



**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA**

**DETERMINACIÓN DE *Cryptosporidium* sp., EN VICUÑAS EN
SEMICAUTIVERIO DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA
TECNOLÓGICA (CIPTT) - TULLPACANCHA, HUANCAVELICA – PERÚ.**

Tesis

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

Autor

Manchay Berrú Julia Jasmin

Asesora

MV. Nidia Puray Chavez

Lima-Perú

2019

DEDICATORIA

A nuestro Señor por la vida y por toda la paciencia que me ha dado en esta etapa.

A mis papis Victoria y Sixto por ser el motivo, ejemplo y guía en mi vida, por todo el sacrificio que han hecho hacia mi persona, por el apoyo que me han brindado en toda esta etapa y todo su amor.

A mis hermanas Erika y Katty por el ejemplo y preocupación en esta etapa de tesis.

A mis pequeñas mascotas por ser mis primeros pacientes. Y a Capitán, mi perrito que desde el cielo me cuida y me hace entender lo importante de ser un buen profesional.

A mi directora, la doctora Nidia Puray Chávez, por toda la paciencia, orientación en este tema, por el apoyo, amistad, consejos, brindándome sus conocimientos y confianza para el desarrollo de esta tesis. Y al Ingeniero José López Vega por la amistad que tuvo hacia mi persona, sus buenos consejos. Siempre lo recordare y tendré presente.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por ser la razón de mis logros, por su apoyo incondicional

Erika y Katty mis dos hermanas, que son parte de toda mi vida, que por más diferencias que tengamos, la familia es primero.

A la Doctora Nidia Puray Chávez porque gracias al apoyo, confianza que puso hacia mi persona para la elaboración de este proyecto. Y por su increíble amistad.

A Miguel por estar siempre a mi lado en esta etapa, por el apoyo en esta aventura que enrubamos juntos.

A mis compañeros de tesis ya que si ellos no serían posibles este trabajo.

A los encargados del Centro De Investigación Y Transferencia Tecnológica (CIPTT), muchas gracias.

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo la determinación de *Cryptosporidium sp.* en vicuñas en semicautiverio del Centro de Investigación y Transferencia Tecnológica (CIPTT) de la Universidad Alas Peruanas (UAP) Tullpacancha, Huancavelica – Perú. Con esta finalidad se estudiaron muestras de heces recolectadas del recto de 32 vicuñas del chaccu realizado en setiembre del 2017, considerando crías, juveniles y adultos de ambos sexos. El procesamiento, evaluación y análisis de laboratorio se realizó mediante la coloración Zhiel Nilsen Modificado. Se encontró un 78,13% (25/32) positivo a *Cryptosporidium sp.* Además, las crías presentaron *Cryptosporidium sp.*, en un 84,62% (11/13), mientras que los animales juveniles presentaron 100% (3/3) y los adultos 68,75% (11/16) de positividad y el 15,63% (5/32) tuvieron diarrea al momento de la extracción de heces y fueron positivos a *Cryptosporidium sp.* El trabajo se realizó en el mes de setiembre del año 2017, cuando se presentó el Fenómeno del Niño, el cual provocó una escasez de paasturas y un estrés nutricional.

Palabras clave: Ooquistes, *Cryptosporidium*, esquila, heces.

ABSTRACT

The present study aimed at determining *Cryptosporidium* sp. in vicuñas in semi-tutoring of the Center for Research and Technology Transfer (CIPTT) of the Alas Peruanas University (UAP) Tullpacancha, Huancavelica - Peru. With this proposal, samples of feces collected from the rectum of 32 vicuñas of the chaccu were carried out in September 2017, creatures, juveniles and adults of both sexes. The processing, evaluation and laboratory analysis was performed using the modified Zhiel Nilsen staining. A 78.13% (25/32) positive for *Cryptosporidium* sp. In addition, the offspring manifestation *Cryptosporidium* sp, at 84.62% (11/13), while juvenile animals manifestation 100% (3/3) and adults 68.75% (11/16) of positivity and 15, 63% (5/32) had diarrhea at the time of stool extraction and were positive for *Cryptosporidium* sp. The work was carried out in the month of September of the year 2017, when the Phenomenon of the Child was presented, which caused a shortage of pastures and nutritional stress.

Key words: Oocysts, *Cryptosporidium*, shearing, feces

INDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT.....	iv
I. INTRODUCCIÓN	3
II. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. Generalidades	5
2.2. Taxonomía.....	5
2.3. Morfología.....	8
2.3.1. Ooquiste	8
2.4. Ciclo biológico	9
2.5. Signos clínicos.....	10
2.6. Epidemiología.....	11
2.6.1. Hospedero	11
2.6.2. Parásito.....	12
2.6.3. Ambiente	13
2.6.4. Zoonosis.....	15
2.6.5. Prevención y control.....	16
2.6.6. Técnicas de diagnóstico	16
2.6.6.1. Métodos de flotación.....	16
2.6.6.1.1. Técnica de Sheather – Sugar	16
2.6.6.2. Pruebas con tinciones y coloraciones	17
2.6.6.2.1. Zhiel Nilsen Modificado	17

2.6.6.3.	Técnicas moleculares	17
2.6.6.3.1.	PCR	17
2.6.6.3.2.	ELISA	18
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1.	Espacio y Tiempo	19
3.2.	Población y Muestra	19
3.3.	Diseño de la Investigación	19
3.4.	Equipos y Procedimientos	20
3.4.1.	Equipos	20
3.4.1.1.	Equipos	20
3.4.1.2.	Materiales:.....	20
3.4.1.3.	Insumos:	21
3.4.1.4.	Servicios:.....	21
3.4.1.5.	Materiales de escritorio:.....	22
3.4.2.	Procedimientos.....	22
3.4.2.1.	Envío de solicitudes	22
3.4.2.2.	Toma de muestras post mortem	22
3.4.2.3.	Conservación y transporte de muestras al laboratorio.....	23
3.4.2.4.	Preparación de tinciones	23
3.4.2.4.1.	Fucsina básica.....	23
3.4.2.4.2.	Verde Malaquita	23
3.4.2.4.3.	Ácido sulfúrico al 2% en etanol.....	23
3.4.2.5.	Procesamiento de obtención de muestras	24
3.5.	Diseño Estadístico.....	25
IV.	RESULTADOS	26
V.	DISCUSIÓN.....	31
VI.	CONCLUSIONES	36
VII.	RECOMENDACIONES	37
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
	ANEXO.....	46

I. INTRODUCCIÓN

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria que afecta a humanos y animales alrededor del mundo. Su signología es básicamente entérica, causando diarreas profusas, temperaturas altas que pueden llegar a los 40 °, deshidratación y anorexia, llegando a causar incluso la muerte. *Cryptosporidium sp.*, está incluido como patógeno en la enteritis neonatal de camélidos sudamericanos, terneros y corderos, causando una alta morbilidad y mortalidad en ellos. Este patógeno puede también estar presente incluso en animales que no presentan diarrea. Las lesiones microscópicas en intestino son el debilitamiento de vellosidades y un cambio a nivel del epitelio de cilíndrico a cúbico, a nivel del yeyuno, aunque también podría estar presente en íleon. *Cryptosporidium sp.*, es uno de las mayores agentes zoonóticos en el mundo. Tiene una vía de transmisión oro-fecal y está asociado a diarreas en seres humanos; especialmente en niños, llegando a una prevalencia de 14,3% (1). La fuente de contagio de mayor importancia es el agua, tal como ocurrió en el brote que hubo en Europa en el 2010, siendo este el segundo brote de mayor magnitud a nivel mundial (2).

En nuestro medio, no hay reportes previos sobre este parásito en vicuñas. En los trabajos realizados en alpacas destaca la importancia de *Cryptosporidium sp.*, como agente primario en neonatos, en donde cursa con cuadros de diarrea e incluso la muerte; y en los animales adultos, en donde las madres son las principales portadoras y diseminando el agente en la etapa de relajamiento inmune periparto. Por lo tanto, aquellos animales que convivan con los neonatos en la época de empadre y parición, también son portadores asintomáticos.

La crianza de camélidos sudamericanos en la parte alta del país es una importante fuente de recursos para los pobladores, donde destaca la alpaca y vicuña; siendo la obtención de fibra de vicuña la actividad que genera el mayor impacto económico, por su calidad y alto valor comercial. El factor limitante de esta actividad, radica en que la vicuña es un animal protegido que solamente se encuentra en determinadas áreas y que puede verse afectada por agentes infecciosos de distintos orígenes (viral, bacteriano y/o parasitario).

Los efectos de este parásito en camélidos y rumiantes producen una alta mortalidad y morbilidad. Las crías son animales susceptibles, debido a la falta de sanidad de algunos productores y a un mal manejo al momento de dar el calostro. El daño que produce el parásito a nivel del intestino hace que baje la tasa de crecimiento debido a la mala absorción de nutrientes conllevándose así a una baja en los índices de producción.

Por lo tanto, el objetivo del estudio fue determinar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium sp* en vicuñas que se encuentran en el CIPTT de la UAP-Tullpacancha, Huancavelica – Perú. Por medio de los resultados revelan la situación epidemiológica del agente en las vicuñas de la zona de estudio; y con esto genera un foco de atención por parte de las autoridades locales para el control de la enfermedad y de los posibles riesgos sanitarios en humanos y en otros animales de la zona.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades

En 1907 *Cryptosporidium sp* fue descubierto en las criptas gástricas de un ratón, por el médico Tyzzer. Hasta que en el año de 1979 fue descrito por primera vez en pacientes con SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) (3). La criptosporidiasis es una parasitosis causada por *Cryptosporidium sp.*, que se manifiesta por la presencia de diarreas en animales neonatos, ocasionando una elevada morbilidad (4).

