

## Patógenos Involucrados en Casos Fatales de Diarrea en Crías de Alpaca de la Sierra Central del Perú

### PATHOGENS INVOLVED IN FATAL CASES OF DIARRHEA IN YOUNG ALPACAS IN THE CENTRAL HIGHLANDS OF PERU

Juan R. Lucas L.<sup>1,6,7</sup>, Siever Morales C.<sup>2</sup>, Manuel Barrios A.<sup>3</sup>, José Rodríguez G.<sup>1</sup>,  
María Vásquez C.<sup>4</sup>, Boris Lira M.<sup>4</sup>, Bernardo Torres L.<sup>5</sup>, Eva Casas A.<sup>2</sup>, Juan  
Espinoza B.<sup>5</sup>

#### RESUMEN

Se evaluó la presencia de enteropatógenos en 60 crías de alpacas de 1 a 2.5 meses de edad con cuadros mortales de diarrea de las regiones de Pasco y Junín, Perú. Se tomaron muestras de heces para determinar la frecuencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* sp mediante microbiología convencional, de parásitos gastrointestinales por las técnicas de sedimentación y flotación, y de *Cryptosporidium* sp mediante la técnica de Ziehl Neelsen modificado. Además, se evidenció la presencia de antígenos virales con la ayuda de un kit comercial de inmunocromatografía. Se identificó *E. coli* (80%), coronavirus (53.3%), *Eimeria* sp (43.3%), *Nematodirus* sp (40%), rotavirus (36.6%), *Cryptosporidium* sp (20%) y *Salmonella* sp (18.3%). Asimismo, se determinó que el 38.3% de los animales presentó los tres tipos de patógenos, mientras que el 23.3% presentó asociación de bacterias y parásitos, y el 11.7% presentó asociación de virus y bacterias.

**Palabras clave:** alpacas, *Cryptosporidium* sp, *Eimeria* sp, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones IVITA, Estación El Mantaro, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Huancayo, Perú

<sup>2</sup> Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, <sup>3</sup> Laboratorio de Patología Clínica y Biología Molecular, <sup>4</sup> Laboratorio de Fisiología, <sup>5</sup> Laboratorio de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

<sup>6</sup> E-mail: jrucas.pe@gmail.com

<sup>7</sup> El estudio fue financiado con fondos provenientes del Proyecto N.º 173- FINCyT-IB-2013, Lima, Perú

Recibido: 9 de julio de 2015

Aceptado para publicación: 18 de octubre de 2015

## ABSTRACT

The presence of enteric pathogens was assessed in 60 young alpacas (1 to 2.5 months old) raised in Pasco and Junin, Peru that died due to diarrhea. Stool samples were collected to determine the frequency of *Escherichia coli* and *Salmonella* sp by conventional microbiology, gastrointestinal parasites by the sedimentation and flotation techniques, and *Cryptosporidium* sp by the modified Ziehl Neelsen technique. Besides, the presence of viral antigens using an immunochromatography commercial kit. The results showed the presence of *E. coli* (80%), coronavirus (53.3%), *Eimeria* sp (43.3%), *Nematodirus* sp (40%), rotavirus (36.6%), *Cryptosporidium* sp (20%) and *Salmonella* sp (18.3%). Moreover, it was determined that 38.3% of the animals presented the three types of pathogens, while 23.3% had association of bacteria and parasites, and 11.7% showed association of virus and bacteria.

**Key words:** alpaca, *Cryptosporidium* sp, *Eimeria* sp, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp

## INTRODUCCIÓN

La alpaca es crucial en la seguridad alimentaria del poblador andino que habita por encima de los 3500 msnm, pues en muchos casos es su único medio de subsistencia. La alpaca suministra productos como fibra y carne a partir de los pastos pobres de las zonas altoandinas (Fernández Baca, 2005). El 85% de la producción alpaquera del Perú está en manos de comunidades campesinas y pequeños productores que viven en extrema pobreza y que no cuentan con el asesoramiento técnico adecuado (Bustinza *et al.*, 1988; Amegino y De Martini, 1991).

Una de las principales limitantes en la crianza de alpacas es la elevada tasa de mortalidad en las crías, donde se observan frecuencias de 12 a 50%, principalmente a causa de problemas diarreicos. Las diarreas neonatales en alpacas son causadas por enteropatógenos que incluyen principalmente bacterias, virus y parásitos (Bustinza *et al.*, 1988; Amegino y De Martini, 1991; Whitehead y Anderson, 2006).

