



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETECCIÓN DE *Cryptosporidium* spp. EN EQUINOS (*Equus caballus*) DE
UN CENTRO ECUESTRE MILITAR DE LA REGIÓN METROPOLITANA

Sebastián Edgardo Agüero Alarcón

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: FERNANDO FREDES MARTÍNEZ

**SANTIAGO, CHILE
2014**



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETECCIÓN DE *Cryptosporidium* spp. EN EQUINOS (*Equus caballus*) DE UN CENTRO ECUESTRE MILITAR DE LA REGIÓN METROPOLITANA

Sebastián Edgardo Agüero Alarcón

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA:	FERNANDO FREDES
PROFESOR CONSEJERO:	GALIA RAMÍREZ
PROFESOR CONSEJERO:	CHRISTOPHER HAMILTON-WEST

**SANTIAGO, CHILE
2014**

1. INTRODUCCIÓN

El protozoo *Cryptosporidium* spp. ha sido detectado en las cuatro clases de vertebrados y es considerado un agente entérico primario en algunas de ellas (Tzipori y Widmer, 2008). Este protozoario es el causante de la criptosporidiosis, enfermedad parasitaria que afecta principalmente al tubo digestivo del hombre y otros animales vertebrados (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

Identificado hace más de un siglo, cobró mayor atención a finales de la década del '70, cuando se describieron los primeros casos de criptosporidiosis humana. Desde esa época, se ha estudiado las características patógenas, epidemiológicas y biológicas del agente, quedando aún una serie de aspectos por dilucidar (Zanaro y Garbossa, 2008). Respecto a lo anterior, estudios genéticos y del RNA ribosomal, supondrían un claro alejamiento filogenético del resto de los coccidios y otros apicomplexos (Zanaro y Garbossa, 2008). En la actualidad es considerada una zoonosis re-emergente (Chen *et al.*, 2002; Fayer y Xiao, 2007).

La criptosporidiosis se caracteriza por un cuadro de diarrea autolimitante, con anorexia y pérdida de peso. En animales inmunocomprometidos, la infección se vuelve persistente, amenazando seriamente la esperanza de vida del paciente. En hospederos susceptibles, el parásito también afecta los ductos biliares y el tracto respiratorio (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

Varios factores favorecen la amplia distribución y resistencia del parásito en el mundo. Entre ellos destacan que: a) la transmisión puede ocurrir por vía directa oro fecal, b) los ooquistes son excretados de manera que estos son directamente infectivos, sin maduración externa, c) los ooquistes se liberan en gran cantidad al ambiente y son

resistentes a varios desinfectantes, d) existen muchas infecciones asintomáticas y e) no existe tratamiento específico ni completamente efectivo (Chen *et al.*, 2002).

A nivel global, existen pocos reportes de criptosporidiosis en equinos. Ooquistes del parásito fueron encontrados por primera vez en 1978, en cinco potrillos árabes inmunodeficientes (Snyder *et al.*, 1978). Posterior a eso, se han realizado estudios en distintas partes del mundo, encontrándose prevalencias de hasta un 69%, siendo siempre el grupo de los potrillos el más afectado. Estas altas prevalencias sugieren que la principal vía de infección se debe a la ingesta de agua contaminada (Bjerneby *et al.*, 1991; Fayer y Xiao, 2007).

En Chile hay pocos datos que permitan determinar condiciones epidemiológicas del protozoo en la población equina. La presente Memoria de Título intenta contribuir en este sentido, centrando su estudio en el diagnóstico de la criptosporidiosis.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. DESCRIPCIÓN DEL AGENTE

2.1 Taxonomía

Cryptosporidium parvum fue identificado por primera vez en ratones en 1907 (Atías, 1998; Cordero del Campilo *et al.*, 1999). Si bien el género se encuentra en constante revisión, actualmente se le clasifica dentro del phylum Apicomplexa, grupo Alveolata, clase Sporozoa, subclase Coccidia, orden Eucoccidiorida, suborden Eimeriorina, familia Cryptosporidiidae (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2002). En estudios más recientes, se observó que los miembros de este género están más cercanos a las gregarinas que a las eimerias (Xiao *et al.*, 2004).