La patogenicidad de *Cryptosporidium sp* es variable, dependiendo del estado inmune del hospedador, y la edad y del tipo de animal involucrado (5). *Cryptosporidium sp* se puede encontrar en los distintos hospederos a nivel de tráquea, mucosa intestinal y gástrica, lo cual dependerá de la especie de *Cryptosporidium sp.* y del hospedador (6).

2.2. Taxonomía

Filo: Apicomplexa,

Clase: Coccidia

Orden: Eucoccidiorida

Suborden: Eimeriorina

Familia: Cryptosporidiidae (7).

Las particularidades en el genotipo y el aspecto molecular de las especies de *Cryptosporidium sp.* han innovado la comprensión de la variedad biológica de este microorganismo (8).

En la actualidad no hay una clasificación exacta ya que hay varios genotipos pendientes y solo podemos reconocer actualmente 23 especies. Para reconocer las diferentes especies se requiere de técnicas moleculares de amplificación como es el caso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esto, en razón de que existe una una baja especificidad por su hospedador y hay pequeñas diferencias de la estructura o forma de los ooquistes de las distintas especies del género (9).

Se han utilizado técnicas como el PCR donde se emplearon “primers” para poder amplificar selectivamente la cantidad de loci genéticos que actúan como marcadores seguidos de una hidrólisis enzimáticas para realizar la categoría de especies, genotipos y subgenotipos (10). Con las diferencias encontradas en las secuencias de las subunidades de ARNr, la proteína de choque térmico, la identificación de subgenotipos la glicoproteína GP60 y el gen de actina, se ha podido describir los diferentes tipos de *Cryptosporidium sp* (11).

Para el sistema digestivo, la mayoría de especies de *Cryptosporidium sp.* Tiene efectos perjudiciales, variados debido a las distintas zonas comprometidas, como el intestino delgado en el caso de *C. hominis* y *C. parvum*, también está el íleon que es específico para el contagio en *C. parvum*. Mientras tanto, en lo que refiere a mucosa gástrica podemos encontrar a *C. muris* y *C. serpentis*; y en rumiantes podemos encontrar en la mucosa del abomaso a *C. andersoni* (Tabla 1) (12).

Tabla 1: Especie de *Cryptosporidium sp.*, sus hospedadores y sitios de infección (2).

ESPECIE	HOSPEDADOR	SITIO DE INFECCIÓN
<i>C. parvum</i>	Ratón común, Vacunos, Humanos, Cerdos, Ovejas, Cabras, Caballos	Intestino delgado
<i>C. hominis</i>	Humanos, Monos	Intestino delgado
<i>C. muris</i>	Humanos, Monos	Estómago
<i>C. meleagridis</i>	Humanos, Pavos	Intestino delgado
<i>C. serpentis</i>	Serpientes, Lagartijas	Estómago
<i>C. felis</i>	Gatos, Humanos	Intestino delgado
<i>C. suis</i>	Cerdos	Intestino delgado
<i>C. wairi</i>	Cobayos	Intestino delgado
<i>C. baileyi</i>	Gallinas, Pavos	Tráquea, bolsa de Fabricio, cloaca
<i>C. canis</i>	Caninos, Humanos	Intestino delgado
<i>C. andersoni</i>	Vacunos	Estómago
<i>C. bovis</i>	Bovinos	Intestino delgado
<i>C. ubiquitum</i> (Genotipo cervino)	Ovejas y otros animales, Humanos	Intestino delgado
<i>C. galli</i>	Gallo	Estómago
<i>C. cuniculus</i>	Conejos	Intestino
<i>C. genotipo de mono</i>	Monos	Intestino

2.3. Morfología

2.3.1. Ooquiste

El ooquiste de *Cryptosporidium sp.* tiene una forma que es similar a una esfera, ligeramente ovoidal y la medición de su diámetro tiene un intervalo de 4 a 6 μm ; los ooquistos más grande pueden llegar a alcanzar 5.6 a 7.4 μm de diámetro.

Al ser observado en el microscopio se puede apreciar una estructura interna que está conformada por cuatro esporozoítos vermiformes y cuerpos residuales que no se pueden distinguir, estos están rodeados por una doble pared. Presenta ooquistes no esporulados y ooquiste esporulado, de los cuales destacan los esporozoítos que están situados como líneas trasversales claras y mancha oscura, que son los cuerpos residuales al momento de la tinción Ziehl – Neelsen modificado (ZNM) (13).

Existen dos tipos de ooquistes, el primero que cuenta con una pared gruesa, este es responsable de la transmisión de un reservorio a otro y el segundo que tiene pared delgada y que es responsable de un ciclo de una autoinfección en el hospedador infectado a través del reciclaje continuo de los esporozoítos que salen de los ooquistes (14).

Estudios del tipo molecular han confirmado que existe una especie aislada en ciervos que es el *C. ryanae*, donde sus ooquistes son parecidos a *C. bovis* y *C. parvum* pero de un tamaño pequeño. Se dice que este genotipo existe en forma generalizada en bovinos, de manera mundial (15).

Los ooquistes son resistentes a los procedimientos de potabilización por lo que se requiere un mínimo de 80mg/L de concentración de cloro libre para disolver la pared del ooquiste, esto es de mucha ayuda ya que puede ser un indicador de la calidad del agua (16).

Esta forma de *Cryptosporidium sp.*, es resistente a temperatura de 4°C a 22°C (17) llegando a permanecer hasta 18 meses en condiciones húmedas y frías, esto hace que puedan permanecer viables (18).

2.4. Ciclo biológico

El ciclo del *Cryptosporidium sp.* es directo, cuenta con dos fases, una endógena donde se puede apreciar ciertos cambios, que empiezan cuando el hospedador ingiere el ooquiste del parásito; y una exógena. Para empezar la infección, dentro del cuerpo del hospedador, el primer paso es la apertura de la pared del ooquiste, en este proceso llamado el desenquistamiento salen los esporozoítos para ser expuesto a condiciones reductoras del estómago, donde aparecen las enzimas parasitarias pancreáticas y/o sales biliares, tal como ocurre en los ciclos biológicos de parásitos Apicomplexa (12).

Por tal motivo, su ciclo de vida es similar a otros coccidios monoxénicos, terminando con la formación del ooquiste que es el estadio infectivo pues ya sale al exterior esporulado, teniendo en su interior a los cuatro esporozoítos (19).

El ciclo de *Cryptosporidium sp.* inicia cuando el hospedador ingiere el estado infectivo que son los ooquistes esporulados, los cuales son eliminados en las heces de otro hospedador. Luego que el hospedador consume el ooquiste a través del agua o alimentos contaminados, estos se desenquistan en el tracto gastrointestinal del hospedador, y empieza la liberación de los cuatro esporozoítos de su interior. Algunos factores que favorecen el desenquistamiento son: la temperatura del hospedador, las sales biliares y también es posible que la tripsina (20).

El desarrollo de *Cryptosporidium sp.* puede desencadenar la formación de ooquistes que tengan una pared gruesa y delgada en la mayoría de los casos, los cigotos maduros desarrollan una cubierta externa resistente y se modifican en ooquistes infectantes, con una pared gruesa (21). Esto ocurre con el 80% del total

de los ooquistes que salen al medio mediante las heces contaminadas, haciendo factible la transmisión y posterior diseminación de la parasitosis entre los posibles hospedadores. El resto de los cigotos maduros (20%) forman ooquistes de pared delgada, al tener esta característica morfológica tienden a romperse con facilidad, generándose una autoinfección en el hospedador sin abandonar el intestino y se empieza otra vez el ciclo de manera endógena como se puede apreciar en el anexo 1 y el anexo 2 (21).

El período pre patente puede ser diferente dependiendo del hospedador, la dosis infectiva y la especie de *Cryptosporidium sp.* En terneros puede ser de 2 a 7 días, en alpacas neonatales se vio que el período pre patente es de 3 a 4 días, mientras que en los seres humanos puede ser de 4 a 22 días. Esto dependerá si el hospedador este inmunosuprimido, mientras que el período de patencia que es cuando el ooquiste es eliminado al medio exterior; dura de 1 a 12 días en terneros, en alpacas de 11 a 14 días y 1 a 20 días en humanos (22).

2.5. Signos clínicos

La criptosporidiosis se presenta con signos a nivel del sistema digestivo. El signo peculiar de la infección por *Cryptosporidium sp.*, es la diarrea profusa, aunque no siempre está presente (23). También se presenta anorexia, hipertermia (40.5 a 41.0 °C), una deshidratación leve a moderada y depresión. En casos más graves, ocurre pérdida del reflejo de succión, postración, dolor abdominal a la palpación, hipotermia y muerte (24).

Los signos clínicos en camélidos sudamericanos tienen la misma presentación que en rumiantes, uno de los principales patógenos que afectan el tracto entérico que está ligado a una alta cantidad de animales enfermos y baja mortalidad es *C. parvum* en alpacas neonatales (6). Al examen físico se puede observar en crías, signos de shock hemodinámico, deshidratación, taquicardia, ojos hundidos, taquipnea, mucosas secas y fiebre, mientras en los exámenes de sangre se puede

observar; hipoalbumemia, azotemia, hipocalcemia e hiponatremia (25). En un estudio experimental en alpacas neonatales se observaron heces líquidas con mucho mucus, amarillo claro y olor a ácido. Posteriormente, se observó fiebre, dolor abdominal, anorexia, emaciación y deshidratación (26).

