

Universidad Católica de Santa María

Escuela de Postgrado

Maestría en Producción y Salud Animal



**DIAGNOSTICO DE CRIPTOSPORIDIOSIS MEDIANTE LA TINCION DE
ZIEHL NIELSEEN MODIFICADO, EN TERNEROS DE LECHERIA
DE LA ZONA GANADERA DE SAMUEL PASTOR
CAMANÁ- AREQUIPA - 2016**

Tesis presentada por la Bachiller:

Mogrovejo Lopez Cecilia

Para optar el Grado Académico de

Maestro en Producción y Salud animal

Asesor: Mgter Fernando Fernández Fernández

AREQUIPA - PERU

2018

Arequipa, 08 de Agosto del 2017

Sr. Dr.
HUGO TEJADA PRADELL
DIRECTOR DE LA ESCUELA DE POSGRAO
UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

Presente,

De mi consideración,

Es grato dirigirme a usted para dar respuesta al expediente Nro. 16027805 presentado por la Bachiller **Mogrovejo López Cecilia Laura**, referido al Borrador de Tesis titulada: "DIAGNOSTICO DE CRIPTOSPORIDIOSIS MEDIANTE LA TINCION DE ZIELH NIELSEN MODIFICADO EN TERNEROS DE LECHERIA DE LA ZONA GANADERA DE SAMUEL PASTOR – CAMANA – AREQUIPA – 2016".

Realizada la revisión del borrador y habiéndose presentado las subsanaciones de las observaciones, el borrador está listo para su pase a sustentación.

Atentamente.



M.Sc. M.V. Fernando Fernández Fernández.

Jurado.

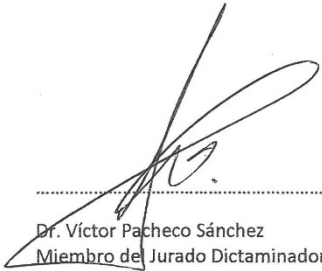


Arequipa, 07 de agosto del 2017

Sr. Doctor
Hugo Tejada Pradell
Director de la Escuela de Postgrado
Universidad Católica de Santa María
Presente.-

REFERENCIA: Expediente 16027805

Tengo a bien dirigirme a Ud. para saludarlo y a la vez para informar sobre el Dictamen del Borrador de Tesis presentado por el Br. Cecilia Mogrovejo Lopez, para optar el Grado Académico de Maestro En Ciencias Titulado: **Diagnostico de criptosporidiosis mediante la tinción de Zielh Nielsen modificado, en terneros de lechería de la zona ganadera de Samuel Pastor- Camana-Arequipa-2016**; a fin de hacer conocer que una vez revisado y habiendo levantado las observaciones solicitados se da Pase a Sustentación.



.....
Dr. Víctor Pacheco Sánchez
Miembro del Jurado Dictaminador

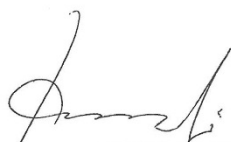


Arequipa, 05 de Diciembre del 2017

Sr. Doctor
Hugo Tejada Pradell
Director de la Escuela de Postgrado
Universidad Católica de Santa María
Presente.-

REFERENCIA: Expediente 16027805

Tengo a bien dirigirme a Ud., para saludarlo y a la vez para informarle sobre el Dictamen del Borrador de Tesis presentado por el Br. Cecilia Mogrovejo López, para optar el Grado Académico de Maestro en Ciencias Titulado: "DIAGNÓSTICO DE CRIPTOSPORIDIOSIS MEDIANTE LA TINCIÓN DE ZIELH NIELSEN MODIFICADO, EN TERNEROS DE LECHERÍA DE LA ZONA GANADERA DE SAMUEL PASTOR – CAMANA – AREQUIPA 2016", a fin de hacer conocer que una vez revisado y habiendo levantado las observaciones solicitados se da Pase a Sustentación.



Dr. Victor Velez Marroquin
Miembro del Jurado Dictaminador



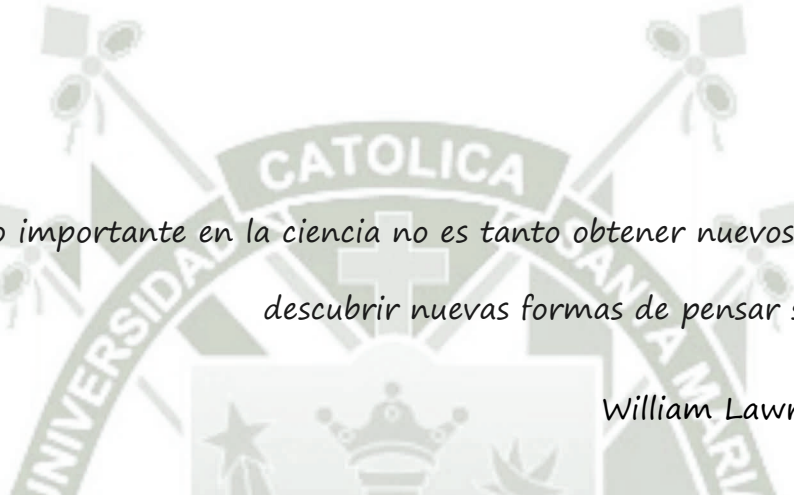
DEDICATORIA

Dedicado con todo mi amor y agradecimiento a mi padre Adolfo Mogrovejo Medrano por todo su apoyo y comprensión durante todas las etapas de mi crecimiento profesional, por ser un ejemplo de superación y amor incondicional a su familia.

A mi madre Gloria López Vda. de Mogrovejo por estar conmigo siempre apoyándome y ayudándome en cada proyecto iniciado en mi vida profesional.

A mi hermana Kelly Mogrovejo López por su apoyo y cuidado de mis pequeños durante el tiempo que duraron mis estudios de post grado.

A mis hijos Rodrigo y Eduardo que son el motivo de cada esfuerzo y superación día a día, los amo.



“Lo importante en la ciencia no es tanto obtener nuevos datos, sino descubrir nuevas formas de pensar sobre ellos.”

William Lawrence Bragg



INDICE

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCION

CAPITULO UNICO.....	17
RESULTADOS Y DISCUSION	17
1. Comparación de técnicas de preparación de muestras para el diagnóstico de Criptosporidiosis mediante la Tinción Zielh Nielsen modificado.....	18
2. Determinación del diagnóstico de Criptosporidiosis por edades en terneros de 0 a 6 meses	20
3. Determinación del diagnóstico de Criptosporidiosis por sexo en terneros	24
CONCLUSIONES.....	31
RECOMENDACIONES	33
PROPUESTA	34
BIBLIOGRAFIA	38
ANEXOS	41
ANEXO N° 01: <u>PROYECTO DE TESIS</u>	42
ANEXO N° 02: <u>CONSTANCIA DE LABORATORIO</u>	78
ANEXO N° 03: <u>MATRICES DE SISTEMATIZACION</u>	80
ANEXO N° 04: <u>CÁLCULOS ESTADÍSTICOS</u>	89
ANEXO N° 05: <u>SECUENCIA FOTOGRAFICA</u>	98

INDICE DE CUADROS

Cuadro N° 01: Comparación de técnicas de preparación de muestras para el diagnóstico de Criptosporidiosis mediante la Tinción Zielh Nielsen modificado	18
Cuadro N° 02: Diagnóstico de Criptosporidiosis por edades en terneros de 0 a 6 meses Técnica de extendido directo	20
Cuadro N° 03: Diagnóstico de Criptosporidiosis por edades en terneros de 0 a 6 meses. Técnica de concentración formol- acetato de etilo	21
Cuadro N° 04: Diagnóstico de Criptosporidiosis por edades en terneros de 0 a 6 meses. Técnica de adición de peróxido de hidrogeno	22
Cuadro N° 05: Diagnóstico de Criptosporidiosis por sexo en terneros Técnica de extendido directo	24
Cuadro N° 06: Diagnóstico de Criptosporidiosis por sexo en terneros Técnica de concentración formol – acetato de etilo	25
Cuadro N° 07: Diagnóstico de Criptosporidiosis por sexo en terneros Técnica de adición de peróxido de hidrogeno	26

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 01: Comparación de las técnicas de preparación de muestras
para el diagnóstico de Criptosporidiosis considerando
edad y sexo27



RESUMEN

La presente investigación se realizó en el Distrito Samuel Pastor, Provincia de Camaná, geográficamente ubicado en la localidad de La Pampa, latitud sur $16^{\circ}36'24''$ y longitud oeste $72^{\circ}41'49''$; siendo el objetivo determinar la técnica de preparación de muestras más adecuada para el diagnóstico de Cryptosporidiosis en terneros de lechería de la zona, así como su asociación con las variables sexo y edad, mediante la utilización de la técnica de Zielh Neelsen modificado, aplicandose tres técnicas en la preparación de las muestras. Se recolectaron 31 muestras fecales de terneros de ambos sexos y con edades entre 0 a 6 meses. Se utilizó tres técnicas en la preparación de las muestras siendo las siguientes: extendido directo, concentración de ooquistes mediante sedimentación en centrifuga (formol/acetato de etilo) y adición de peróxido de hidrogeno al 1,5 %. La evaluación estadística se realizó mediante la prueba de Chi cuadrado. Se encontró que la identificación positiva que obtuvo mayor porcentaje **41,9%** fue la técnica de extendido directo en comparación con la de concentración formol – acetato de etilo **35,5%** y adición de peróxido de hidrogeno **16,1%** que obtuvo el menor porcentaje. La frecuencia de tratamiento de muestras para identificación de *Cryptosporidium* difiere significativamente en los tres tratamientos con un valor P de 0,0002 ($P < 0,05$). Utilizando extendido directo, los valores encontrados son de **50%** para terneros de 0 a 2 meses, **38,5%** en terneros de 3 a 4 meses y **40%** en terneros de 5 a 6 meses, con un total de **41,9%** de casos positivos a criptosporidiosis. No se observa significancia entre los tres grupos etarios de terneros al tratamiento de muestras con extendido directo; con un valor P de 0,293 ($P > 0,05$). Técnica de concentración formol – acetato de etilo, la identificación positiva que obtuvo mayor porcentaje corresponde a terneros de 0 a 2 meses **50%** seguido de terneros de 5 a 6 meses **40%** y terneros de 3 a 4 meses **23,1%**. Si se observa diferencia significativa entre los tres grupos etarios de terneros al tratamiento de muestras con concentración formol – acetato de etilo. Con un valor de 0,0004 ($P < 0,05$). Técnica de adición de peróxido de hidrogeno, los resultados positivos corresponden a terneros de 5 a 6 meses **30%**, terneros de 0 a 2 meses **25%** y terneros de 3 a 4 meses **0%**. Observamos diferencia significativa entre los tres grupos etarios evaluados, con un valor P de 0,0000 ($P < 0,05$). Encontramos que la frecuencia positiva utilizando la pre técnica de extendido directo de acuerdo a sexo es de **44,4%** para hembras y **38,5%** para machos. No hay significancia entre terneros machos y hembras

al tratamiento de muestras con extendido directo, con un valor P de 0,11 ($P > 0,05$). Para la técnica de concentración formol – acetato de etilo la positividad al diagnóstico de criptosporidiosis es mayor para hembras **38,9%** y menor para machos **30,8%**. No hay diferencia significativa entre terneros machos y hembras, con un valor P de 0,217 ($P > 0,05$). Técnica de adición de peróxido de hidrogeno, se determinó positividad de **16,7%** para hembras y **15,4%** para machos, observándose que no hay diferencia significativa entre terneros machos y hembras al tratamiento de muestras con agua oxigenada. $P = 0,09$ ($P > 0,05$).



ABSTRACT

The present investigation was carried out in the Samuel Pastor District, Camaná Province, geographically located in La Pampa, latitude south $16^{\circ} 36' 24''$ and longitude $72^{\circ} 41' 49''$; Being the objective to determine the technique of preparation of samples more suitable for the diagnosis of Cryptosporidiosis in dairy calves of the zone, as well as its association with the variables sex and age, using the Zielh Neelsen modified technique, applying three techniques in the preparation of the samples. 31 fecal samples of calves of both sexes and between 0 and 6 months old were collected. Three techniques were used in the preparation of samples: direct extension, concentration of oocysts by centrifugation sedimentation (formaldehyde / ethyl acetate) and addition of 1,5% hydrogen peroxide. The statistical evaluation was performed using the Chi square test. It was found that the positive identification that obtained the highest percentage 41,9% was the direct extension technique in comparison with the formaldehyde – 35,5% ethyl acetate concentration and the addition of 16,1% hydrogen peroxide, which obtained the lowest percentage. The treatment frequency of samples for identification of *Cryptosporidium* differs significantly in all three treatments with a P value of 0,0002 ($P < 0,05$). Using direct extension, the values found are 50% for calves of 0 to 2 months, 38,5% for calves of 3 to 4 months and 40% for calves of 5 to 6 months, with a total of 41,9% of calves. Positive cases of cryptosporidiosis. No significance was observed among the three age groups of calves to the treatment of samples with direct extension; with a P value of 0,293 ($P > 0,05$). Formaldehyde acetate concentration, the positive identification that obtained the highest percentage corresponds to calves from 0 to 2 months 50% followed by calves from 5 to 6 months 40% and calves from 3 to 4 months 23,1%. If a significant difference is observed between the three age groups of calves to the treatment of samples with formaldehyde concentration - ethyl acetate. With a value of 0,0004 ($P < 0,05$). Hydrogen peroxide addition technique, positive results correspond to calves from 5 to 6 months 30%, calves from 0 to 2 months 25% and calves from 3 to 4 months 0%. We observed a significant difference between the three age groups evaluated, with a P value of 0,0000 ($P < 0,05$). We found that the positive frequency using the pre-technique of direct extension according to sex is 44.4% for females and 38,5% for males. There is no significant difference between male and female calves when treating samples with direct extension, with a P value of 0,11 ($P > 0,05$). For the

formaldehyde - ethyl acetate concentration, the positivity to the diagnosis of cryptosporidiosis is higher for females 38,9% and lower for males 30,8%. There was no significant difference between male and female calves, with a P value of 0,217 ($P > 0,05$). Hydrogen peroxide addition technique, 16,7% positivity was determined for females and 15,4% for males. It was observed that there was no significant difference between male and female calves when treating samples with hydrogen peroxide. $P = 0,09$ ($P > 0,05$).



INTRODUCCION

La producción de ganado vacuno lechero tiene como objetivo mayor rentabilidad de la explotación; siendo la etapa de recría un factor importante para lograr esté. Considerando que la Criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria causante de cuadros entéricos autolimitantes, especialmente en terneros en etapa de lactación; los cuales ocasionan pérdida de la condición corporal, retraso en el crecimiento de estos, las mismas que ocasionan pérdidas económicas de importancia para los productores durante esta etapa de desarrollo del animal. Es necesario la identificación de este parásito para mejorar la calidad sanitaria de los animales contribuyendo a una mejora en el manejo y consecuentemente en la rentabilidad del hato.

La criptosporiosis es producida por protozoos parásitos del género *Cryptosporidium*, de los que hay 18 especies “válidas”. *C. andersoni* y *C. bovis*, en ganado vacuno. Se ha descrito que *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. baileyi*, *C. meleagridis* y *C. galli* producen mortalidad y brotes de enfermedad en el ganado. Para confirmar el diagnóstico, se requiere identificación en el laboratorio.¹

Se localiza en el intestino delgado con especial predilección por las partes terminales del yeyuno e íleon, también puede afectar el intestino grueso. Los estados endógenos se sitúan en el borde luminal de los enterocitos, localización definida como intracelular pero extracitoplasmática.²

El Ciclo Biológico es monoxeno y todas sus fases asexuadas y sexuadas ocurren en el mismo hospedero.²

Todas las etapas de desarrollo endógeno (asexual y sexual) del parásito, ocurren en la superficie apical de los enterocitos, dentro de una vacuola parasitófora en posición intracelular pero extracitoplasmática, culminando con la formación del ooquiste, estado infectivo del parásito, que se elimina en grandes cantidades con las heces y es capaz de sobrevivir durante largos periodos en el ambiente.³

La distribución de la criptosporidiosis en rumiantes domésticos es cosmopolita.²

La criptosporidiosis por *Cryptosporidium parvum* origina diarreas en el ganado joven de granja no destetado que incluye terneros, corderos, cabritos y alpacas. Las fases endógenas infectan a los enterocitos de la porción distal del intestino delgado, el ciego y el colon. Los mayores cambios patológicos asociados con la enfermedad son la atrofia de las vellosidades intestinales, el acortamiento de las vellosidades y la disgregación de los enterocitos, los animales afectados se recuperan a las dos semanas de mostrar síntomas de la enfermedad. Los animales destetados y adultos también pueden resultar infectados. Los síntomas pueden variar de una infección moderada o asintomática en animales adultos a diarreas graves en animales jóvenes. La mortalidad es baja excepto si ocurre una infección asociada con otros patógenos entéricos, tales como el *rotavirus*, *E. coli*. Los animales adultos pueden excretar ooquistes que pueden transmitirse a otros hospedadores susceptibles.¹

La criptosporidiosis por *Cryptosporidium andersoni* afecta a las glándulas digestivas del rumen de terneros mayores y de ganado adulto.¹

Además es considerada como una enfermedad zoonótica por lo que debemos contemplar la posibilidad de que los animales actúen como fuente de infección, llegando el parásito a la población humana a través de los alimentos y el agua contaminados con las heces de estos animales.

Generalmente no se realiza un diagnóstico eficiente de la enfermedad mediante la identificación del parásito, por lo tanto los tratamientos aplicados son inespecíficos para la misma. Con lo que se incrementan las pérdidas económicas por tratamientos infructuosos.

