999; Ramírez *et al.*, 2004; Whitehead y Anderson, 2006). Sin embargo, a dosis bajas este fármaco no ha demostrado ninguna eficacia contra la infección por *C. parvum* (Ramírez *et al.*, 2004).

La nitazoxanida es una droga que ha demostrado tener eficacia en el tratamiento de pacientes con criptosporidiosis. Así mismo, ha sido probada en modelos animales pero ha mostrado tener una eficacia parcial. En un modelo de cerdos gnotobióticos, la nitazoxanida redujo la eliminación de ooquistes pero indujo diarrea por el uso de esta droga. La falta de eficacia en modelos roedores, pone en duda la verdadera actividad de esta droga (Ramírez *et al.*, 2004).

La importancia del calostro en la protección de rumiantes neonatales contra la infección por *C. parvum* es un punto relevante a tomar en cuenta. En condiciones de campo, los anticuerpos adquiridos pasivamente no protegen a terneros (Peeters *et al.*, 1992) y corderos contra la infección natural por este parásito. Sin embargo, terneros (Fayer *et al.*, 1989) y corderos alimentados con calostro de madres inmunizadas con grandes títulos de anticuerpos específicos, brindaron protección parcial contra la infección (De Graaf *et al.*, 1999a). Terapias alternativas como la inmunoterapia pasiva usando suero hiperinmune y calostro bovino hiperinmune conteniendo anticuerpos contra *C. parvum*, han sido ensayados, mostrando resultados prometedores pero no concluyentes (Tzipori *et al.*, 1994; Crabb, 1998; Ramírez *et al.*, 2004).

En los humanos como en los animales, el curso clínico de la criptosporidiosis depende del estado inmunológico del hospedador, y su tratamiento varía de acuerdo a éste (Griffiths, 1998). En adultos y niños inmunocompetentes, no hay terapia específica indicada, ya que la enfermedad es autolimitante; sin embargo, la presentación de cuadros diarreicos requieren terapia de rehidratación (Clark, 1999). Las infecciones agudas en pacientes inmunocompetentes es autolimitante, mientras que la mayoría de ensayos clínicos se han llevado a cabo en pacientes con SIDA con infección crónica con resultados variados (Fahey, 2003).

La vacunación ha sido propuesta como método de control de la criptosporidiosis en poblaciones animales (De Graaf *et al.*, 1999b; Jenkins, 2001; Riggs, 2002; Olson *et al.*, 2004). Antígenos inmunodominantes de *Cryptosporidium* han sido identificados en infecciones naturales, y a partir de ellas se han preparado y ensayado vacunas en terneros (De Graaf *et al.*, 1999b; Jenkins, 2001).

Las vacunas han demostrado reducir los signos clínicos pero, en la mayoría de los casos, no elimina o reduce la eliminación de ooquistes (Olson *et al.*, 2004). La vacunación de animales jóvenes con un sistema inmune inmaduro puede no ser efectiva, y una amplia cobertura de vacunación puede no resultar económica, ya que la enfermedad es raramente letal cuando se tiene buenas medidas de prevención en las explotaciones (Ramírez *et al.*, 2004).

En ausencia, por el momento, de tratamientos farmacológicos eficaces frente a la criptosporidiosis, el tratamiento sintomático puede prevenir la presencia de elevadas tasas de mortalidad, en el rebaño y disminuir a niveles permisibles las pérdidas por morbilidad (O'Donoghue, 1995; Ortega-Mora *et al.*, 1999). La administración oral o parenteral de soluciones de electrolitos es la primera medida a tomar ante la presentación de cuadros diarreicos, con la debida restricción de acceso a leche materna o artificial de las crías (Ortega-Mora *et al.*, 1999; Martín-Gómez, 2001).

La administración de probióticos es otra de las recomendaciones que se ha realizado por el efecto antagónico que supone la instauración de una flora beneficiosa en el intestino (Ortega-Mora *et al.*, 1999). Al respecto, se ha observado que el empleo de probióticos reduce la duración y eliminación de ooquistes en ratones infectados experimentalmente

(Ramírez *et al.*, 2004). En adición, un estudio *in vitro* demostró que bacterias ácido lácticas reducen significativamente la viabilidad de los ooquistes de *C. parvum* (Foster *et al.*, 2003).

## 10. ASOCIACION DE VARIABLES

### 10.1 Diseños transversales de tipo ecológico

En un estudio ecológico tradicional, dos variables son contrastadas para examinar su posible asociación. Típicamente, son comparadas una medida ecológica de exposición y una medida agregada de la enfermedad o mortalidad. Las unidades de observación en un estudio ecológico son usualmente poblaciones definidas geográficamente (tal como un país o regiones dentro de un país) o la misma población definida geográficamente en diferentes puntos en el tiempo. Los valores medios para ambos, un factor de riesgo postulado dado y el resultado de interés, son obtenidos para cada unidad de observación para propósitos de comparación (Szklo y Nieto, 2000). Es el tipo de estudio que se empleó en trabajos de investigación para determinar el riesgo que significaba la asociación entre presencia de *C. parvum* y diarrea en alpacas neonatales (López, 1997; Romero, 1998; López *et al.*, 2001b).

### 10.2 Diseños epidemiológicos

Los diseños epidemiológicos se emplean para investigar causalidad entre variables asociadas a la enfermedad y la ocurrencia de la misma. Hay dos tipos de estudio epidemiológico que investigan relaciones de causalidad potenciales, los diseños de cohortes y de caso control.

#### 10.2.1 Estudio Caso-Control

Un estudio de caso-control usualmente compara el riesgo de exposiciones pasadas a un factor de riesgo sospechado entre los casos (individuos que se enfermaron) y controles (usualmente individuos que no se enfermaron). Aunque la comparación del riesgo de la exposición es el enfoque analítico típico en un estudio de caso-control, otros tipos de medida pueden ser comparados entre los casos y los

controles. Entonces, la estrategia analítica principal consiste en el cálculo del Odds ratio (Razón de Riesgo) de la exposición, la cual es un estimado del riesgo relativo (Szklo y Nieto 2000).

El diseño del estudio Caso-Control es una alternativa a los estudios de cohortes para investigaciones de las asociaciones exposición-enfermedad. En contraste, en un estudio de cohorte los participantes expuestos y no expuestos, son comparados en relación a la incidencia de la enfermedad (o algún otro valor promedio para el resultado). En el diseño del estudio de Caso-Control se optimiza la velocidad y la eficiencia, ventajas importantes que tiene sobre el diseño de cohortes, particularmente sobre el estudio de cohorte concurrente, pues este tipo de estudio requiere tiempo de seguimiento y al menos dos muestreos (Szklo y Nieto 2000).

#### 10.2.2 Estudio de cohortes

En un estudio de cohorte, un grupo de individuos sanos o cohorte son identificados y seguidos o tratados durante un periodo de tiempo dado para determinar la ocurrencia de eventos relacionados a la salud. Los participantes expuestos y no expuestos, son comparados en relación a la incidencia de la enfermedad. El objetivo de un estudio de cohorte usualmente es investigar si la incidencia de un evento está relacionada a la supuesta exposición (Szklo y Nieto 2000).



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. **Diseño del estudio**

La presente tesis evaluó la relación causal entre la presencia de *C. parvum* y la diarrea neonatal en alpacas en el Sur del Perú. Con tal fin, el presente estudio empleó el diseño epidemiológico de Caso-Control. Por tanto, la estrategia analítica principal consiste en el cálculo del riesgo del grupo expuesto versus el control de forma tal que calcule el Odds Ratio de la exposición (Szklo y Nieto, 2000).

