

***Cryptosporidium parvum* COMO FACTOR DE RIESGO EN LA DIARREA NEONATAL EN ALPACAS DE PUNO**

CRYPTOSPORIDIUM PARVUM AS RISK FACTOR ON NEONATAL DIARRHEA IN ALPACAS OF PUNO

Daniel Molina M.¹, Teresa López U.^{1,2}, Armando González Z.³, Luís Gómez P.³ y Danilo Pezo C.⁴

RESUMEN

El presente trabajo evaluó en campo el rol 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 durante la temporada de parición, entre los meses de febrero y marzo de 2006. Se recolectaron muestras fecales (n=487) 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. El 39% (130/336) de los animales con diarrea y el 23% (35/151) de las que estaban sin diarrea fueron positivos a la infección por *C. parvum*. El análisis de regresión logística demostró que no hubo relación estadística significativa entre la presencia de *Cryptosporidium* y la diarrea neonatal en alpacas (OR: 1.5, IC 95%: 0.9-2.4). Por otro lado, dentro de las demás variables en evaluación se determinó que la localidad de La Raya fue estadísticamente significativa (P = 0.046), representando un factor de riesgo para la presentación de diarrea neonatal (OR: 2.5, IC 95%: 1.1-6.1).

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

ABSTRACT

The role of *Cryptosporidium parvum* as a risk factor for the occurrence of neonatal diarrhea was evaluated using a case-control study design in alpacas from Puno. The study was carried out during the calving season, between February and March 2006. Stool samples (n=487) were collected in alpacas of 1 to 15 days of age in four localities: Antacalla, La Raya, Quimsachata and Macusani. The faecal smears were processed following the Modified Ziehl-Neelsen stain. The 39% (130/336) of alpacas with diarrhea and 23% (35/151) of alpacas without diarrhea were positives to *C. parvum* infection. The logistic regression showed that this parasite does not represent a risk factor for neonatal diarrhea in the screened animals (OR: 1.5, IC 95%: 0.9-2.4). It was also determined that La

¹Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, ³Laboratorio de Medicina Veterinaria Preventiva, ⁴ Estación Experimental del Centro de Investigaciones IVITA-Marangani, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

²E-mail: mtlu@terra.com.pe

Raya was statistically significant ($p=0.046$) and represented a risk factor for the occurrence of neonatal diarrhea (OR: 2.5, IC 95%: 1.1-6.1).

Key words: alpaca, *Cryptosporidium parvum*, neonatal diarrhea, risk factor

INTRODUCCIÓN

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria producida por el protozoo *Cryptosporidium parvum* que se caracteriza por producir brotes de diarrea en rumiantes neonatos y ocasionar una elevada morbilidad (De Graaf *et al.*, 1999). Se han realizado diversos estudios para dilucidar el rol de este parásito como agente primario o en asociación con otros enteropatógenos dentro del complejo entérico neonatal en los rumiantes domésticos (O'Donoghue, 1995; De Graaf *et al.*, 1999) y en los camélidos sudamericanos, principalmente la alpaca (López *et al.*, 2001a; Whitehead y Anderson, 2006).

Actualmente, los datos disponibles sobre la criptosporidiosis en alpacas en el Perú consisten principalmente en estudios epidemiológicos así como de aspectos clínicos y patológicos de la enfermedad. Dentro de los primeros, los estudios que se han llevado a cabo en alpacas neonatales señalan entre 10 a 26% de prevalencia en diversas localidades del país (López, 1997; Romero, 1998). Asimismo, la asociación temporal entre diarrea y la presencia del parásito ha sido estudiada empleando un estudio ecológico de tipo transversal (López *et al.*, 2001b).

El presente estudio fue diseñado para investigar la presencia de *C. parvum* como factor de riesgo para la presentación de diarrea neonatal en alpacas no mayores de 15 días de edad, mediante el diseño epidemiológico Caso-Control en el departamento de Puno. Además, el diseño del estudio permitió la evaluación de otras variables como la localidad de origen, el sexo y la raza de las alpacas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Estudio y Animales

El muestreo se realizó durante la época de parición de las alpacas, entre febrero y marzo de 2006, en cuatro localidades del departamento de Puno: Antacalla, La Raya, Quimsachata y Macusani.