Hasta ahora, se describen 22 especies de *Cryptosporidium* según el hospedador involucrado, sitio de infección y morfología del protozoo. Sin embargo, sólo 13 de éstas son consideradas válidas por la mayoría de los investigadores (Siddiki y Masduzzaman 2009). *C. parvum* es la especie que más afecta a los mamíferos, incluido el hombre. Aparte de ésta, se han descrito 151 especies hospedadoras distintas, es decir, este parásito no es hospedero específico (Fayer y Xiao, 2007). Otras especies aceptadas son *C. andersoni*, *C. baileyi*, *C. galli*, *C. canis*, *C. felis*, *C. hominis*, *C. molnari*, *C. wrairi*, *C. saurophilum* y *C. serpentis*, cuyos hospederos son bovinos, gallinas y otras aves, perros, gatos, humanos, peces, cuyes, lagartos y serpientes, respectivamente. *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. muris* y *C. felis*, junto con afectar a rumiantes, pavos, ratones y gatos, también parasitan al hombre, por lo que deben ser considerados zoonóticos (Xiao *et al.*, 2004). Otras posibles especies de *Cryptosporidium* spp. han sido encontradas en peces, reptiles, aves y mamíferos, pero aún no han sido clasificadas. (Xiao *et al.*, 2004).

2.2 Ciclo biológico

Los coccidios del género *Cryptosporidium* presentan un ciclo de vida monogénico, es decir, son capaces de completar todos sus estadios de desarrollo, tanto sexuales como asexuales, dentro de un solo hospedero (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

Un individuo infectado libera ooquistes esporulados principalmente por las heces, los cuales son ingeridos por un hospedero, iniciándose así la fase endógena (Atías, 1998). Una vez que estos llegan al tracto gastrointestinal, se desenquistan, liberando cuatro estadios haploides o esporozoitos a través de una fisura en la pared del ooquiste (Zanaro y Garbossa, 2008). Este proceso estaría condicionado por variables como temperatura, pH, presencia de enzimas, movilidad de los esporozoitos y exposición de receptores, favoreciendo así el aumento de permeabilidad de la pared del ooquiste y el desenquistamiento (Siddiki y Masduzzaman, 2009). El esporozoito se adhiere a la zona apical de las microvellosidades de los enterocitos, en un proceso mediado por ligandos específicos, logrando reorganizar el citoesqueleto de actina para favorecer la protrusión de la membrana celular en torno al esporozoito, y de tal forma, crear la vacuola parasitófora. Esto deja al parásito dentro de la célula, pero fuera de su citoplasma (Chen *et al.*, 2002).

Una vez dentro de la vacuola, al esporozoito se denomina trofozoito. En esta situación, el parásito comienza a alimentarse a expensas del hospedador, iniciando así el ciclo de multiplicación asexual (esquizogonias), que producirán merozoitos. Estos estadios, ya en el lumen intestinal, son capaces de infectar otras células epiteliales, formando nuevos trofozoitos, o alternatively, realizar multiplicación sexual, generando estructuras haploides llamadas gametogonias, las cuales luego de la fertilización, retornarán al estado haploide generando esporozoitos infectivos (u ooquistes) que serán eliminados al ambiente, afectando a nuevos individuos susceptibles (Atías, 1998).

2.3 Periodo de prepatencia y patencia

En modelos experimentales, se ha determinado que el periodo de prepatencia es en promedio cuatro días (DE= 2 días), variando según factores como cantidad de ooquistes ingeridos, grado de virulencia del parásito y estado inmunitario del hospedero (Siddiki y Masduzzaman, 2009). En cuanto al período de patencia, éste tiene una duración de 1 a 12 días en terneros y de 1 a 20 días en humanos (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

2.4 Morfología

La mayoría de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. poseen una doble capa, característica que los hace muy resistentes al ambiente. Ciertos métodos químicos y físicos logran la inactivación de tales ooquistes. Entre estos se encuentran el ozono, los rayos ultravioleta y el amonio, con resultados variables (Siddiki y Masduzzaman, 2009).

En cuanto a la morfología de ooquistes, su forma es parcialmente esférica, de tamaño aproximado de 4 a 6 μm de diámetro. Cuando son liberados en las heces, están esporulados, es decir, poseen cuatro esporozoitos en su interior (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

2.5 Patogenia

El tubo digestivo es el órgano blanco de *Cryptosporidium* spp. Mayormente afecta las partes finales de yeyuno e íleon, también ciego y colon, aunque a la vez se le describe alojándose en tejidos extra intestinales (Chen *et al.*, 2002). A muchos individuos se les describe una diarrea acuosa profusa, con mucus y rara vez sanguinolenta. Sin embargo, la duración e intensidad de los signos depende del estado inmunitario del hospedero, ya que inmunocompetentes pueden presentar una enfermedad autolimitada o bien estar infectados, pero asintomáticos (Zanaro y Garbossa, 2008).

Aparentemente, el parásito solo afecta la superficie epitelial, sin comprometer capas celulares más profundas. Histológicamente, se describen alteraciones en criptas y vellosidades, como atrofia, hiperplasia, e infiltración de células inflamatorias, fenómenos que originaran síndrome de mal absorción. El mecanismo molecular de este proceso aún no está del todo claro. Se ha descrito la presencia de enterotoxinas en muestras de heces, sin embargo, éstas no han sido purificadas (Chen *et al.*, 2002).