La región central de los Andes posee una importante población de alpacas, la cual se encuentra técnicamente desatendida des-

de su repoblamiento en 1996, año en que el Ministerio de Agricultura del Perú movilizó alpacas a esta zona (Fernández Baca, 2005). El presente trabajo tuvo como objetivo identificar enteropatógenos en crías de alpacas de la sierra central peruana con cuadros fatales de diarrea.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar de Ejecución y Animales

El estudio se realizó durante los meses de febrero y marzo de 2014 en las comunidades alpaqueras de Pasco y Junín, Perú, ubicadas por encima de los 3500 metros sobre el nivel del mar. Se evaluaron 60 alpacas, 42 machos y 18 hembras, de 1 a 2.5 meses de edad con cuadros fatales de diarrea.

Se realizó la necropsia de los animales afectados y se tomaron muestras de heces directamente del recto (aprox. 15 g), para los análisis parasitológicos e identificación de antígenos virales. Para el análisis bacteriológico, las muestras de heces fueron recolectadas con hisopos estériles y colocadas en tubos con medio de transporte Stuart. Las muestras fueron llevadas en cajas térmicas (4 °C) al laboratorio de microbiología de la

Universidad Científica del Sur, Lima, para los análisis bacteriológicos y virales y a los laboratorios de la Estación Experimental del Centro de Investigación IVITA de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en El Mantaro, Junín, para los demás análisis.

### Análisis Parasitológico

Las muestras fueron procesadas mediante los métodos cualitativos de sedimentación y flotación en solución saturada de azúcar y por el método cuantitativo de McMaster modificado para determinar la carga parasitaria e identificar las especies de parásitos (Hansen y Perry, 1994).

Se prepararon láminas teñidas con la coloración de Ziehl Neelsen modificado para detectar la presencia de *Cryptosporidium* spp. Las muestras se observaron al microscopio con objetivos de 40-100X, considerándose positivas aquellas con la presencia de ooquistes del protozoario. Para esto, se tienen que visualizar organismos esféricos u ovalados de 4-6  $\mu\text{m}$  de diámetro, de color rojo fucsia y con algunas granulaciones oscuras en su interior, que contrastaban con un fondo teñido de azul (Henricksen y Pohlenz, 1981). Se utilizó un microscopio óptico (Carl Zeiss) con cámara digital incorporada (AxionCam ERc5s, Carl Zeiss) y software de medición ZEN 2012 SP1 (Blue edition, Carl Zeiss).

### Análisis Bacteriológico e Identificación de Antígenos Virales

Se realizó el aislamiento de *Salmonella* sp y *Escherichia coli* mediante protocolos convencionales (MINSa, 2005; OIE, 2008). La presencia de los antígenos virales de coronavirus y rotavirus se identificaron directamente de las heces mediante un kit comercial de inmunocromatografía en sandwich (Anigen Rapid BoviD-5 Ag Test Kit, Bionote), el cual detecta, además, antígenos de *Cryptosporidium* y *Escherichia coli* k99.

## RESULTADOS

En la Figura 1 se muestra la frecuencia de patógenos en crías con diarrea. Se detectó al menos un tipo de virus, parásito o bacteria en el 60.0% (36/60), 73.3% (44/60) y 86.7% (52/60) de los animales, respectivamente. Asimismo, el 38.3% (23/60) de los animales presentó los tres tipos de patógenos, mientras que el 23.3% (14/60) presentó asociación de bacterias y parásitos, y el 11.7% (7/60) de virus y bacterias.

*E. coli* fue el patógeno más frecuente (80%, 48/60), estando como única causa aparente en el 10% (6/60) de las crías y asociado a *Salmonella* sp en el 13.3% (8/60). El coronavirus estuvo presente en el 53.3% (32/60) de las crías y asociado a rotavirus en el 30% (18/60). *Eimeria* sp fue el parásito más frecuente (43.3%, 26/60), estando presente la asociación *Nematodirus* sp, *Eimeria* sp y *Cryptosporidium* sp en dos casos (3.3%).

El tamaño de las eimerias detectadas fue de 23-24 x 18-20  $\mu\text{m}$  en *E. alpaca*, 81-107 x 61-80  $\mu\text{m}$  en *E. macusaniensis* y de 30-40 x 21-30  $\mu\text{m}$  en *E. lamae*. Las cargas parasitarias halladas se muestran en el Cuadro 1.

En las crías menores de 30 días de edad se detectaron principalmente, además de *E. coli*, a coronavirus y rotavirus, seguido de *Eimeria* sp, en tanto que en crías de 31 a 75 días de edad, después de *E. coli*, se detectó en mayor frecuencia al coronavirus, seguido de *Eimeria* sp y *Nematodirus* sp (Figura 1).