El cálculo del tamaño muestral se hizo en base a la fórmula para estudios de caso-control no pareado (Rothman y Greenland, 1998). Se utilizó un nivel de confianza de 95%, un poder de la prueba de 80%. La proporción esperada de exposición entre los controles fue de 14.02% (Foroca *et al.*, 2001) y el Odds Ratio usado en el cálculo fue de 2.38 (López, 1997).

Se recolectaron muestras fecales de 487 crías de alpaca cuyas edades fluctuaban entre 3 y 15 días de edad. Las muestras se tomaron directamente del recto en bolsas plásticas debidamente identificadas. Se hizo un frotis con cada una de las muestras, se fijaron en metanol durante 5 minutos, y posteriormente, se procesaron en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en Lima.

Identificación del Parásito

El diagnóstico de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* se hizo a través de la técnica de tinción de Ziehl-Neelsen Modificado (Henricksen y Pohlenz, 1981). Los ooquistes se observan como microorganismos esféricos u ovalados de 4-6 μm (Fayer *et al.*, 2000; 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).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se evaluó la relación causal entre la presencia de ooquistes de *C. parvum* y la diarrea neonatal en alpacas empleando el diseño epidemiológico de Caso-Control. Por tanto, la estrategia analítica principal consistió en el cálculo del riesgo del grupo expuesto versus el control calculando el Odds Ratio de la exposición (Szklo y Nieto, 2000).

En el momento de la toma de muestra se verificó la presencia de diarrea, definida como presencia de heces líquidas o pastosas, fibra de la zona perineal sucia con heces, y signos de deshidratación o depresión. Con base a estos criterios se constituyeron los animales pertenecientes al grupo caso mientras que los animales con estado aparentemente normal constituyeron los controles.

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) y su respectivo intervalo de confianza al 95%. Para ello, se empleó una regresión logística utilizando el paquete estadístico STATA v. 8.0. En este caso, al tratarse de un estudio caso-control no pareado, el riesgo de diarrea por *Cryptosporidium* se evaluó junto a otras variables potencialmente confundentes como el lugar de origen, la edad, el sexo y la raza de las alpacas empleando una regresión logística.

RESULTADOS

La distribución de los animales muestreados por localidad se detalla en el Cuadro 1. De los 487 animales evaluados se

detectó la presencia de diarrea en 336 que pasaron a constituir el grupo de casos, mientras que los 151 animales restantes constituyeron el grupo control (animales sin diarrea). El Cuadro 2 muestra la distribución de animales positivos a *C. parvum* y su relación con la presencia de diarrea.

Se determinó la presencia de ooquistes de *C. parvum* en 165 de las 487 muestras fecales recolectadas ($79 \pm 6\%$), mientras que el 64% de las muestras negativas a la prueba de Ziehl-Neelsen Modificado también fueron diarreicas (Cuadro 2). El mayor porcentaje de animales con diarrea se observó en la localidad de Antacalla (77%), mientras que Quimsachata fue la localidad que presentó la menor frecuencia (37%) (Cuadro 2).

El Cuadro 3 muestra el Odds Ratio (OR) calculado para la infección por *C. parvum* y diarrea neonatal ajustado por las otras variables predictoras y el valor de P. El análisis muestra que el riesgo para la presentación de diarrea neonatal no estuvo influenciado por la infección del parásito. La localidad de Quimsachata se tomó de referencia para comparar las otras tres localidades y evaluar su influencia en la presentación de diarrea, determinándose que en la localidad de La Raya las alpacas del grupo de casos tiene 2.5 veces más posibilidades de presentar diarrea que las alpacas del grupo control, no habiendo diferencia significativa en las otras localidades. Asimismo, la raza y el sexo no presentaron significancia estadística para la presentación de diarrea en las alpacas neonatales evaluadas.