#### 2. **Lugar de estudio**

El proceso de muestreo se llevó a cabo en 4 localidades del departamento de Puno, tomándose muestras fecales de crías de alpacas (ver tabla 3). Estas zonas de muestreo tuvieron las siguientes características:

##### **a) Antacalla**

Las unidades productivas pertenecen a la Empresa de Propiedad Social (EPS) “Rural Alianza”, ubicada en la localidad de Antacalla, distrito de Nuñoa, provincia de Melgar. Se muestrearon alpacas neonatales de 4 puntas de parición en la Unidad Productiva Antacalla y 3 puntas de la Unidad Productiva Alianza, pertenecientes a la indicada Empresa. Estos animales son criados en forma extensiva, alimentándose a base de pastos naturales; en un medio ambiente frío y seco, a una altitud que va entre los 4,190 a 4,300 m.s.n.m. (Saravia, 2004).

#### **b) La Raya**

El muestreo se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Producción (CIP) La Raya de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano (UNA) Puno, ubicado en el distrito de Santa Rosa, provincia de Melgar. Dicho centro se encuentra a una altitud de 4200 m.s.n.m., a 10° 13' 33" latitud sur y 20° 57' 12" de longitud oeste; corresponde a la zona agroecológica de puna húmeda, con clima tipo semiseco y frío, con temperaturas que varían de 4.5 a 18°, con una precipitación fluvial de 932 mm/año, contando con una superficie total de 5095.87 hectáreas (INEI, 2000).

#### **c) Quimsachata**

Se tomó muestras de una punta de parición perteneciente a la Estación Experimental del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) en la localidad de Quimsachata, distrito Santa Lucía, provincia de Lampa. El lugar se encuentra a una altitud de 4,025 m.s.n.m., a 15° 41' 39" latitud sur y 70° 36' 24" longitud oeste; presenta dos estaciones marcadas (lluviosa y seca), con una temperatura mínima de -4.7 °C y una máxima de 13.2 °C, y una humedad relativa de 55% (INEI, 2000).

#### **d) Macusani**

Se tomó muestras fecales de una punta de parición perteneciente a un criador alpaquero particular en la localidad de Macusani, distrito Macusani, provincia de Carabaya.

### **3. Animales**

El muestreo se realizó durante la época de parición, entre Febrero y Marzo del 2006, considerándose crías de alpacas nacidas en todas las comunidades mencionadas anteriormente, que no tuvieran menos de 1 día de nacidos ni más de 15 días de edad, porque a partir de los 15 días se espera la presentación de *Eimerias* que pueden interferir en el diagnóstico (Melo y Hurtado, 1985; Fayer y Ungar, 1986). Asimismo se tomaron datos sobre su sexo, raza y edad; calculándose la última en función a la dentición, registros de nacimiento y la edad declarada por el pastor. Los criterios tomados para determinar si el animal presentaba o no diarrea fueron: presencia de heces líquidas o pastosas, fibra de la zona perineal sucia con heces con presencia de

deshidratación y/o depresión. Con base a estos criterios se constituyeron los animales pertenecientes al grupo caso mientras que los animales con estado aparentemente normal al momento de la toma de muestra constituyeron los controles.

#### 4. Tamaño muestral

Se aplicó la fórmula para el cálculo de tamaño muestral para un estudio de caso-control no pareado (Rothman y Greenland, 1998):

$$m = \frac{\left( \frac{Z(a)}{2} + Z(b) \cdot \sqrt{P \cdot (1 - P)} \right)^2}{\left( P - \frac{1}{2} \right)^2} \quad M = \frac{m}{Pe}$$

Para el caso:

$$P = \frac{OR}{1 + OR} \quad p1 = \frac{p0 \cdot OR}{1 + p0 \cdot (OR - 1)} \quad Pe = p0 \cdot (1 - p1) + p1 \cdot (1 - p0)$$

donde:

- M = número de pares requeridos para detectar pares discordantes en m
- m = número mínimo de pares discordantes requeridos
- Z(a) = nivel de confianza especificado para la prueba (95%)
- Z(b) = potencia especificada para la prueba (80%)
- p0 = proporción esperada de exposición entre los controles (14.02%) (Foroca *et al.*, 2001)
- p1 = proporción calculada de exposición entre los casos
- OR = Odds Ratio estimado de suficiente importancia (2.38) (López, 1997)

A partir de dicha fórmula se calculó un número mínimo de 133 animales requeridos para el grupo control y 133 animales para el grupo de casos, lo que suma 266 animales a muestrear como mínimo para el estudio. Debido a la disponibilidad de animales se muestrearon en total 487 crías de alpaca, correspondiendo para los controles 151 animales y para los casos 336 animales.

## 5. **Recolección de muestras**

Se recolectaron muestras fecales, tomadas directamente del recto, en una bolsa de polietileno (aproximadamente de 3 a 6 gramos por animal) de las crías enfermas y de las aparentemente sanas. Cada bolsa fue rotulada, anotando datos sobre la fecha de recolección, punta de parición, sexo, raza y edad de cada cría.

## 6. **Procesamiento de muestras**

Posteriormente a la recolección, se realizó la extensión de una parte de cada muestra recolectada sobre una lámina portaobjetos, dejándola secar al medio ambiente. Luego las muestras fueron colocadas en un vaso Koplíng con metanol para ser fijadas por espacio de 5 minutos y de allí, fueron remitidas al Laboratorio de Inmunoparasitología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM, donde las extensiones fijadas se tiñeron empleando la técnica Ziehl-Neelsen modificado y se procedió a su observación al microscopio.

## 7. **Técnica de tinción para *Cryptosporidium* sp.**

### 7.1 **Tinción de Ziehl-Neelsen Modificada**

En el laboratorio de Inmunoparasitología Veterinaria de la UNMSM, las láminas fueron teñidas utilizando la técnica de tinción de Ziehl-Neelsen modificada (Henricksen y Pohlenz, 1981). Primero se cubre el frotis con fucsina básica fenicada durante 20 minutos. Luego se lava con agua corriente hasta eliminar el exceso de fucsina fenicada. Se decolora con ácido sulfúrico al 2% durante 20 segundos, para después lavarse nuevamente con agua destilada. Una vez seco, el frotis se contrasta con verde malaquita al 5% durante 5 minutos. Después de un último lavado con agua corriente se deja secar. Posteriormente se agrega una gota de aceite de inmersión y se cubre la extensión con un cubreobjeto.

### 7.2 **Lectura de las muestras**

Todas las muestras teñidas con la técnica de Ziehl-Neelsen modificada fueron examinadas al microscopio con un objetivo de 40x. Un objetivo de 100x fue usado para confirmar las muestras positivas, tomando en cuenta las medidas (largo por ancho) de los ooquistes de *C. parvum* encontrados.

### 7.3 Criterios de diagnóstico

Mediante la técnica de Ziehl-Neelsen modificada, los ooquistes se observan como microorganismos esféricos u ovalados de 4-6  $\mu\text{m}$  (Muñoz *et al.*, 1993a; Weitz, 1994; Fayer *et al.*, 2000; Bullock-Lacullo, 2001; Kosek *et al.*, 2001; Ramírez *et al.*, 2004) de color rojo fucsia con algunas granulaciones oscuras en su interior, que contrastan con el fondo teñido de verde (Henriksen y Pholenz, 1981; Casemore *et al.*, 1985; Muñoz *et al.*, 1993b). Las levaduras también adquieren coloración con esta técnica, no obstante, las características morfológicas y de tinción permiten diferenciar ambos tipos de organismos por diversidad en el tamaño y tinción homogénea, imagen plana, que presentan las levaduras (Romero, 1998).