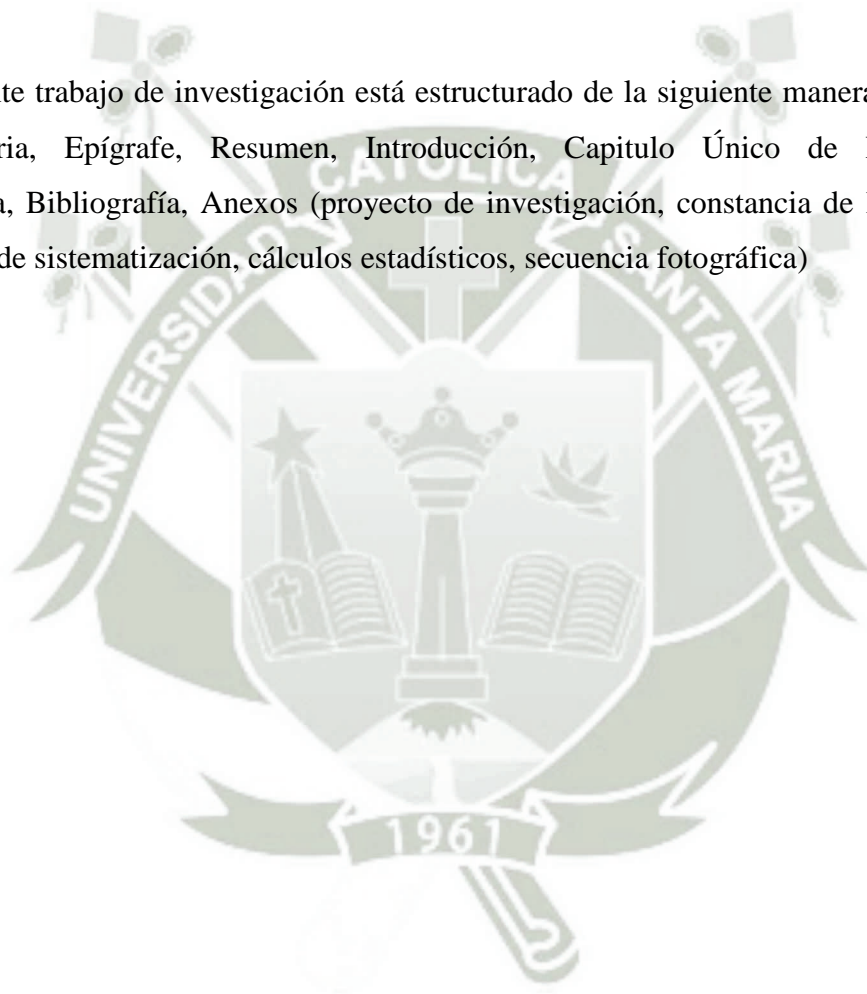
El diagnóstico se realiza mediante la identificación del parásito, a partir de la observación de ooquistes de *Cryptosporidium spp* que se realiza a través de la técnica de tinción de Ziehl-Neelsen Modificado. Los ooquistes se observan como microorganismos esféricos u ovalados de 4 - 6 μm , de color rojo fucsia con algunas granulaciones oscuras en su interior, que contrastan con el fondo teñido de azul.⁵

La concentración mediante centrifugación por la técnica del formol-eter o formol-acetato de etilo ha demostrado su eficacia en el procesamiento de las muestras. El

tratamiento de las heces con agua oxigenada (a una concentración final de 5 volúmenes, durante 10 min) hace que todos los ooquistes sean ácido-alcohol resistentes y, por lo tanto, la sensibilidad de las tinciones puede incrementarse hasta 40 veces.⁶

Por lo que al utilizar estas técnicas en la preparación de las muestras que consisten en concentración mediante centrifugación con formol – acetato de etilo y adición de peróxido de hidrogeno, además del extendido directo previos a la coloración de Ziehl-Neelsen modificado, es que determinamos cual es la técnica de preparación de muestra más adecuada para la identificación del parásito y diagnóstico de criptosporidiosis.

El presente trabajo de investigación está estructurado de la siguiente manera: Cubierta, Dedicatoria, Epígrafe, Resumen, Introducción, Capítulo Único de Resultados, Propuesta, Bibliografía, Anexos (proyecto de investigación, constancia de laboratorio, matrices de sistematización, cálculos estadísticos, secuencia fotográfica)





CAPITULO UNICO
RESULTADOS Y DISCUSION

1. Comparación de técnicas de preparación de muestras para el diagnóstico de Criptosporidiosis mediante la Tinción Zielh Nielsen modificado

Cuadro N° 01

Comparación de técnicas de preparación de muestras para el diagnóstico de Criptosporidiosis mediante la Tinción Zielh Nielsen modificado

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA							
DIAGNOSTICO DE CRIPTOSPORIDIOSIS		EXTENDIDO DIRECTO		CONCENTRACION CON FORMOL – ACETATO DE ETILO		ADICION DE PEROXIDO DE HIDROGENO	
		n	%	n	%	n	%
	POSITIVO	13	41.9	11	35.5	5	16.1
	NEGATIVO	18	58.1	20	64.5	26	83.9
	TOTAL	31	100	31	100	31	100

P = 0.0002 (P < 0,05)

Observamos diferencia significativa entre las tres técnicas de preparación de muestras para identificación de *Cryptosporidium* con un Chi cuadrado para proporciones de 17,11; P = 0.0002 (P < 0,05)

Entre las técnicas de preparación de muestras antes de la coloración Zielh Nielseen se encontró que de las tres, la técnica de adición de peróxido de hidrogeno (83,9%) es la que mayor resultado negativos presentó seguido por la de concentración con formol – acetato de etilo (64,5%) y finalmente el extendido directo (58,1%).

La identificación positiva que obtuvo mayor porcentaje fue la técnica de extendido directo (41,9%) en comparación con la de concentración formol – acetato de etilo (35,5%) y adición de peróxido de hidrogeno (16,1%) la cual obtuvo el menor porcentaje.

Lo que indica que probablemente la técnica sencilla de extendido directo sigue siendo la más adecuada, mejorando la calidad del frotis directo o combinando la técnica de

concentración formol – acetato de etilo y adición de peróxido de hidrogeno, es probable que se pueda diagnosticar con mayor eficiencia esta parasitosis.

Los valores encontrados en el presente trabajo son de 41,9% de muestras positivas en la técnica de extendido directo, estos son inferiores a los reportados en Argentina por Pinto De Almeida.⁷ que reporta 93,4 % para terneros, utilizando la misma técnica, a diferencia de los resultados encontrados también en Argentina por Araujo.³ que reporta que el 27,1% de las muestras examinadas presentaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. similar al reporte de 22,1% de Surumay y Sandoval.⁸ en Venezuela y de Avendaño.⁹ que reporta el 22% de muestras positivas resultados inferiores a los reportados en la presente investigación.

García.¹⁰, reporta que estudios cuantitativos realizados en España han demostrado que el porcentaje de quistes teñidos aumenta considerablemente con un tratamiento previo de las heces durante 10 min con agua oxigenada (concentración final de 5 volúmenes). Resultado contrario al encontrado en la investigación que determina un valor de 16,1% de positividad en las muestras tratadas con peróxido de hidrogeno, dato considerablemente menor al de extendido directo e incluso al de concentración de ooquistes con formol – acetato de etilo, esto se debe probablemente a que la técnica de adición de peróxido de hidrogeno aún no está estandarizada o que está es trabajada con ooquistes de *Cryptosporidium* purificados.

En cuanto a la técnica de concentración formol – acetato de etilo, los resultados positivos son 35,5%, menores al extendido directo, difiriendo con lo mencionado por Rodríguez y Royo.⁶, que indican que la concentración mediante centrifugación por la técnica del formol-eter o formol acetato de etilo ha demostrado su eficacia en el procesamiento de las muestras, pero mejora su sensibilidad prolongando el tiempo de centrifugación, aumentando la sensibilidad del 86 al 99%. Esto se puede atribuir a que el tiempo de centrifugación utilizado en la presente investigación fue de 2 minutos.

Estos resultados muestran una importante diferencia de valores de positividad al diagnóstico de criptosporidiosis, lo cual podría deberse a que existen factores que no fueron tomados en cuenta cuando se realizó la evaluación, tales como mayor tiempo de centrifugación, purificación de ooquistes.

2. Determinación del diagnóstico de Criptosporidiosis por edades en terneros de 0 a 6 meses

Cuadro N° 02

Diagnóstico De Criptosporidiosis por edades en terneros de 0 a 6 meses.

Técnica de extendido directo

		EDAD (MESES)							
		0 - 2		3 - 4		5 - 6		TOTAL	
DIAGNOSTICO DE CRIPTOSPORIDIOSIS		n	%	n	%	n	%	n	%
	POSITIVO	4	50	5	38.5	4	40	13	41.9
	NEGATIVO	4	50	8	61.5	6	60	18	58.1
	TOTAL	8	100	13	100	10	100	31	100

P= 0,293 (P > 0,05)

De los tres grupos etarios, el de mayor porcentaje de positividad es el que corresponde a terneros de 0 a 2 meses (50%), seguido por terneros de 5 a 6 meses (40%) y finalmente terneros de 3 a 4 meses de edad (38,5%).

No se observa diferencia estadística entre los tres grupos etarios de terneros al tratamiento de muestras con extendido directo; con un Chi cuadrado de 0,293 (P > 0,05).

La identificación negativa que obtuvo mayor porcentaje (61,5%) fue la de terneros de 3 a 4 meses, seguida por terneros de 5 a 6 meses (60%) y por último terneros de 0 a 2 meses (50%) de edad.

Al observar los datos encontrados podemos indicar que la técnica de extendido directo, no presenta discriminación en cuanto al diagnóstico de criptosporidiosis por edades.

Los valores encontrados son de 50% para terneros de 0 a 2 meses, 38,5% en terneros de 3 a 4 meses y 40% en terneros de 5 a 6 meses, con un total de 41,9% de casos positivos a criptosporidiosis, datos similares a los reportados por Surumay et al.⁸ en Venezuela los cuales 48,3% de animales tenían menos de 4 semanas de edad y 51,7% entre 4 y 24

semanas. En Argentina, Araujo.³ reporta que el grupo etario “lactantes” presentó la mayor prevalencia 56,2% en promedio de ambas unidades de producción evaluadas. En Brasil Lippi y Castro.¹¹ indican que la aparición de diarrea fue alta durante la segunda semana de vida, aunque, criptosporidiosis fue igualmente detectada en becerros de 1 a 3 semanas de vida 68% y menos frecuentes en becerros de mayor edad 11,5%. Todos los datos reportados coinciden en que a menor edad hay mayor incidencia de presentación de la enfermedad.

Cuadro N° 03

Diagnóstico de Criptosporidiosis por edades en terneros de 0 a 6 meses.

Técnica de concentración formol- acetato de etilo

		EDAD (MESES)							
		0 - 2		3 - 4		5 - 6		TOTAL	
DIAGNOSTICO DE CRIPTOSPORIDIOSIS		n	%	n	%	n	%	n	%
	POSITIVO	4	50	3	23.1	4	40	11	35.5
	NEGATIVO	4	50	10	76.9	6	60	20	64.5
	TOTAL	8	100	13	100	10	100	31	100

P = 0.0004 (P < 0,05)

Se observa diferencia significativa entre los tres grupos etarios de terneros al tratamiento de muestras con concentración formol – acetato de etilo. Con un Chi cuadrado para proporciones de 0,0004 (P < 0,05).

La mayor frecuencia de casos negativos encontrados corresponde a terneros de 3 a 4 meses (76,9%), seguido por terneros de 5 a 6 meses (60%) y finalmente los terneros de 0 a 2 meses (50%).

La identificación positiva que obtuvo mayor porcentaje corresponde a terneros de 0 a 2 meses (50%) seguido de terneros de 5 a 6 meses (40%) y terneros de 3 a 4 meses (23,1%).

Estos resultados se deben probablemente que en este período el parásito completa su ciclo comenzando la manifestación de signos clínicos en los terneros y la eliminación de ooquistes en la materia fecal; además este período es la edad de mayor susceptibilidad

del ternero a microorganismos enteropatógenos causales de disturbios entéricos, los que pueden favorecer la patogenicidad de los ooquistes.⁷

Los resultados obtenidos utilizando la técnica de centrifugación formol – acetato de etilo son las siguientes: para terneros de 0 a 2 meses 50%, terneros de 3 a 4 meses 23,1% y terneros de 5 a 6 meses 35,5% estos son superiores a lo reportado por Chirinos.⁴ en Venezuela que utilizó el diagnóstico a través de las técnicas de Zielh – Neelsen modificada y de flotación con solución de sacarosa de Sheather. Determinando que *Cryptosporidium parvum* fue encontrado en 31 becerros, con frecuencia de 24% en el grupo entre tres días y dos meses, del 16,7% en los becerros entre tres y cuatro meses y de 18,2% en los animales entre cinco y seis meses

Se observa en los trabajos revisados y el propio desarrollado que la presencia de esta enfermedad tiene una relación directa con la edad del animal, afectando en mayor proporción animales menores de 2 meses, debido probablemente al aun inmaduro sistema inmunológico y contacto continuo con animales portadores (madres) durante la lactación.⁴

Cuadro N° 04

**Diagnóstico de Criptosporidiosis por edades en terneros de 0 a 6 meses.
Técnica de adición de peróxido de hidrogeno**

DIAGNOSTICO DE CRIPTOSPORIDIOSIS		EDAD (MESES)							
		0 - 2		3 - 4		5 - 6		TOTAL	
		n	%	n	%	n	%	n	%
POSITIVO		2	25	0	0	3	30	5	16.1
NEGATIVO		6	75	13	100	7	70	26	93.9
TOTAL		8	100	13	100	10	100	31	100

P = 0.0000 (P < 0,05)

Observamos diferencia significativa entre los tres grupos etarios evaluados mediante la técnica de adición de peróxido de hidrogeno, con un Chi cuadrado de 0,0000 (P < 0,05).

La frecuencia negativa con mayor representación es la que corresponde a terneros de 3 a 4 meses (100%), luego terneros de 0 a 2 meses (75%) y finalmente terneros de 5 a 6 meses (70%).

Los resultados positivos corresponden a terneros de 5 a 6 meses (30%), terneros de 0 a 2 meses (25%) y terneros de 3 a 4 meses (0%).

Podemos decir que estos datos, muestran variabilidad en cuanto a lo establecido como el factor edad como predisponente a la susceptibilidad de la enfermedad, ya que se muestra un mayor porcentaje de positivos en terneros de 5 a 6 meses en comparación a terneros de 3 a 4 meses, guardando si siempre relación de este factor con terneros menores de 2 meses o lactantes. Es probable que esto se deba a factores en la estandarización de las muestras.

La frecuencia positiva de criptosporidiosis es de 30% para terneros de 5 a 6 meses, 25% para terneros de 0 a 2 meses y 0% para terneros de 3 a 4 meses. Estos datos son inferiores a los encontrados en la evaluación utilizando el extendido directo. Lo que difiere a lo encontrado por Rodríguez y Royo.⁶ que refieren que el tratamiento de las heces con agua oxigenada (a una concentración final de 5 volúmenes, durante 10 minutos) hace que todos los ooquistes sean ácido-alcohol resistentes y, por lo tanto, la sensibilidad de las tinciones puede incrementarse hasta 40 veces. Lo mismo reporta Entrala et. al.¹²

Podemos suponer que la diferencia se debe a que la técnica aún no está estandarizada y a otros factores que no fueron evaluados en la investigación.

3. Determinación del diagnóstico de Criptosporidiosis por sexo en terneros

Cuadro N° 05

**Diagnóstico de Criptosporidiosis por sexo en terneros
Técnica de extendido directo**

DIAGNOSTICO DE CRIPTOSPORIDIOSIS	SEXO						
	HEMBRA		MACHO		TOTAL		
	n	%	n	%	n	%	
POSITIVO	8	44.4	5	38.5	13	41.9	
NEGATIVO	10	55.6	8	61.5	18	58.1	
TOTAL	18	100	13	100	31	100	

P= 0,11 (P > 0,05)

No hay significancia entre terneros machos y hembras al tratamiento de muestras con extendido directo, con un Chi cuadrado de 0,11 (P > 0,05)

Utilizando la técnica de extendido directo, el mayor resultado negativo hallado para diagnóstico de criptosporidiosis según sexo fue para machos (61,5%) y el menor para hembra (55,6%). Por ende la positividad al diagnóstico es de forma inversa mayor para hembras (44,4%) y menor para machos (38,5%). Dando un total de 58,1% de casos negativos y 41,9% de positivos indistintamente al sexo.

Estos datos coinciden con la literatura revisada,³ ya que no se observa significancia entre sexos, para esta enfermedad parasitaria.

Encontramos que la frecuencia positiva utilizando la técnica de extendido directo de acuerdo a sexo es de 44,4% para terneros hembras y 38,5% para terneros machos.

Los resultados encontrados difieren un poco a los presentados en Argentina por Araujo et, al.³ que determino una prevalencia levemente mayor en los machos respecto a las

hembras, a diferencia del presente trabajo que reporta una frecuencia levemente mayor en hembras que en machos, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas en ambos estudios, lo mismo detalla en Venezuela Chirinos.⁴ que no evidenció diferencia significativa entre sexo e infección.

Cuadro N° 06

Diagnóstico de Criptosporidiosis por sexo en terneros Técnica de concentración formol – acetato de etilo

DIAGNOSTICO DE CRIPTOSPORIDIOSIS	SEXO						
	HEMBRA		MACHO		TOTAL		
	n	%	n	%	n	%	
POSITIVO	7	38.9	4	30.8	11	35.5	
NEGATIVO	11	61.1	9	69.2	20	64.5	
TOTAL	18	100	13	100	31	100	

P= 0,217 (P > 0,05)

No hay diferencia significativa entre terneros machos y hembras al tratamiento de muestras con concentración formol – acetato de etilo, con un Chi cuadrado de 0,217 (P > 0,05).

Mediante la utilización de la técnica de concentración formol – acetato de etilo determinamos que el mayor porcentaje de resultados negativos en cuanto a sexo, es para machos (69,2%) y el menor para hembras (61,1%). Por lo tanto la positividad al diagnóstico de criptosporidiosis es inversamente mayor para hembras (38,9%) y menor para machos (30,8%). Dando un total de 64,5% de casos negativos y 35,5% de positivos indistintamente al sexo.