2.6. Epidemiología

2.6.1. Hospedero

En mamíferos la infección se produce por la ingesta de ooquistes infectivo que están presentes en heces diarreicas de animales positivos, en especial en rumiantes neonatos (4).

En la provincia de Sili, Cusco se presentó un brote de diarrea que resultó en un alto número de animales enfermos y muertos entre las alpacas neonatales. Uno de los patógenos involucrados en el brote de diarreas fue *Cryptosporidium sp.*, con un 20%. Esto fue detectado en animales de 1 a 5 semanas de edad (27). En este sentido, los estudios realizados indican que la infección por *Cryptosporidium sp.* depende de la edad del hospedador, siendo los más susceptibles los recién nacidos (28).

Cryptosporidium sp., es más prevalente en animales menores a 30 días de nacido y está ligado a la diarrea neonatal en becerros (29). Depende también del estado inmunitario de la persona y/o animal que lo contraiga, en personas que tengan un sistema inmune estable la criptosporidiosis solo cursa como una diarrea pasajera, mientras tanto en personas que tienen comprometido su sistema inmune, se presenta como una diarrea persistente por ende una infección crónica (30).

En el estudio de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos a 4300 msnm se recolectaron heces de crías sin diarrea y con diarrea dando un total de 148 animales. Los seguimientos semanales desde la primera semana de vida hasta la

sexta semana y el diagnóstico por medio de la técnica de ZNM mostraron que el parásito se encuentra principalmente durante la segunda y cuarta semana con presencia de diarreas en crías (31).

En el 2012, se realizó un estudio donde no se logró demostrar la relación de la presencia de diarreas con los animales que fueron positivos a *Cryptosporidium* sp., ya que también hubo animales positivos al parásito, los cuales no presentaron diarreas. Este estudio se realizó en animales mayores a 5 semanas de vida (32).

En un estudio realizado el 2017 durante el evento del chaccu de vicuñas en Picotani (Perú), se registró que en los grupos familiares hay un mayor porcentaje de hembras en comparación a los machos. Esto guarda cierto grado de vínculo con las manifestaciones de estrés que observaron al momento de la captura y encierro (33).

2.6.2. Parásito

La sobrevivencia de los ooquistes de *Cryptosporidium* sp, está influenciada por el grosor de su pared; pudiendo ser viable incluso bajo circunstancias no favorables en el ambiente. Estos pueden permanecer en el agua o suelo durante meses; además, el parásito es resistente a la mayor parte de desinfectantes entre ellos el cloro (34). La temperatura en que el ooquiste es resistente al medio varía entre 4°C a 22°C (17), mientras la temperatura en la cual el ooquiste es infectivo es de 10°C a 25 °C por un tiempo de 12 meses, pero la infectividad baja cuando son expuestos a temperaturas mayores a 45°C por 5 a 20 minutos (34).

La naturaleza de la pared del ooquiste hace que sobreviva a condiciones no favorables, los ooquistes esporulados cuentan con una pared trilaminar dura que rodea los esporozoítos, que serán la fuente de infección (12). La viabilidad del ooquiste va a depender de factores energéticos y su susceptibilidad ocurre cuando es sometido a altas temperaturas, en donde el ATP producido disminuye por una actividad metabólica elevada (35).

Con todo lo dicho anteriormente, el ooquiste al salir al medio exterior sale infeccioso y tiene una pared gruesa, logrando sobrevivir a temperaturas de -4° a 4° °C y permanecer infeccioso durante un tiempo de 6 a 12 semanas (36).

2.6.3. Ambiente

En Irán, en los estudios sobre infecciones por *Cryptosporidium sp.*, en camellos mediante tinción Ziehl-Neelsen modificado se tuvo una prevalencia que varió entre 0,5% y el 37,9%, entre los años 1995 y 2016, tomando en cuenta que durante esos años la cantidad de muestra fue variable. En las crías de camellos menores a un año la prevalencia fue la más elevada con un 20%, estos animales mostraron diarreas y debilidad. Un factor predisponente en este estudio fue la temperatura (1° a 14° C) debido que la infección fue más alta en invierno (32%), mientras que en verano fue de 16%. Esto indica que la parasitosis es favorable por las bajas temperaturas, pues; en época de frío (otoño – invierno) la temperatura fluctúa entre 1° C hasta los 8° °C en los días más fríos. Otro factor que favorece esta infección radica en el hecho que en los meses fríos los animales tienden a estar dentro de los establos y los ooquistes están protegidos de la luz solar directa (37).

Como en otros rumiantes, en las alpacas se determina que el origen de la infección guarda relación con la época de parición donde se presentan las lluvias, con la presencia de aguas estancadas y la defecación que contamina el ambiente. Además, los adultos también podrían actuar como portadores asintomáticos y diseminar a los ooquistes infecciosos (38).

En estudios realizados en Puno no se logró demostrar como factor de riesgo la presencia de *C. parvum* para desencadenar diarreas en alpacas neonatales (38), sin embargo, en un estudio en la provincia de La Raya en Cuzco se demostró que en las alpacas neonatales se presentaba con mayor frecuencia *C. parvum* en animales con diarrea (14,78%) en comparación a los animales supuestamente sanos (5,55%). Por lo tanto, si se representó como factor de riesgo para la

presencia de diarreas en alpacas neonatales. En este trabajo, se recomienda que se realice cambios en el ambiente; tales como, la rotación de dormideros, disminuir la cantidad de animales en la zona de los pastizales para evitar la acumulación de charcos (los que favorecerían en la propagación de la enfermedad) y la crianza en terrenos inclinados (39).

En Canchis-Cusco, se confirmó la presencia del parásito en madres alpacas dando como resultado 34% de madres positivas; lo que representaría un factor de riesgo para sus respectivas crías que la madre positiva tiene dos veces más riesgo de contagiar a su cría *Cryptosporidium sp.*, (a diferencia de las madres negativas). Una condición que podría estar indicada es la falta de transferencia de anticuerpos calostrales (40).

En la Raya-Cusco, de una población muestreada de 156 machos reproductores se encontró una prevalencia corregida de 57,6%(76) de machos positivos a la tinción de Ziehl Neelsen modificada. Su alta prevalencia se puede deber a que los machos reproductores del estudio estaban en contacto con las crías, favoreciendo la infección. Este trabajo se realizó en la época de parición que oscila entre Enero – Marzo y se recomienda realizar estudios epidemiológicos en otros grupos etarios (41).

En el 2016 se demostró que *Cryptosporidium sp.*, forma parte del complejo entérico neonatal en camélidos sudamericanos, junto a otros patógenos. El 20% estuvieron infectados con *Cryptosporidium sp.*, (42) lo cual concuerda con el estudio en 2009, donde reporto un 12% para Junín y 13% de prevalencia a nivel nacional (28).

Las vicuñas de Tullpacancha realizan la parición en lugares cercanos a lagos o lagunas formadas por las intensas lluvias situados cerca de ellas. Esto coincide también con la época de lluvias y hace más factible la formación de lagunas (43).

2.6.4. Zoonosis

Los humanos que habitan en el mismo lugar de los portadores de *Cryptosporidium sp.*, como las parejas sexuales de los infectados, trabajadores de las ganaderías y/o centro de producción alpaquero, centro de salud; tienen más probabilidades de adquirir la parasitosis al estar en contacto con los portadores. Lo mismo ha sido reportado con las personas que viajan a los sitios con mayor prevalencia de este parásito al adquirirlo por el consumo de agua contaminada (2).

La prevalencia de *Cryptosporidium sp.*, va ser variable, por lo que depende de la economía de la población y de la cultura de la misma. Esto se presentará más en aquellos lugares que cuenten con una pobre infraestructura en lo que se refiere a canalizaciones de las aguas potables, recreativas (piscinas, lagos, lagunas, ríos) y un contacto cercano a los animales (44).

La especie que más afecta al ser humano es el *C. melagridis*, de acuerdo a los últimos estudios moleculares epidemiológicos. Como ejemplo en países como el Perú, la tasa de infecciones de *C. melagridis* es más alta en comparación con la tasa de *C. parvum* (45) (46).

El primer caso reportado de zoonosis ligado a *Cryptosporidium sp.*, fue en una persona que estuvo en contacto con la cría de alpaca, la cual estaba eliminando ooquistes del parásito sin presentar diarrea (47), y Sazmad en el 2012, reportó casos de cryptosporidiosis en personas que tuvieron contacto con camellos (48).

En lo que corresponde a distribución mundial, en América del Sur y Medio Oriente *C. parvum*, tiene una alta prevalencia, Australia, América del Norte y África, la prevalencia es mayor de *C. hominis* con un porcentaje de 62%. En cambio, en Europa ambas especies son de igual de prevalente, aunque *C. parvum* prevalece más que *C. hominis* en las áreas rurales (17).

2.6.5. Prevención y control

Las medidas preventivas en humanos son el buen lavado de manos con agua y jabón después de haber tenido contacto con personas infectados, animales posiblemente infectados. El buen lavado de los alimentos y tener cuidado con los bebederos o comederos de los animales que sean positivos al parásito (44).

Desde el momento que se presenta un brote en un centro de producción, lo primero que se hace o debería hacerse es utilizar desinfectantes para las zonas involucradas y separar los animales sanos de los enfermos (10).

Por lo tanto, se tiene que hacer una terapia de mantenimiento en los animales enfermos para brindarles la hidratación adecuada y aplicar coccidiostáticos o antibacterianos para evitar las infecciones secundarias (49).