DISCUSIÓN

El presente trabajo es el primero que evalúa la presencia de *C. parvum* como factor de riesgo de diarrea en alpacas neonatales empleando el diseño epidemiológico de Caso-Control. Los resultados indicaron que el riesgo para diarrea neonatal no estuvo influenciado por la presencia del parásito

Cuadro 1. Distribución de alpacas neonatas, según el lugar de origen, que fueron muestreadas para determinar la presencia de *Cryptosporidium parvum*

Localidad	Casos	Controles	Total
Antacalla	273	81	354
La Raya	23	17	40
Quimsachata	16	27	43
Macusani	24	26	50
Total	336	151	487

Cuadro 2. Frecuencia de alpacas con diarrea según la presencia de *Cryptosporidium parvum* y de la zona de procedencia

	Animales (n)	Presencia de diarrea	
		Nº	% ± I.C. ¹
<i>Cryptosporidium parvum</i>			
Positivos	165	130	79 ± 6
Negativos	322	206	64 ± 5
Localidad			
Antacalla	354	273	77 ± 4
La Raya	40	23	58 ± 15
Quimsachata	43	16	37 ± 14
Macusani	50	24	48 ± 14
Total	487	336	69 ± 4

¹ Porcentaje ± Intervalo de Confianza al 95%

ajustado por las otras variables potencialmente confundentes, pero hubo una clara tendencia que podría indicar que el tamaño de la muestra no fue el adecuado. Estudios previos, utilizando un tamaño de muestra mucho mayor, establecieron una asociación positiva entre estas variables aunque de forma tem-

poral (Romero, 1998). En este sentido, los primeros estudios que se realizaron para determinar esta asociación en alpacas neonatales emplearon diseños transversales de tipo ecológico, con resultados similares entre ellos (Romero, 1998; López *et al.*, 2001b).

Cuadro 3. Regresión logística para cuatro predictores de diarrea neonatal en alpacas de Puno

Predictores	OR ¹	P ²	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
<i>C. parvum</i>				
Positivo	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

¹ Odds Ratio² Nivel de significancia

Al tratarse de un estudio caso-control no pareado, se pudo hacer la evaluación de otras variables potencialmente confundentes junto a *C. parvum*, como el sexo, la raza y el lugar de origen. Esta última variable demostró estar asociada a la infección por el parásito y a la ocurrencia de 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.

Los resultados del análisis de regresión logística relacionados a la variable origen mostraron que la localidad de La Raya representó un factor de riesgo para la ocurrencia de diarrea (Cuadro 3). En forma similar, la loca-

lidad de Antacalla podría representar un factor de riesgo. Las diferencias entre localidades podrían deberse al tamaño de la muestra evaluada y al tipo de manejo animal que se realiza en 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. Por ejemplo, el uso de rotación de dormideros junto a una menor carga animal por pastizal dentro de las prácticas del manejo, pudieron constituir una medida importante para el control y prevención de la enfermedad (Bustinza, 2001) en el caso de Quinsachata. Además, debe considerarse el comportamiento de esta especie respecto al hábito de defecar en un lugar específico en el ambiente de crianza (Leguía, 1989), limitando en cierto modo la capacidad de los portadores asintomáticos de diseminar la infección por el parásito.

El empleo de rebaños relativamente grandes (100 a 150 animales por rebaño) observado en la localidad de Antacalla predispone a una mayor densidad de animales por área de superficie, condición que favorecería la presentación del parásito (Garber *et al.*, 1994), y que podría explicar los resultados encontrados en esta localidad. 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.*, 2001a), se sabe que el cuadro se vuelve grave cuando la criptosporidiosis se asocia con otros patógenos entéricos, pudiendo producir alta mortalidad (O'Donoghue, 1995; De Graaf *et al.*, 1999).

El 23.2% (35/151) de los animales que no presentaron diarrea fueron positivas a *C. parvum*, constituyendo una frecuencia relativamente alta. Estas crías se comportarían como portadores asintomáticos representando una fuente de infección para otras alpacas recién nacidas. Por otro lado, no se puede descartar el papel que puedan desempeñar las alpacas adultas en el mantenimiento de la infección, como se ha demostrado en otras especies domésticas (Faubert y Litvinsky, 2000; Castro-Hermida *et al.*, 2005). Además, se debe tener en cuenta otras fuentes de infección y considerarse a otras especies domésticas, roedores, mamíferos silvestres e inclusive el hombre (O'Donoghue, 1995; Ramírez *et al.*, 2004) que actuarían diseminando especies de *Cryptosporidium* que no provocarían diarrea en las alpacas (Xiao *et al.*, 2004).