Encontramos que la frecuencia positiva utilizando la técnica de concentración formol – acetato de etilo de acuerdo a sexo es de 38,9% para hembras y 30,8% para machos. No se observa diferencia significativa para este indicador (sexo) lo que coincide con la literatura revisada.⁴

En Venezuela Díaz et, al.¹³, examino a 31 becerros, 13 fueron hembras y 18 machos, no observándose diferencias estadísticamente significativas en el riesgo de infección por

Cryptosporidium sp., entre ambos sexos. Al igual que Chirinos⁴ que determino que no se evidenció diferencia significativa entre sexo e infección. En Argentina Modini¹⁴ calculó la proporción de los animales que excretaron ooquistes. Para los machos fue de 32% y para las hembras de 21%. No obstante ser mayor dicha proporción en los machos, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,142$, χ^2) y no se detectó un riesgo asociado al sexo.

Cuadro N° 07

Diagnóstico de Criptosporidiosis por sexo en terneros

Técnica de adición de peróxido de hidrogeno

		SEXO					
		HEMBRA		MACHO		TOTAL	
DIAGNOSTICO DE CRIPТОSPORIDIOSIS		n	%	n	%	n	%
	POSITIVO	3	16.7	2	15.4	5	16.1
	NEGATIVO	15	83.3	11	84.6	26	83.9
	TOTAL	18	100	13	100	31	100

$P= 0,09$ ($P > 0,05$)

El diagnóstico de criptosporidiosis identifico 84,6% de casos negativos para machos dato superior al de hembras 83,3%. Determinando positividad de 16,7% para hembras y 15,4% para machos, observándose que no hay diferencia significativa entre terneros machos y hembras al tratamiento de muestras con peróxido de hidrogeno. Chi cuadrado 0,09 ($P > 0,05$).

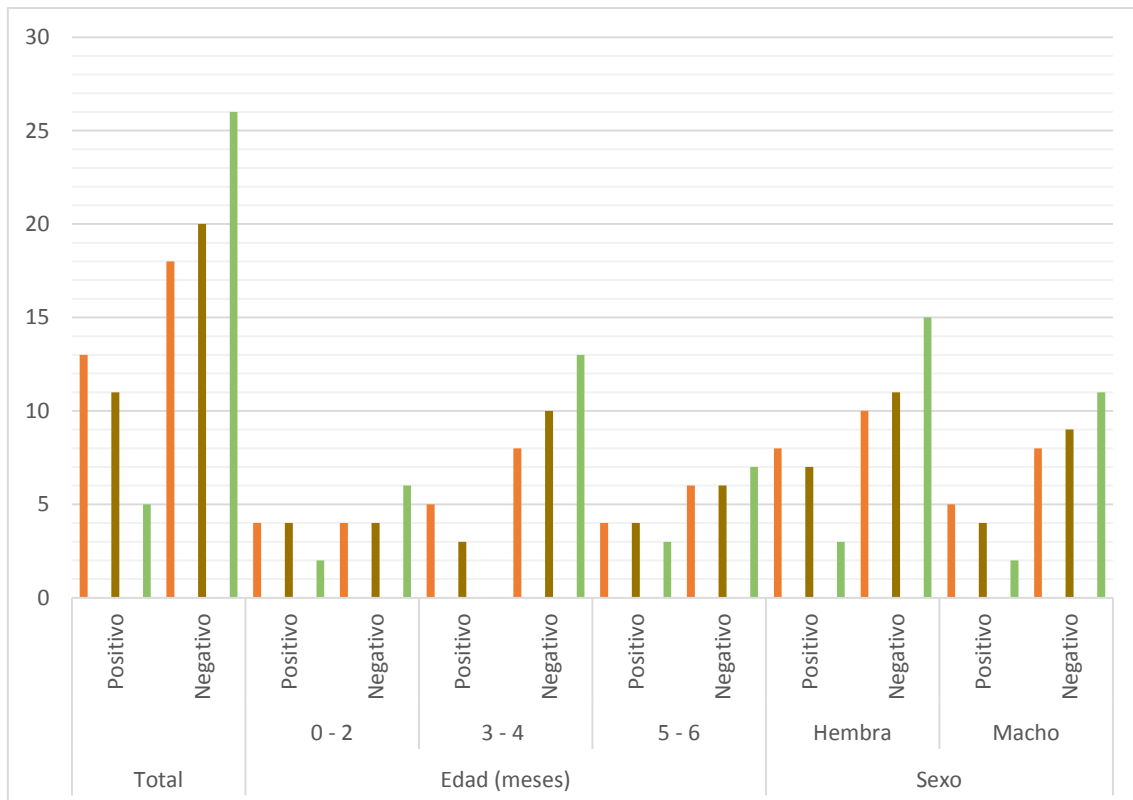
Estos datos son inferiores a los encontrados en la evaluación utilizando el extendido directo. Lo que difiere a lo encontrado por Rodríguez y Royo⁶ que refieren que el tratamiento de las heces con agua oxigenada (a una concentración final de 5 volúmenes, durante 10 min) hace que todos los ooquistes sean ácido-alcohol resistentes y, por lo tanto, la sensibilidad de las tinciones puede incrementarse hasta 40 veces. Lo mismo reporta Entrala.¹²

Podemos suponer que la diferencia se debe a que la técnica aún no está estandarizada y a otros factores que no fueron evaluados en la investigación, como son purificación de los ooquistes que se describe en la técnica de adición de peróxido de hidrogeno.

Gráfico N° 01

Comparación de las técnicas de preparación de muestras para el diagnóstico de Criptosporidiosis considerando edad y sexo





En el presente gráfico se resume la comparación de la aplicación de tres diferentes técnicas en la preparación de muestras para la identificación de Criptosporidiosis mediante la tinción de Ziehl Nielsen, relacionando a su vez con las variables de sexo y edad de los terneros muestreados.

Se observa que la técnica de extendido directo es la que más resultados positivo al diagnóstico presenta con 13 muestras positivas (41,9%), seguido de la técnica de concentración con formol acetato de etilo con 11 muestras positivas (35,5%) y finalmente la técnica de adición de peróxido de hidrogeno con 5 muestras positivas (16,1%).

Se determinó diferencia significativa entre las tres técnicas de preparación de muestras para identificación de *Cryptosporidium* con un Chi cuadrado para proporciones de 17,11; $P = 0.0002$ ($P < 0,05$)

Estos valores de extendido directo de 41,9% de muestras positivas son superiores a los encontrados en Argentina por Araujo.³ que reporta que el 27,1% de las muestras examinadas presentaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. similar al reporte de 22,1%

de Surumay y Sandoval.⁸ en Venezuela y de Avendaño.⁹ que reporta el 22% de muestras positivas.

En cuanto a la técnica de concentración con formol acetato de etilo, los resultados positivos son 11 muestras (35,5%), menores al extendido directo, difiriendo con lo mencionado por Rodríguez y Royo.⁶, que indican que la concentración mediante centrifugación por la técnica del formol-eter o formol acetato de etilo ha demostrado su eficacia en el procesamiento de las muestras, pero mejora su sensibilidad prolongando el tiempo de centrifugación, aumentando la sensibilidad del 86 al 99%.

En la técnica de adición de peróxido de hidrogeno se obtuvieron 5 muestras positivas (16,1%) resultado diferente al que reporta García.¹⁰, que indica, que estudios cuantitativos realizados en España han demostrado que el porcentaje de quistes teñidos aumenta considerablemente con un tratamiento previo de las heces durante 10 min con agua oxigenada (concentración final de 5 volúmenes), esto se puede deber probablemente a que la técnica de adición de peróxido de hidrogeno aún no está estandarizada o que está es trabajada con ooquistes de *Cryptosporidium* purificados.

En cuanto a edad se observan iguales resultados de muestras positivas para la técnica de extendido directo y concentración con formol acetato de etilo ambos con 4 muestras positivas (50%) para terneros de 0 a 2 meses, y en menor cantidad para la técnica de adición de peróxido de hidrogeno con 2 muestras positivas (25%). Para terneros de 3 a 4 meses se obtuvo 5 muestras positivas (38,5%) para la técnica de extendido directo, 3 muestras positivas (23,1%) para la técnica de concentración con formol acetato de etilo y 0 (0%) para la técnica de adición de peróxido de hidrogeno, en terneros de 5 a 6 meses se determinó 4 muestras positivas (40%) tanto para la técnica de extendido directo y de concentración con formol acetato de etilo y en la técnica de adición de peróxido de hidrogeno de observo 3 muestras positivas (30%).

Podemos determinar que en cuanto a edad, la técnica que mayores resultados positivos presento es la de extendido directo, seguida de la de concentración con formol acetato de etilo y finalmente la técnica de adición de peróxido de hidrogeno.

Se observa diferencia significativa en la técnica de concentración con formol acetato de etilo $P = 0,0004$ y en la técnica de adición de peróxido de hidrogeno $P = 0,0000$.

Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Diaz de Ramirez et. al.¹³ (33,8%), observándose asociación significativa entre la edad de los animales y la infección con *Cryptosporidium*.

En cuanto a sexo se observó que la técnica de extendido directo es la que mayores resultados positivos obtuvo con 8 muestras positivas (44,4%) para hembras y 5 para machos (38,5%), seguida de la técnica de concertación con formol acetato de etilo con 7 muestras positivas (38,9%) para hembras y 4 (30,8%) para machos y finalmente la de menos resultados positivos fue la técnica de adición de peróxido de hidrogeno con 3 muestras positivas (16,7%) para hembras y 2 para machos(15,4%).

No se observa diferencia significativa en ninguna de las tres técnicas aplicadas, extendido directo $P = 0,11$; concentración acetato de etilo $P = 0,217$ y adición de peróxido de hidrogeno $P = 0,09$.

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Chirinos⁴ en Venezuela que indica que no se evidencia diferencia significativa entre sexo e infección.

Según lo observado podemos indicar que la técnica de extendido directo es la más adecuada para el diagnóstico *Criptosporidiosis*.

CONCLUSIONES

Primera: La identificación positiva de criptosporidiosis en heces de terneros, que obtuvo mayor porcentaje 41,9% fue la técnica de extendido directo en comparación con la técnica de concentración formol – acetato de etilo 35,5% y adición de peróxido de hidrogeno 16,1% que obtuvo el menor porcentaje. La frecuencia de tratamiento de muestras para identificación de *Cryptosporidium* difiere significativamente en los tres tratamientos con un Chi cuadrado para proporciones de 0,0002 ($P < 0,05$). La técnica en la preparación de muestras más adecuada continúa siendo el extendido directo.

Segunda: Utilizando extendido directo para la identificación de *Cryptosporidium*, los valores encontrados son de 50% para terneros de 0 a 2 meses, 38,5% en terneros de 3 a 4 meses y 40% en terneros de 5 a 6 meses, con un total de 41,9% de casos positivos a criptosporidiosis, No se observa significancia entre los tres grupos etarios de terneros al tratamiento de muestras con extendido directo; con un Chi cuadrado de 0.293 ($P > 0.05$).

Técnica de concentración formol – acetato de etilo, la identificación positiva de *Cryptosporidium* que obtuvo mayor porcentaje corresponde a terneros de 0 a 2 meses 50% seguido de terneros de 5 a 6 meses 40% y terneros de 3 a 4 meses 23,1%. Si se observa diferencia significativa entre los tres grupos etarios de terneros al tratamiento de muestras con concentración formol – acetato de etilo. Con un Chi cuadrado para proporciones de 0,0004 ($P < 0.05$).

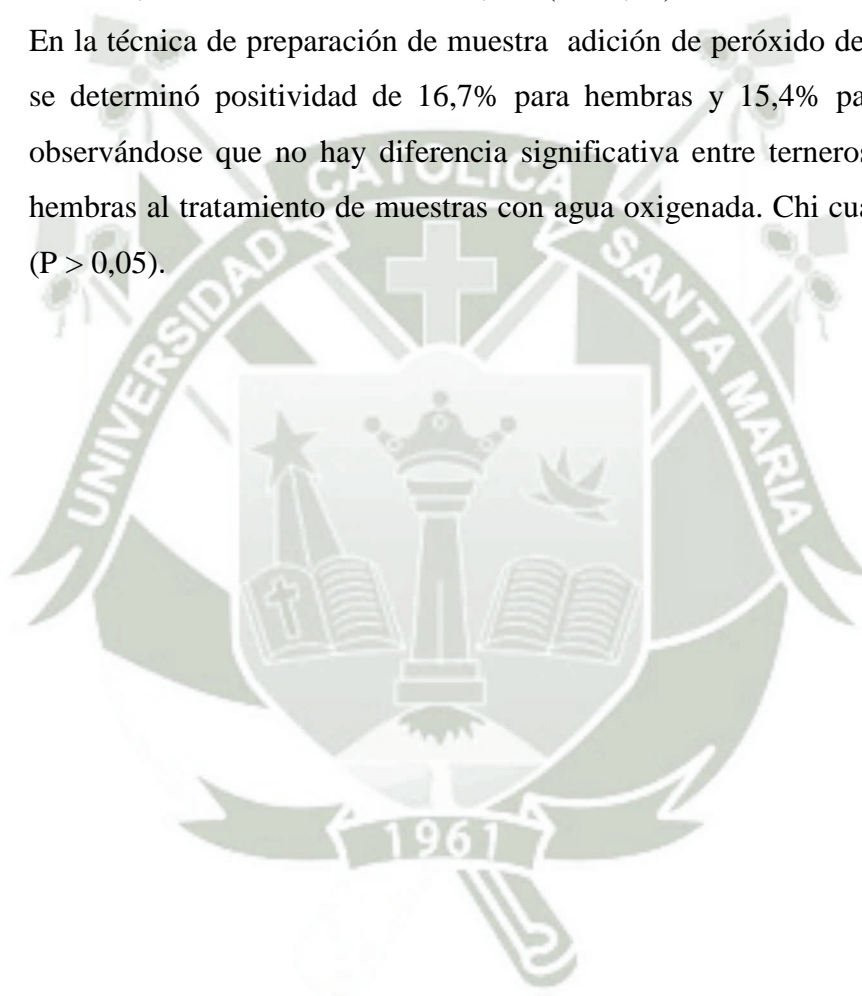
Técnica de adición de peróxido de hidrogeno, los resultados positivos corresponden a terneros de 5 a 6 meses 30%, terneros de 0 a 2 meses 25% y terneros de 3 a 4 meses 0%. Observamos diferencia significativa entre los tres grupos etarios evaluados, con un Chi cuadrado de 0,0000 ($P < 0.05$).

Se observa que la presencia de esta enfermedad tiene una relación directa con la edad del animal, afectando en mayor proporción animales menores de 2 meses

Tercera: Se encontró que la frecuencia positiva utilizando la técnica de preparación de muestra extendido directo para la identificación de *Cryptosporidium* de acuerdo a sexo es de 44,4% para hembras y 38,5% para machos. No hay significancia entre terneros machos y hembras al tratamiento de muestras con extendido directo, con un Chi cuadrado de 0.11 ($P > 0.05$).

Para la técnica de concentración formol – acetato de etilo la positividad al diagnóstico de criptosporidiosis es mayor para hembras 38,9% y menor para machos 30,8%. No hay diferencia significativa entre terneros machos y hembras, con un Chi cuadrado de 0,217 ($P > 0,05$).

En la técnica de preparación de muestra adición de peróxido de hidrogeno, se determinó positividad de 16,7% para hembras y 15,4% para machos, observándose que no hay diferencia significativa entre terneros machos y hembras al tratamiento de muestras con agua oxigenada. Chi cuadrado 0,09 ($P > 0,05$).



RECOMENDACIONES

1. La identificación del parásito *Cryptosporidium spp*, utilizando la técnica de extendido directo en la preparación de la muestra y coloración de Zielh Nielsen modificado debería ser una herramienta de diagnóstico de *Cryptosporidium*, permanente en terneros.
2. Difundir la técnica de diagnóstico de *Cryptosporidiosis* mediante coloración de Zielh Nielsen modificado, en terneros.
3. La criptosporidiosis es una enfermedad que repercute en la eficiencia de ganancia de peso y crecimiento de los terneros de los hatos lecheros, es por ello que ha de considerarse de suma importancia continuar con su estudio en cuanto a un diagnóstico más eficaz mediante el pre tratamiento de las muestras antes de la coloración, para lograr identificar el agente causal y con ello disminuir la presentación de la enfermedad implementando un manejo adecuado al nacimiento.

PROPUESTA

“DIFUNDIR LA TÉCNICA DE DIAGNOSTICO DE CRIPTOSPORIDIOSIS MEDIANTE LA COLORACION DE ZIELH NIELSEEN MODIFICADO EN TERNEROS EN CAMANA”

1. Objetivos

a. Objetivo general

Difundir y capacitar a los profesionales y técnicos de campo dedicados a la ganadería lechera sobre la técnica de diagnóstico de criptosporidiosis mediante a coloración de Zielh Nielseen.

2. Antecedentes

a. Tinción de Zielh Nielseen

Se utiliza para coloración de microorganismos ácido-alcohol resistentes en muestras clínicas y/o a partir de cultivos microbianos.

La propiedad que presentan algunos microorganismos de resistir la decoloración con ácidos fuertes después de ser coloreadas con solución de fucsina caliente, permite reunir las bajo la denominación general de “ácido-resistentes” o “ácido-alcohol resistentes”.

La ácido-alcohol resistencia es la capacidad de incorporar ciertos colorantes y retenerlos después de someterlos a la acción de ácidos y alcohol y está determinada por la presencia en la pared celular de los ácidos micólicos que son ácidos grasos de cadenas ramificadas de alto peso molecular (60 a 70 átomos de carbono).

Los microorganismos “ácido-alcohol resistentes” (MAAR) se observan de color rojo al ser coloreados con los colorantes para Ziehl Neelsen, mientras

que otros gérmenes y células toman distintos tonos de azul debido al azul de metileno que se utiliza como colorante de contraste.

La coloración de Ziehl Neelsen constituye una técnica sencilla rápida y económica, de baja sensibilidad pero es una valiosa herramienta para detectar los casos de cryptosporidiosis.¹⁶

El diagnóstico se realiza mediante la identificación del parásito a partir de la observación de ooquistes de *Cryptosporidium spp* que se realiza a través de la técnica de tinción de Ziehl-Neelsen Modificado. Los ooquistes se observan como microorganismos esféricos u ovalados de 4 - 6 μm , de color rojo fucsia con algunas granulaciones oscuras en su interior, que contrastan con el fondo teñido de azul.⁵

Existen diferentes técnicas de preparación de la muestra antes del realizar la coloración de Ziehl Neelsen las cuales pueden mejorar la identificación del parásito, tales como la concentración mediante centrifugación por la técnica de formol - éter o formol - acetato de etilo, adición de peróxido de hidrogeno y el extendido directo de la muestra.