## DISCUSIÓN

Los enteropatógenos encontrados en el presente estudio y que han sido asociados a la diarrea neonatal en los camélidos sudamericanos (CSA) son los rotavirus, coronavirus, ciertas estirpes de *Escherichia coli*, *Cryptosporidium* sp y *Coccidia* (Rosadio y

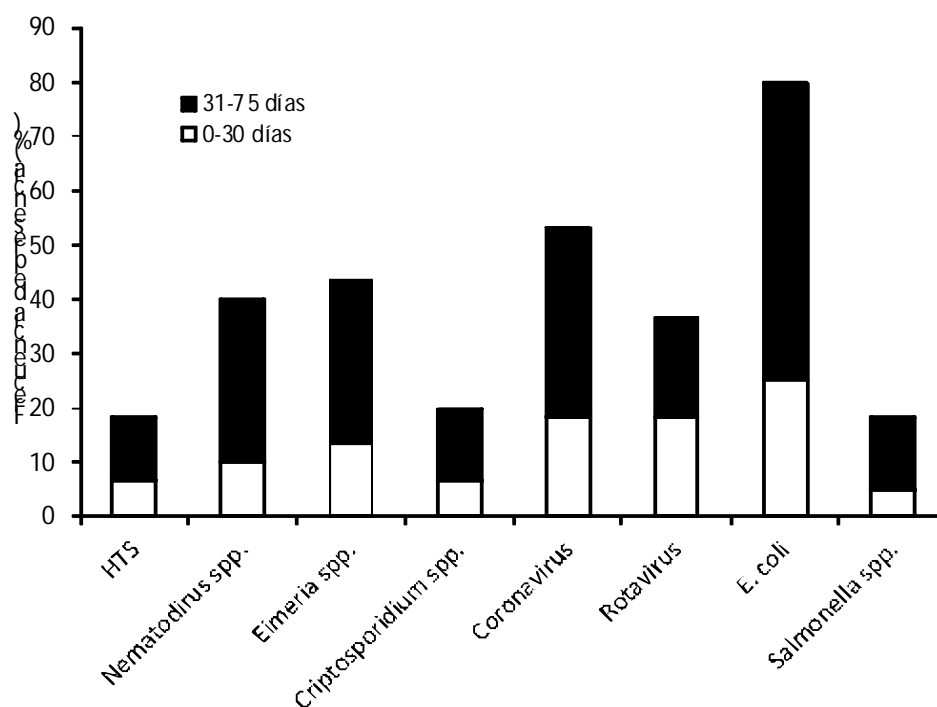


Figura 1. Frecuencia de causas de diarreas en crías de alpacas de la sierra central.

Cuadro 1. Promedio de huevos por gramo de heces (hpg) de parásitos en 60 crías de alpacas con diarrea en la sierra central del Perú

Parásito	Positivos	Huevos por gramo de heces (hpg)	
	(n)	Promedio	Mínimo - Máximo
Huevos tipo Strongylus	11	73	0 - 400
<i>Nematodirus</i> sp	24	329	50 - 1,500
<i>Eimeria</i> sp	26	26779	50 - 253,800
<i>Trichuris</i> sp	1	50	-

Ameghino, 1994; Cebra *et al.*, 2003; Whitehead y Anderson, 2006; Waitt *et al.*, 2008).

El rotavirus de bovino ha demostrado ser causante de diarrea en crías de guanacos (Parreño *et al.*, 2004). Asimismo, en el Perú, el 9.3% de crías de alpacas con cuadros diarreicos fueron identificados como positivas a rotavirus y, además, en asociación con *E. coli* (Morales *et al.*, 2007), mientras que Cebra *et al.* (2003) los detectaron en el 2%

de crías de llamas y alpacas con diarrea. En el presente trabajo, se encontró una frecuencia de rotavirus de 36.6%, siendo mayor a los estudios previos.

Por otro lado, se conoce que el coronavirus bovino causa una severa enteritis viral en crías de alpaca (Cebra *et al.*, 2003; Genova *et al.*, 2008). Se ha establecido que es el agente causal del 40% de las diarreas en alpacas de 8-150 días de edad (Cebra *et*

*al.*, 2003; Whitehead y Anderson, 2006; Waitt *et al.*, 2008), frecuencia similar a la reportada en el presente estudio.