2.6.6. Técnicas de diagnóstico

Se pueden dividir en 3 grupos; las que permiten visualizar la morfología general, las que emplean distintas tinciones o coloraciones químicas y la inmunofluorescencia y las que agrupan las pruebas bioquímicas y de biología molecular (19).

2.6.6.1. Métodos de flotación

2.6.6.1.1. Técnica de Sheather – Sugar

Consiste en la concentración por flotación de ooquistes de protozoo que tiene una baja densidad a diferencia de la solución azucarada que es más densa. Es importante para la concentración de ooquistes y se utiliza como método en el diagnóstico de coccidios como el *Cryptosporidium sp*, entre otros (50).

2.6.6.2. Pruebas con tinciones y coloraciones

2.6.6.2.1. Zhiel Nilsen Modificado

La técnica de ZNM ácido resistente donde los ooquistes se tiñen de fucsia o rojo destacando gracias a los colores de contraste (azul o verde) (51). Esto se debe a la composición de la pared del ooquiste que es lipídica y glicoproteíca (22) sirve en la determinación de la morfología y ayuda en la medición de los ooquistes (52). A pesar de que se necesita tiempo y un personal adecuado, esta técnica es usada por tener una especificidad de 98.9% y una sensibilidad de 83.7% (53).

Normalmente se diagnostica la presencia de *Cryptosporidium sp.*, mediante la detección microscópica de los ooquistes en las heces por medio del frotis de estas por métodos de tinción convencional. Este es el de la tinción Zhiel Nilsen modificado, el cual es un método directo, rápido y económico para detectar ooquistes (19).

En el proceso de tinción para Zhiel Nilsen modificado las láminas con las muestras se colorean con fucsina básica durante 20 minutos, después se lava con agua y se decolora con ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 2% durante 20 segundos y se dejará secar. Una vez seca la lámina, esta será coloreada con verde malaquita al 5%, durante 5 minutos. Por último, se dejará secar para luego ser observada al microscopio (54).

2.6.6.3. Técnicas moleculares

2.6.6.3.1. PCR

El PCR es una técnica de reacción enzimática *in vitro*, que fue utilizada por primera vez por Kary Mullis en 1985. Lo que hace esta técnica es ampliar las secuencias de ADN, de mil a un millón de veces; esto es copiado idénticamente

con el uso de “primers”, ADN polimerasas termoestables y los ciclos térmicos (55). Esto hace que haya una alta especificidad y una alta sensibilidad al momento de detectar los ooquistes en muestras clínicas y ambientales (56). Mullis propuso que la cantidad de PCR y el número de ciclos, producto final se podría utilizar para calcular la cantidad inicial de material genético por comparación con un estándar conocido (55).

El diagnóstico de *Cryptosporidium sp*, por medio de la técnica de PCR se ha realizado muestras clínicas de heces diarreicas, en donde demostró una sensibilidad de 97 – 100% y una especificidad de 100% para el diagnóstico del parásito (57) (58).

2.6.6.3.2. ELISA

La técnica de ELISA es una prueba enzimática que permite la detección de antígeno y requiere de la concentración de 500,000 de ooquistes por mL en heces solidas (59). Esta prueba es importante para la detección de antígenos de *Cryptosporidium sp.*, por lo que es más sensible que el ZNM (60).

Actualmente se utilizan kits que tienen parecidos niveles de sensibilidad y pueden ser utilizados en heces frescas concentradas y en heces frescas no concentradas, lo cual dependerá de la cantidad probable de ooquistes que hay en las muestras. Si hacemos comparaciones con las técnicas tradicionales, ELISA resulta ser una técnica costosa, siendo ambas de similar umbral de detección (61).

ELISA tiene un 94% de especificidad y sensibilidad (62). En algunos estudios se determinó que la concentración de ooquistes necesarias para la detección analítica mínima es de 50,000-500,00 ooquistes/g de heces (59).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Espacio y Tiempo

La recolección de muestras fue en el CIPTT de la UAP que, se encuentra ubicado en la localidad de Carmen de Tullpacancha, Distrito de Locroja, Provincia de Churcampa, Región de Huancavelica, a 4200 msnm, en la sierra central del Perú como se observa en el anexo 3. El proceso, evaluación y análisis de las muestras se realizó en el laboratorio de Patobiología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria de la UAP. El tiempo del muestreo fue en el mes de setiembre del 2017, época de chaccu.

3.2. Población y Muestra

La estación Tullpacancha cuenta con 1800 vicuñas aproximadamente, como se aprecia en el anexo 4 donde se ve a la población de vicuñas en el Módulo de Uso Sostenible. Solo se consideraron los animales que murieron antes y después del Chaccu llegando a recolectarse 32 muestras en un tiempo de 15 días.

3.3. Diseño de la Investigación

El estudio es descriptivo no experimental, se recolectaron muestras de heces directamente del recto del animal fallecido a causa de estrés por la captura,

encierro y esquila. Y las muestras fueron llevadas al laboratorio de Patobiología Veterinaria de la Universidad Alas Peruanas.

3.4. Equipos y Procedimientos

3.4.1. Equipos

3.4.1.1. Equipos

Microscopio.

Cámara digital.

Computadora portátil

Baño María

Balanza

3.4.1.2. Materiales:

Láminas porta objeto.

Beaker.

Pipeta.

Pipeta graduada.

Papel toalla.

Hisopos estériles.

Vaso Coplin.

Caja de láminas.

Frascos de plástico.

Goteros.

Guantes quirúrgicos.

Mandil.

Mascarilla.

3.4.1.3. Insumos:

Suero fisiológico.

Metanol.

Fenol.

Ácido sulfúrico.

Alcohol 95%.

Alcohol 70%.

Agua destilada.

Fucsina básica.

Verde Malaquita.

3.4.1.4. Servicios:

Laboratorio.

Impresión.

Internet.

3.4.1.5. Materiales de escritorio:

USB.

Corrector.

Lapicero.

Plumón indeleble.

Cuaderno.

3.4.2. Procedimientos

3.4.2.1. Envío de solicitudes

Se realizó el envío de solicitud al Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre SERFOR, Gobierno Regional, Consejo Nacional de Camélidos Sudamericanos CONACS, Ministerio de Agricultura, ya que cualquier investigación que implique la captura temporal y/o colecta de material biológico con fines científicos debe tener la autorización dada por la autoridad correspondiente en este caso de SERFOR. Para el procesamiento, la evaluación y análisis se contó con la autorización para el uso del laboratorio de Patobiología Veterinaria de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria.

3.4.2.2. Toma de muestras post mortem

Se realizaron las necropsias en campo, para ello se procedió a realizar previamente la evaluación clínica de la vicuña (anexo 5) para verificar la muerte

del animal ya que este haya ocurrido antes, durante y después del chaccu. Posteriormente se tomó la muestra directamente del recto (anexo 6).

3.4.2.3. Conservación y transporte de muestras al laboratorio

Las muestras fueron rotuladas y almacenadas en refrigeración hasta su procesamiento. Todas las muestras fueron puestas en frascos estériles de boca ancha y rotuladas para ser procesadas posteriormente en el laboratorio de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria de la UAP.

3.4.2.4. Preparación de tinciones

3.4.2.4.1. Fucsina básica

Se disolvió 3 gr. de fucsina básica en un beacker y se agregó 100 ml de alcohol al 95%. En baño maría se calentó el fenol cristalizado hasta que esté en fase líquida. Una vez ya calentado el fenol se agregó 55 ml de metanol y se completó el litro con agua destilada.

3.4.2.4.2. Verde Malaquita

Se disolvió 5 gr. de verde malaquita y se agregó 100 ml de agua destilada en un beacker. Se dejó reposar por 24 horas.

3.4.2.4.3. Ácido sulfúrico al 2% en etanol

En un beacker se puso 2 ml de Ácido sulfúrico y se agregó una cantidad de 98 ml de etanol al 70% para después homogenizar la mezcla.

3.4.2.5. Procesamiento de obtención de muestras

1. Las muestras de heces de las vicuñas, fueron tomadas directamente del recto (con guantes) y puestas en frascos estériles debidamente rotulados (anexo 6).
2. Por cada muestra se empleó 3 láminas que fueron identificadas con el número de vicuña. Esto se realizó con la ayuda de hisopos estériles empapados con suero fisiológico.
3. Se dejó secar y se fijó dentro de las 24 horas obtenidas las muestras con metanol durante un tiempo de 5 minutos. Luego que las muestras fueron fijadas se colocaron en una caja porta láminas para su conservación y envió.
4. Las láminas fijadas fueron introducidas en vasos coplin con fucsina básica durante 20 minutos.
5. Después con agua corriente de caño se procedió al lavado y decoloración con ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 2% durante 20 segundos, moviendo la lámina constantemente.
6. Una vez que se realizó la decoloración, se continuó con el lavado con agua y posteriormente se dejó secar.
7. Después que la lámina fue secada, se introdujo en otro vaso coplin que contenía verde malaquita al 5%, durante un tiempo de 5 minutos.
8. Luego se realizó un último lavado y se dejó secar (anexo 7) las láminas ya coloreadas.
9. Se colocó una gota de xilol sobre la muestra teñida y se colocó un cubreobjeto.

10. Las muestras procesadas fueron examinadas en el microscopio con el programa (anexo 8) Leica application suit para la medición con objetivo de 40X y 100X (anexo 9).