## 8. Análisis de datos

La presencia de *C. parvum* como factor de riesgo para la presentación de diarrea neonatal en alpacas neonatas se evaluó mediante el cálculo de la estimación del riesgo (odds ratio). Para ello, se empleó una regresión logística utilizando el paquete estadístico Stata versión 8.0. El riesgo calculado tuvo su respectivo intervalo de confianza al 95%. En este caso, al tratarse de un estudio caso-control, el riesgo de diarrea por *Cryptosporidium* se evaluó junto a otros factores como el lugar de origen, la edad, el sexo y la raza de las alpacas empleando una regresión logística.

#### IV. RESULTADOS

De los 487 animales muestreados en las cuatro localidades del departamento de Puno, 336 padecieron diarrea, mientras que los 151 animales restantes no presentaron este cuadro. Mediante la tinción de Ziehl-Neelsen modificado se determinó la presencia de ooquistes de *C. parvum* en el  $34 \pm 4\%$  (165/487) del total de muestras recolectadas. El  $66 \pm 4\%$  (322/487) de las muestras analizadas fueron negativas. La Tabla 4 muestra que el  $79 \pm 6\%$  (130/165) de los animales positivos a la infección por el parásito resultaron diarreicos. Por otro lado, el  $23\%$  (35/151) de las alpacas sin diarrea estaban infectadas (Apéndice 2).

La distribución de las crías de alpaca en las 4 localidades muestreadas del departamento de Puno y su relación con diarrea se presentan en la Tabla 5. Se distingue un mayor porcentaje de animales diarreicos en la localidad de Antacalla con el  $77.1 \pm 4.4\%$  (273/354). Dicha localidad también presenta mayor porcentaje de animales positivos a *C. parvum* por localidad muestreada con el  $43\%$  (153/354) (Apéndice 3). No se detectó el parásito en ningún animal muestreado en la localidad de Macusani.

La distribución de las crías de acuerdo al sexo mostró que 237 del total de muestras colectadas pertenecieron a los machos, mientras que las 250 muestras restantes fueron hembras. Se determinó que el  $66 \pm 6\%$  (157/237) de los machos y el  $72 \pm 6\%$  (179/250) de las hembras presentaron diarrea al momento del muestreo (Tabla 6). Además, el  $32\%$  (76/237) del total de machos fueron positivos a la técnica de Ziehl-Neelsen modificado. Así mismo, el  $36\%$  (89/250) de las hembras muestreadas fueron positivas a la técnica (Apéndice 4).

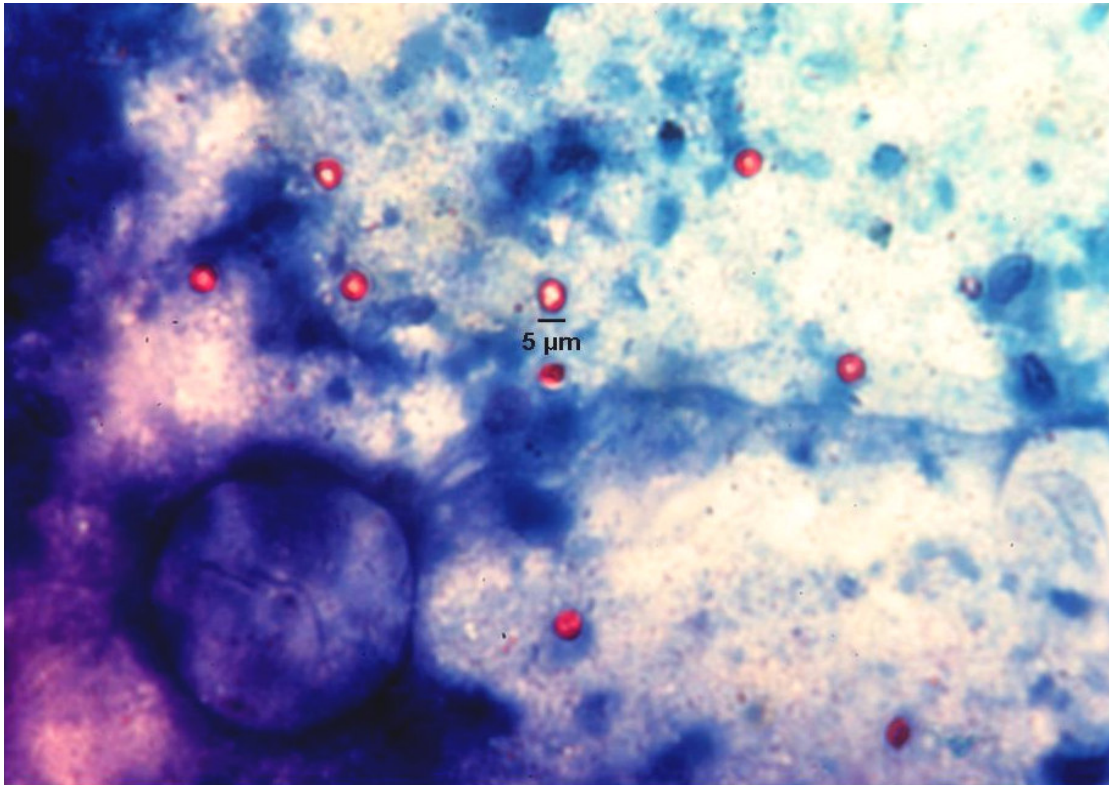
Del total de alpacas muestreadas, 376 fueron de raza Suri y 111 de raza Huacaya. El  $76 \pm 4$  % (287/376) de las alpacas Suri y el  $44 \pm 9$  % (49/111) de las Huacaya, presentaron muestras diarreas (Tabla 7). Se observó que el 41% (155/376) de las alpacas Suri resultaron positivas a *C. parvum*. Por otro lado, el 9% (10/111) de las Huacaya fueron también positivas al parásito (Apéndice 5).

El promedio del largo de los ooquistes encontrados en cada una de las 165 muestras positivas fue de  $4.78 \mu\text{m}$ ; mientras que el promedio del ancho fue de  $4.58 \mu\text{m}$ .

Se empleó una regresión logística utilizando el paquete estadístico Stata versión 8.0 para estimar el valor del Odds Ratio para los predictores de diarrea. La tabla 8 muestra el Odds ratio (OR) calculado para la infección por *C. parvum* y diarrea neonatal ajustado por las otras variables predictoras. El análisis muestra que el riesgo para la presentación de diarrea neonatal no estuvo influenciado por la infección del parásito (OR: 1.5, IC 95%: 0.9 – 2.4).

El lugar de origen, específicamente la localidad de La Raya, resultó estadísticamente significativa en la regresión logística ( $p < 0.05$ ). Para ello, se tomó Quimsachata como la localidad de referencia contra la cual se compararon las 3 localidades restantes para evaluar su influencia en la presentación de diarrea. Los resultados de la tabla 8 para el análisis de la variable localidad se puede interpretar como sigue: se encuentran 2.5 veces diarrea en el grupo de los casos por cada diarrea en el grupo control en la localidad de La Raya. Esto quiere decir que la localidad de La Raya representa un factor de riesgo para la presentación de diarrea. En el mismo análisis, las localidades de Antacalla y Macusani no fueron significativas estadísticamente ( $p > 0.05$ ).