Se han descrito varios parásitos protozoarios causantes de mortalidad en crías de alpacas, especialmente las eimerias (Rosadio y Ameghino, 1994; Cebra *et al.*, 2003; Palacios *et al.*, 2006; Whitehead y Anderson, 2006; Waitt *et al.*, 2008). Así, Rosadio y Ameghino (1994) reportaron cuadros severos de diarrea en alpacas de 25-35 días, Cebra *et al.* (2003) aislaron este protozoo en el 13% de crías con diarrea de 21 a 60 días de edad, y Whitehead y Anderson (2006) la reportaron en el 12% en crías de 21 a 104 días. Esto es coincidente con los resultados presentados, donde la coccidiosis mostró una alta e importante frecuencia (Figura 1), especialmente en crías con más de 30 días de edad (30%).

La carga parasitaria de *Eimeria* sp fue elevada (Cuadro 1), lo que implica que crías con cuadros diarreicos y positivas a coccidias pueden contaminar el ambiente en forma considerable. Los CSA se pueden infectar con *Eimeria* desde los primeros días de vida siempre que su entorno se encuentre muy contaminado. Asimismo, los cuadros severos se asocian con animales expuestos por primera vez al parásito y con una ingesta elevada de estas coccidias (Whitehead y Anderson, 2006).

Las eimerias de los CSA son altamente específicas, no pueden infectar a otros animales domésticos, pero puede existir la transmisión cruzada entre especies de CSA. Se ha reportado cinco especies que afectan a las alpacas: *E. punoensis*, *E. ivitaensis*, *E. lamae*, *E. alpaca* y *E. macusaniensis* (Palacios *et al.*, 2006), donde las tres últimas fueron detectadas en el presente trabajo.

El 20% (16/60) de las crías estuvieron infectadas con *Cryptosporidium* sp, lo cual concuerda por López-Urbina *et al.* (2009) quienes reportaron 13% de prevalencia a nivel nacional y 12% para Junín. Asimismo,

Cebra *et al.* (2003) y Whitehead y Anderson (2006) reportan frecuencias de *Cryptosporidium* de 9% en crías de alpaca de 10 a 45 días y de 26% en crías de 7 a 100 días de edad, respectivamente. Por otro lado, se indica que los casos fatales de criptosporidiasis ocurren mayormente en crías de 9 a 30 días de edad (Bidewell y Cattell, 1998; Waitt *et al.*, 2008).

No se puede descartar que la parasitosis hallada (parásitos con huevos tipo *Strongylus*, *Nematodirus* sp y *Trichuris* sp) pueda contribuir al cuadro entérico, a pesar que la carga parasitaria haya sido relativamente baja (Cuadro 1). En los casos de teniasis y gastroenteritis verminosas en animales mayores de 2 meses se encuentra un gran número de huevos por gramo de heces (Whitehead y Anderson, 2006).

*Salmonella* sp fue aislada en el 18.3% de las alpacas y, si bien, reportes previos indican que esta bacteria no es una causa común de diarrea en alpacas (Cebra *et al.*, 2003), se han detectado varias especies de *Salmonella* en animales menores de 6 meses de edad y con diarrea (Whitehead y Anderson, 2006).

En el caso de la colibacilosis, la infección ocurre como infección secundaria a otras enfermedades gastrointestinales, aunque también se le ha descrito en forma concomitante a infecciones por rotavirus o coronavirus, donde muestra una presentación más severa (Whitehead y Anderson, 2006). En el presente estudio, la asociación virus y bacterias se dio en el 11.7%, donde *E. coli* K99 fue identificada en el 13.3% de los 60 casos, cifra importante que denota su participación en la diarrea neonatal.

Si bien *E. coli* es parte de la flora normal del tracto intestinal, existen cepas patógenas de este agente capaces de causar enfermedad en los animales y el hombre. *E. coli* fue la bacteria de mayor frecuencia en el presente estudio, por lo que es necesario determinar los patotipos existentes. *E. coli*

enterohemorrágica y *E. coli* enteropatógena son patotipos que están involucrados en los cuadros diarreicos mortales en crías de alpacas en el Perú (Cid *et al.*, 2011; Luna *et al.*, 2012; Silvera *et al.*, 2012).