No existen signos patognomónicos en la criptosporidiosis. El signo más comúnmente descrito es diarrea, asociada a la excreción de ooquistes. La enfermedad puede cursar con anorexia, dolor abdominal, pérdida de peso, postración y fiebre. Su duración es variable, va entre tres y cinco días en los casos leves y uno a dos semanas en los más graves (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

La transmisión de este parásito es directa, vía oro-fecal y la principal fuente de infección son las heces excretadas por neonatos con diarrea, aunque también hay que considerar la eliminación de ooquistes por los animales adultos que actúan como portadores asintomáticos (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

También se ha descrito la transmisión indirecta de esta parasitosis, ya sea a través de los alimentos o por ingesta de aguas contaminadas con este agente protozoario (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Últimamente se ha incrementado el número de comunicaciones de brotes de criptosporidiosis, incluso en países desarrollados, por ingesta de aguas contaminadas con este agente, ya sea por aguas de piscina, aguas de ríos e incluso redes de agua potable (Fayer y Xiao, 2007; Molina, 2010).

2.6 Aspectos epidemiológicos

Esta enfermedad parasitaria ha sido descrita en todos los continentes, incluido el Antártico (Fredes *et al.*, 2007). Si bien en un comienzo Tyzzer describió la parasitosis como la responsable de cuadros diarreicos de roedores, actualmente *Cryptosporidium* spp. se considera un agente etiológico causal de severos cuadros de diarrea en humanos, animales domésticos y silvestres (Muñoz *et al.*, 2011).

Hasta la fecha, existe escasa información sobre la criptosporidiosis en caballos. El primer antecedente surge en 1978 con cinco potrillos inmunocomprometidos de raza Árabe (Snyder *et al.*, 1978; Tzipori y Widmer, 2008). Posteriormente, aparecieron reportes en distintos lugares del mundo, con equinos tanto inmunocomprometidos como inmunocompetentes (Fayer y Xiao, 2007).

Los índices de prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en equinos son bastante variables entre países y dentro de ellos. Más aún, en una misma región pueden cambiar en el tiempo. Varios estudios han probado la ausencia de ooquistes, incluso en équidos sospechosos y con signos evidentes. Según información analizada por Fayer y Xiao (2007), la tasa de infección, según técnicas microscópicas, oscila entre 1 y 47% a nivel mundial.

En Chile, este protozoo es considerado endémico, afectando a varias especies domésticas, entre ellas los equinos (Atías, 1998). Un primer antecedente es el de Gorman y Godoy (1989), quienes describen el caso de un caballo adulto inmunocompetente que cursaba con diarrea esporádica sin respuesta a antibiótico, al que luego de detectar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. fue tratado exitosamente con diyodohidroxiquinolina.

2.7 Diagnóstico

Actualmente se considera como un error, el descartar la infección con una sola muestra fecal negativa a la presencia del protozoo, ya que es reconocida la capacidad de excretar de manera intermitente en el tiempo los ooquistes por parte de los hospederos. Se hace imperante por tanto, la colección de varias muestras de heces, acompañada de distintas técnicas diagnósticas (Fayer y Xiao, 2007).

Técnicas de tinción de extendidos fecales, como Ziehl-Neelsen (ZN) o Aureamina, son pruebas estándar (Atías, 1998). Sin embargo, es reconocida su menor sensibilidad y especificidad respecto de otras pruebas. En relación a esto, se han desarrollado pruebas más eficientes como la inmunofluorescencia indirecta y el ensayo de inmunoabsorción enzimática, las cuales mejoran hasta diez veces la sensibilidad. Actualmente, se desarrollan y mejoran técnicas moleculares con el fin de determinar las especies y genotipos de *Cryptosporidium* spp. que afectan a equinos y el resto de los vertebrados susceptibles, para así evaluar tasas de morbilidad y mortalidad (Fayer y Xiao, 2007).

2.8 Nuevos desafíos

La investigación de este coccidio, en términos generales, ha volcado su interés en establecer las características biológicas que lo hacen especial. Actualmente, se encuentra disponible la secuencia completa del genoma de *C. parvum* (Abrahamsen *et al.*, 2004), y su análisis ha permitido el descubrimiento de la existencia de transferencia horizontal de genes (recombinación genética) (Tzipori y Widmer, 2008).

No obstante lo anterior, hay aspectos que aún no se logran resolver relacionados con las características biológicas del organismo (Zanaro y Garbossa, 2008).