3.5. Diseño Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó la estadística descriptiva referido a porcentajes.

IV. RESULTADOS

Tabla N°1. Determinación de *Cryptosporidium sp.*, correspondiente a edad en vicuñas en semicautiverio del Centro de Investigación y Transferencia Tecnológica CIPTT-Tullpacancha, Huancavelica - Perú 2017.

		N° de muestras	Positivo		Negativo		Total	
			N°	%±IC	N°	%	N°	%
Edad	Crías	13	11	84,62%	2	15,38%	13	40,62%
	Juveniles	3	3	100%	0	0%	3	9,38%
	Adultos	16	11	68,75%	5	31,25%	16	50%
Total		32	25	78,13%	7	21,87%	32	100%

De las 32 muestras de heces de vicuñas analizadas, el 78,13% (25/32) resulto positivo y el 21,87% (7/32) fueron negativas mediante la coloración ZNM. Las crías arrojaron un 84,62% (11/13) de animales positivos, un 100% (3/3) de juveniles y un 68,75% (11/16) en adultos, fueron positivos a *Cryptosporidium sp.*, y el 15,38% (2/13) en crías fueron negativas, el 0% (0/3) de juveniles y el 31,25% (5/11) en adultos resultaron negativos a *Cryptosporidium sp.*.

Tabla N°2. Determinación de *Cryptosporidium sp.*, correspondiente al sexo de vicuñas en semicautiverio del Centro de Investigación y Transferencia Tecnológica CIPTT-Tullpacancha, Huancavelica - Perú 2017.

		N° muestras	Positivo		Negativo		Total	
			N°	%±IC	N°	%	N°	%
			SEXO	Hembra	Cría	7	5 71,43%	2
Juvenil	2	2 100%			0	0%	2	6,25%
Adulto	10	7 70%			3	30%	10	31,25%
Total de Hembras	19	14 73,68%			5	26,32%	19	100%
Macho	Cría	6		6 100%	0	0%	6	18,75%
	Juvenil	1		1 100%	0	0%	1	3,13%
	Adulto	6		4 66,67%	2	33,33%	6	18,75%
	Total de Machos	13		11 84,62%	2	15,38%	13	100%
Total		32		25 78,13 %	7	21,87%	32	100%

De la tabla observamos que el total de cría de hembras que dieron positivo a *Cryptosporidium sp.*, es de 71,43% (5/7), el 100% (2/2) de hembras juveniles y el 70% (7/10) de hembras adultas fueron positivas a *Cryptosporidium sp.*, dando un total de positivas 73,68% (14/19). Mientras un 26,32% de hembras en total fueron negativas. En lo concerniente a machos, las crías obtuvieron un 100% (6/6) de positividad, en los juveniles un 100% (1/1) y en machos adultos el 66,67% (4/6) fue positivo, dando un total de 84,62% (11/13) machos positivos y el 15,38% (2/1) resultaron negativos.

Tabla N°3. Determinación de *Cryptosporidium sp.*, correspondiente a edad con presencia de diarreas en vicuñas en semicautiverio del Centro de Investigación y Transferencia Tecnológica CIPTT - Tullpacancha, Huancavelica - Perú 2017

	N° de muestras	Positivo a				Negativo a				Total		
		<i>Cryptosporidium sp.</i>				<i>Cryptosporidium sp.</i>						
		Positivo		Negativo		Positivo		Negativo				
		N°	%±IC	N°	%±IC	N°	%±IC	N°	%±IC	N°	%	
Edad	Crías	13	2	15,38%	9	69,24%	0	0%	2	15,38%	13	40,62%
	Juveniles	3	0	0%	3	100%	0	0%	0	0%	3	9,38%
	Adultos	16	3	18,75%	8	50%	0	0%	5	31,25%	16	50%
Total		32	5	15,62%	20	62,5%	0	0%	7	21,88%	32	100%

Como se observa en la Tabla N° 3, de las 32 muestras de heces de vicuñas analizadas, el 15,62% (5/32) resultó positivo a la presencia de diarreas y positivo a *Cryptosporidium sp.*, el 62,5% (20/32) fue negativa a la presencia de diarreas siendo estos animales positivos a *Cryptosporidium sp.*, el 21,88% (7/32) resultó negativo a la presencia de diarreas y a *Cryptosporidium sp.*. El porcentaje de crías positivas a la presencia de diarreas y a *Cryptosporidium sp.*, fue de 15,38% (2/13). En el caso de juveniles todas las muestras fueron negativas para la presencia de diarreas pero positivas para *Cryptosporidium sp.*, y en lo concerniente a los animales adultos solo el 18,75% (3/16) arrojó positivo tanto a la presencia de diarrea como a *Cryptosporidium sp.*.

Tabla N°4. Determinación de *Cryptosporidium* sp., correspondiente al sexo con presencia de diarreas en vicuñas en semicautiverio del Centro de Investigación y Transferencia Tecnológica CIPTT- Tullpacancha, Huancavelica - Perú 2017.

		N° de muestras	Positivo a <i>Cryptosporidium</i> sp.,				Negativo a <i>Cryptosporidium</i> sp.,				Total	
			Positivo		Negativo		Positivo		Negativo		N°	%
			N°	%±IC	N°	%±IC	N°	%±IC	N°	%±IC		
SEXO	Hembra	Cría	7	1 14,29%	4 57,14%	0 0%	2 28,57%	7	21,88%			
		Juvenil	2	0 0%	2 100%	0 0%	0 0%	2	6,25%			
		Adulto	10	2 20%	5 50%	0 0%	3 30%	10	31,25%			
	Total de Hembras		19	3 15,79%	11 57,89%	0 0%	5 26,32%	19	100%			
	Macho	Cría	6	1 16,67%	5 83,33%	0 0%	0 0%	6	18,75%			
		Juvenil	1	0 0%	1 100%	0 0%	0 0%	1	3,13%			
Adulto		6	1 16,67%	3 50%	0 0%	2 33,33%	6	18,75%				
Total de Machos		13	2 15,38%	9 69,24%	0 0%	2 15,38%	13	100%				
Total		32	5 15,62%	20 62,5%	0 0%	7 21,88%	32	100%				

De la tabla observamos que el total de cría hembras que dieron positivo a la presencia de diarreas fue de 15,79% (3/19) y también positivas a *Cryptosporidium* sp., en las juveniles notamos que el 100% (0/2) fueron negativas a la presencia de diarreas, pero positivas a *Cryptosporidium* sp., en las hembras adultas fueron positivas a la presencia de diarrea un total de 20% (2/10), mientras en 50% fue negativa para diarreas pero positivas para *Cryptosporidium* sp. En general, de un total de 19 hembras solo el 15,79% (3/19) fue positiva diarreas y a *Cryptosporidium* sp., y el 57,89% (11/19) fue negativo para diarreas pero positivas para *Cryptosporidium* sp.,. En lo que se refiere a machos el total de los 13 animales solo

el 15,38% (2/13) fueron positivos a la presencia de diarreas y a *Cryptosporidium sp.*, mientras que el 69,24% (9/13) fueron negativos a diarrea, pero positivos a *Cryptosporidium sp.* En crías macho el 16,67% (1/6) fue positivo a diarrea y a *Cryptosporidium sp.* En los juveniles notamos que el 100% (0/1) fueron negativos a la presencia de diarreas, pero positivos a *Cryptosporidium sp.*; y en animales adultos el 16,67% (1/6) fue positivo a diarrea y a *Cryptosporidium sp.*, mientras el 50% fueron negativos para diarreas, pero positivo para *Cryptosporidium sp*

V. DISCUSIÓN

El trabajo de investigación es el primero en evaluar presencia de *Cryptosporidium* sp., en vicuñas. Aquí en Perú y Latinoamérica, son escasos los estudios de parásitos en vicuñas, debido que estos animales son silvestres y protegidos por el estado.

En la investigación se ha estudiado la determinación de ooquistes de *Cryptosporidium* sp., que afecta a las vicuñas del CIPTT en la localidad de Tullpacancha de la UAP, se procesó un total de 32 muestras, que fueron fijadas en el CIPTT y fueron coloreadas con la técnica Ziehl Neelsen Modificado ZNM, en las instalaciones del Laboratorio de Patobiología Veterinaria de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UAP.

De todas las muestras en general el 78,13% (25/32) resultó siendo positivo, mientras que el 21,87% (7/32) fueron negativas; esto fue diagnosticado por el método de tinción de ZNM ya que este método es económico, directo, rápido e ideal para la detección de ooquistes de protozoos (19), por tener una especificidad de 98,9% y una sensibilidad de 83,7% (53).

En Irán, en los estudios sobre infecciones por *Cryptosporidium* sp., en camellos se tuvo una prevalencia que varió entre 0,5% y el 37,9%, entre los años 1995 y 2016, tomando en cuenta que durante esos años la cantidad de muestra fue variable; y en las crías de camellos hubo una prevalencia de un 20%(37), estos animales mostraron diarreas y debilidad. Ellos concluyeron que los resultados se dieron por

el ambiente frío, ya que en la época del año que hubo un mayor porcentaje fue en invierno 32% de infecciones mientras que en la época de verano el porcentaje de infección fue de 16%; se puede incrementar al asociarse con la estabulación; y hace al hospedero más predispuesto a sufrir la parasitosis y los animales al estar en grupos familiares hace más propensa la infección.

Esto se corrobora por que el parásito puede llegar a sobrevivir a temperaturas de 10 °C hasta 25 °C y puede ser infectivo tranquilamente durante un año (34); tiene que ver la supervivencia del ooquiste en el medio, dado que las vicuñas forman grupos familiares donde duermen, defecan (estercoleros) y al momento de dormir, estos animales duermen hacinados, haciendo más propensa la infección (38).