La raza y sexo no presentaron significancia estadística para la presentación de diarrea en las alpacas neonatales evaluadas ( $p > 0.05$ ).



**Figura 2.** Microfotografía de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* con la técnica de ZNM, a 400x.



**Tabla 3.** Distribución de alpacas neonatales muestreadas según el lugar de origen.

ORIGEN			N° de animales		
			CASOS	CONTROLES	TOTAL
ANTACALLA (EPS Rural Alianza)	UP Antacalla	R1	6	6	12
		R2	89	12	101
		R3	43	9	52
		R4	25	12	37
	UP Alianza	R1	69	38	107
		R2	20	2	22
		R3	21	2	23
LA RAYA (UNA)			23	17	40
QUIMSACHATA (INIA)			16	27	43
MACUSANI (particular)			24	26	50
TOTAL			336	151	487

R 1-4 = Número de rebaño en cada Unidad Productiva (UP).

**Tabla 4.** Distribución de alpacas neonatales diarreicas según la presencia o no de *Cryptosporidium parvum*.

<i>C. parvum</i>	Animales muestreados	PRESENCIA DE DIARREA	
		Número	Porcentaje $\pm$ IC 95%
POS	165	130	79 $\pm$ 6
NEG	322	206	64 $\pm$ 5
Total	487	336	69 $\pm$ 4

**Tabla 5.** Distribución de alpacas neonatales diarreicas según la localidad de origen.

ORIGEN	Animales muestreados	PRESENCIA DE DIARREA	
		Número	Porcentaje $\pm$ IC 95%
ANTACALLA	354	273	77 $\pm$ 4
LA RAYA	40	23	58 $\pm$ 15
QUIMSACHATA	43	16	37 $\pm$ 14
MACUSANI	50	24	48 $\pm$ 14
Total	487	336	69 $\pm$ 4

**Tabla 6.** Distribución de alpacas neonatales diarreicas según el sexo.

SEXO	Animales muestreados	PRESENCIA DE DIARREA	
		Número	Porcentaje $\pm$ IC 95%
MACHO	237	157	66 $\pm$ 6
HEMBRA	250	179	72 $\pm$ 6
Total	487	336	69 $\pm$ 4

**Tabla 7.** Distribución de alpacas neonatales diarreicas según la raza.

RAZA	Animales muestreados	PRESENCIA DE DIARREA	
		Número	Porcentaje $\pm$ IC 95%
SURI	376	287	76 $\pm$ 4
HUACAYA	111	49	44 $\pm$ 9
Total	487	336	69 $\pm$ 4

**Tabla 8.** Resultados del análisis de regresión logística para los predictores de diarrea en alpacas neonatales en el departamento de Puno.

Predictores		OR	P	Límite inferior del IC al 95%	Límite superior del IC al 95%
<i>C. parvum</i>		1.5	0.099	0.9	2.4
Localidad	La Raya	2.5	0.046	1.1	6.1
	Antacalla	2.6	0.078	0.9	7.6
	Macusani	1.7	0.250	0.7	3.9
Sexo	Hembra	1.3	0.212	0.9	1.9
Raza	Huacaya	0.4	0.087	0.2	1.1

OR = Odds Ratio

p = Nivel de significancia

## V. DISCUSIÓN

El presente trabajo es el primero que evalúa en campo, la presencia de *C. parvum* como factor de riesgo de diarrea en alpacas neonatales empleando el diseño epidemiológico de Caso-Control. El análisis estadístico reveló que el riesgo para diarrea neonatal no estuvo influenciado por la infección del parásito ajustado por las otras variables potencialmente confundentes aunque hubo tendencia a ser significativo estadísticamente.

Si bien es cierto que el estudio realizado no demostró que el parásito represente un riesgo para la diarrea en alpacas recién nacidas, estudios previos han establecido una asociación positiva entre estas variables pero de forma temporal, por el diseño del estudio empleado. Los primeros estudios que se realizaron para determinar esta asociación en alpacas neonatales emplearon diseños transversales de tipo ecológico, con resultados similares entre ellos (López *et al.*, 1995; Romero, 1998).

Al tratarse de un estudio caso-control no pareado, se pudo hacer la evaluación de otras variables potencialmente confundentes junto a *C. parvum*, como lo son el sexo y la raza de las alpacas, pero especialmente el lugar de origen, variable que ha demostrado estar asociada a la infección por el parásito y diarrea en alpacas neonatales (López, 1997; Romero, 1998). Bajo condiciones de campo, un estudio pareado (selección de individuos controles con características similares a los casos), es difícil de llevar a cabo por el tipo de crianza en las explotaciones, ya que lo que se pretende es descartar la influencia de la variable de pareo sobre el factor predisponente de la enfermedad en estudio, de allí que se emplee un estudio no pareado para el diseño del presente trabajo.

Los resultados del análisis de regresión logística relacionados a la variable origen mostró que la localidad de La Raya representa un factor de riesgo para la ocurrencia de diarrea como así lo demuestran los resultados ajustados en la tabla 8. No debe descartarse la localidad de Antacalla, que aunque no demostró tener influencia en la presentación de diarrea, tuvo tendencia a ser significativa. Las otras localidades mostraron ausencia de significancia estadística. Estos resultados obedecen principalmente al tamaño muestral alcanzado para cada localidad y al tipo de manejo que se realiza dentro de cada una de ellas, ejerciendo un efecto que enmascara la verdadera influencia del parásito en la ocurrencia de cuadros diarreicos en las alpacas neonatales estudiadas.

La Raya es la segunda localidad que presentó mayor porcentaje de animales diarreicos por localidad con 57.5 % (23/40) después de Antacalla. Por otro lado, la localidad de Quimsachata, donde se practicaba la rotación de dormideros al igual que en La Raya, fue la que presentó el menor porcentaje de riesgo de diarrea por *C. parvum*. En este sentido, la rotación de los dormideros, dentro de las prácticas del manejo, constituye una medida importante para el control y prevención de la enfermedad (Bustinza, 2001b). Debe considerarse además el comportamiento de esta especie respecto al hábito de defecar en un lugar específico en el ambiente de crianza constituyendo una forma de letrina dentro del ambiente de crianza (Leguía, 1989), limitando en cierto modo la capacidad de los portadores asintomáticos y crías enfermas de diseminar la infección. Estos hechos explicarían que La Raya presente menor frecuencia de la infección por el parásito.

La EPS “Rural Alianza” ubicada en la localidad de Antacalla, fue en la que se observó un tamaño de los rebaños relativamente grande (100 a 150 animales por rebaño) respecto a las otras localidades, debido a que la eficiencia del sistema productivo es importante en esta empresa, de tal forma que existe mayor densidad de animales. Esta mayor densidad ocasiona el hacinamiento de los animales, condición que favorecería la presentación del parásito (Garber *et al.*, 1994) que explicaría el alto número de animales diarreicos en Antacalla (Tabla 5). Además, debe considerarse otros posibles factores que pueden ayudar a explicar mejor la epidemiología de los procesos diarreicos en las alpacas. Si bien es cierto que el *C. parvum* es patógeno primario en alpacas neonatales (López *et al.*, 2001), se sabe que cuando la criptosporidiosis se asocia con otros patógenos entéricos, el cuadro se vuelve más severo produciendo en muchos casos alta mortalidad (Holland, 1990; Troncoso, 1992; O’Donoghue, 1995; De Graaf *et al.*, 1999).