Tras la emergencia de criptosporidiosis en aguas contaminadas (Zanaro y Garbossa, 2008) y la asociación del parásito con el virus del SIDA en humanos (Chen *et al.*, 2002), se ha hecho imperante lograr un tratamiento eficiente contra el protozoo. Esto, junto con establecer aspectos epidemiológicos como la prevalencia, es fundamental para actuar asertivamente frente a nuevas emergencias.

Ante lo ya expuesto, a pesar que esta enfermedad ya ha sido enfrentada como un problema real en esta especie animal, resulta de interés detectar la presencia de *Cryptosporidium* spp. en el modelo equino, considerando un protocolo más eficiente de diagnóstico. Para esto, se realizará este estudio en un lugar restringido físicamente y de alta densidad poblacional, con cuidados y manejos periódicos de los animales, como los de un regimiento del Ejército de Chile.

3. OBJETIVO GENERAL

Detectar la presencia de *Cryptosporidium* spp. en equinos (*Equus caballus*) del Regimiento de Artillería N°1 “Tacna”, perteneciente al Ejército de Chile, San Bernardo, Región Metropolitana.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1 Describir la presencia del agente protozoario según sexo, edad y grupo de equinos a evaluar.

4.2 Determinar la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en el Regimiento de Artillería N°1 “Tacna”.

4.3 Comparar la eficiencia diagnóstica de la tinción ZN en la detección de *Cryptosporidium* spp. en equinos entre un muestreo único versus uno seriado.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se analizaron 400 muestras de heces recolectadas de equinos pertenecientes al Regimiento de Artillería N°1 “Tacna” del Ejército de Chile (33°36′ S; 70°39′ O) entre los meses de abril y junio del año 2009.

5.1 Tamaño de muestra

El tamaño de muestra fue de 80 ejemplares. Tal número se determinó considerando un nivel de confianza de 95%, una prevalencia esperada de *Cryptosporidium* spp. de un 5% y un margen de error del 5% (WinEpiscope 2.0.). Dicha prevalencia se encuentra dentro del rango de 1 a 47 % determinada en equinos (Fayer y Xiao, 2007). Se utilizó arbitrariamente un 5%, ya que ese porcentaje se encuentra dentro del rango inferior de infección, situación más plausible en nuestro territorio. Además de esta forma, el tamaño de muestra no fue tan reducido como lo sería considerando el rango superior de prevalencia en equinos.

El 60% (48/80) de los animales correspondieron a machos, mientras que 40% (32/80) fueron hembras. Estos estaban distribuidos en cuatro grupos (I, II, III y IV) de 20 animales cada uno (Anexo).

Ninguno de los equinos tuvo menos de 1 año y el promedio de edad fue de 13,25 años (DE= 4,76 años; rango 1-23 años), como se puede observar en el Anexo. A partir de esto se constituyeron arbitrariamente cuatro grupos etarios, cuya distribución fue de 0 a 7 años 11 meses (n=10); 8 años a 13 años 11 meses (n=31); 14 años a 18 años 11 meses (n=28) y de 19 a 23 años (n=11).

5.2 Recolección de muestras

Las muestras de heces de cada animal, fueron tomadas para otro estudio que buscó la presencia de otro agente biológico. Tal estudio realizó un método de recolección de muestras completamente homologable al requerido para este trabajo, el cual se describe a continuación.

Bajo la supervisión Médico Veterinaria, durante cinco días consecutivos, se colectaron 30 gramos aproximados de material fecal, directamente del recto de cada animal. Tales muestras fueron preservadas en tubos Falcon con 20 mL de etanol al 70%.

5.3 Procesamiento de las muestras

El procesamiento de cada muestra se realizó en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Este incluyó la centrifugación a 1.500g por 15 minutos, la eliminación del sobrenadante, la homogenización y fijación del extendido de 1 x 0,5 cm² aprox., sobre un portaobjetos, el cual se dejó secar a temperatura ambiente y luego fue teñido mediante la técnica de ZN modificada.

5.4.1 Tinción de ZN modificada (Henriksen y Pohlenz, 1981).

Sobre cada extendido, asegurando la identificación durante todo el proceso, se procedió a agregar fucsina básica hasta cubrirlos completamente. La muestra se calentó hasta la emisión de vapor, pasando bajo ellas un algodón con alcohol encendido, cuidando de no hervir el colorante, el cual se dejó actuar durante 20 minutos. Posteriormente, se procedió a lavar con agua corriente, indirectamente bajo el chorro de la llave, es decir, de modo que su canto lateral atravesase el chorro de agua, eliminando así todo el exceso de colorante.