El ooquiste cuando sale al medio, esté se encuentra en su forma infectiva y al contar con una pared gruesa, puede llegar a sobrevivir a temperaturas de -4° a 4 °C, lo que indica que hace más factible a que más animales adquieran la parasitosis como se registró en el estudio con una prevalencia de 78,13% (25/32) y puede permanecer infectivo durante 6 a 2 semanas (36). La investigación se realizó en la época del chaccu en el mes de setiembre donde la región sierra están en otoño donde la temperatura oscila entre los -1°C con picos máximo de 17°C (Región Huancavelica) esto explicaría porque los resultados fueron altos.

Concerniente a la edad, en las crías analizadas, un 84,62% (11/13) fueron positivas en crías. Esto coincide por la época del año y el tipo de manejo, por lo que las vicuñas se quedan en grupo debido que no hay separación de madre y cría, durmiendo en sus estercoleros que es el lugar donde las vicuñas defecan y se podría comparar con el manejo estabulado en camélidos sudamericanos. También dependería de la cantidad de pasto para alimentarse y por último del número de muestras obtenidas que a mayor población los resultados podrían variar, por lo que en el estudio tiene un número pequeño de muestras ya que solo se recolectaron 32 muestras obtenidas de vicuñas fallecidas.

En un estudio similar realizado en crías de camélidos sudamericanos (llamas) se recolectaron heces de crías con diarrea y sin diarrea con un número de 148 animales y se realizaron seguimientos semanales desde la primera semana de vida hasta la sexta semana y también se utilizó la técnica de ZNM obteniendo los siguientes diagnósticos positivos por semana: 1/5 (20%), 5/22 (22,73%), 4/24 (16,67%), 7/16 (43,75%), 2/5 (40%) y 0/6 (0%) mientras que fueron positivas pero no presentaron diarreas 0/143 (0%), 3/123 (2,10%), 1/123 (0,70%), 1/131 (0,70%), 0/143 (0%) y 0/142 (0%). Con esto concluyeron que el parásito se presenta durante la segunda y cuarta semana con presencia de diarreas en crías (31).

En febrero del 2010 en Sili, Cusco se presentó un brote de diarrea que resultó en un alto número de enfermos y muertos entre las alpacas neonatales (27). El objetivo fue determinar la presencia de patógenos involucrados en el brote de diarreas en donde el porcentaje de los animales infectados fueron de 20% con *Cryptosporidium sp.*, esto fue detectado de 1 a 5 semanas de edad en los animales (27).

En el trabajo realizado todas las crías tenían un promedio de edad no mayor a 6 meses en esta época del año, pero debido a su edad ellos se comportarían como portadores asintomáticos.

En lo que corresponde a machos, en adultos y juveniles se reporta 66,67% (4/6) y 100% (1/1) respectivamente. En juveniles se reporta un porcentaje mayor dado que estos animales se expusieron a más temprana edad al parásito y lo estarían liberando en un momento de estrés como es en las épocas donde hay menor cantidad de alimento, más aún si en ese año no hubo la suficiente cantidad de lluvias, y necesitarían un mayor recorrido de territorio y por ende mayor cantidad de energía para alimentarse.

Este resultado se corrobora con el trabajo realizado por Ayala en el 2014 en la Raya-Cusco, de una población muestreada de 156 machos reproductores fueron

positivos a *Cryptosporidium* sp., donde el 57,6% (76/156) con prevalencia corregida. Según el estudio la alta prevalencia se pudo deber a que los machos reproductores del estudio estaban en contacto con las crías, favoreciendo la parasitosis (41).

En lo que refiere a las hembras el resultado total fue de 73,68% (14/19) de animales positivos. Las hembras adultas tuvieron un resultado del 70% (7/10) de animales positivos, lo cual esto se corroboraría por el estudio de Aguilar en la Provincia de Canchis en Cusco, donde obtuvo un resultado del 34% de madres alpacas positivas a *Cryptosporidium* sp. Se concluye que la cría tiene un doble riesgo de contraer la parasitosis a diferencia de aquella cría en la que su madre es negativa al parásito y esto se debe a una falta de anticuerpos calostrales (40).

Las vicuñas son animales silvestres donde confluyen; madre, padre, hermanos y crías y esto hace que los machos al momento del empadre estén en contacto con las hembras y estas aún estén con sus crías.

En los grupos familiares suele haber más hembras y crías que machos. Esto se confirma con el estudio en Puno en el 2017 donde realizaron el chaccu de vicuñas en la Multicomunal de Picotani del distrito y provincia de San Antonio de Putina, donde la población de vicuñas hembras fue superior a la población de vicuñas machos al momento de la captura y encierro (33), siendo las hembras susceptibles, la etapa en que estaban las hembras del estudio fue la etapa del destete.

Se sabe que las vicuñas de Tullpacancha paren en las zonas cercanas a aguas estancadas y riachuelos (43), lugares donde es fuente de contagio de mayor importancia, tanto en animales como en humanos. Las vicuñas necesitan vivir cerca de lugares húmedos (bofedales, fuentes de agua), y los dirigentes de la estación de Tullpacancha, realizan un control sanitario mínimo al ser animales silvestres

Cabe recalcar que, en el 2017 se presentó el fenómeno del Niño por lo que la zona registró baja frecuencia de lluvias o escases de estas, lo cual fue expresado en la escasez de pastos; proporcionando una mala alimentación; y, por ende, mayor estrés. Entonces, el animal al estar en ese estado tiende a inmunodeprimirse y al ser un animal silvestre estaría propenso a adquirir agentes infecciosos (25).

En lo concerniente a la presencia de diarreas en los animales en general del estudio, el 15,63% (5/32) fueron positivos para diarreas y para *Cryptosporidium* sp., mientras un 62,5% (20/32) fueron negativas para la presencia de diarreas pero positivas para *Cryptosporidium* sp. Con estos resultados para el estudio la presencia de diarrea no es relevante para el diagnóstico de *Cryptosporidium* sp., en vicuñas, esto coincide con las investigaciones de Molina en el 2009 donde no se logró demostrar como factor de riesgo para la presentación de diarreas en alpacas neonatales. En Puno donde el 23,2% (35/151) de los animales que no presentaron diarrea fueron positivas a *C. parvum* (38) y con Gómez en el 2012 donde su estudio con animales de Puno y Cusco solo un 4,4% de las muestras fue positivo a *Cryptosporidium* sp. En ese estudio no se logró establecer la relación del parásito con la presencia de diarreas, ya que también detectaron el parásito en animales que no presentaban diarreas. Los animales muestreados fueron mayores a las 5 semanas de vida (32) al igual que los resultados del estudio realizado en vicuñas

VI. CONCLUSIONES

- En las vicuñas analizadas, se determinó que el 78,13% (25/32) resultó positivo y el 21,87% (7/32) fue negativo a *Cryptosporidium sp.*, mediante la coloración ZNM.
- Se presentó *Cryptosporidium sp.*, en crías en un 84,62% (11/13) y el 15,38% (2/13) fue negativo. En animales juveniles, el porcentaje fue de 100% (3/3) y en adultos de 68,75% (11/16).
- El 15,63% (5/32) presentó diarrea y fue positivo a *Cryptosporidium sp.*; mientras el 62,5% (20/32) fue negativa a la presencia de diarreas siendo estos animales positivos a *Cryptosporidium sp.*,
- La técnica de coloración ZNM, es una técnica fácil, económica y rápida para el diagnóstico *Cryptosporidium sp.*.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar el estudio en diferentes épocas del año.
- Se recomienda realizar hacer investigaciones en crías, a partir de las primeras semanas de nacido.
- Realizar charlas de prevención y control a los pobladores de Tullpacancha, para evitar la infección en humanos y otros animales.
- Realizar estudios de los animales que se encuentran alrededor de la zona (perros, ovinos, caprinos, vacunos, porcinos).

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Palacios T. Prevalencia de *Cryptosporidium spp.* y *Giardia spp.* en terneros, y su presencia en agua y en niños con problemas digestivos en el cantón San Fernando, Ecuador. Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. Maskana. Cuenca-Ecuador. 2017. Volumen 8. Nro 1
2. Cieloszyk J. Caracterización Molecular de Especies, Genotipos y Subtipos de *Cryptosporidium Spp.* Aislados en Humanos en España e Identificación De *G. Duodenalis* Por Técnicas Moleculares. Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de Zaragoza. Zaragoza-España. 2016.
3. Olay G. Parasitosis Emergentes Importancia Clínica de las Coccidias Intestinales. Biblioteca Virtual. Mexico D.F., Mexico. 1997.
4. De Graaf D, Ortega-Mora, Vanopdenbosch E, Peeter JE, Abbassi H. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasitol.* 1999. 29: 1269-1287p.
5. Xiao L, Upton SJ, Ryan U Fayer R. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advance and Implications for Public Health. *Clin Microbial Rev.* 2004. 17:72-97p.
6. Rojas M. Nosoparasitosis en rumiantes domésticos peruanos. 2º Ed. Lima Perú. 2004. 120 – 123p.
7. Tay Zavala J. Microbiología y Parasitología Médica. Méndez editores, Mexico D.F., 1993.