En este estudio, otra variable que cabe mencionar fue la edad de las crías muestreadas. La disponibilidad de las mismas al momento del muestreo, llevó a que el 94.6 % (461/487) de los animales se concentren entre los 14 y 15 días de edad, en un rango de edades comprendido entre los 3 a 15 días (Apéndice 6), lo que dificultó el análisis de la infección y la diarrea en las crías por estrato etéreo. Al respecto, diversos estudios de prevalencia realizados en alpacas mostraron una mayor frecuencia del parásito entre los 10 a 15 días de edad (Caman, 1996; Morales, 1996; Wanda, 1996; Ramírez, 1997; Tribeño, 1997; Romero, 1998).

Entre los animales que no presentaron diarrea se determinó un 23.2% (35/151) de crías positivas a *C. parvum*, constituyendo una frecuencia relativamente alta. Estas crías se comportarían como portadores asintomáticos (Chermette y Boufassa-Ouzrout, 1988; Díaz, 2002), representando una fuente de infección para las crías recién nacidas. No se puede descartar el papel que puedan desempeñar las alpacas adultas, manteniendo la infección año a año, como se ha demostrado en otras especies domésticas (Foreyt, 1990; Troncoso, 1992; Requejo-Fernández *et al.*, 1995; Faubert y Letvinsky, 2000; Díaz *et al.*, 2002; Castro-Hermida *et al.*, 2005). Además, se debe tener en cuenta otras fuentes de infección y considerarse a otras especies domésticas, roedores y otros mamíferos silvestres incluyendo el hombre (Fayer y Ungar, 1986; O'Donoghue, 1995; Olson *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2004) que actuarían diseminando especies de *Cryptosporidium* que no provocarían diarrea en las alpacas (Xiao *et al.*, 2004).

## VI. CONCLUSIONES

Utilizando la técnica de Ziehl-Neelsen Modificado en la tinción de frotis fecales de alpacas neonatas no mayores de 15 días de edad en 4 localidades del departamento de Puno, se concluye:

1. Los resultados presentados en este trabajo no pudieron demostrar que la presencia de *Cryptosporidium parvum* represente un factor de riesgo para la presentación de diarrea en alpacas neonatales en el departamento de Puno.
2. Que la localidad de La Raya representó un factor de riesgo para la presentación de diarrea en alpacas neonatales.



## VII. LITERATURA CITADA

1. **Acha, P.; B. Szyfres. 2003.** Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Vol. III: Parasitosis. 3ª ed. OPS. Washington – EUA. p 413.
2. **Ameghino, E.; J. De Martini. 1991.** Mortalidad en crías de alpacas. Boletín de divulgación del IVITA-Rerumen-INIA. UNMSM. Ed. Martegraf. Lima. p 128.
3. **Anderson, B. 1998.** Cryptosporidiosis in Bovine and Human Health. J Dairy Sci. 81(11): 3036-3041.
4. **Barwick, R.S.; H.O. Mohammed; M.E. White; R.B. Bryant. 2003.** Factors associated with the likelihood of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in soil from dairy farms. J Dairy Sci. 86:784–791.
5. **Bidewell, C.A.; J.H. Catell. 1998.** Cryptosporidiosis in young alpacas. Vet Rec. 142(11): 287.
6. **Bullock-Lacullo, S. 2001.** Laboratory diagnosis of intestinal Cryptosporidiosis. U.S. Department of Health and Human Services. CDC. Atlanta, Georgia. p 5.
7. **Bustinza, V.C. 2001a.** La alpaca: conocimiento del gran potencial andino. Tomo I. Oficina de recursos del aprendizaje-Sección Publicaciones. UNA. Puno. p 452- 453.
8. **Bustinza, V.C. 2001b.** La alpaca: crianza, manejo y mejoramiento. Tomo II. Oficina de recursos del aprendizaje-Sección Publicaciones. UNA. Puno. p 343.
9. **Caman, V. 1996.** Prevalencia de Criptosporidiosis en alpacas neonatas en el centro alpaquero de la SAIS Maranganí-Cusco. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM. Lima. p 38.

10. **Castro-Hermida, J.A.; Y.A. González-Losada; E. Ares-Mazás. 2002.** Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). *Vet Parasitol.* 106: 1-10.
11. **Castro-Hermida, J.A.; A. Delafosse; I. Pors; E. Ares-Mazás; C. Chartier. 2005.** *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* infections in adult goats and their implications for neonatal kids. *Vet Rec.* 157: 623-627.
12. **Casemore, R.; M. Armstrong; R. Sans. 1985.** Laboratory diagnosis of Cryptosporidiosis. *J Clin Pathol.* 38: 1337-1341.
13. **Cebra, K.; D. Mattson; R. Backer; R. Sonn; L. Peggy. 2003.** Potential pathogens in feces from unweaned llamas and alpacas with diarrhea. *J Am Vet Med Assoc.* 223: 1806-1808.
14. **Chalmers, R.M.; Casemore, D.P. 2004.** Epidemiology and strain variation of *Cryptosporidium*. En: *The pathogenic enteric protozoa: Giardia, Entamoeba, Cryptosporidium and Cyclospora.* Cap. 1. C.R. Sterling y R.D. Adam (ed). Kluwer Academic Publishers. University of Arizona. Tucson, Arizona. p 27-41.
15. **Chen, X; J. Keithly; C. Paya; N. LaRusso. 2002.** Cryptosporidiosis. *N Engl J Med.* 346(22): 1723-1731.
16. **Chermette, R.; S. Boufassa-Ouzrout. 1988.** Cryptosporidiosis: a cosmopolitan disease in animals and in man. OIE. 2<sup>nd</sup> edition. Technical series N°5. Paris. p 122.
17. **Clark, D. 1999.** New insights into human cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev.* 12(4): 554–563.
18. **Crabb, J. H. 1998.** Antibody-based immunotherapy of cryptosporidiosis. *Adv Parasitol.* 40:121–149.
19. **Current, W.; L.S. García. 1991.** Criptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev.* 4(3): 325-358.
20. **Current, W.; T.B. Haynes. 1984.** Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. *Science.* 224: 603-605
21. **DeGraaf, D.; E. Vanopdenbosch; L. Ortega-Mora; H. Abbassi; J.E. Peeter. 1999a.** A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasitol.* 29: 1269-1287.
22. **DeGraaf, D.; F. Spano; F. Petra; S. Sagodira; A. Bonnin. 1999b.** Speculation on whether a vaccine against cryptosporidiosis is a reality or fantasy. *Int J Parasitol.* 29: 1289-1306.