La concentración mediante centrifugación por la técnica del formol-eter o formol-acetato de etilo ha demostrado su eficacia en el procesamiento de las muestras. El tratamiento de las heces con agua oxigenada (a una concentración final de 5 volúmenes, durante 10 min) hace que todos los ooquistes sean ácido-alcohol resistentes y, por lo tanto, la sensibilidad de las tinciones puede incrementarse hasta 40 veces.⁶

3. Actividades

- a. Difundir la técnica de diagnóstico de cryptosporidiosis mediante coloración de Ziehl Neelsen

Se difundirá la técnica de diagnóstico de criptosporidiosis mediante la coloración de Ziehl Neelsen para la identificación de esta enfermedad

parasitaria como método de evaluación de la salud gastrointestinal de los terneros.

La técnica se caracteriza por ser rápida específica y económica lo que la califica como una herramienta útil para el trabajo en campo y así mejorar la eficiencia productiva de los establos.

- b. Capacitación a profesionales y técnicos sobre la técnica de diagnóstico de criptosporidiosis mediante coloración de Zielh Nielseen

En coordinación con profesionales veterinarios y técnicos agropecuarios de campo que se dedican a la práctica privada se organizara eventos de capacitación de la técnica de diagnóstico de criptosporidiosis mediante la coloración de Zielh Nielseen.

Con la participación de especialistas en sanidad animal se realizaran charlas sobre enfermedades parasitarias que alteran la eficiencia productiva del hato lechero.

En coordinación con el Ministerio de Agricultura, Comité Regional de Productividad Lechera se realizara un programa de asistencia técnica para el diagnóstico de criptosporidiosis en terneros.

- c. Informe y coordinación con La Microred de Salud Camaná Caraveli para informar sobre la problemática de zoonosis de la enfermedad

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

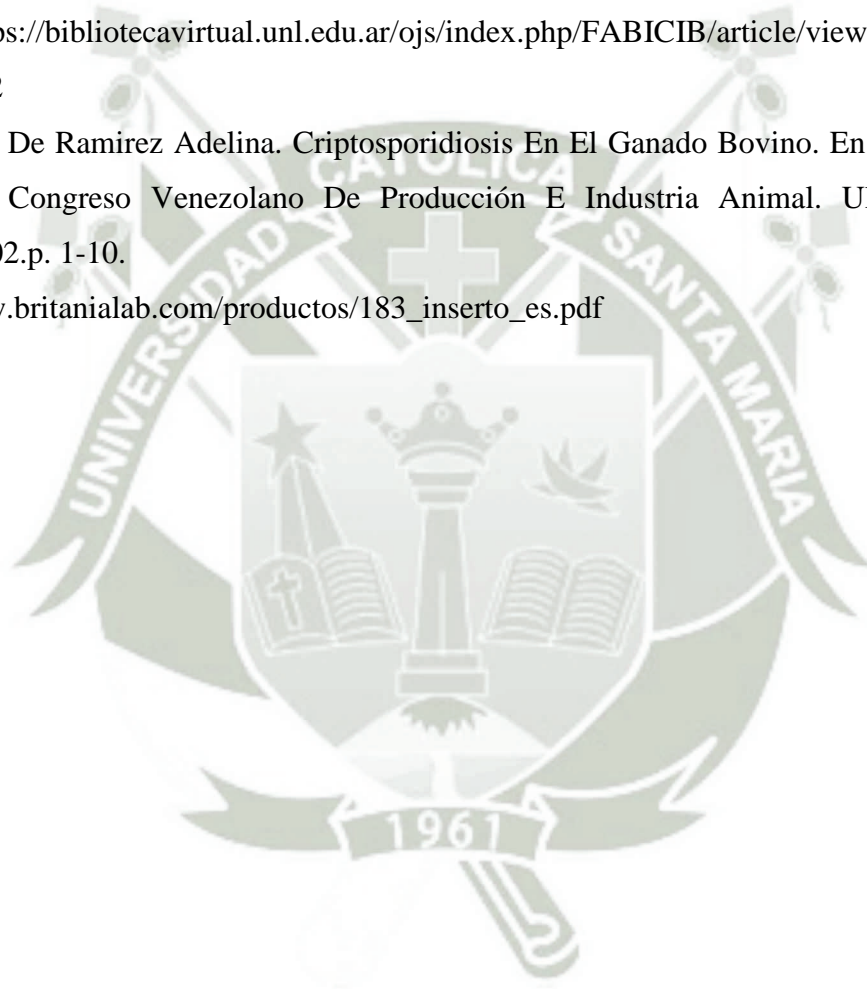
ACTIVIDADES	RESPONSABLES	SEMESTRES			
		1	2	3	4
Capacitación a profesionales y técnicos sobre el de diagnóstico de criptosporidiosis mediante coloración de Zielh Nielseen	Médicos Veterinarios	X			
Establecimiento del programa de asistencia técnica al ganadero	Ministerio de Agricultura y Comité Regional de Productividad Lechera		X	X	
Coordinación e información sobre problemática de zoonosis	Ministerio de Salud Red Camaná		X	X	
Monitoreo de los resultados	Médicos Veterinarios	X	X	X	X
Evaluación e informe final	Jefe de proyecto				X

BIBLIOGRAFIA

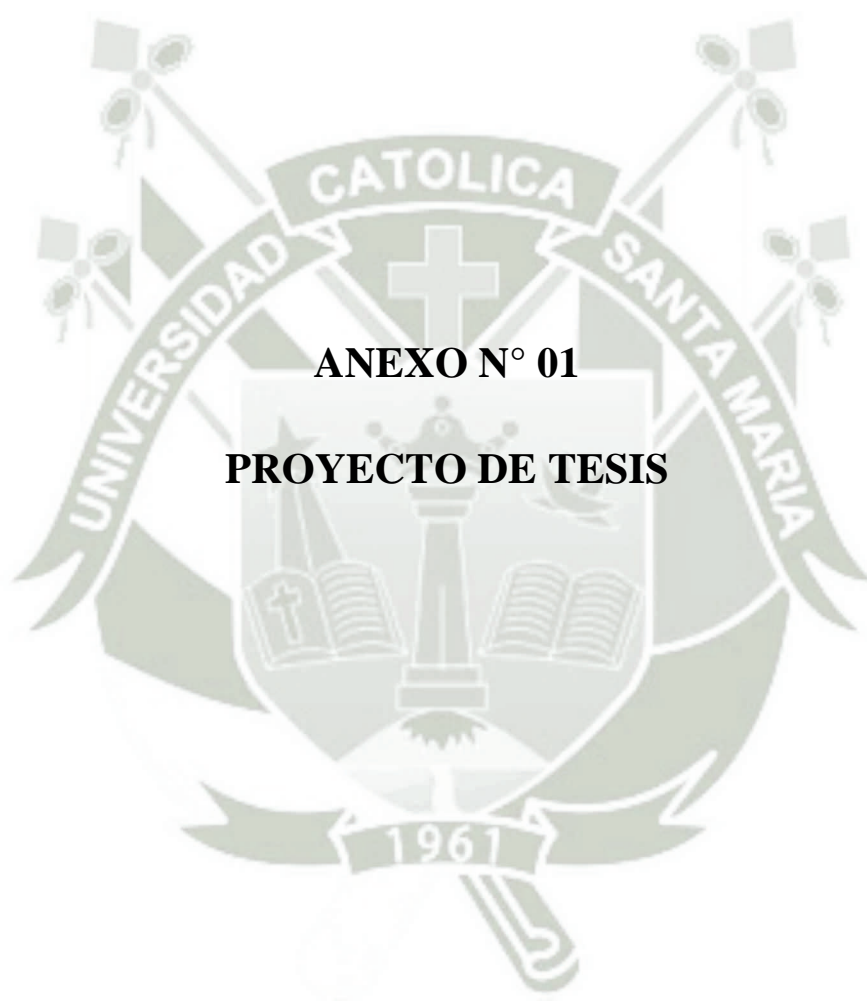
1. OIE.int [Internet]. Paris: web OIE.int; 2008 [actualizado mayo 2016; citado 25 Jun 2017]. Disponible en: http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.04.%20Criptosporidiosis.pdf
2. Ortega Mora L M, Gómez Bautista M y Rojo Vázquez F A. Cryptosporidiosis. En: Cordero del Campillo M. et al. Parasitología Veterinaria. 1° Ed. España Mc Gram-Hill Interamericana: 1999.p. 213- 221
3. Araujo Analía Vanesa, Gómez Muñoz María de los Ángeles, Milano Alicia María Francisca. Prevalencia de la infección por *Cryptosporidium* spp. en bovinos de dos establecimientos del Nordeste Argentino. REDVET [Internet]. 2011 [18 May 2017]; 12(10):1-10. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101011/101108.pdf>
4. Chirinos V. Ysamar Y., Rojas Marisela, Salinas Griseira, Bastidas P. Gilberto A y García G. Francisco. Frecuencia De Criptosporidiosis En Becerreros De Diez Fincas De La Zona Ganadera De Tucacas, Estado Falcón, Venezuela.. Rev. Fac. Cs. Vets. 2004; UCV. 45(1): 9-17. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/239601139_FRECUENCIA_DE_CRYPTOSPORIDIOSIS_EN_BECERREROS_DE_DIEZ_FINCAS_DE_LA_ZONA_GANADERA_DE_TUCACAS_ESTADO_FALCON_VENEZUELA
5. Molina M. Daniel, López U. Teresa, González Z. Armando, Gómez P. Luís, Pezo C. Danilo. *Cryptosporidium Parvum* Como Factor De Riesgo En La Diarrea Neonatal En Alpacas De Puno Rev Inv Vet Perú 2009; 20 (2): 263-269. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172009000200017&script=sci_arttext
6. Rodríguez Juan Carlos y Royo Gloria. Cryptosporidium y criptosporidiosis. SEIMC [Internet] 2000 [citado 15 Jun 2017]; disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/crypto.pdf>

7. Pinto de Almeida Castro A., Bilbao G., Echevarría H., Morán P., Catena M., Cacciato C. y Monteavaro C. Cryptosporidiosis: caracterización de la infección en terneros de rodeos lecheros. [Página principal en Internet]. Argentina: c2009. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/parasitarias_bovinos/131-Cryptosporidiosis.pdf
8. Surumay Queila, Sandoval Yoalis . *Cryptosporidium sp.* En bovinos juvenes de fincas del estado Zulia, Venezuela. Veterinaria Tropical [Internet]. 2000 [citado 12 May 2017]; 25(1): 73-80. Disponible en: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/VeterinariaTropical/vt2501/texto/qsumaray.htm
9. Avendaño Catalina, Amaya Álvaro, Bayona Martín. Caracterización epidemiológica de la criptosporidiosis en bovinos en la región Sabana Centro (Cundinamarca). Rev U.D.C.A Act. & Div. Cient. [Internet]. 2010 [citado 12 mayo 2017]; 13 (2): 109-116. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262010000200013
10. García Tapia Ana María, Gutiérrez del Álamo Clotilde Fernández, López García Carmen, García Martos Pedro, Marín Casanova Pilar. Brotes epidémicos de criptosporidiosis. SEIMC [Internet] 2003. [citado 15 Jun 2017] Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/Brotcripto.pdf>
11. Lippi Ortolani Enrico y Castro Soares Pierre. Aspectos epidemiológicos de la criptosporidiosis en becerros de rebaños lecheros. Parasitol Latinoam. Scielo [Internet]. 2003 [citado 15 Jun 2017]; 58: 122 - 127, disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-77122003000300006
12. Entrala E., Rueda-Rubio M. Janssen D. and Mascar C. Influence of Hydrogen Peroxide on Acid-fast Staining of *Cryptosporidium parvum* Oocysts. International Journal for Parasitology. Almeria, Spain [Internet] January 1996 [citado 15 Jun 2017]; 25(12):1473-7. Disponible en : https://www.researchgate.net/publication/14482370_Influence_of_hydrogen_peroxide_on_acid_fast_staining_of_Cryptosporidium_parvum_oocysts

13. Díaz de Ramírez A., Ramírez-Iglesia L. N., Morillo Luque J. G., Barreto Bastidas A. J. Infección Con *Cryptosporidium Sp.* y Su Asociación Con Diarrea En Becerras De Ganadería De Doble Propósito. Mundo Pecuario, III [Internet]. 2007 [citado 12 May 2017]; N° 2 y 3, 37-44. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/21988/2/articulo1.pdf>
14. Modini, L. B., Carrera, E., Otero, J. L., Zerbato, M. G., Eliggi, M. S., Vaira, S., Abramovich, B. L. Infección por *Cryptosporidium spp.* En ganado vacuno de la cuenca lechera de la provincia de Santa Fe Argentina. Revista FABICIB [Internet]. 2011 [citado 15 de Jun 2017]; vol. 15 págs. 97 a 107. Disponible en: <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar/ojs/index.php/FABICIB/article/viewFile/884/1312>
15. Diaz De Ramirez Adelina. Criptosporidiosis En El Ganado Bovino. En: Memorias XI Congreso Venezolano De Producción E Industria Animal. Ula Trujillo; 2002.p. 1-10.
16. www.britanialab.com/productos/183_inserto_es.pdf







**UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
ESCUELA DE POST GRADO
MAESTRIA EN PRODUCCION Y SALUD ANIMAL**



**DIAGNOSTICO DE CRIPTOSPORIDIOSIS MEDIANTE LA TINCION DE
ZIEHL NIELSEEN MODIFICADO, EN TERNEROS DE LECHERIA DE LA
ZONA GANADERA DE SAMUEL PASTOR – CAMANA- AREQUIPA - 2016**

**Proyecto de Tesis presentado por la Bachiller:
CECILIA MOGROVEJO LOPEZ
Para optar el Grado Académico de Magister en
Producción y Salud Animal.**

AREQUIPA

2016

I. PREAMBULO

La criptosporiosis es producida por protozoos parásitos del género *Cryptosporidium*, de los que hay 18 especies “válidas”. Se ha descrito que *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. baileyi*, *C. meleagridis* y *C. galli* producen mortalidad y brotes de enfermedad en el ganado. Para confirmar el diagnóstico, se requiere identificación en el laboratorio. La criptosporidiosis causada por *Cryptosporidium parvum* produce diarrea en mamíferos jóvenes no destetados, aunque los animales destetados y adultos también pueden infectarse. Los síntomas varían desde una infección leve y latente a diarreas graves, y los jóvenes, viejos o inmunodeprimidos son los más susceptibles. La mortalidad es baja. Generalmente, los animales destetados y los adultos infectados no manifiestan síntomas de la enfermedad, pero pueden excretar ooquistes que contaminan el medio. La criptosporidiosis por *Cryptosporidium andersoni* afecta a las glándulas digestivas del rumen de terneros mayores y de ganado adulto. (1)

En todas las especies domésticas, los animales que se encuentran en lactación son los más susceptibles a la infección. (2)

Durante los últimos años la criptosporidiosis en ganado bovino, causada por *Cryptosporidium parvum* ha sido catalogada como una importante enfermedad entérica, con severas implicaciones en la salud y con efectos negativos en la industria ganadera al causar disminución de la ganancia de peso y mortalidad. (3)

Cryptosporidium parvum produce diarrea de consistencia pastosa a acuosa de color amarillento y de pésimo olor, conteniendo leche no digerida, sangre, moco y bilis en terneros de 1 a 4 semanas de edad.

Los animales afectados pierden el apetito, se observan decaídos, manifiestan fiebre (hasta 40°) y deshidratación. Cuando el protozoario es el único agente involucrado en el cuadro diarreico este es moderado y de baja mortalidad. En aquellos casos de infección mixta (*Escherichia coli*, *Rotavirus*, etc.) el pronóstico es desfavorable. Los terneros de 6 a 8 semanas tienen síntomas menos severos o

prolongados y los mayores a esta edad adquieren cierta resistencia a la infección.
(4)

El ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. es similar al de otros coccidios. Todas las etapas de desarrollo endógeno (asexual y sexual) del parásito, ocurren en la superficie apical de los enterocitos, dentro de una vacuola parasitófora en posición intracelular pero extracitoplasmática, culminando con la formación del ooquiste, estado infectivo del parásito, que se elimina en grandes cantidades con las heces y es capaz de sobrevivir durante largos periodos en el ambiente. (5)

La Identificación del Parásito: El diagnóstico de ooquistes de *Cryptosporidium* spp se realiza a través de la técnica de tinción de Ziehl-Neelsen Modificado. Los ooquistes se observan como microorganismos esféricos u ovalados de 4 - 6 μm , de color rojo fucsia con algunas granulaciones oscuras en su interior, que contrastan con el fondo teñido de azul. (6)

La Criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria que tiene gran impacto en la economía de los países, ya que afecta el desarrollo y crecimiento del bovino, específicamente en los neonatos, pudiendo incluso producir su muerte. Además, puede ser transmitida al hombre, por lo que se considera un problema de gran importancia en sanidad animal y salud pública. (3)

En los niños, *Cryptosporidium* sp es la tercera causa de diarrea infecciosa, generalmente después de los *rotavirus* y de *Escherichia coli*. (2)

Si bien el riesgo de infección a través de alimentos no debe ser descartado es, sin dudas, el agua contaminada con heces humanas o animales, la vía más importante de transmisión ambiental. (7)

II. PLANTEAMIENTO TEORICO

1. PROBLEMA DE INVESTIGACION

1.1 ENUNCIADO DEL PROBLEMA

DIAGNOSTICO DE CRIPTOSPORIDIOSIS MEDIANTE LA TINCION DE ZIEHL NIELSEN MODIFICADO EN TERNEROS DE LECHERIA DE LA ZONA GANADERA DE SAMUEL PASTOR – CAMANA- AREQUIPA - 2016

1.2 DESCRIPCION DEL PROBLEMA

1.2.1 AREA DE CONOCIMIENTO A LA QUE PERTENECE

El área de investigación del presente trabajo es: Sanidad Animal, Diagnostico de Laboratorio, Enfermedades Parasitarias de rumiantes, Criptosporidiosis.