En conclusión, los resultados presentados en este trabajo no lograron 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. Sin embargo, la localidad de La Raya representó un factor de riesgo para la presentación de diarrea en alpacas neonatales, por lo que se recomien-

da tomar especial atención a factores tales como rotación de dormideros, menor carga animal en los pastizales y la crianza sobre terrenos inclinados que eviten la formación de charcos que favorezcan la diseminación del parásito.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los doctores Rómulo Sapana, Dora Yucra y Rosa Perales por su valiosa colaboración en la ejecución del estudio y revisión del manuscrito.

LITERATURA CITADA

1. **Bustinza VC. 2001.** La alpaca: crianza, manejo y mejoramiento. Tomo II. Puno: Oficina de Recursos del Aprendizaje, Universidad Nacional del Altiplano. 343 p.
2. **Casemore R, Armstrong M, Sans R. 1985.** Laboratory diagnosis of Cryptosporidiosis. *J Clin Pathol* 38: 1337-1341.
3. **Castro-Hermida JA, Delafosse A, Pors I, Ares-Mazás E, Chartier C. 2005.** *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* infections in adult goats and their implications for neonatal kids. *Vet Rec* 157: 623-627.
4. **DeGraaf D, Vanopdenbosch E, Ortega-Mora L, Abbassi H, Peeter JE. 1999.** A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasitol* 29: 1269-1287.
5. **Faubert GM, Litvinsky Y. 2000.** Natural transmission of *Cryptosporidium parvum* between dams and calves on a dairy farm. *Int J Parasitol* 86(3): 495-500.
6. **Fayer R, Morgan U, Upton S. 2000.** Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* 30: 1305-1322.
7. **Garber LP, Salman MD, Hurd HS, Keefe T, Schlater JL. 1994.** Potential risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. *J Am Vet Med Assoc* 205: 86-91.

8. **Henriksen S, Pholenz J. 1981.** Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl Neelsen technique. *Acta Vet Scand* 22: 594-596.
9. **Leguía GP. 1989.** Enfermedades parasitarias de las alpacas. En: XIII Reunión Científica Anual –APPA. Simposio: Producción de alpacas y llamas. Lima: APPA. p 168.
10. **López MT. 1997.** Estudio epidemiológico de la infección por *Cryptosporidium parvum* en alpacas neonatas en Perú. Tesis Doctoral. León: Facultad de Veterinaria, Univ. de León. 176 p.
11. **López MT, González AE, Rojo-Vázquez F. 2001a.** Infección experimental de alpacas neonatas con *Cryptosporidium parvum*. *Rev Acad Per Cien Vet* 2(1): 11-17.
12. **López MT, González AE, Rojo-Vázquez F. 2001b.** *Cryptosporidium parvum* como factor de riesgo de diarrea en alpacas recién nacidas. En: Resúmenes II Congreso Latinoamericano de especialistas en pequeños rumiantes y camélidos sudamericanos. Yucatán, México. p 28.
13. **O'Donoghue PJ. 1995.** Cryptosporidium and cryptosporidiosis in man and animals. *Int J Parasitol* 25: 139-195.
14. **Ramírez NE, Ward LA, Sreevatsan S. 2004.** A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes Infect* 6: 773-785.
15. **Romero M. 1998.** Prevalencia de *Cryptosporidium parvum* en alpacas neonatales de la Sierra Central peruana. Tesis de Magister. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria, Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 63 p.
16. **Szklo M, Nieto J. 2000.** Epidemiology beyond the basics. Maryland: Ed. Aspen Publishers. 494 p.
17. **Whitehead C, Anderson D. 2006.** Neonatal diarrhea in llamas and alpacas. *Small Rum Res* 61: 207-215.
18. **Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton S. 2004.** Cryptosporidium taxonomy: recent advances and implications for Public Health. *Clin Microbiol Rev* 17: 72-97.