23. **Díaz, A. 2002.** Criptosporidiosis en el ganado bovino. Memorias XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. Universidad Los Andes. Trujillo. Valera 22-26 de Octubre. p 10.
24. **Díaz, A.; L.N. Ramírez-Iglesia; M.R. Godoy; R. Román. 2002.** Excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. durante el postparto, en vacas mestizas de doble propósito. Rev Cien. 12(2): 614-616.
25. **Dillingham, R.; A. Lima; R. Guerrant. 2002.** Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. Microbes Infect. 4: 1059–1066.
26. **FAO. 2005.** Situación actual de los Camélidos Sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. p 63.
27. **Fahey, T. 2003.** Cryptosporidiosis. J Infect Dis. 10(2): 75-80.
28. **Faubert, G. M.; Y. Litvinsky. 2000.** Natural transmission of *Cryptosporidium parvum* between dams and calves on a dairy farm. Int J Parasitol. 86(3): 495–500.
29. **Fayer, R.; B.L.P. Ungar. 1986.** *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis. Microbiol Rev. 50:458-483.
30. **Fayer, R.; C. Andrews; B.L.P. Ungar; B. Blagburn. 1989.** Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of Cryptosporidiosis in neonatal calves. Int J Parasitol. 75:393-7.
31. **Fayer, R.; U. Morgan; S. Upton. 2000.** Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int J Parasitol. 30: 1305-1322.
32. **Fayer, R. 2004.** *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. Vet Parasitol. 126: 37-56.
33. **Fernández, M. 1995.** Prevalencia de *Cryptosporidium parvum* en alpacas neonatas del Centro experimental La Raya-Cusco. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM. Lima. p 39.
34. **Foreyt W. 1990.** Coccidiosis and Cryptosporidiosis in sheep and goats. Veterinary Clinics of North American: Food Animal Practice. 1990. Vol 6 N°3. p 655-670.
35. **Foroca, D.; V. Zanabria; J. Málaga; F. Vilca. 2001.** Cryptosporidiosis en alpacas crías del Centro de Investigación y Producción La Raya-UNA Puno. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNA. Puno. Oficina Universitaria de Investigación. Investigación en Camélidos Sudamericanos 1963-2003.

36. **Foster, J.C.; M.D. Glass; P.D. Courtney; L.A. Ward. 2003.** Effect of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Food Microbiol.* 20: 351–357.
37. **García, L.; D. Bruckner; T. Brewer; R. Shimizu. 1983.** Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocyst from stools specimens. *J Clin Microbiol.* 18(1):185-190.
38. **Garber, L.P.; M.D. Salman; H.S Hurd; T. Keefe; J.L. Schlater. 1994.** Potential risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. *J AmVet Med Assoc.* 205: 86-91.
39. **Griffiths, J. K. 1998.** Human Cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment, and diagnosis. *Adv Parasitol.* 40:37–85.
40. **Harp, J.A.; D.B. Woodmansee; H.W. Moon. 1990.** Resistance of calves to *Cryptosporidium parvum*: effects of age and previous exposure. *Infect Immun.* 58(7): 2237-2240.
41. **Harp, J.A.; R. Fayer; B.A. Pesch; G.J. Jackson. 1996.** Effect of pasteurization on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water and milk. *Appl Environ Microbiol.* 62: 2866-2868.
42. **Heine, J.; J.F. Pohlenz; H.W. Moon; G.N. Woode. 1984.** Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. *J Infect Dis.* 150:768-775.
43. **Henriksen, S.; J. Pholenz. 1981.** Staining of *Cryptosporidia* by a modified Ziehl Neelsen technique. *Acta Vet Scand.* 22:594-596.
44. **Hoar, B. R.; E.R. Atwill; C. Elmi; T. B. Farver. 2001.** An examination of risk factors associated with beef cattle shedding pathogens of potential zoonotic concern. *Epidemiol Infect.* 127: 147-155.
45. **Holland, R.E. 1990.** Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin Microbiol Rev.* 10: 345-75.
46. **Huetink, R.E.C.; J.W.B. Van Der Giessen; J.P.T.M. Noordhuizen; H.W. Ploeger. 2001.** Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Vet Parasitol.* 102: 53–67.
47. **Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). 2000.** Perú: Compendio Estadístico: 1994-1995. Tomo I. Sistema Nacional de Estadística e Informática. Lima-Perú. p 720.
48. **Jenkins, M.C. 2001.** Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. *Vet Parasitol.* 101: 291–310.

49. **Johnson, D. W.; N. J. Pieniazek; D. W. Griffin; L. Misener; J. B. Rose1. 1995.** Development of a PCR Protocol for Sensitive Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Water Samples. *Appl Environ Microbiol.* 61(11): 3849–3855.
50. **Juranek, D. 2000.** Cryptosporidiosis. En: *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*. Cap.1. T. Strickland (ed). W.B. Saunders Company. Philadelphia. p 594-600.
51. **Juranek, D. 2001.** Cryptosporidiosis: sources of infection and guidelines for prevention. *Clin Infect Dis.* 21(1): 57-61.
52. **Kehl, K.S.; H. Cicirello; P. Havens. 1995.** Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *J Clin Microbiol.* 33(2): 416–418.
53. **Kosek, M.; C. Alcantara; A.M. Lima; R.L. Guerrant. 2001.** Cryptosporidiosis: an update. *Lancet Inf Dis.* 1: 262-269.
54. **Laurent, F.; M. Kagnoff; T. Savidge; M. Naciri; L. Eckmann. 1998.** Human intestinal epithelial cells respond to *Cryptosporidium parvum* infection with increased prostaglandin H synthase 2 expression and prostaglandin E2 and F2a production. *Infect Immun.* 66(4): 1787–1790.
55. **Laurent, F.; D. McCole; L. Eckmann; M.F. Kagnoff. 1999.** Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. *Microb. Infect.* 2: 141–148.
56. **Leguía, G.P. 1989.** Enfermedades parasitarias de las alpacas. XIII Reunión Científica Anual – APPA. Simposio: Producción de alpacas y llamas. Lima-Perú. p 168.
57. **Leguía, G. 1991.** Enfermedades parasitarias: Coccidiosis. En: *Producción de Rumiantes Menores: alpaca*. Cap. 10. C. Novoa y A. Florez (ed). Ed. Rerumen. Lima. p 261-262.
58. **Leguía, G.; E. Casas. 1999.** Enfermedades Parasitarias y Atlas Parasitológico de Camélidos Sudamericanos. Ed. De Mar. Lima. p 190.
59. **Levine, N.D. 1980.** Some corrections of *Coccidium* (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *Int J Parasitol.* 66(5): 830-834.
60. **López, M.T.; A.E. González; L. Ortega-Mora; M. Fernández; M. Romero; C. Gavidia; F.A. Rojo-Vázquez. 1995.** Prevalencia de la criptosporidiosis y de la diarrea neonatal en alpacas. IV Congreso Ibérico de Parasitología. Santiago de Compostela. p 108-109.
61. **López, M.T. 1997.** Estudio epidemiológico de la infección por *Cryptosporidium parvum* en alpacas neonatas en Perú. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, Univ. de León. León. p 176.

62. **López, M.T.; A.E. González, F. Rojo-Vázquez. 2001a.** Infección experimental de alpacas neonatas con *Cryptosporidium parvum*. Rev Acad Per Cien Vet. 2(1):11-17.
63. **López, M.T.; A.E. González, F. Rojo-Vázquez. 2001b.** *Cryptosporidium parvum* como factor de riesgo de diarrea en alpacas recién nacidas. Resúmenes II Congreso Latinoamericano de especialistas en pequeños rumiantes y Camélidos Sudamericanos. Yucatán, México. p 28.
64. **MacPherson, D.W.; R. McQueen. 1993.** Cryptosporidiosis: Multiattribute evaluation of six diagnostic methods. J Clin Microbiol. 31 (2): 198-202.
65. **Maldonado-Camargo, S.; E.R. Atwill; J.A. Saltijeral-Oaxacaa; L.C. Herrera-Alonso. 1998.** Prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in Holstein Freisian dairy calves in central México. Prevent Vet Med. 36: 95-107.
66. **Marcial, M.A.; J.L. Madara. 1986.** *Cryptosporidium*: celular localization, structural analysis of absorptive cell-parasite membrane-membrane interactions in guinea pigs, and suggestions of protozoan transport by M cells. Gastroenterology. 90:583-594.
67. **Martín-Gómez, S.; L.M. Ortega-Mora; M. Pilar-Izquierdo; F.A. Rojo-Vázquez; J. Pereira-Bueno. 1995.** Prevalencia de la infección por *Cryptosporidium parvum* en terneros de la provincia de León. IV Congreso Ibérico de Parasitología. Santiago de Compostela. p 118-119.
68. **Martín-Gómez, S. 1996.** Aspectos epidemiológicos de la infección por *Cryptosporidium parvum* en corderos y cabritos. Tesina de licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. p 128.
69. **Martín-Gómez, S. 2001.** Neonatal diarrhea syndrome in ruminants with special attention to Cryptosporidiosis: current importance in Spain and proposal for control of the disease. Ganadería. Year I. N° 10.
70. **Melo, M.; E. Hurtado. 1985.** Infestación parasitaria en alpacas desde el nacimiento hasta el destete. Allpak'a. Universidad Nacional del Altiplano. Rev Invest Camel Sudam. Puno. 1: 78-86.
71. **Mohammed, H.O.; S.E. Wade; S. Schaaf. 1999.** Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in dairy cattle in southeastern New York State. Vet Parasitol. 83: 1-13.
72. **Morales, B. 1996.** Prevalencia de Criptosporidiosis en alpacas neonatales en el departamento de Puno. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM. Lima. p 40.