1.2.2 ANALISIS Y OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES

VARIABLE	INDICADOR	SUBINDICADOR	TECNICA
Diagnóstico de criptosporidiosis	Extendido directo	Terneros de 0 a 2 meses hembras y machos Terneros de 2 a 4 meses hembras y machos Terneros de 4 a 6 meses hembras y machos	Coloración Ziehl Nielsen modificado
	Concetracion Formol/acetato de etilo	Terneros de 0 a 2 meses hembras y machos Terneros de 2 a 4 meses hembras y machos Terneros de 4 a 6 meses hembras y machos	Coloración Ziehl Nielsen modificado
	Adicion de peróxido de hidrogeno	Terneros de 0 a 2 meses hembras y machos Terneros de 2 a 4 meses hembras y machos Terneros de 4 a 6 meses hembras y machos	Coloración Ziehl Nielsen modificado

		machos	
--	--	--------	--

1.2.3 INTERROGANTES DE INVESTIGACION

Las interrogantes a responder en el presente trabajo son:

- ¿Qué relación existe entre edad de los animales y presencia de criptosporidiosis?
- ¿Qué relación existe entre sexo de los animales y presencia de criptosporidiosis?
- ¿Qué relación existe entre la preparación de la muestra y el diagnóstico de Criptosporidiosis?

1.2.4 TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACION

El tipo y nivel de investigación es: Investigación Científica Descriptivo Analítico.

Los indicadores para determinar el diagnóstico de la parasitosis es la presencia o ausencia de los ooquistes de *Cryptosporidium spp* en las muestras de heces procesadas.

1.3 JUSTIFICACION DEL PROBLEMA

La crianza de vacunos de leche busca conseguir una mayor rentabilidad de la explotación, siendo la etapa de recría un factor importante dentro de la producción de ganado lechero. Considerando que la Criptosporidiosis una enfermedad parasitaria causante de cuadros entéricos autolimitantes, especialmente en terneros lactantes; los cuales ocasionan pérdida de la condición corporal, retraso en el crecimiento lo cual influye en pérdidas económicas importantes para el productor durante esta etapa de desarrollo del animal.

No suele realizarse un diagnostico eficiente de la presencia de este parásito, por lo tanto los tratamientos que se aplican ya sean antibióticos como antiparasitarios son inespecíficos para la misma. Con lo que se incrementan las pérdidas económicas por tratamientos infructuosos.

Además de ser una enfermedad zoonótica debemos considerar la posibilidad de que los animales actúen como fuente de infección, llegando el parásito a la población humana a través de los alimentos y el agua contaminados con las heces de los animales. Por lo cual se hace necesario la determinación de un adecuado diagnóstico de Criptosporidiosis para establecer en qué grado se encuentran afectados los animales y con ello establecer planes de higienización y control de la enfermedad.

La importancia del presente trabajo de investigación es establecer el método más adecuado para el diagnóstico de criptosporidiosis como una causa más de desequilibrio en la salud de los vacunos.

2. MARCO CONCEPTUAL

2.1 CRIPTOSPORIDIOSIS

La criptosporidiosis es una infección causada por protozoo del género *Cryptosporidium* que colonizan las células epiteliales, especialmente las que se encuentran a lo largo del tracto digestivo de un amplio rango de vertebrados. (8)

2.2 ETIOLOGIA

Taxonomía

La criptosporidiosis está causada por protozoos parásitos del género *Cryptosporidium* (familia Cryptosporidiidae, orden Eucoccidiorida, subclase Coccidiasina, clase Sporozoasida, filum Apicomplexa). Aunque se han descrito más de 20 “especies” de este parásito en función de los hospedadores animales de los que se aíslan, la especificidad del hospedador como criterio de especificación parece mal fundamentada, ya que algunas “especies” carecen de tal especificidad.

La definición de especie y la identificación de este género están en constante cambio, con la adición de “nuevas” especies basada principalmente en criterios moleculares.

En la actualidad, hay 18 especies “válidas” (cuadro N° 01): *C. hominis*, encontrado fundamentalmente en humanos (previamente conocido como *C. parvum* Tipo 1); *C. parvum*, en humanos y otros mamíferos (previamente conocido como *C. parvum* Tipo 2); *C. andersoni* y *C. bovis*, en ganado vacuno; *C. canis*, en perros; *C. muris*, en ratones; *C. felis*, en gatos; *C. wrairi*, en cobayas; *C. suis*, en cerdos; *C. meleagridis*, en pavos y en humanos; *C. baileyi*, en pollos; *C. galli*, en gallinas adultas y en algunas aves silvestres (Se ha descrito que *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. baileyi* y *C. meleagridis* producen morbilidad y brotes de enfermedad en el ganado. Para confirmar el diagnóstico se requiere la identificación en el laboratorio. (1)

CUADRO N° 01. ALGUNAS DIFERENCIAS ENTRE ESPECIES DEL

Especies	Dimensiones del ooquiste (um)	Lugar de infección	Principal hospedador	Infección para humano
<i>C. hominis</i>	4.5 x 5.5	Intestino delgado	Humanos	Si
<i>C. parvum</i>	4.5 x 5.5	Intestino delgado	Mamíferos de cría neonatos,	Si
<i>C. suis</i>	5.05 x 4.41	Intestino delgado	Humanos	Si
<i>C. felis</i>	4.5 x 5.0	Intestino delgado	Cerdos	Si
<i>C. canis</i>	4.95 x 4.71	Intestino delgado	Gatos	Si
<i>C. meleagridis</i>	4.5–4.0 x 4.6–5.2	Intestino	Perros	Si
<i>C. muris</i>	5.5 x 7.4	Estomago	Pavos	Si
<i>C. andersoni</i>	5.6 x 7.4	Estomago	Roedores	No
<i>C. wrairi</i>	4.0-5.0 x 4.8-5.6	Intestino Delgado	Ganado	No
<i>C. bovis</i>	4.7-5.3 x 4.2-4.8	Intestino Delgado	Cobayos	No
<i>C. baileyi</i>	4.6 x 6.2	Tráquea, bursa, cloaca	Vacunos Aves de corral	No

GÉNERO CRYPTOSPORIDIUM

Fuente: adaptado de:

http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.04.%20Criptosporidiosis.pdf

2.3 LOCALIZACIÓN DEL HOSPEDADOR

Se localiza en el intestino delgado con especial predilección por las partes terminales del yeyuno e íleon, también puede afectar el intestino grueso. Ocasionalmente se ha encontrado en estómago, vesícula biliar, hígado, páncreas útero, tráquea, pulmones, corazón, vías urinarias y conjuntivas.

Los estados endógenos se sitúan en el borde luminal de los enterocitos, localización definida como intracelular pero extracitoplasmática. (9)

2.4 CICLO BIOLÓGICO

El Ciclo Biológico es monoxeno y todas sus fases asexuadas y sexuadas ocurren en el mismo hospedero.

En los rumiantes domésticos, el ciclo comienza con la ingestión seguida por el desenquistamiento en el tracto gastrointestinal del hospedador. La temperatura corporal, las sales biliares y posiblemente la tripsina son los factores que más influyen en esta fase. Una vez liberados los esporozoitos alcanzan el borde luminal de los enterocitos mediante movimientos de contracción extensión y deslizamiento. Allí se invaginan siendo englobados por la membrana de la célula hospedadora, que encapsula al parásito en el interior de una vacuola parasitofora. (9)

DESCRIPCIÓN DE LA FIGURA N° 01

1. Ingestión oral de los **esporocistos**. Los **ooquistes** se transforman en esporocistos por transformación de su pared. Estos esporocistos contienen **4 esporozoitos**.
- 2.-8. *Esquizogonia*: Los **esporozoitos** se adhieren a la superficie del intestino se desarrollan en el interior de una vacuola específica y se transforman en **esquizontes** (4) de **8 merozoitos** (8). Estos merozoitos pueden adherirse a su vez a otras células intestinales no infectadas e iniciar un nuevo proceso de *esquizogonia* (2-8).
- 9.-12. *Gametogonia*: Formación del **macrogamonte** (10, 11) y del **microgamonte** con **16 microgametos** (9.1, 9.2); el **zigoto** produce una pared y se convierte en **ooquiste** (12).
- 13.-16. *Esporogonia*: Producción de **esporocistos**. El proceso se puede desarrollar de dos maneras (13, 15). **Autoinvasión final**: el ooquiste se transforma aun en el intestino en un esporocisto, que eventualmente puede liberar esporozoitos (14) e iniciar un nuevo proceso de esquizogonia (2, 8) en el mismo hospedero. (Infección masiva). Estos esporocistos también pueden ser eliminados con las heces (13.1, 16).
- 15.-16. Los ooquistes (12) pueden eliminarse también sin esporular, desarrollándose los esporocistos infecciosos en el medio ambiente. (10)

2.5 EPIDEMIOLOGIA

Distribución geográfica y prevalencia

La distribución de la criptosporidiosis en rumiantes domésticos es cosmopolita. La criptosporidiosis afecta el ganado bovino de carne y de leche y la prevalencia de la infección en terneros con diarrea es de 10 – 80%. La prevalencia en rebaños se ha calculado en un 59% y el número de terneros infectados en torno al 22%. (9)

En América Latina, Colombia, se determinó la más alta prevalencia de criptosporidiosis bovina (87%) (Vergara et al., 1999), en contraste con

México, Brasil y Perú que muestran prevalencias de 25%, 9,75% y 26%, respectivamente (Nevarez et al., 1999; Oliveira, 2000; Rojas, 2002). En Venezuela, la información sobre criptosporidiosis bovina es limitada, solo se tienen registros de los estados Falcón, 42,86% (Chirinos et al., 1996, datos no publicados); Monagas 30,1% (Surumay y Alfaro, 1999); Zulia, 32% (Surumay y Sandoval, 2000) y 50,8% (Valera et al., 2001) y Táchira, 53,84% (González y Moreno, 2003). (3)

2.6 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRESENTACION DE LA CRIPTOSPORIDIOSIS

2.6.1 Resistencia de los oocistos

Los oocistos de *Cryptosporidium* son infectantes en el momento de ser excretados con las heces y están perfectamente adaptados para la supervivencia en el ambiente siendo muy resistentes a las condiciones variables de éste con la única excepción de la desecación y la congelación.

Los oocistos son capaces de conservar su infectividad durante 2 a 6 meses a 4°C sin embargo estas se alteran por el calor (60 5°C durante 30 minutos) o por el frío (-18°C durante 24 horas).

La estrategia de control mediante desinfección por medios químicos ha chocado con la extraordinaria resistencia de los oocistos. El hidróxido amónico al 5% o la formalina al 10% son eficaces actuando ente 18 a 24 horas.

Su hallazgo frecuente en agua para consumo humano evidencia que los métodos habituales de filtración, floculación, sedimentación y desinfección no son completamente eficaces en la separación o inactivación de los oocistos. (9)

2.6.2 Dosis infectantes

La comparación entre infección natural e infección experimental con una dosis conocida ha demostrado que los patrones de la infección (prepatencia, patencia y eliminación de ooquistes) son similares en ambas. La infección no es dependiente de la dosis infectante, sin embargo el periodo de prepatencia se alarga en infecciones experimentales con dosis bajas. (9)

2.6.3 Especie hospedadora

La presencia de signos clínicos acompañando la infección se presenta con mayor frecuencia en los rumiantes domésticos y en el hombre. Por el contrario la infección en roedores y lagomorfos solo parece acompañarse de eliminación de ooquistes, pero sin presentación de sintomatología. (9)

2.6.4 Estado inmunitario

De importancia solo en los seres humanos inmunocomprometidos o inmunocompetentes. (9)

2.6.5 Calostro

Los anticuerpos calostrales producidos en respuesta a la infección natural no tienen un efecto protector frente a la infección neonatal en terneros y corderos. Sin embargo el calostro hiperinmune producido por inmunización de las madres con altos títulos de anticuerpos específicos puede proteger de manera parcial, frente a la infección, disminuyendo el periodo de duración de la diarrea y la eliminación de ooquistes. (9)

2.6.6 Edad

Se ha observado una menor receptividad a la infección en los rumiantes domésticos a medida que aumenta la edad. En condiciones naturales el binomio infección – diarrea se presenta con mayor frecuencia en la segunda semana de vida

puede existir eliminación de ooquistes por rumiantes adultos sin que presenten sintomatología. (9)

2.7 SINGNOS CLINICOS

La criptosporidiosis por *Cryptosporidium parvum* origina diarreas en el ganado joven de granja no destetado que incluye terneros, corderos, cabritos y alpacas. Las fases endógenas infectan a los enterocitos de la porción distal del intestino delgado, el ciego y el colon. Los mayores cambios patológicos asociados con la enfermedad son la atrofia de las vellosidades intestinales, el acortamiento de las vellosidades y la disgregación de los enterocitos, los animales afectados se recuperan a las dos semanas de mostrar síntomas de la enfermedad. Los animales destetados y adultos también pueden resultar infectados. Los síntomas pueden variar desde una infección moderada o asintomática en animales adultos a diarreas graves en animales jóvenes. La mortalidad es baja excepto si ocurre una infección asociada con otros patógenos entéricos, tales como el *rotavirus*, *E. coli*. Los animales adultos pueden excretar ooquistes que pueden transmitirse a otros hospedadores susceptibles.

Las infecciones del ganado vacuno por *Cryptosporidium parvum* pueden producir diversos grados de deshidratación, inactivación, anorexia, fiebre y deterioro del estado físico. La mortalidad puede ser alta.

Raramente producen la deshidratación aguda, el colapso y la elevada mortalidad que se observan con *Escherichia coli enterotoxigénica* o con el *rotavirus*, que pueden ocurrir en paralelo. Se pueden detectar ooquistes en hospedadores clínicamente normales y en enfermos. Los terneros y los corderos con diarrea pueden excretar entre 10^6 y 10^8 ooquistes por g de heces. El ganado adulto infectado excreta menor cantidad de ooquistes, aunque en infecciones subclínicas pueden generar concentraciones similares de ooquistes en un periodo de 12 meses.

Cryptosporidium andersoni coloniza las glándulas digestivas del rumen de terneros mayores y del ganado adulto.

Los microvilli de las glándulas pépticas son destruidos por las fases endógenas, lo que puede explicar la elevada concentración de pepsinógeno detectada en el plasma de los hospedadores infectados. El ganado adulto no desarrolla diarrea, pero puede excretar ooquistes durante varios meses. (1)

2.8 TRANSMISIÓN

La transmisión puede producirse por cualquier vía de ingestión de material contaminado con ooquistes viables excretados por individuos infectados. Entre las prácticas más probables para aumentar la difusión de la criptosporidiosis están la cría de terneros, cabritos y corderos caseros y la alimentación y la cría comunal de neonatos, donde los animales jóvenes susceptibles están en contacto unos con otros y con las heces de animales infectados.

De forma similar, la eliminación de las heces, el abono de granjas u otros desechos contaminados acumulados sobre el terreno, cuando van seguidos de períodos de lluvias persistentes, puede provocar la contaminación del curso del agua por los ooquistes de *C. parvum*. Estas trayectorias se pueden utilizar como fuente de agua para otros animales, y de agua potable para el consumo humano. Los desechos contaminados incluyen tanto productos líquidos como sólidos derivados de la cría de animales. (1)

2.9 ZOONOSIS

La criptosporidiosis es una enfermedad que se transmite de forma horizontal, una de las principales maneras de contraerla es el contacto con animales, este mecanismo de transmisión se ha asociado directamente con procesos zoonóticos por medio de estudios epidemiológicos, donde han estado involucrados trabajadores veterinarios que están en constante contacto con animales infectados y que posteriormente han desarrollado la patología. (11)

Dentro de las principales especies de *Cryptosporidium* spp. asociadas a problemas zoonóticos reportadas en la literatura, se encuentran *C. parvum*,

C. hominis, *C. muris*, *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. suis*, y *C. baileyi*.
(11)

2.10 DIAGNOSTICO

La detección de ooquistes de especies de *Cryptosporidium* o antígenos, en una muestra recogida y manipulada adecuadamente es suficiente para el diagnóstico positivo, y los métodos preferidos para la recogida de las muestras no son invasivos. No existen técnicas de cultivo in-vitro reproducibles y disponibles para amplificar el número de parásitos antes de la identificación, por lo que los métodos elegidos son la detección de los ooquistes (el estadio de transmisión), del antígeno de *Cryptosporidium* y/o del ADN a partir de las heces o de líquidos corporales adecuados. Además de estas pruebas, se puede utilizar la tinción de hematoxilina y eosina para una confirmación histológica del diagnóstico post mórtem, es útil para el diagnóstico confirmativo.

Se pueden realizar análisis adicionales para la identificación de especies y/o del subtipo de *C. parvum* con el ADN de *Cryptosporidium* mediante técnicas moleculares, como la PCR y/o la secuenciación de los productos amplificados de zonas genéticas definidas. Esto no solo confirma el diagnóstico sino que permite discriminar más de lo que es posible mediante morfología o morfometría en la que se utiliza el microscopio. (1)

Las propiedades diagnósticas de los ooquistes de *C. parvum* observables en suspensión, utilizando microscopía de contraste interdifereencial de Nomarski (DIC), son las siguientes. Los ooquistes son lisos, con pared celular gruesa, sin color, con formas esféricas o ligeramente ovoides que cuando están desarrollados (esporulados) contienen cuatro esporozoitos alargados libres (es decir, no contenidos en un esporocisto) y un cuerpo citoplasmático residual. El tamaño medio de los ooquistes de *C. parvum* es de $4,5 \times 5,0 \mu\text{m}$ (rango de 4–6 μm). (1)

2.11 DEMOSTRACIÓN EN LAS HECES

Las muestras fecales de los animales clínicamente más enfermos contienen un gran número de ooquistes con paredes celulares engrosadas y suficiente antígeno de *Cryptosporidium*, por lo que el empleo de técnicas estándar de tinción e inmunológicas deben dar un diagnóstico positivo. Se desconoce el número de animales excretadores clínicamente normales y, dada la insensibilidad de los métodos convencionales, los que excretan pocos ooquistes pueden no ser diagnosticados por tales técnicas, debido a que el número de ooquistes está por debajo de sus límites de detección. (1)

En animales con enfermedad clínica, los ooquistes se detectan por lo general en frotis de muestras sin concentrar. La utilización de un método de concentración de ooquistes aumenta la frecuencia de detección. Tanto los métodos de flotación, preferentemente, como los de sedimentación son adecuados para concentrar ooquistes de *Cryptosporidium spp.*, y los antígenos de los ooquistes pueden buscarse en las heces después de estos procedimientos de concentración. Podrían no detectarse los ooquistes en las muestras clínicas de todos los casos de criptosporidiosis, y la ausencia de ooquistes en repetidas presentaciones de las muestras de hospedadores sintomáticos, no indica necesariamente la ausencia de infección. En estos casos, y particularmente cuando la sospecha clínica es alta, las muestras de heces negativas de ooquistes deben someterse a la detección de antígeno y/o la detección basada en la PCR, ya que en las heces debe encontrarse suficiente antígeno o ADN de *Cryptosporidium* procedentes de formas correspondientes al ciclo de vida asexual. (1)

La Identificación del Parásito: El diagnóstico de ooquistes de *Cryptosporidium spp* se realiza a través de la técnica de tinción de Ziehl-Neelsen Modificado 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 azul. (6)

2.12 COLORACION ZIEHL-NEELSEN MODIFICADO (12)

Se utiliza para coloración de microorganismos ácido-alcohol resistentes en muestras clínicas y/o a partir de cultivos microbianos.