8. Cacciò SM, Smith HV, McLauchlin J, Thompson RC. Unravelling *Giardia* and *Cryptosporidium* epidemiology. Trends Parasitol. 2005. 21: 430–437 p.
9. Navarro-Martínez L, Bornay-Llinares FJ, Del Águila C. *Cryptosporidium*: a genus in revision. The situation in Spain. Enferm Infecc Microbiol Clin.; 2011. 29:135–43 p.
10. Jex AR, Gasser RB. Genetic richness and diversity in *C. parvum* and *C. hominis* reveals major knowledge gaps and a need for the application of “next generation” technologies—research review. Biotechnol Adv. 2010. 28(1): 17:26.
11. Plutzer J, Karanis P. Polimorfismo genético en especies de *Cryptosporidium*: una actualización. Vet Parasitol; 165 (3-4): 187-99. 2009.
12. Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* y cryptosporidiosis Second Edition, Estados Unidos; Taylor & Francis Group, LLC: 70- 330 pp. 2007.
13. Wietz J C, Astorga B. *C. parvum* in patients with chronic diarrhea and AIDS; diagnosis by means of indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies. Rev. Med. Chil. 121 (8): 923 – 926. 1993.
14. Chacín-Bonilla L. *Cryptosporidium*: Filogenia y taxonomía. Investigación Clínica.;48:1-4.2007
15. Fayer R, Trout JM, Santin M. *C. ryanae*. sp. (Apicomplexa: Cyptosporidiidae) in cattle (*Bos Taurus*). Vet Parasitol. 153(3-4):191-8. 2008.
16. GEPAMOL Gdl. Detección y Viabilidad de ooquistes de *Cryptosporidium* sp, quistes de *Blastocystis* sp y *Giardia* sp, el sistema de agua no potable y potable del municipio de Ar,enia, Quindio. Colombia: Universidad del Quindio.; 2012
17. Carey CM, Trevors JT, Lee H. Biology, persistence and detection of *C. parvum* and *C. hominis* oocyst. Water research;38(4):818-62.2004

18. Kumar T, Jaturas N, Andiappan H, Majid MA, et al. Presence of *C. parvum* and *G. lamblia* in water samples from Southeast Asia: towards an integrated water detection system. *Infectious diseases of poverty*. 2016; 5(1):3.
19. Cordero Del Campillo M, Rojo – Vásquez. *Parasitología Veterinaria*. 1º Ed. Editorial Mc Graw-Hill. 213 – 219. 1999.
20. Acha P.; B, Szyfres. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 3º Ed. Volumen III. Parasitosis. Organización Panamericana de la Salud. 23 – 24. 2003.
21. Snodgrass D. R. and Angus. Enteritis in young lambs. *Parasitol Today*. 9(3): 43-49. 1983.
22. Del Coco VF, Basualdo JA, Córdoba MA. Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. *Revista argentina de microbiología*, 41: 185-96. Argentina. 2009.
23. Anderson B, Bulgin, M. Enteritis causada por *Cryptosporidium* en terneros. *Vet Med Small Anim Clin*. 76: 865-868. 1981.
24. López T, Vázquez F, González A. Infección experimental de alpacas neonatas de alpacas con *C. parvum*. *Rev Acad Per Cienc Vet* 2: 11-17. 2001.
25. Waitt LH, Firshman AM, McLenzie EC, Cebra CK. Criptosporidiosis en 20 crías de alpacas. *J AM Vet Med Assoc* 233: 294 – 298. 2008.
26. López T, Vázquez F, González A. Infección experimental de alpacas neonatas con *C. parvum*. *Rev Acad Per Cienc Vet* 6:22-627. 2001.
27. Rojas M, Silva R, Manchego A, Rocha C, Fornells L, Mendes G, Dias G, et al. Outbreak of diarrhea among preweaning alpacas in the southern Peruvian highland. *J Infect Dev Ctries*; 10(3):269-274.2016.

28. Lopez-Urbina MT, Xiao L, Romero-Arbizu M, Gonzales A, Gomez-Puerta L, Rojo-Vasquez F, Cama V. Prevalence of neonatal cryptosporidiosis in Andean alpacas in Perú. *Open Parasitol J* 3: 9 -13. 2009.
29. Neciri M, Chermette R, Lefay M, Mancassola R, Poirier P. Role of *C. parvum* as a pathogen in neonatal diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France. *Vet Parasitol.* 85:254-257. 1999.
30. Chermette R, Boufassa-Ouzrout S. Cryptosporidiosis: a cosmopolitan disease in animals and in man. Technical series N°5. Office International Des Epizooties. 2an Ed. 122p. Paris. 1988.
31. Pezo, D.; Franco, F.; Paredes, D.; García, R. Determinación de *Cryptosporidium* sp en crías de llamas con diarreas y sin diarreas. Cusco. 2004.
32. Gómez-Couso H, Ortega-Mora LM, Aguado-Martínez A, Rosadio-Alcántara R, Maturrano-Hernández L, Luna-Espinoza L, Zanabria-Huisa V, Pedraza-Díaz S. Presence and molecular characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* in alpacas (*Vicugna pacos*) from Peru. *Vet Parasitol* 187: 414420. 2012.
33. Quispe R, Jihuallanca B. Fiesta y ritual del chaku de vicuñas en la Multicomunal Picotani San Antonio De Putina – 2017 Universidad Nacional Del Altiplano Facultad De Ciencias Sociales Escuela Profesional De Antropología Puno – Perú 2018.
34. Fayer R, Speer CA, Dubey. The general biology of *Cryptosporidium*; *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. CRC press Boca Raton. 47pp. 1997.
35. King BJ, Keegan AR, Monis TP, Saint CP. Experimental temperature controls *Cryptosporidium* oocysts metabolic rate and associated retention of infectivity. *Appl Environ Microbiol* 71: 3848-3857. 2005.

36. Olson M, R. O'Handley. Update on Giardia and Cryptosporidium infections in cattle. Trends In Parasitology. 20: 4. 185 – 191.2004.
37. Sazmand A., Joachim A. Parasitic diseases of camels in Iran (1931–2017) – a literature review. Parasite. 21-24. Irán.2017.
38. Molina D, Gómez L, López T, Pezo D, Gonzales A. *C. parvum* como factor de riesgo en la diarrea neonatal en alpacas en Puno. Rev Inv Vet Perú; 20(2): 263-269. Puno. 2009.
39. Fernández M. Prevalencia de *C. parvum* en alpacas neonatales de centro experimental La Raya, Cusco. Tesis Bachillerato. Fac.Med. Vet. UNMSM. Lima, Perú. 1995.
40. Aguilar R. Evaluación de la madre positiva a *C. parvum* como factor de riesgo para la presentación de *C. parvum* en crías de alpacas con diarrea en la provincia de Canchis - Cusco. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú. 2009.
41. Ayala F. Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en alpacas machos reproductores de Centro Experimental La Raya, Cusco. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú. 2014.
42. Lucas J, Vasquez M, Rodriguez J, Morales S, Barrios M, Lira B, Torres B, Casas E, Espinoza J. Patógenos involucrados en casos fetales de diarrea en crías de alpaca de la Sierra Central del Perú. 2016.
43. Marco Zúñiga. Comportamiento de las vicuñas en cautiverio durante la parición en el Centro de Investigación, Producción y Transferencia Tecnológica CIPTT de la Universidad Alas Peruanas. Tullpacancha, Churcampa, Huancavelica. Ciencia y Desarrollo. Universidad Alas Peruanas <http://revistas.uap.edu.pe/ojs/index.php/CYD/index>. 19 (2): 49-54. Perú.2016.

44. Baruch WLA. Parasitología Humana. Interamericana MH, editor. México D.F: McGraw Hill Education. México. 2012.
45. Cama V, Bern C, Roberts J, Cabrera L, Sterling C, Ortega Y, Xiao L. Cryptosporidium Especies, Subtipos y manifestaciones clínicas en niños. Perú Infect Dis 14: 1567-1574. 2008.
46. Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. Exp Parasitol 124: 80-89. 2010.
47. Starkey SR, Johnson AL, Ziegler PE, Mohammed HO. Un brote de criptosporidiosis entre crías de alpaca y sus cuidadores humanos. J Am Vet Assoc 68: 1562-1567. 2007.
48. Sazmand A, Rasooli A, Hekmatimoghaddam S, Nouri M, Hamidinejar H. Prevalencia de Cryptosporidium spp. En camellos y personas involucradas en la provincia de Yazd. Iranian J Parasitol 7: 80-84. Iran. 2012.
49. Mehlhorn H, Piekarski G. Fundamentos de la Parasitología (párasitos del hombre y animales domesticos). Editorial Acribia S.A. 59-64. España. 1993.
50. A JC, A. M-MC, Cesar Z-A. Comparación de las técnicas de Willis y de Sheather para el diagnóstico coproparasitoscópico. Universidad nacional de Trujillo. Perú 2006.
51. Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnostico de los Parásitos Intestinales del Hombre, Serie de Normas Técnicas. 2003.
52. Casemore D, Roberts C. Pautas para la detección de Cryptosporidium en heces: informe de un grupo de trabajo conjunto. J. clin. Pathol. 46 2-4. 1993.