Posteriormente, sobre cada portaobjeto se vació alcohol-ácido hasta cubrirlas y se dejó actuar por 30 segundos, para luego lavar con agua corriente y así eliminar todo el exceso de producto. Este punto es importantísimo en la técnica, por lo que se debe respetar el tiempo indicado, sin sobrepasarlo para no alterar el proceso.

Después de lavadas las láminas, se cubrieron con azul de metileno y se dejó actuar durante dos a cinco minutos. Posteriormente, se lavaron bajo el chorro de agua de la misma forma señalada anteriormente, hasta eliminar todo el exceso de colorante.

Finalmente, cada lámina se apoyó sobre papel absorbente y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez ocurrido esto, se procedió a su observación al microscopio óptico, directamente con objetivo de 100x con aceite de inmersión. Se observaron todos los campos teñidos de la lámina.

Una muestra fue considerada positiva cuando se encontró la presencia de elementos esféricos teñidos de color fucsia, por lo tanto ácido-alcohol resistentes, irregularmente teñidos, de 5 μm de diámetro aproximadamente, compatibles con ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (Figura 1).

5.5 Análisis de resultados

En relación al objetivo 4.1, una vez determinada la presencia de *Cryptosporidium* spp. en cada uno de los individuos, se relacionó esta positividad con la edad, sexo y caballerizas de cada ejemplar equino. Para esto, las variables se sometieron a pruebas estadísticas de independencia, basadas en la distribución de χ^2 .

Con el fin de lograr el objetivo específico 4.2, se analizaron todas las muestras teñidas con el método de ZN, y así se estableció la prevalencia del parásito en el regimiento.

El último objetivo específico 4.3, requirió, una vez establecida la positividad o negatividad de las 400 muestras mediante ZN, someter éstas al test estadístico de Friedman. Dadas las condiciones previas que exige el test, fue necesario utilizar una variante del mismo ofrecida por Iman y Davenport (Zar, 1999). De esta manera, se comparó estadísticamente el valor diagnóstico de la primera toma de muestras, frente a cualquiera de las cuatro siguientes.

6. RESULTADOS

Los resultados de la tinción ZN de las 400 muestras provenientes de los 80 ejemplares equinos, se pueden observar en el Anexo.

Atendiendo el objetivo específico 4.1, de los 20 animales estudiados por grupo, de todas las edades y sexos, se detectaron niveles de infección, con al menos una de las cinco muestras con estructuras compatibles a *Cryptosporidium* spp. para cada grupo (I, II, III y IV) de un 80%, 20%, 15% y 45%, respectivamente (Anexo y Figura 1). La relación entre la infección y el grupo de caballerizas al que pertenecen los animales y por medio del test χ^2 , estableció que hay diferencias significativas entre pertenecer a determinado grupo y ser positivo al test ZN ($\chi^2=22,08$; $p<0,05$). Al analizar la variable infección, que no cumple supuestos de homocedasticidad y normalidad, dentro de cada grupo (I, II, III, y IV) mediante la prueba de Kruskal-Wallis, se estableció que dicha variable tiene distribución homogénea respecto al sexo, es decir, no se encuentra asociada a este factor ($H1=1,61$; $p>0,05$; $H2=0,57$; $p>0,05$; $H3=0,01$; $p>0,05$; $H4=2,19$; $p>0,05$). De igual manera, se determinó que el grupo etario no está asociado a la infección dentro de cada uno de los cuatro grupos ($H1=1,35$; $p>0,05$; $H2=2,32$; $p>0,05$; $H3=0,19$; $p>0,05$; $H4=1,29$; $p>0,05$).

Respecto a los equinos estudiados con edades entre 0 y 7 años 11 meses, entre 8 años y 13 años 11 meses, entre 14 años y 18 años 11 meses y entre 19 años y 23 años, de todos los grupos y sexos, se detectaron a 4 de 10 (40%), a 11 de 31 (35,48%), a 12 de 28 (42,86%) y a 5 de 11 (45,45%) con al menos una de las cinco muestras con estructuras compatibles a *Cryptosporidium* spp, para cada grupo etario respectivamente (Anexo y Figura 1). Según el test χ^2 , no existiría diferencias significativas entre el grupo de edad y el porcentaje de infección ($\chi^2=0,5$; $p>0,05$).

De los animales estudiados según sexo, el 41,66% de los machos (20/48) y el 37,5% de las hembras (12/32) de todos los grupos y edades, se detectaron con al menos una de las cinco muestras con estructuras compatibles a *Cryptosporidium* spp. (Anexo y Figura 1). La relación entre la positividad al test ZN y el sexo de los hospedadores, analizada mediante el test χ^2 , indica que no hay diferencias entre estas dos variables ($\chi^2=0,14$; $p>0,05$).