Fundamento

La propiedad que presentan algunos microorganismos de resistir la decoloración con ácidos fuertes después de ser coloreadas con solución de fucsina caliente, permite reunirlos bajo la denominación general de “ácido-resistentes” o “ácido-alcohol resistentes”.

La ácido-alcohol resistencia es la capacidad de incorporar ciertos colorantes y retenerlos después de someterlos a la acción de ácidos y alcohol y está determinada por la presencia en la pared celular de los ácidos micólicos que son ácidos grasos de cadenas ramificadas de alto peso molecular (60 a 70 átomos de carbono).

Los microorganismos “ácido-alcohol resistentes” (MAAR) se observan de color rojo al ser coloreados con los colorantes para Ziehl Neelsen, mientras que otros gérmenes y células toman distintos tonos de azul debido al azul de metileno que se utiliza como colorante de contraste.

La coloración de Ziehl Neelsen constituye una técnica sencilla rápida y económica, de baja sensibilidad pero es una valiosa herramienta para detectar los casos de criptosporidiosis

3. ANTECEDENTES DE INVESTIGACION

3.1 Pinto De Almeida Castro A., et al. 2009.

La cryptosporidiosis es una zoonosis parasitaria cosmopolita. En Argentina estudios realizados en 1989, describe al *Cryptosporidium spp.* como el agente causal de diarrea neonatal en un 69,7 % de los rodeos lecheros (Bellinzoni et al 1990). Este coccidio coloniza las microvellosidades intestinales por lo tanto se asocia con cuadros de diarrea, deshidratación y cólicos. Los objetivos del trabajo son caracterizar la evolución de la cryptosporidiosis en terneros desde el nacimiento hasta los 37 días de edad; describir la concordancia entre la presencia de ooquistes con las características de la materia fecal y considerar a la vaca como fuente de contagio. Para complementar estos objetivos se realizó un seguimiento de 15 terneros Holando Argentino, criados en guachera en forma individual en condiciones de campo, alimentados con sustituto lácteo, concentrado comercial, agua a discreción y forraje fresco. Diariamente se observaron las deposiciones clasificándolas según su consistencia. Además se tomó muestras de materia fecal de 13 vacas (madres de los terneros) entre 12 y 24 horas postparto. Las muestras de materia fecal de los terneros y de las madres se recolectaron directamente del recto. A partir de estas se realizaron frotis y coloración Kinyoun. Se efectuó un análisis semi cuantitativo en 25 campos de 40X. Los resultados positivos a *Cryptosporidium* fueron de un 77 % para las madres y un 93,4 % para los terneros; observándose el mayor porcentaje de terneros positivos y con elevados conteos en la segunda semana de vida coincidiendo con signos de diarrea, presencia de moco y sangre en las heces. Se detectaron protozoarios a partir del primer día de vida. De acuerdo con los resultados obtenidos, las madres en el periparto revelan su condición de portadoras y fuente de infección de los neonatos desde el primer día de vida. La segunda semana de vida es la de mayor incidencia coincidente con los episodios diarreicos. (4)

3.2 Araujo Analía Vanesa, Gómez Muñoz María de los Ángeles, Milano Alicia María Francisca. 2011.

Con la finalidad de evaluar la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. En bovinos se desarrolló una investigación en dos unidades de producción del Nordeste Argentino (SC y PL). Se evaluaron parasitológicamente 107 individuos, con edades comprendidas entre 20 días y 2 años, con y sin diarrea, 44 individuos pertenecientes al establecimiento SC y 63 a PL. Se obtuvieron muestras fecales, las que fueron analizadas individualmente mediante frotis coloreados con la técnica de Ziehl- Neelsen modificada y observadas a una magnificación de 1000x. El 27,1% (29/107) de las muestras examinadas presentó ooquistes de *Cryptosporidium* spp. En el establecimiento de SC, la prevalencia fue 29,5%, mientras que en el de PL fue 25,3%. El grupo etario “lactantes” presentó la mayor prevalencia en ambas unidades de producción, verificándose una asociación estadísticamente significativa entre la excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y la edad de los animales. Se observa una prevalencia levemente mayor en los machos respecto a las hembras y en las heces diarreicas respecto a las no diarreicas, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. (5)

3.3 Díaz de Ramírez A., Ramírez-Iglesia L. N., Morillo Luque J. G., Barreto Bastidas A. J. 2007.

La presencia de *Cryptosporidium* sp. y su asociación con diarrea fue determinada en 31 becerros mestizos de ganadería de doble propósito (*Bos taurus* x *Bos indicus*) nacidos durante cuatro meses consecutivos en una finca comercial. Durante el primer mes de vida fueron colectadas cuatro a cinco muestras fecales por becerro, para un total de 140, las cuales fueron procesadas por el método de centrífugo-flotación con NaCl y coloreadas con carbol-fucsina. Los resultados mostraron que todos los becerros adquirieron la infección antes de los 15 días de edad, observándose asociación altamente significativa ($P < 0,01$) entre la edad de los animales y la infección con *Cryptosporidium* sp. El 47,1% (66/140) de las muestras fueron de consistencia líquida y semilíquida, de estas, el 84,8% (56/66) exhibieron ooquistes de *Cryptosporidium* sp., en contraste, solo el 33,8% (25/74) de las

muestras de consistencia normal presentaron dichas formas, observándose una asociación altamente significativa entre infección con *Cryptosporidium* sp. y la consistencia de las heces ($P < 0,01$). El riesgo de manifestar diarrea para los becerros infectados con *Cryptosporidium* sp fue 2,51 veces mayor comparado con los no infectados. Los casos de diarrea predominaron entre los 4-14 días de edad de los becerros. Aunque en todas las edades el porcentaje de muestras diarreicas fue mayor entre las positivas, solo en las tres primeras colectas existe una asociación significativa ($P < 0,05$) entre infección por *Cryptosporidium* sp y diarrea. Por consiguiente, el riesgo de presentar diarrea entre los becerros infectados, fue significativamente mayor para los <15 días de edad. (13)

3.4 Chirinos V. Ysamar Y., Rojas Marisela, Salinas Griseira . Bastidas P. Gilberto A y García G. Francisco. 2004

Se determinó la frecuencia de *Cryptosporidium parvum* en becerros y su relación con edad, sexo y condiciones sanitarias de diez fincas de la zona ganadera de Tucacas, estado Falcón – Venezuela, con la finalidad de aportar información sobre esta enfermedad, poco abordada en el país. Se trató de una investigación descriptiva de corte transversal. La muestra estuvo conformada por 152 bovinos de tres días de nacidos a seis meses de edad de ambos sexos, se recolectó muestra fecal mediante estimulación rectal, el diagnóstico se hizo a través de las técnicas de Zielh – Neelsen modificada y de flotación con solución de sacarosa de Sheather. *Cryptosporidium parvum* fue encontrado en 31 becerros, con frecuencia de 24% en el grupo entre tres días y dos meses, del 16,7% en los becerros entre tres y cuatro meses y de 18,2% en los animales entre cinco y seis meses; no se evidenció diferencia significativa entre sexo e infección. La mayor frecuencia de *Cryptosporidium parvum* se ubicó en las fincas con corrales en malas condiciones.

Se concluye que la infección causada por este enteropatógeno fue frecuente en los becerros de menor edad, surgiendo la posibilidad de infección inmediata al nacimiento. Igualmente, una inadecuada condición higiénica es una condición de riesgo que favorece la transmisión. Esta situación afecta la

salud de los animales de reemplazo y acarrearía importantes pérdidas económicas en los sistemas de producción de ganadería bovina. (3)

3.5 Surumay Queila y Sandoval Yoalis. 2000.

Por primera vez se reseña la presencia de *Cryptosporidium sp.* en bovinos de corta edad, de los municipios Mara y Páez del estado Zulia, luego de analizar 262 muestras fecales de animales de edades comprendidas entre 1 semana y 2 años de edad. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Parasitología del CIAE-Zulia, por medio de la técnica de Kinyoun. Se determinó la ocurrencia de la enfermedad, ocasionada por *Cryptosporidium sp.*, en 58 animales (22,1%) que presentaban diarrea y bajo peso corporal; 48,3% de estos animales tenían menos de 4 semanas de edad y 51,7% entre 4 y 24 semanas. De este patógeno, emergente y frecuente en Venezuela, se han determinado prevalencias de 32%, por lo que se considera de importancia su estudio por constituir un problema en Salud Pública. (14)

3.6 Avendaño Catalina, Amaya Álvaro, Bayona Martín. 2010.

Para contribuir al conocimiento de la criptosporidiosis, comprender la prevalencia de *Cryptosporidium spp.* en terneros y asociar la presencia de ooquistes a diferentes factores ambientales, se realizó un estudio, en el cual, se recolectaron 151 muestras de heces de terneros, de hasta un mes de nacidos, en la región Sabana Centro (Cundinamarca). Para identificar los ooquistes de *Cryptosporidium spp.*, se empleó la técnica de Ziehl Neelsen modificada. El 22% de las muestras fue positivo y en el 83% de las fincas había, al menos, un animal infectado. El análisis estadístico mostró una asociación entre la consistencia de la materia fecal y la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium spp.* ($X^2 16,3; p < 0,01$). La fuente de agua de las fincas reveló una asociación estadísticamente significativa, cuando se comparó con la presencia de ooquistes en las heces ($x^2 11,79; p < 0,008$), siendo un factor de riesgo el agua de acueducto; contrario a lo esperado, el agua tratada mostró tener un efecto protector. Así mismo, se consiguió una relación estadísticamente significativa entre el tipo de alojamiento y la presencia de ooquistes ($x^2 7,23; p < 0,02$), con una mayor probabilidad de

hallar ooquistes en los animales que estaban en estaca que en aquellos que permanecían estabulados ($OR > 4,03$). Los resultados obtenidos confirman que la infección por *Cryptosporidium spp.* está ampliamente distribuida en los hatos lecheros de la zona geográfica de estudio. (15)

4. OBJETIVOS

- Determinar la técnica de preparación de muestras más adecuada para el diagnóstico de Criptosporidiosis con el método de Tinción Ziehl Nielsen modificado
- Determinar la presencia de Criptosporidiosis por edades en terneros de 0 a 6 meses
- Determinar la presencia de Criptosporidiosis por sexo en terneros

5. HIPOTESIS

Dado que la criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria importante que afecta terneros, principalmente en la etapa de lactación y que el diagnóstico de laboratorio indicado es el uso de la técnica de Ziehl Neelsen Modificado.

Es probable que se encuentre la presencia de este enteroparásito, *Cryptosporidium spp.* causante de afecciones gastrointestinales utilizando diferentes tratamientos en la muestra antes de la coloración.

I. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1. TECNICAS INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACION

1.1 TECNICAS

A. Metodología Análisis de Laboratorio

i. Coloración Ziehl Neelsen

Contenido y composición

- Fucsina para Ziehl Neelsen: Carbolfucsina: solución de fucsina fenicada:
 - Fucsina básica 0.3 g
 - Alcohol etílico 95% 10 ml
 - Solución acuosa de fenol al 5% 90 ml
- Decolorante para Ziehl Neelsen: solución de alcohol ácido
 - Alcohol etílico 95% 97 ml
 - Ácido clorhídrico 3 ml
- Azul de Metileno para Ziehl Neelsen
 - Azul de metileno 0.3 g
 - Agua purificada 100 ml

Almacenamiento

A 10-35 °C, protegido de la luz.

Procedimiento

- **Preparación del extendido:**

El material a estudiar debe extenderse y diseminarse, utilizando ansa, sobre la superficie de portaobjetos delgados y nuevos, previamente desengrasados.

La existencia de cualquier anfractuosidad o rayadura en el vidrio podrá ser causa de confusión en la observación.

▪ **Secado del extendido:**

Colocar el portaobjetos en posición horizontal dentro de la estufa de cultivos o sobre la corriente de aire caliente de un mechero.

▪ **Fijado del extendido:**

Mediante calentamiento suave, flameándolo sobre la llama. Esto se efectúa pasando 3 veces el lado del portaobjeto que no tiene la preparación sobre la llama del mechero para que la misma adquiera una temperatura de aproximadamente 80 °C.

▪ **Coloración:**

- Colocar un pequeño trozo de papel de filtro un poco más largo que el tamaño del preparado sobre el portaobjeto. Importante: el papel de filtro tiene que estar por encima del extendido.
- Cubrir el extendido con Fucsina para Ziehl Neelsen (carbolfucsina). Flamear por debajo del portaobjeto hasta el desprendimiento de vapores blancos (evitar que se produzca la ebullición por exceso de calor). Dejar enfriar 5 minutos y repetir el flameado hasta nuevo desprendimiento de vapores blancos. Dejar enfriar 5 minutos. Cuando esté frío, mediante el uso de pinzas, quitar y descartar el papel de filtro.
- Lavar con agua corriente.
- Cubrir con Decolorante para Ziehl Neelsen. Dejar 2 minutos. Realizar sucesivos lavados hasta que no se desprenda más colorante (aproximadamente 2 minutos; pero en el caso de preparados más gruesos, puede requerirse mayor tiempo).

- Lavar con agua corriente.
- Cubrir con Azul de Metileno para Ziehl Neelsen. Dejar 30 segundos.
- Lavar con agua corriente durante 30 segundos.
- Secar el extendido.

▪ **Interpretación de los resultados**

Cubrir el extendido con una gota de aceite de inmersión y observar al microscopio óptico, con aumento 100X.

Observar al microscopio.

Los “microorganismos ácido-alcohol resistentes” (MAAR) aparecen de color rojo sobre un fondo azul claro, mientras que otros gérmenes o células toman distintas tonalidades de azul.

ii. **Tratamientos de la muestra para el extendido**

Preparación de frotis fecales sin concentrar

• **Procedimiento de la prueba**

- Se coloca una gota de solución salina (unos 50 μ l) en el centro del porta.
- Se toma una pequeña muestra de las heces (unos 2 mg) con la punta de una barra aplicadora limpia (o con una pipeta después de mezclar bien, si son muestras líquidas) y se emulsiona la muestra en solución salina mezclando cuidadosamente. Para heces líquidas se pone una gota directamente sobre el porta. En el caso de heces líquidas, hebras mucosas, exudados o pus, se pueden mezclar con solución salina sobre el porta de microscopio. Las heces líquidas se pueden diluir con una gota de solución salina 150 mM.
- Se prepara un medio para hacer el frotis más grueso con áreas de grosor variable. Hay que asegurarse de que el frotis tiene la transparencia correcta.

- Se seca el frotis al aire a temperatura ambiente.

Concentración de ooquistes mediante sedimentación en centrífuga (formol/éter)

• Procedimiento de la prueba

- Se muestrean aproximadamente 500 mg–1 g de heces con un palillo aplicador y se colocan en un tubo de centrífuga limpio de 12–15 ml que contenga 7 ml de formalina al 10%. Si las heces son líquidas, se colocan unos 750 μ l en el tubo de centrífuga.
- Se rompe la muestra completamente y se la emulsiona utilizando un palillo aplicador.
- Se filtra la suspensión resultante a través de un tamiz dentro de un vaso de precipitado, y después se vierte el filtrado de nuevo dentro del mismo tubo de centrífuga.
- Se añaden 3 ml de dietil éter (o acetato de etilo) a la solución con formalina, se sella el cuello del tubo con un tapón de goma (o con el dedo pulgar enguantado sobre la parte alta del tubo) y se agita la mezcla vigorosamente durante 30 segundos. Se invierte el tubo varias veces durante ese procedimiento y se libera la presión desarrollada retirando el tapón de goma suavemente (o el dedo pulgar) lentamente.
- Se centrifuga el tubo a 1.100 g durante 2 minutos.
- Se desprende el tapón grasoso con un palillo de madera pasando el palo entre la pared interior del tubo y el tapón. Se desecha el tapón y el líquido superior e inferior invirtiendo el tubo, permitiendo que solo caigan de nuevo dentro del tubo la última o las dos últimas gotas. Se elimina este líquido, que contiene dietil éter y formalina, en un contenedor de desechos líquidos marcado.
- Se suspende de nuevo el precipitado mediante agitación. Se vierte todo o la mayor parte del precipitado

resuspendido en un porta para microscopio, o se transfiere al porta con una pipeta desechable y se seca al aire.

Adición de Peróxido de Hidrogeno

- **Procedimiento de la prueba**

- Se realiza el tratamiento de las heces con agua oxigenada (a una concentración final de 5 volúmenes, durante 10 min)
- Las muestras se diluyen en soluciones de cloruro sódico al 0,9 % y se almacena a 4 ° C hasta su uso.
- Los ooquistes se purifican a partir de las suspensiones fecales por filtración a través de tamices de malla de nylon (300 , 150 , 75 , 40 y 10 um de diámetro de poro) y centrifugación en gradiente de densidad en soluciones de cloruro de cesio como se describe por Kilani y Sekla (1987).
- Los oocistos se tratan mediante la mezcla de 1 ml de suspensión fecal con 1 ml. de peróxido de hidrógeno (5 vol) Durante 10 min a temperatura ambiente.
- Las muestras se lavan 3 veces con NaCl al 0,9 % después del tratamiento con el fin de eliminar el peróxido de hidrógeno residual.