53. Kehl K, Cicirello CH, Havens P. Comparison of four different methods for the detection of *Cryptosporidium* species. *J Clin Microbiol* 33:416-418. 1995.
54. Henricksen S, Pohlenz J. Staining of *Cryptosporidium* by a Modified Ziehl-Neelsen technique. *Act. Vet. Scand*; 22: 594-596.191.
55. Tamay de Dios L, Velasquillo C. Fundamentos del PCR y de la PCR en tiempo real Investigación en Discapacidad. 70-8. 2013.
56. Urquhart G. parasitología Veterinaria. 2°. Ed. Editorial Acribia. 266-267. España. 2001.
57. Morgan U.M, Pallant L, Thompson R, Dwyer B.W, Forbes D.A, Rich G. Comparasion of PCR and microscopyfor detection of *Cryptosporidium parvum* in human faecal specimens: Clinica Trial. *J Clin Microbiol*.36: 995-998. 1998.
58. Bialek R, Binder N, Dietz K, Joachim A, Knobloch J y Zelck U.E. comparison of fluorescence, antigen and Chain Reaction of Polymerization assays to detect *Cryptosporidium parvum* in faecal specimens. *Diagn. Microbiol. Intect. Dis.* 43:283-288. 2002.
59. Weber R, Sullivan D, Bryan H, Bishop S, Wahlquist J. Umbral de detección de ooquistes de *Cryptosporidium* en muestras de heces humanas: evidencia de baja sensibilidad de los métodos diagnósticos actuales. *J. clin. Microbial.* 29:1323-1327. 1991.
60. Katanik M, Schneider S, Rosenblantt J, Hall G, PROCOP G. Evaluación del ensayo rápido Color PAC Guard / *Cryptosporidium* y ProSpect Giardia / *Cryptosporidium* microplaca para la detección de Giardia y *Cryptosporidium* en muestras fecales. *Clin. Microbial.* 39:4523-4525. 2001.

61. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres [Internet]. Disponible en: http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.10.09_cryptosporidiosis.pdf
[Consultado Enero 2019.](#)

62. Kaushik K, Wanchu A, Khurana S, Malla N. Evaluation of staining techniques, antigen detection and nested Chain Reaction of Polymerization for the diagnosis of cryptosporidiosis in HIV seropositive and seronegative patients. *Acta Trop.*; 107:1-7. 2008.

ANEXOS

Anexo 1

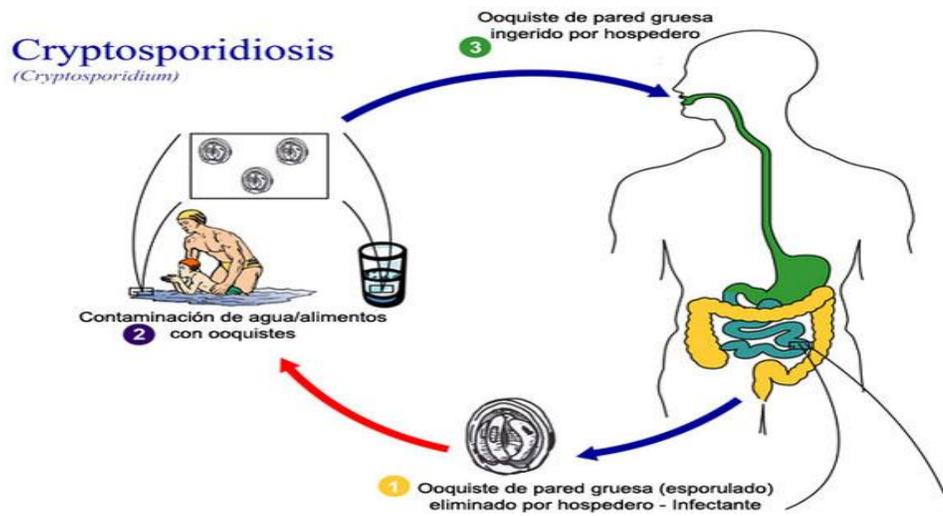
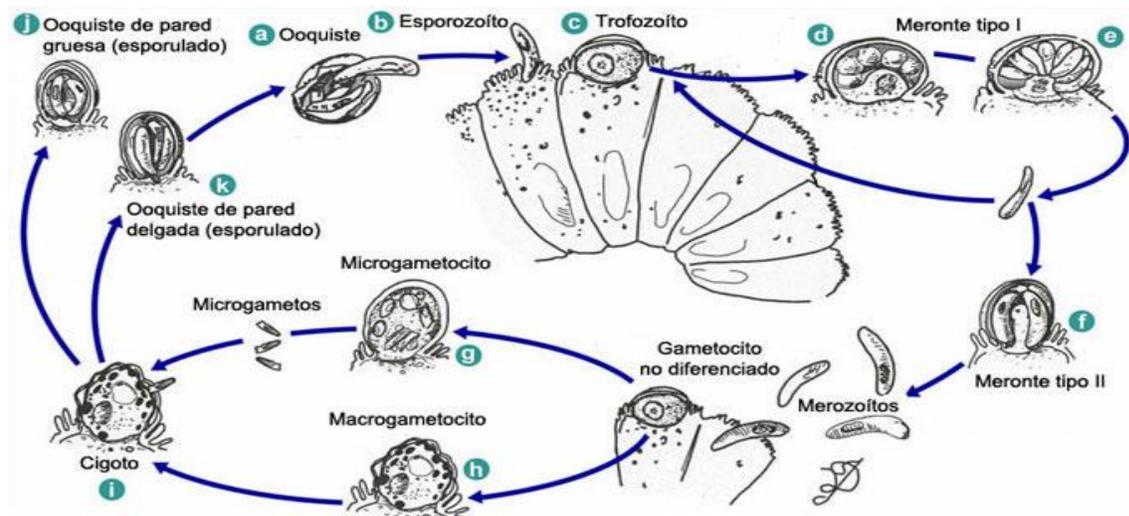


Figura 1.- Ciclo biológico de *Cryptosporidium sp* Fuente: CDCanta 2007

Anexo 2



Anexo 3



Anexo 4

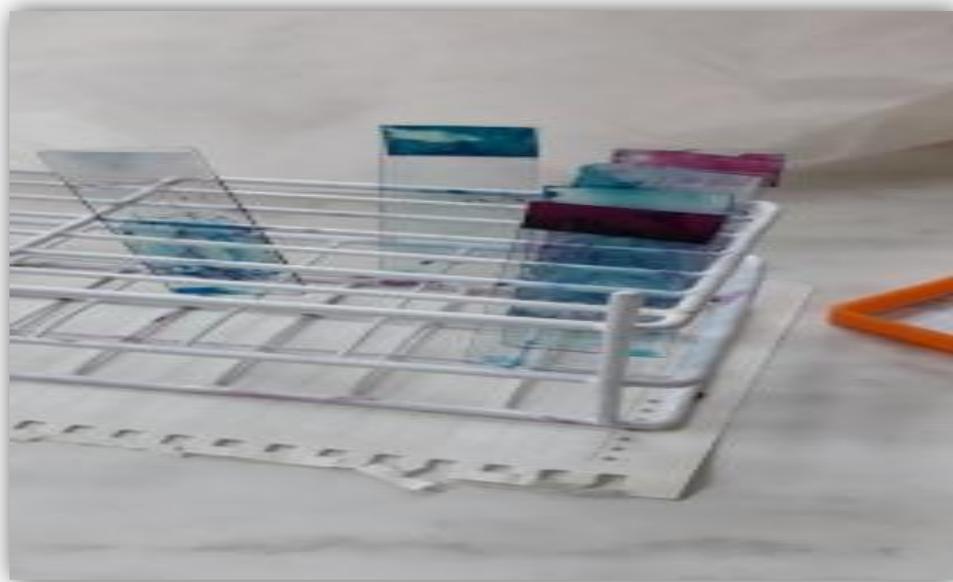
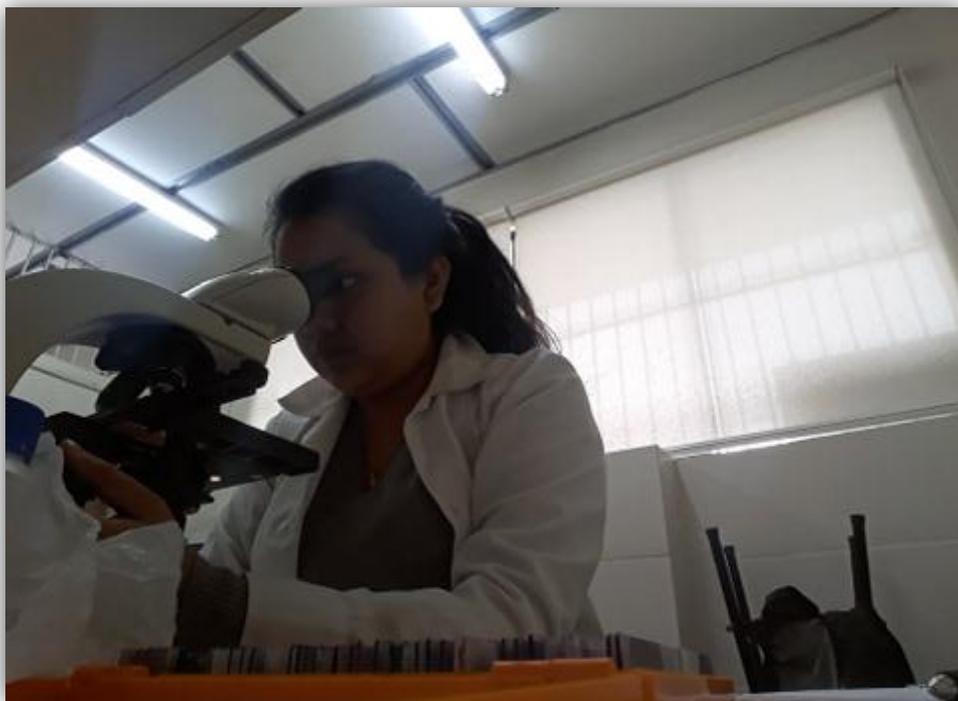


Anexo 5



Anexo 6



Anexo 7**Anexo 8**

Anexo 9