73. **Morgan, U.M.; K.D. Sargent; P. Deplazes; D.A. Forbes; F. Spano; H. Hertzberg; A. Elliot; R.C. Thompson. 1998a.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitol.* 117: 31–37.
74. **Morgan, U.M.; L. Pallant; B. W. Dwyer; D. A. Forbes; G. Rich; R. C. A. Thompson. 1998b.** Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: *Clinical Trial. J Clin Microbiol.* 36(4): 995–998.
75. **Morgan-Ryan, U. M.; A. Fall; L. A. Ward; N. Hijjawi; I. Sulaiman; R. Fayer; R. C. Thompson; M. Olson; A. Lal; L. Xiao. 2002.** *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J Eukaryot Microbiol.* 49:433–440.
76. **Muñoz, F.M.; L. Ortega-Mora; D. Carmenes. 1993a.** Gastroenteritis infecciosas y parasitarias de los corderos y cabritos: Etiología. *Tratado de patología y producción Ovina. Rev. Ovis-Aula Veterinaria.* 27: 9-16.
77. **Muñoz, F.M.; L. Ortega-Mora; D. Carmenes. 1993b.** Gastroenteritis infecciosas y parasitarias de los corderos y cabritos: Epidemiología. *Tratado de patología y producción Ovina. Rev. Ovis-Aula Veterinaria.* 27: 35-41.
78. **Naciri, M.; R. Mancassola; P. Ivore; J.E. Peeters. 1993.** The effect of halofuginone lactate on experimental *Cryptosporidium parvum* infections in calves. *Vet Parasitol.* 45: 199–207.
79. **O'Donoghue, P.J. 1995.** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int J Parasitol.* 25:139-195.
80. **Olson, M.E.; N.J. Guselle; R.M. O'Handley; M.L. Swift; T.A. McAllister; M.D. Jelinski; D.W. Morck. 1997.** *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in British Columbia. *Can Vet J.* 38: 703-706.
81. **Olson, M.E.; M. Ryan; O'Handley; B.J. Ralston; T.A. McAllister; R.C. Thompson. 2004.** Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Parasitol.* 20(4):185-191.
82. **Ortega-Mora, L.M.; S.E. Wright. 1994.** Age-related resistance in ovine cryptosporidiosis: patterns of infection and humoral immune response. *Infect Immun.* 62(11): 5003-5009.
83. **Ortega-Mora, L.M.; M. Gómez; F. Rojo-Vásquez. 1999.** Criptosporidiosis. En: *Parasitología Veterinaria. Cap. 17. M. Cordero del Campillo y M. Rojo (ed). Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid. p 213-221.*

84. **Ortiz, S. 1988.** Evaluación de algunos métodos de control de la mortalidad en crías de alpacas (*Lama pacos*) en explotaciones familiares. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM. Lima. p 71.
85. **Palacios, C. 2004.** Caracterización anatomo-histopatológica de enteropatías causantes de mortalidad en crías de alpaca. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM. Lima. p 164.
86. **Parreño, V.; V. Costantini; S. Cheetham; J. Blanco Viera; L.J. Saif; F. Fernández; L. Leoni; A. Schudel. 2001.** First isolation of rotavirus associated with neonatal diarrhoea in guanacos (*Lama guanicoe*) in the Argentinean Patagonia region. J Vet Med. 48: 713–720.
87. **Peeters, J.E.; I. Villacorta; E. Vanopdenbosch. 1992.** *Cryptosporidium parvum* in calves: kinetics and immunoblot analysis of specific serum and local antibody responses (immunoglobulin A (IgA), IgG and IgM) after natural and experimental infections. Infect Immun. 60: 2309-16.
88. **Pereira, S.J.; N.E. Ramirez; L. Xiao; L.A. Ward. 2002.** Pathogenesis of human and bovine *Cryptosporidium parvum* in gnotobiotic pigs. J. Infect. Dis. 186:715–718.
89. **Pérez, D. 2006.** Genotipificación y subtipificación de *Clostridium perfringens* aislados de crías de alpacas muertas por enterotoxemia. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM. Lima. p 91.
90. **Ramírez, A. 1991.** Enfermedades infecciosas. En: Avances y perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sudamericanos. Cap. 8. S. Fernández-Baca (ed). FAO. Santiago. p 263-323.
91. **Ramírez, A.; E. Franco; D. Pezo; W. García. 1998.** Diagnóstico y control de las enfermedades en CSA. FMV-UNMSM. IVITA-Maranganí. Pub. Técnica N°34. p 1-43.
92. **Ramírez, G. 1997.** Prevalencia de Criptosporidiosis en alpacas neonatales en la provincia de Lucanas – Ayacucho. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM. Lima. p 40.
93. **Ramírez, N.E.; L.A. Ward; S. Sreevatsan. 2004.** A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. Microbes Infect. 6: 773-785.
94. **Requejo-Fernández, J.A.; J. Pereira-Bueno; M. Pilar-Izquierdo; F. Rojo-Vázquez; L. Ortega-Mora. 1995.** Papel epidemiológico de los animales adultos en la infección por *Cryptosporidium parvum* en la especie ovina: eliminación de ooquistes en el periparto. IV Congreso Ibérico de Parasitología. Santiago de Compostela. p 122-123.