1.2 PROCEDIMIENTO

A. Metodología de la experimentación

Se tomaran muestras de heces de todos los terneros hembras y machos y edades comprendidas entre 0 a 6 meses.

B. Metodología para la recolección de muestras

Por cada ternero se recolectará una muestra fecal mediante la estimulación rectal, utilizando para ello, guantes estériles, se colocara la muestra en frascos estériles rotulados con el número de la muestra, nombre del establo, fecha del muestreo e identificación del animal.

Las muestras serán transportadas en cajas herméticas con hielo y llevadas para su procesamiento al laboratorio de la Universidad Católica de Santa María.

1.3 INSTRUMENTO

El instrumento utilizado para la obtención de datos y diagnóstico de criptosporidiosis se encuentra en los anexos:

- Anexo N° 01. Recolección de muestras
- Anexo N° 02. Preparación y observación de la muestra

1.4 EQUIPOS Y MATERIALES

1.4.1 EQUIPOS

- Para la observación de los ooquistes de cryptosporidium
 - Batería de coloración
 - Microscopio óptico
 - Centrifuga

1.4.2 MATERIAL BIOLÓGICO

- Está representado por todas las muestras de heces de cada uno de los animales muestreados.

1.4.3 MATERIAL DE LABORATORIO

- Fucsina para Ziehl Neelsen: Carbofucsina: solución de fucsina fenicada:
 - Fucsina básica 0.3 g
 - Alcohol etílico 95% 10 ml
 - Solución acuosa de fenol al 5% 90 ml
- Decolorante para Ziehl Neelsen: solución de alcohol ácido
 - Alcohol etílico 95% 97 ml
 - Ácido clorhídrico 3 ml
- Azul de Metileno para Ziehl Neelsen
 - Azul de metileno 0.3 g
 - Agua purificada 100 ml
- Formalina al 10%
- Éter
- Peróxido de Hidrogeno
- Láminas portaobjetos
- Láminas cubreobjetos

- Aceite de inmersión

VARIABLE	INDICADOR	SUBINDICADOR	TECNICA	INSTRUMENTO
Diagnóstico de criptosporidiosis	Extendido directo	Terneros de 0 a 2 meses hembras y machos Terneros de 2 a 4 meses hembras y machos Terneros de 4 a 6 meses hembras y machos	Coloración Ziehl Nielsen modificado	Microscopia Anexo 01
	Concentracion de Formol/acetato de etilo	Terneros de 0 a 2 meses hembras y machos Terneros de 2 a 4 meses hembras y machos Terneros de 4 a 6 meses hembras y machos	Coloración Ziehl Nielsen modificado	Microscopia Anexo 01
	Adicion de peróxido de hidrogeno	Terneros de 0 a 2 meses hembras y machos Terneros de 2 a 4 meses hembras y machos Terneros de 4 a 6 meses hembras y machos	Coloración Ziehl Nielsen modificado	Microscopia Anexo 02

2. CAMPO DE VERIFICACION

2.1 UBICACIÓN ESPACIAL

El trabajo de investigación se realizará en la localidad La Pampa, distrito de Samuel Pastor, provincia de Camaná, departamento de Arequipa.

Localidad	Latitud Sur	Longitud Oeste
La Pampa	16°36'24''	72° 41'49''

Sus límites son:

- Por el norte con el Distrito de Nicolás de Piérola
- Por el Sur con el Océano Pacifico

- Por el Este con el Distrito de Quilca
- Por el Oeste con los Distritos de Camaná y José María Quimper

(Municipalidad de Camaná)(16)

Tiene una extensión de 113,40 Km². Presenta un clima cálido.

Se encuentra a una altitud de 15 m.s.n.m. con una temperatura máxima de 24.4 °C y temperatura mínima de 18.2°C, y precipitación (07mm) 0 – (19 mm) 0

(SENAMHI)(17)

Presenta una humedad relativa media anual de 79%

(INDECI)(18)

2.2 UBICACIÓN TEMPORAL

El presente trabajo de investigación se realizara en el mes de agosto del 2016: Fase Experimental.

2.3 UNIDADES DE ESTUDIO

Las unidades de estudio, están formadas por cada muestra evaluada en cada variable.

3. ESTRATEGIAS DE RECOLECIÓN DE DATOS

3.1 ORGANIZACIÓN

La matriz de resultados: se encuentra en el anexo:

- Anexo N° 03. Matriz de resultados

3.2 RECURSOS

A. RECURSOS HUMANOS

La ejecución del presente trabajo de investigación será realizada por la Bachiller Cecilia Mogrovejo López

B. RECURSOS FISICOS E INSTITUCIONALES

El financiamiento será asumido al 100 % por el ejecutor.

3.3 CRITERIO PARA EL MANEJO DE RESULTADOS

A. MUESTREO

Procedimiento de muestreo

El procedimiento de muestreo será probabilístico donde se evaluarán a todos los animales que se adecuen a las variables consideradas en el presente trabajo de investigación.

B. DISEÑO ESTADÍSTICO

Para el análisis de los datos se emplearán tablas de frecuencias; mientras que para contrastar variables la prueba de Chi-cuadrado.

$$\chi^2 = \sum \frac{(fo - ft)^2}{ft}$$

Donde:

χ^2 = chi cuadrado

\sum = sumatoria

fo = frecuencia observada

ft = frecuencia esperada

C. CRONOGRAMA

ACTIVIDADES	TIEMPO					
	Jul.	Ago.	Set.	Oct.	Nov.	Dic.
Revisión bibliográfica	X	X				
Presentación y aprobación del proyecto de investigación			X			

Recolección de datos				X		
Estructuración de resultados					X	
Informe final					X	X
Sustentación						X



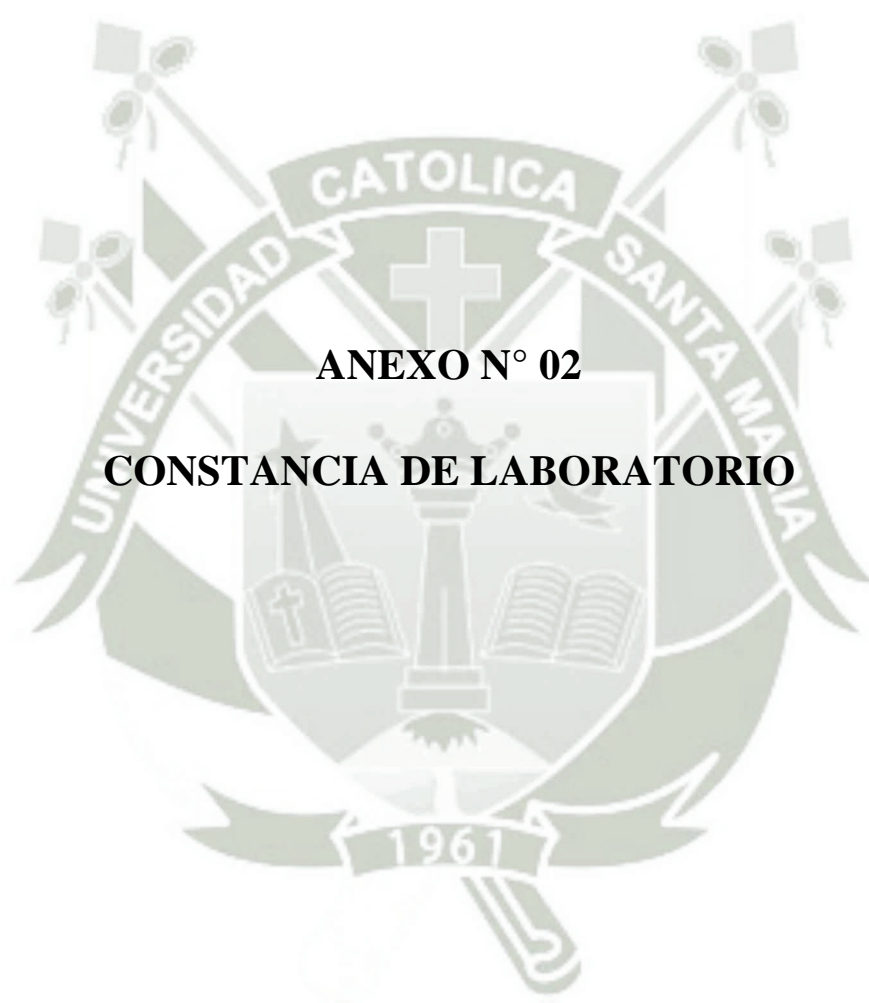
II. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OIE.int [Internet]. Paris: web OIE.int; 2008 [actualizado mayo 2016; citado 25 Jun 2016]. Disponible en: http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.04.%20Criptosporidiosis.pdf
2. Celis S Noemit, Chávez V. Amanda, Suárez A. Francisco, Falcón P. Néstor, Fernández P. Viviana. Criptosporidiosis en Caninos Criados en Comunidades Campesinas de Puno, Perú. Rev Inv Vet Perú [Internet]. 2015 [citado 20 Jun 2016]; 26(2): 266-272. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i2.11010>
3. Chirinos V. Ysamar Y., Rojas Marisela, Salinas Griseira, Bastidas P. Gilberto A y García G. Francisco. Frecuencia De Criptosporidiosis En Becerreros De Diez Fincas De La Zona Ganadera De Tucacas, Estado Falcón, Venezuela.. Rev. Fac. Cs. Vets. 2004; UCV. 45(1): 9-17. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/239601139_FRECUENCIA_DE_CRIPTOSPORIDIOSIS_EN_BECERREROS_DE_DIEZ_FINCAS_DE_LA_ZONA_GANADERA_DE_TUCACAS_ESTADO_FALCON_VENEZUELA
4. Pinto de Almeida Castro A., Bilbao G., Echevarría H., Morán P., Catena M., Cacciatto C. y Monteavaro C. Cryptosporidiosis: caracterización de la infección en terneros de rodeos lecheros. [Página principal en Internet]. Argentina: c2009. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/parasitarias_bovinos/131-Cryptosporidiosis.pdf
5. Araujo Analía Vanesa, Gómez Muñoz María de los Ángeles, Milano Alicia María Francisca. Prevalencia de la infección por *Cryptosporidium* spp. en bovinos de dos establecimientos del Nordeste Argentino. REDVET [Internet]. 2011 [18 May 2016]; 12(10):1-10. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101011/101108.pdf>
6. Molina M. Daniel, López U. Teresa, González Z. Armando, Gómez P. Luís, Pezo C. Danilo. *Cryptosporidium Parvum* Como Factor De Riesgo En La Diarrea Neonatal En Alpacas De Puno Rev Inv Vet Perú 2009; 20 (2): 263-

269. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172009000200017&script=sci_arttext
7. Modini, L., Otero, J. L., Carrera, E., Zerbato, M., Eliggi, S. & Abramovich, B. *Cryptosporidium Spp.* En Ganado Bovino: Su Potencial Como Contaminante De Los Recursos Hídricos. Revista Fave - Ciencias Veterinarias [Internet]. 2010 [citado 10 May 2016]; 9 (1). Disponible en: <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar/ojs/index.php/FAVEveterinaria/article/viewFile/1494/2390>
 8. Diaz De Ramirez Adelina. Criptosporidiosis En El Ganado Bovino. En: Memorias XI Congreso Venezolano De Produccion E Industria Animal. Ula Trujillo; 2002.p. 1-10.
 9. Ortega Mora L M, Gómez Bautista M y Rojo Vázquez F A. Cryptosporidiosis. En: Cordero del Campillo M. et al. Parasitología Veterinaria. 1° Ed. España Mc Gram-Hill Interamericana: 1999.p. 213-221.
 10. Mehlhorn Heinz, Piekarski Gerhard. Fundamentos de Parasitología. 3° ed. España Editorial Acribia S.A.; 1989.
 11. Pérez Dueñas Jenny Stefany. Estado Actual De Las Zoonosis Por *Cryptosporidium Spp.* En El Continente Americano [Tesis]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana Facultad De Ciencias Básicas Programa Bacteriología; 2013. Disponible en: <http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/15441/1/PerezDuenasJennyStefany2013.pdf>
 12. www.britanialab.com/productos/183_inserto_es.pdf
 13. Díaz de Ramírez A., Ramírez-Iglesia L. N., Morillo Luque J. G., Barreto Bastidas A. J. Infección Con *Cryptosporidium Sp.* y Su Asociación Con Diarrea En Becerros De Ganadería De Doble Propósito. Mundo Pecuario, III [Internet]. 2007 [citado 12 May 2016]; N° 2 y 3, 37-44. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/21988/2/articulo1.pdf>
 14. Surumay Queila, Sandoval Yoalis . *Cryptosporidium sp.* En bovinos jovenes de fincas del estado Zulla, Venezuela. Veterinaria Tropical [Internet]. 2000 [citado 12 May 2016]; 25(1): 73-80. Disponible en: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/VeterinariaTropical/vt2501/texto/qsumaray.htm

15. Avendaño Catalina, Amaya Álvaro, Bayona Martín. Caracterización epidemiológica de la criptosporidiosis en bovinos en la región Sabana Centro (Cundinamarca). Rev U.D.C.A Act. & Div. Cient. [Internet]. 2010 [citado 12 mayo 2016]; 13 (2): 109-116. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262010000200013
16. <http://www.municamana.gob.pe/provincia/turismo.php>
17. http://senamhi.gob.pe/include_mapas/_dat_esta_tipo.php?estaciones=000832
18. http://bvpad.indeci.gob.pe/doc/estudios_CS/Region_Arequipa/camana/camana.pdf







Universidad Católica de Santa María

(51 54) 382038 Fax:(51 54) 251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe Apartado: 1350

AREQUIPA - PERU

CONSTANCIA ESPECIAL N°003-Coord.Lab-2017

LA QUE SUSCRIBE COORDINADORA DE LABORATORIOS DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA, DEJA CONSTANCIA QUE EL (LA) SEÑOR (ITA):

CECILIA MOGROVEJO LOPEZ

INSTITUCION EDUCATIVA: UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA.

HA DESARROLLADO EL PROYECTO DE TESIS, INTITULADO:

“DIAGNOSTICO DE CRIPTOSPORIDIOSIS MEDIANTE LA TINCIÓN DE ZIEHL NIELSEEN MODIFICADO, EN TERNEROS DE LECHERA DE LA DE LA ZONA GANADERA DE SAMUEL PASTOR – CAMANÁ – AREQUIPA - 216”

PERIODO : Se le autorizo mes de noviembre del 2016.

SE EXPIDE LA PRESENTE CONSTANCIA A SOLICITUD EXPRESA, Y PARA LOS FINES QUE CONVENGA.

Arequipa, 2017-07-14


DRA. JESÚS MARÍA ZAMBRANO SALAS DE CALLE
COORDINADORA DE LABORATORIOS
Y GABINETES
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA



FORMATO DE RECOLECCION DE MUESTRAS

RECOLECCION DE MUESTRAS						
Establo: Esperanza						
Dirección: Tupac Amaru – La Pampa						
Propietario: Francisco Roque Bustinso						
Fecha: 07-11-16		Obs.:				
Código de la muestra	Sexo		Edad			Identificación del animal
	Hembra	Macho	0 a 2 meses	2 a 4 meses	4 a 6 meses	
E01-7	X			X		
E02-7	X				X	
E03-7	X				X	
E04-7	X			X		
E05-7	X				X	

RECOLECCION DE MUESTRAS						
Establo: Virgen de Fatima						
Dirección: La Pampa						
Propietario: Maria Ramos Camargo						
Fecha: 07-11-16			Obs.:			
Código de la muestra	Sexo		Edad			Identificación del animal
	Hembra	Macho	0 a 2 meses	2 a 4 meses	4 a 6 meses	
VF01-7		X			X	
VF02-7		X			X	
VF03-7	X			X		
VF04-7		X			X	
VF05-7	X		X			
VF06-7		X			X	

RECOLECCION DE MUESTRAS						
Establo: Esperanza						
Dirección: Tupac amaru – La Pampa						
Propietario: Francisco Roque Bustinso						
Fecha: 15-11-16		Obs.:				
Código de la muestra	Sexo		Edad			Identificación del animal
	Hembra	Macho	0 a 2 meses	2 a 4 meses	4 a 6 meses	
E01-15	X			X		
E02-15		X			X	
E03-15		X		X		
E04-15		X		X		
E05-15		X			X	
E06-15		X			X	
E07-15		X		X		
E08-15		X		X		
E09-15		X			X	

RECOLECCION DE MUESTRAS						
Establo: ISTP Faustino B. Franco						
Dirección: Tupac amaru – La Pampa						
Propietario: ISTP Faustino B. Franco						
Fecha: 15-11-16		Obs.:				
Código de la muestra	Sexo		Edad			Identificación del animal
	Hembra	Macho	0 a 2 meses	2 a 4 meses	4 a 6 meses	
FBF01-15		X		X		
FBF02-15	X			X		
FBF03-15	X			X		
FBF04-15	X				X	
FBF05-15		X			X	

RECOLECCION DE MUESTRAS						
Establo: Chaparral						
Dirección: La Pampa						
Propietario: Antonio Ramos						
Fecha: 23-11-16			Obs.:			
Código de la muestra	Sexo		Edad			Identificación del animal
	Hembra	Macho	0 a 2 meses	2 a 4 meses	4 a 6 meses	
C01-23		X	X			
C02-23		X	X			
C03-23		X	X			
C04-23		X	X			
C05-23	X		X			

RECOLECCION DE MUESTRAS						
Establo: ISTP Faustino B. Franco						
Dirección: La Pampa						
Propietario: ISTP Faustino B. Franco						
Fecha: 23-11-16			Obs.:			
Código de la muestra	Sexo		Edad			Identificación del animal
	Hembra	Macho	0 a 2 meses	2 a 4 meses	4 a 6 meses	
FBF01-23	X		X			