En relación al objetivo específico 4.2, de los 80 animales estudiados, de todos los grupos, edades y sexos, se detectaron 32 de ellos (40%) con al menos una de las cinco muestras con estructuras compatibles a *Cryptosporidium* spp. (Anexo y Figura 1).

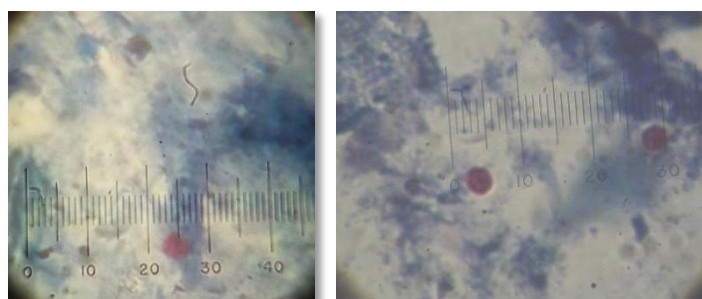


Figura 1. Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (Objetivo 100x) detectados mediante la técnica de ZN modificada, en heces de equinos del regimiento de Artillería N°1 “Tacna”, perteneciente al Ejército de Chile, San Bernardo, Región Metropolitana.

Respecto al objetivo específico 4.3, los resultados mostraron homogeneidad según la variable de muestreo único versus uno seriado. En otras palabras, para cada día de muestreo, no hubo diferencias significativas ($F=6,76$; $p>0,05$; $F=5,45$; $p>0,05$; $F=4,00$; $p>0,05$; $F=1,12$; $p>0,05$, respectivamente).

7. DISCUSIÓN

El método de diagnóstico de *Cryptosporidium* de elección en nuestro país, en las distintas especies hospedadoras, implica la concentración y tinción de sus ooquistes (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer y Xiao, 2007). Entre estas técnicas, destaca la tinción de ZN, la cual se basa en las características morfológicas y propiedades ácido-alcohol resistente de los ooquistes (Atías, 1998). En Chile, existen escasos trabajos que permitan determinar las características epidemiológicas de este protozoo en la población equina. Dado lo anterior, resultó de interés estudiar en base a este método diagnóstico, una población equina de nuestro país, considerando que no existen antecedentes similares.

En primer lugar, se debe destacar del presente trabajo la presencia de *Cryptosporidium* en heces de equinos de la población estudiada, sin tener sospecha clínica de ello. Esta situación ha sido descrita, a nivel nacional, en reportes anteriores, pero en otras especies animales. Así por ejemplo, Gorman *et al.*, (2006) detectó un 1,9% de prevalencia a *Cryptosporidium* spp. en una población de perros callejeros y residenciales de tres comunas de Santiago. Esto también fue considerado por sus autores como un hallazgo.

La prevalencia del coccidio en la población del presente estudio alcanzó el 40%, con distintos grados de positividad según grupo, edad y sexo, pero siempre pesquisando al menos un ooquiste en la muestra. Tal indicador puede ser considerado dentro de un rango esperable (hasta 47%), comparado con otros estudios realizados en condiciones similares de diagnóstico microscópico (Fayer y Xiao, 2007). Es relevante señalar que estos autores, consideran también otras prevalencias que escapan del rango antes señalado, llegando hasta el 100% en uno de los casos. Esto se entendería, en parte, por los distintos tamaños de población y los diversos protocolos de toma de muestra.

Los resultados del presente trabajo muestran diferencias significativas respecto a la relación entre positividad a la infección y grupo al cual pertenecen los équidos. Considerando que todos los ejemplares equinos son abastecidos con la misma fuente de agua, se deben considerar otras variables relacionadas posiblemente con el manejo de los animales, para entender tales diferencias. Lo anterior se debe a que es reconocido por varios autores, que los protozoos del género *Cryptosporidium*, persisten y se diseminan en gran medida por el agua (Fayer y Xiao, 2007; Tzipori y Widmer, 2008; Zanaro y Garbossa, 2008; Molina, 2010). Los resultados indicarían que el primer y último grupo (I y IV) poseen las más altas prevalencias, 80% y 45% respectivamente, siendo esto independiente de los factores sexo y grupo etario. Cabe destacar que estos grupos fueron establecidos por criterios desconocidos, es decir, los animales no fueron asignados a sus respectivos grupos por el azar.

Por otra parte, no habría diferencias de parasitismo según el rango etario de los hospederos. Otros estudios muestran discrepancias en torno a este hecho, estableciendo una clara predilección de *Cryptosporidium* spp. por los potrillos y caballos gerontes (Bjerneby, 1991; Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.* 1999; Fayer y Xiao, 2007; Tzipori y Widmer, 2008). Cabe señalar que todos los equinos de la población estudiada son mayores de un año y están continuamente supervisados por Médicos Veterinarios.