95. **Riggs, M.W. 2002.** Recent advances in Cryptosporidiosis: the immune response. *Microbes Infect.* 4: 1067–1080.
96. **Robertson, L.J.; A.T. Campbell; H.V. Smith. 1992.** Survival of *Cryptosporidium parvum* oocyst under various environmental pressures. *Appl Environ Microbiol.* 58: 3494-3500.
97. **Rojas, M.; I. Lobato; M. Montalvo. 1988.** *Cryptosporidium* en Camélidos Sudamericanos. XI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Lima. p 70.
98. **Romero, M. 1998.** Prevalencia de *Cryptosporidium parvum* en alpacas neonatales de la Sierra Central peruana. Tesis de Magíster en Salud Animal. Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM. Lima. p 63.
99. **Rothman, K.; S. Greenland. 1998.** Modern epidemiology. 2<sup>nd</sup> edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. USA. p 738.
100. **Rulofson, F.C.; E.R. Atwill; C.A. Holmberg. 2001.** Fecal shedding of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium parvum*, *Salmonella* organisms, and *Escherichia coli* O157:H7 from llamas in California. *Am J Vet Res.* 62: 637–642.
101. **Sakai, H.; Y. Tsushima; H. Nagasawa; R.J Ducusin; S. Tanabe; Y. Uzuka; T. Sarashina. 2003.** *Cryptosporidium* infection of cattle in the Tokachi district, Hokkaido. *J Vet Med Sci.* 65(1): 125-127.
102. **Saravia, M. 2004.** Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en llamas hembras adultas en la U.P. Alianza-Antacalla de la E.P.S. Rural Alianza-Puno. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM. Lima. p 52.
103. **Smith, H.V.; S.M. Caccio; A. Tait; J. McLauchlin; R.C.A. Thompson. 2006.** Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends Parasitol.* 22(4): 160-167.
104. **Szklo, M.; J. Nieto. 2000.** *Epidemiology Beyond the Basics.* Ed. Aspen Publication. Maryland. p 28-29.
105. **Szostakowska, B.; Kruminis-Lozowska, W.; Racewicz, M.; Knight, R.; Tamang, L.; Myjak, P.; Graczyk, T. 2004.** *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* recovered from flies on a cattle farm and in a landfill. *Appl Environ Microbiol.* 70(6): 3742–3744.
106. **Sulaiman, I.M.; L. Xiao; C. Yang; L. Escalante; A. Moore; C.B. Beard; M.J. Arrowood; A.A. Lal. 1998.** Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Emerg Infect Dis.* 4: 681-685.

107. **Tanriverdi, S.; G. Widmer. 2006.** Differential evolution of repetitive sequences in *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. Infect Genet Evol. 6: 113–122.
108. **Tribeño, D. 1997.** Prevalencia de Criptosporidiosis en alpacas neonatales en la provincia de Caylloma-Arequipa. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM. Lima. p 43.
109. **Troncoso, J. 1992.** *Cryptosporidium parvum* en la diarrea neonatal en pequeños rumiantes y algunos aspectos epizootiológicos de la criptosporidiosis en corderos. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. p 216.
110. **Tzipori, S. 1988.** Cryptosporidiosis in perspective. Adv Parasitology. 27: 63-129.
111. **Tzipori, S.; W. Rand; J. Griffiths; G. Widmer; J. Crabb. 1994.** Evaluation of an animal model system for Cryptosporidiosis: therapeutic efficacy of paromomycin and hyperimmune bovine colostrum-immunoglobulin. Clin Diagn Lab Immunol. 1(4): 450-463.
112. **Tzipori, S.; H. Ward. 2002.** Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. Microbes Infect. 4:1047-1058.
113. **Upton, S.J.; W.L. Current. 1985.** The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. Int J Parasitol. 71:625-629.
114. **Villacorta, I.; J.E. Peeters; E. Vanopdenbosch; E. Ares-Mazas; H. Theys. 1991.** Efficacy of Halofuginone Lactate against *Cryptosporidium parvum* in Calves. Antimicrob Agents Chemother. 35(2): 283-287.
115. **Viu, M.; J. Quílez; C. Sánchez-Acedo; E. del Cacho; F. López-Bernad. 2000.** Field trial on the therapeutic efficacy of Paromomycin on natural *Cryptosporidium parvum* infections in lambs. Vet Parasitol. 90: 163–170.
116. **Wanda, S. 1996.** Prevalencia de Criptosporidiosis en alpacas neonatales en la Unidad de Producción Cochabamba de la SAIS Túpac Amaru. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM. Lima. p 41.
117. **Weitz, J.C. 1994.** Criptosporidiosis. En: Parasitología clínica. Cap. 16. A. Atías (ed). Publicaciones técnicas Mediterráneo. Santiago. p 160-162.
118. **Weitz, J.C.; B. Astorga. 1993.** *Cryptosporidium parvum* in patients with chronic diarrhea and AIDS: diagnosis by means of indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies. Rev Med Chil. 121(8):923-926.
119. **Whitehead, C.; D. Anderson. 2006.** Neonatal diarrhea in llamas and alpacas. Small Rum Res. 61:207-215.

120. **Xiao, L.; U.M. Morgan; J. Limor; A. Escalante; M. Arrowood; W. Shulaw; R.C. Thompson; R. Fayer; A.A. Lal. 1999.** Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl Environ Microbiol.* 65: 3386–3391.
121. **Xiao, L.; R. Fayer; U. Ryan; S. Upton. 2004.** *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for Public Health. *Clin Microbiol Rev.* 17: 72-97.
122. **Zu, S-X.; G-D. Fang; R. Fayer; R.L. Guerrant. 1992.** Cryptosporidiosis: Pathogenesis and Immunology. *Parasitol Today.* 8(1): 24-27.

## **APÉNDICE**

**Apéndice 1.** Reactivos para la técnica de Ziehl-Neelsen Modificado.

- a) *FUCSINA BÁSICA FENICADA*: se disolvió 8 gramos de fucsina en 345 ml de agua destilada caliente. Luego se agregó 30 ml de fenol puro y se homogenizó; a esta solución posteriormente se le añadió 40 ml de alcohol 96° y luego fue homogenizado, filtrándose antes de su uso. Esta preparación fue comprobada con una lámina patrón.
  
- b) *VERDE MALAQUITA*: Se disolvió 5 gramos de verde malaquita en 100 ml de agua destilada fría. Esta solución fue filtrada antes de su uso y evaluados por comparación con una lámina patrón.
  
- c) *ÁCIDO SULFÚRICO AL 2%*: se diluyó 2 ml de ácido sulfúrico en 98 ml de agua destilada.

**Apéndice 2.** Relación entre la presentación de la infección por *C. parvum* y la presencia de diarrea en alpacas neonatales.

	PRESENCIA DE <i>C. parvum</i>		
DIARREA	Pos	Neg	Total
Pos (Casos)	130	206	336
Neg (Controles)	35	116	151
Total	165	322	487

**Apéndice 3.** Distribución de alpacas neonatales positivas a *Cryptosporidium parvum* según el lugar de origen.

ORIGEN	Animales muestreados	PRESENCIA DE <i>C. parvum</i>	
		Número	Porcentaje
ANTACALLA	354	153	43
LA RAYA	40	2	5
QUIMSACHATA	43	10	23
MACUSANI	50	0	0
Total	487	165	34

**Apéndice 4.** Distribución de alpacas neonatales positivas a *Cryptosporidium parvum* según el sexo.

SEXO	Animales muestreados	PRESENCIA DE <i>C. parvum</i>	
		Número	Porcentaje
MACHO	237	76	32
HEMBRA	250	89	36
Total	487	165	34



**Apéndice 5.** Distribución de alpacas neonatales positivas a *Cryptosporidium parvum* según la raza.

RAZA	Animales muestreados	PRESENCIA DE <i>C. parvum</i>	
		Número	Porcentaje
SURI	376	155	41
HUACAYA	111	10	9
Total	487	165	34

**Apéndice 6.** Distribución de alpacas neonatales diarreicas y positivas a la infección por *C. parvum* por días de edad en el departamento de Puno.

EDAD (días)	Animales muestreados	DIARREA (+)		<i>C. parvum</i> (+)	
		Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
2	0	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
7	5	3	60	3	60
8	2	1	50	0	0
9	2	2	100	0	0
10	9	4	44.44	0	0
11	2	0	0	0	0
12	4	1	25	0	0
13	1	1	100	1	100
14	376	285	75.79	153	40.69
15	85	39	45.88	8	9.41
Total	487	336	68.99	165	33.88