PREPARACIÓN Y OBSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

N° de muestra	Código	Frotis directo		Concentración por centrifugado		Adición de Peróxido de Hidrogeno	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
1	E01-7	X		X			X
2	E02-7	X		X		X	
3	E03-7				X		X
4	E04-7				X		X
5	E05-7	X			X		X
6	VF01-7				X	X	
7	VF02-7				X		X
8	VF03-7	X		X			X
9	VF04-7				X		X
10	VF05-7	X			X		X
11	VF06-7	X		X			X
12	E01-15		X		X		X
13	E02-15		X		X		X
14	E03-15		X		X		X
15	E04-15		X		X		X
16	E05-15	X		X		X	
17	E06-15	X		X			X
18	E07-15	X			X		X
19	E08-15	X		X			X
20	E09-15	X		X			X
21	FBF01-15		X		X		X
22	FBF02-15		X		X		X
23	FBF03-15		X		X		X
24	FBF04-15		X		X		X
25	FBF05-15		X		X		X
26	C01-23		X		X		X
27	C02-23		X		X		X
28	C03-23		X	X			X
29	C04-23	X		X		X	
30	C05-23	X		X		X	
31	FBF01-23		X		X		X

MATRIZ DE RESULTADOS

N°	ESTABLO	IDENTIFICACION	SEXO	EDAD (meses)	CODIGO	FECHA DE MUESTREO	RESULTADO					
							Frotis directo		Concen. Centrifu.		Adición H ₂ O ₂	
							+	-	+	-	+	-
1	Esperanza		H	2	E01-7	07/11/16	X		X			X
2	Esperanza		H	6	E02-7	07/11/16	X		X		X	
3	Esperanza		H	5	E03-7	07/11/16				X		X
4	Esperanza		H	3	E04-7	07/11/16				X		X
5	Esperanza		H	5	E05-7	07/11/16	X			X		X
6	V. Fatima		M	5	VF01-7	07/11/16				X	X	
7	V. Fatima		M	6	VF02-7	07/11/16				X		X
8	V. Fatima		H	3	VF03-7	07/11/16	X		X			X
9	V. Fatima		M	4	VF04-7	07/11/16				X		X
10	V. Fatima		H	2	VF05-7	07/11/16	X			X		X
11	V. Fatima		M	4	VF06-7	07/11/16	X		X			X
12	Esperanza		H	3	E01-15	15/11/16	X			X		X
13	Esperanza		M	6	E02-15	15/11/16		X		X		X
14	Esperanza		M	3	E03-15	15/11/16		X		X		X
15	Esperanza		M	4	E04-15	15/11/16		X		X		X
16	Esperanza		M	5	E05-15	15/11/16	X		X		X	
17	Esperanza		M	5	E06-15	15/11/16	X		X			X
18	Esperanza		M	4	E07-15	15/11/16	X			X		X
19	Esperanza		M	4	E08-15	15/11/16	X		X			X
20	Esperanza		M	6	E09-15	15/11/16	X		X			X
21	F.B. Franco		M	3	FBF01-15	15/11/16		X		X		X
22	F.B. Franco		H	3	FBF02-15	15/11/16		X		X		X
23	F.B. Franco		H	3	FBF03-15	15/11/16		X		X		X
24	F.B. Franco		H	5	FBF04-15	15/11/16		X		X		X
25	F.B. Franco		M	4	FBF05-15	15/11/16		X		X		X
26	Chaparral		M	1	C01-23	23/11/16		X		X		X
27	Chaparral		M	2	C02-23	23/11/16		X		X		X
28	Chaparral		M	1	C03-23	23/11/16		X	X			X
29	Chaparral		M	2	C04-23	23/11/16	X		X		X	
30	Chaparral		H	2	C05-23	23/11/16	X		X		X	
31	F.B. Franco		H	2	FBF01-23	23/11/16		X		X		X



ANEXO N° 04

CÁLCULOS ESTADÍSTICOS

Tabla cruzada dx*técnica

			Técnica		
			Frotis directo	Concentración/c entrifugación	Peróxido de hidrogeno
dx	si	Recuento	13	11	5
		% dentro de técnica	41,9%	35,5%	16,1%
	no	Recuento	18	20	26
		% dentro de técnica	58,1%	64,5%	83,9%
Total	Recuento		31	31	31
	% dentro de técnica		100,0%	100,0%	100,0%

FRE
CUE
NCI
A Y
CHI
CUA
DRA
DO
ENT
RE



ji cuadrado	grados de libertad	valor p
17.1173	2	0,0002

FRECUENCIA Y CHI CUADRADO PARA EDAD

Tabla cruzada dx*edadcod^a

			edadcod			Total
			0-2	3-4	5-6	
dx	si	Recuento	4	5	4	13
		% dentro de edadcod	50,0%	38,5%	40,0%	41,9%
	no	Recuento	4	8	6	18
		% dentro de edadcod	50,0%	61,5%	60,0%	58,1%
Total		Recuento	8	13	10	31
		% dentro de edadcod	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

a. tecnica = Frotis directo

Pruebas de chi-cuadrado^a

	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,293 ^b	2	,864
Razón de verosimilitud	,291	2	,864
Asociación lineal por lineal	,156	1	,692
N de casos válidos	31		

a. tecnica = Frotis directo

b. 3 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 3,35.

Tabla cruzada dx*edadcod^a

			edadcod			Total
			0-2	3-4	5-6	
dx	Si	Recuento	4	3	4	11
		% dentro de edadcod	50,0%	23,1%	40,0%	35,5%
	No	Recuento	4	10	6	20
		% dentro de edadcod	50,0%	76,9%	60,0%	64,5%
Total		Recuento	8	13	10	31
		% dentro de edadcod	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

a. tecnica = Concentracion/Flotacion

ji cuadrado	grado de libertad	valor de p
15,8724	2	0,0004

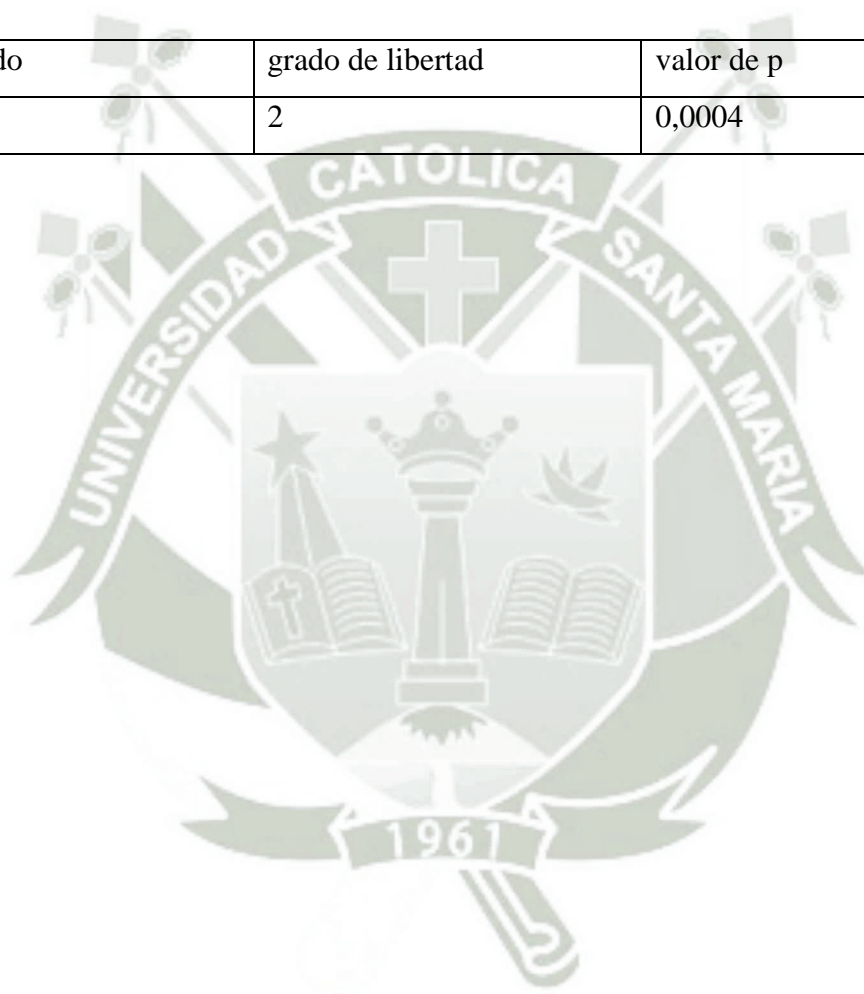
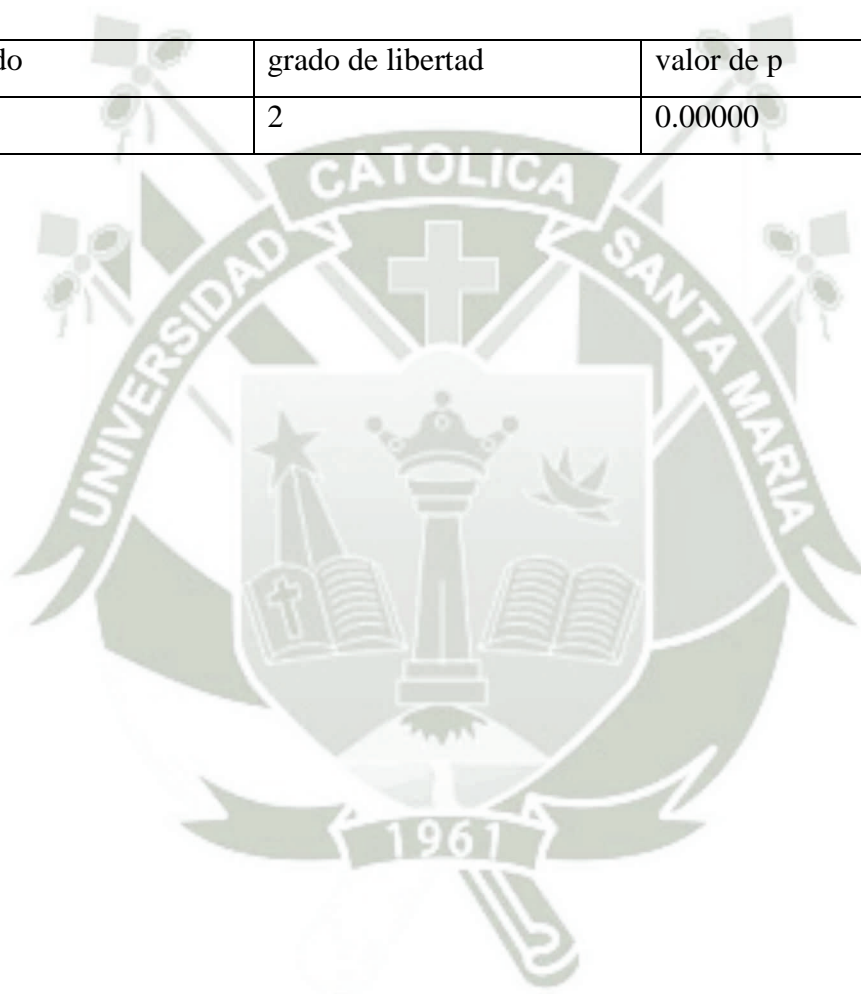


Tabla cruzada dx*edadcod^a

			edadcod			Total
			0-2	3-4	5-6	
dx	si	Recuento	2	0	3	5
		% dentro de edadcod	25,0%	0,0%	30,0%	16,1%
	no	Recuento	6	13	7	26
		% dentro de edadcod	75,0%	100,0%	70,0%	83,9%
Total		Recuento	8	13	10	31
		% dentro de edadcod	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

a. tecnica = Agua Oxigenada

ji cuadrado	grado de libertad	valor de p
34.5083	2	0.00000



FRECUENCIA Y CHI CUADRADO PARA SEXO

Tabla cruzada dx*sexo^a

			Sexo		Total
			macho	hembra	
dx	si	Recuento	5	8	13
		% dentro de sexo	38,5%	44,4%	41,9%
	no	Recuento	8	10	18
		% dentro de sexo	61,5%	55,6%	58,1%
Total		Recuento	13	18	31
		% dentro de sexo	100,0%	100,0%	100,0%

a. tecnica = Frotis directo

Pruebas de chi-cuadrado^a

	Valor	Gl	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,111 ^b	1	,739		
Corrección de continuidad ^c	,000	1	1,000		
Razón de verosimilitud	,111	1	,739		
Prueba exacta de Fisher				1,000	,516
Asociación lineal por lineal	,107	1	,743		
N de casos válidos	31				

a. tecnica = Frotis directo

b. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 5,45.

c. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

Tabla cruzada dx*sexo^a

			Sexo		Total
			Macho	hembra	
Dx	Si	Recuento	4	7	11
		% dentro de sexo	30,8%	38,9%	35,5%
	No	Recuento	9	11	20
		% dentro de sexo	69,2%	61,1%	64,5%
Total		Recuento	13	18	31
		% dentro de sexo	100,0%	100,0%	100,0%

a. tecnica = Concentracion/Flotacion

Pruebas de chi-cuadrado^a

	Valor	Gl	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,217 ^b	1	,641	,718	,468
Corrección de continuidad ^c	,007	1	,932		
Razón de verosimilitud	,219	1	,640		
Prueba exacta de Fisher					
Asociación lineal por lineal	,210	1	,646		
N de casos válidos	31				

a. tecnica = Concentracion/Flotacion

b. 1 casillas (25,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 4,61.

c. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

Tabla cruzada dx*sexo^a

			Sexo		Total
			macho	hembra	
dx	si	Recuento	2	3	5
		% dentro de sexo	15,4%	16,7%	16,1%
	no	Recuento	11	15	26
		% dentro de sexo	84,6%	83,3%	83,9%
Total		Recuento	13	18	31
		% dentro de sexo	100,0%	100,0%	100,0%

a. tecnica = Agua Oxigenada

Pruebas de chi-cuadrado^a

	Valor	Gl	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,009 ^b	1	,924	1,000	,659
Corrección de continuidad ^c	,000	1	1,000		
Razón de verosimilitud	,009	1	,924		
Prueba exacta de Fisher					
Asociación lineal por lineal	,009	1	,925		
N de casos válidos	31				

a. tecnica = Agua Oxigenada

b. 2 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 2,10.

c. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2



FRECUENCIAS SEGÚN EDAD Y SEXO

Edad

		Frecuencia	Porcentaje
Válido	0-2	8	25,8
	3-4	13	41,9
	5-6	10	32,3
	Total	31	100,0

Sexo

		Frecuencia	Porcentaje
Válido	macho	13	41,9
	hembra	18	58,1
	Total	31	100,0

ANEXO N° 05

SECUENCIA FOTOGRAFICA

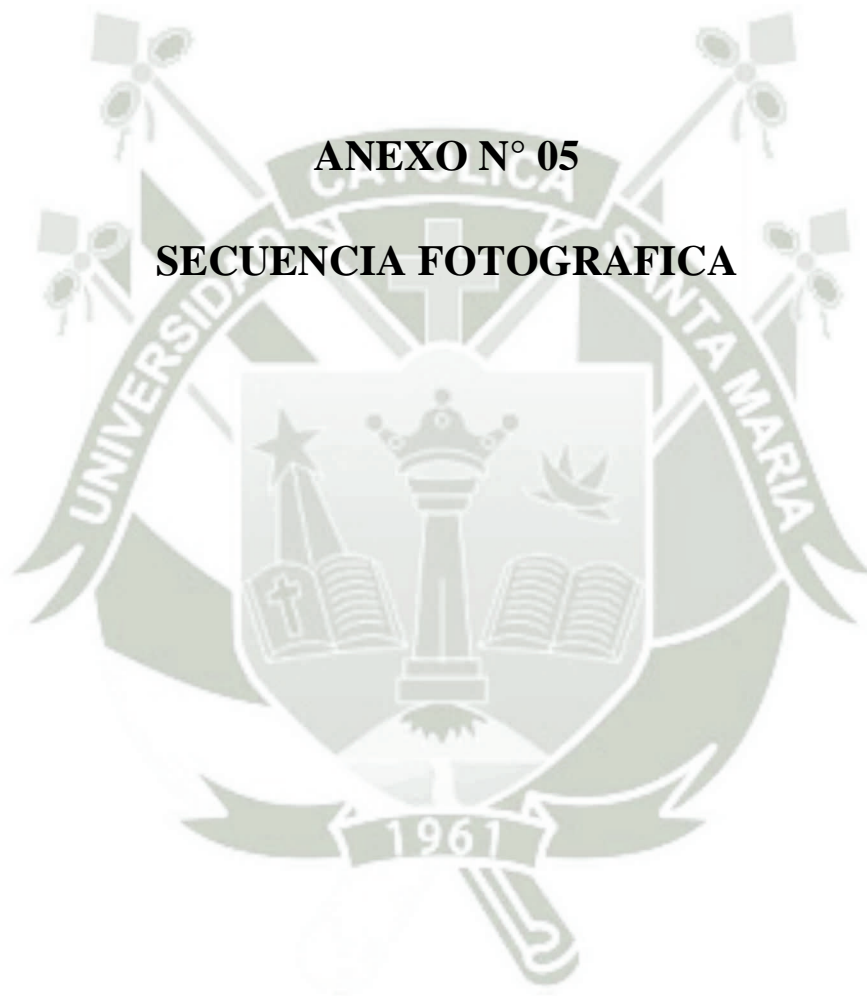




Foto N° 01. Ternero para la
toma de muestra de heces



Foto N° 02. Muestra de heces



Foto N° 03. Homogenización de
la muestra

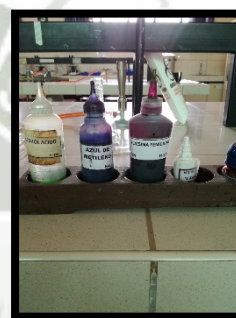


Foto N° 04. Batería de
coloración Ziehl Nielsen



Foto N° 05. Tinción del
extendido

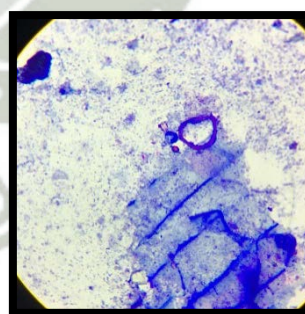


Foto N° 06. Observación de
ooquiste de *Cryptosporidium*