En relación al sexo de los animales, el presente estudio mostró que tal condición es irrelevante para ser más o menos parasitado. Este resultado discreparía de otros estudios (Bjerneby *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2002; Fayer y Xiao, 2007), sin embargo las condiciones particulares de esta población ayudan a entender este fenómeno. Por una parte, todos los machos son caballos, es decir, antes de ingresar al regimiento son castrados. Además, las hembras, aunque no son sometidas a ovariectomía u otro procedimiento quirúrgico que limite su potencial reproductivo, tienen sus cruas y pariciones en otro lugar distinto de éste. En resumen, no existiría interacción sexual en la población, y por ende, tampoco habría momentos de estrés que implicaría, por ejemplo, lesiones en las cruas, partos, etc.

De esta manera, se evitarían momentos que signifiquen comprometer el estado inmunitario debido a la condición sexual de los equinos, compromiso que se considera como determinante para el hospedero cuando se enfrenta al parásito (Bjerneby, 1991; Chen *et al.* 2002; Siddiki y Masduzzaman, 2009).

Respecto al último objetivo planteado (4.3) en este estudio, el test de Friedman no arrojó diferencias significativas. En otras palabras, es indistinto el resultado obtenido por cualquiera de las cinco tomas, o sea, bastaría con una sola toma al azar dentro de los cinco días de muestra, para realizar el diagnóstico por el método de ZN. Sin embargo, considerando el modelo humano (Atías, 1998) si la primera toma de muestra coincidiera con el primer día del periodo de patencia, sería prudente repetir la toma tres días después, junto con 6 tomas más, distanciadas en 3 días. De esta manera, el test de Friedman podría mostrar diferencias significativas para este estudio.

Debido por una parte, a la utilización en mayor medida recreativa de los equinos, son necesario mayores estudios de estas poblaciones para, entre otras cosas, establecer el real rol de estos hospedadores como fuente zoonótica (Fayer y Xiao, 2007). Determinar la especie del parásito en esta población animal, contribuye en este sentido. Para esto, se han desarrollado técnicas moleculares que logran identificar las distintas especies de *Cryptosporidium* spp. (Chen, 2002; Fayer y Xiao, 2007; Tzipori y Widmer, 2008; Muñoz, 2011).

8. CONCLUSIONES

8.1 Se demuestra la presencia de *Cryptosporidium* spp. en la población estudiada.

8.2 La población equina analizada se encuentra altamente parasitada, por lo que se sugiere establecer el riesgo sanitario y zoonótico que ello implica. Sobre todo debido a que la enfermedad tendría un carácter sub-clínico.

8.3 El presente estudio indica que no sería necesario instaurar un protocolo seriado de toma de muestra para determinar la presencia del coccidio en esta especie animal. Bastaría con una toma el mismo día a toda la población, para determinar la prevalencia de este parásito en la población de estudio. No obstante, para entender sus características epidemiológicas, más de una toma de muestra por hospedero sería necesaria.

9. BIBLIOGRAFÍA

- **ABRAHAMSEN, M.; TEMPLETON, T.; ENOMOTO, S.; ABRAHANTE, J.; ZHU, G.; LANCTO, C.; DENG, M.; LIU, C.; WIDMER, G.; TZIPORI, S.; BUCK, G.; XU, P.; BANKIER, A.; DEAR, P.; KONFORTOV, B.; SPRIGGS, H.; IYER, L.; ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L.; KAPUR, V.** 2004. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science* (304): 441-445.

- **ATÍAS, A.** 1998. En: *Parasitología Médica*. Editorial Mediterráneo, Santiago, Chile. 615 pp.

- **BJORNEBY, J.; LEACH, D.; PERRYMAN, L.** 1991. Persistent Cryptosporidiosis in Horses with Severe Combined Immunodeficiency. *Infection and Immunity* 59: 3823-3826.

- **CHEN, X.; KEITHLY, J.; PAYA, C.; LARUSSO, N.** 2002. Cryptosporidiosis. *New England Journal of Medicine* 346 (22): 1723-1731.

- **CORDERO DEL CAMPILLO, M; ROJO, F.; MARTÍNEZ, A; SÁNCHEZ, C.; HERNÁNDEZ, S.; NAVARRETE, J.; DÍEZ, P.; QUIROZ, H.; CARVALHO, M.** 1999. *Parasitología Veterinaria*. Ed. Mc Graw-Hill, Interamericana. Madrid, España. 968 pp.

- **FAYER, R.; XIAO, L.** 2007. En: *Cryptosporidium* y Cryptosporidiosis. Fayer y Xiao. 2° ed. Ed CRC Press. Florida, USA. 576 pp.