#### LITERATURA CITADA

1. **Ameghino E, DeMartini J. 1991.** Mortalidad de crías de alpacas. Bol Div IVITA, Lima. 71 p.
2. **Bidewell C, Catell J. 1998.** Cryptosporidiosis in young alpacas. Vet Rec 142: 287.
3. **Bustinza AV, Burfening PJ, Blackwell RL. 1988.** Factors affecting survival in young alpacas (*Lama pacos*). J Anim Sci 66: 1139-1143.
4. **Cebra C, Mattson D, Baker R, Sonn R, Dearing P. 2003.** Potential pathogens in feces from unweaned llamas and alpacas with diarrhea. J Am Vet Med Assoc 223: 1806-1808. doi: 10.2460/javma.2003.223.1806
5. **Cid D, Martín-Espada C, Maturrano L, García A, Luna L, Rosadio R. 2011.** Diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from young Peruvian alpacas (*Vicugna pacos*) with diarrhea. En: Perez-Cabal MA, Gutierrez JP, Cervantes I, Alcalde MJ (eds). Fibre production in South American camelids and other fibre animals. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers. p 223-228. doi: 10.3920/978-90-8686-727-1
6. **Fernández Baca S. 2005.** Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Santiago de Chile: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 63 p.
7. **Genova SG, Streeter RN, Simpson KM, Kapil S. 2008.** Detection of an antigenic group 2 coronavirus in an adult alpaca with enteritis. Clin Vaccine Immunol 15: 1629-1632. doi: 10.1128/CVI.00232-08
8. **Hansen J, Perry B. 1994.** The epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of ruminants. 2<sup>nd</sup> ed. Nairobi, Kenya: International Laboratory for Research on Animal Diseases. 171 p.
9. **Henricksen SA, Pohlenz JFL. 1981.** Staining of *Cryptosporidium* by a modified Ziehl-Neelsen technique. Acta Vet Scand 22: 594-596.
10. **López-Urbina MT, González AE, Gomez-Puerta LA, Romero-Arbizu MA, Perales-Camacho RA, Rojo-Vázquez FA, Xiao L, Cama V. 2009.** Prevalence of neonatal cryptosporidiosis in Andean alpacas (*Vicugna pacos*) in Peru. Open Parasitol J 3: 9-13.
11. **Luna L, Maturrano L, Rivera H, Zanabria V, Rosadio R. 2012.** Genotipificación, evaluación toxigénica *in vitro* y sensibilidad a antibióticos de cepas de *Escherichia coli* aisladas de casos diarreicos y fatales en alpacas neonatas. Rev Inv Vet Perú 23: 280-288. doi: 10.15381/rivep.v23i3.910
12. **[MINSA] Ministerio de Salud del Perú. 2005.** Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias. Lima: CEPREDIM. Serie de Normas Técnicas N° 28. 106 p.
13. **Morales S, Paredes S, Pezo D. 2007.** Asociación de rotavirus y *Escherichia coli* fimbriada como agentes causales de infecciones entéricas en alpacas neonatas. Rev Inv Vet Perú 18: 150-153. doi: 10.15381/rivep.v18i2.1486
14. **[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2008. Cap 2.9.9.** Salmonelosis. En: Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. 6<sup>a</sup> ed. Paris: OIE. p 1268-1286.
15. **Palacios CA, Perales RA, Chavera AE, Lopez MT, Braga WU, Moro M. 2006.** *Eimeria macusaniensis* and *Eimeria ivitaensis* coinfection in fatal cases of diarrhoea in young alpacas (*Lama pacos*) in Peru. Vet Rec 158: 344-345.
16. **Parreño V, Bok K, Fernandez F, Gomez J. 2004.** Molecular characterization of the first isolation of rotavirus in guanacos (*Lama guanicoe*). Arch Virol 149: 2465-2471. doi: 10.1007/s00705-004-0371-2

- 17. Rosadio RH, Ameghino EF. 1994.** Coccidial infections in neonatal Peruvian alpacas. *Vet Rec* 135: 459-460. doi: 10.1136/vr.135.19.459
- 18. Silvera E, Perales R, Rodríguez J, López T, Gavidia C, Agapito J, Palacios C. 2012.** Presencia de *Escherichia coli* O157 en crías de alpacas (*Vicugna pacos*). *Rev Inv Vet Perú* 23: 98-104. doi: 10.15381/rivep.v23i1.888
- 19. Waitt LH, Cebra CK, Firshman AM, McKenzie EC, Schlipf JW Jr. 2008.** Cryptosporidiosis in 20 alpaca crias. *J Am Vet Med Assoc* 233: 294-298. doi: 10.2460/javma.233.2.294
- 20. Whitehead C, Anderson D. 2006.** Neonatal diarrhea in llamas and alpacas. *Small Ruminant Res* 61: 207-215. doi: 10.1016/j.smallrumres.2005.07.012