- **FREDES, F.; RAFFO, E.; MUÑOZ, P.** 2007. First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in stool of Adélie penguin from the Antarctic using acid-fast stain. *Antarctic Science* 19(4): 437-438.

- **GORMAN, T.; GODOY, P.** 1989. Hallazgo de *Cryptosporidium* spp. en un equino F. S. inglés diarreico. Monografías de Medicina Veterinaria, vol. 11 (10): 96-97.

- **GORMAN, G.; SOTO, A.; ALCAINO, H.** 2006. Parasitismo gastrointestinal en perros de comunas de Santiago de diferente nivel socioeconómico. Parasitología Latinoamericana 61: 126-132.

- **HENRIKSEN, S.; POHLENZ, J.** 1981. Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl Neelsen technic. Acta Veterinaria Scandinavica 22: 594-596.

- **MOLINA, R.** 2010. Comparación de la sensibilidad analítica de métodos de tinción tradicionales en la detección del protozooario zoonótico *Cryptosporidium parvum* en muestras de agua inoculadas con el agente. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 129-159.

- **MUÑOZ, P.; FREDES, F.; DÍAZ-LEE, A.; MERCADO, R.; OZAKI, L.** 2011. Detección de *Cryptosporidium* spp. En terneras de lechería de la Región Metropolitana mediante ZN y confirmada por inmunocromatografía y ensayo molecular. Archivos de Medicina Veterinaria 43: 111-116.

- **SIDDIKI, A.; MASUDUZZAMAN, M.** 2009. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis: a brief review. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine 12 (2): 91-111.

- **SNYDER, S.; ENGLAND, J.; M^CCHESNEY, A.** 1978. Cryptosporidiosis in immunodeficient Arabian foals. Veterinary Pathology 15:12-17.

- **TZIPORI, S.; WIDMER, G.** 2008. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends In Parasitology* 24(4): 184-189.

- **XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S.** 2004. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clinical Microbiology Review* 17(1): 72-97.

- **ZANARO, N.; GARBOSSA, G.** 2008. *Cryptosporidium*: after a hundred years. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 42(2): 195-201.

- **ZAR, J.** 1999. En: *Biostatistical analysis*. Cuarta edición, New Jersey, Estados Unidos. 663 pp.

10. ANEXO

Anexo. Ejemplares equinos muestreados del regimiento de Artillería N°1 “Tacna”, clasificados según grupo, sexo y edad (años). Se adjuntan los respectivos resultados de la tinción ZN. Los individuos pertenecen al Ejército de Chile, San Bernardo, Región Metropolitana.

GRUPO I								
N°	NOMBRE	SEXO	EDAD	Día	Día	Día	Día	Día
				1	2	3	4	5
1	CACHIYUYO	M	23	-	-	+	+	+
2	AYUYES	M	21	+	+	-	-	-
3	DAKAR	M	20	+	+	+	+	+
4	KARAKORUM	M	11	+	+	-	-	-
5	KARKAR	M	11	-	-	+	+	-
6	ESTAQUILLA	H	17	-	-	-	-	-
7	JOTE	M	12	+	+	+	-	+
8	DISTINTA	H	21	-	-	-	-	-
9	LAMPARA	H	10	+	+	+	+	+
10	FESTIN	M	16	+	+	+	-	+
11	HUINCHA	H	14	+	+	+	-	+
12	IAN	H	14	+	+	+	+	-
13	MACETERO	M	10	-	-	-	+	+
14	ENTONADA	H	17	-	-	-	-	-
15	KAPOK	M	11	+	+	+	+	+
16	CATALUÑO	M	20	+	+	+	+	+
17	PANTEON	M	6	+	+	+	+	+
18	HIERRO	M	14	+	-	-	-	-
19	GRINGA	H	15	+	+	+	-	+
20	PALERMO	M	6	-	-	-	-	-

GRUPO II								
N°	NOMBRE	SEXO	EDAD	Día				
				1	2	3	4	5
21	HELICE	H	15	-	-	-	-	-
22	FUYAN	H	12	-	-	-	-	-
23	PANIRI	H	8	-	-	-	-	-
24	JINETE	M	11	-	-	-	-	-
25	ESPINOSO	M	12	-	-	-	-	-
26	RAJO	M	20	-	-	-	-	-
27	HORTENSIA	H	15	-	-	-	-	-
28	MACHINA	H	5	-	-	-	-	-
29	INFERIOR	M	7	-	-	+	-	+
30	GUALLE	M	11	-	-	-	-	-
31	MAHUIDA	H	16	-	-	-	-	-
32	BUSQUILLO	M	21	-	-	-	-	-
33	KALAMBACA	H	14	-	-	-	-	-
34	FORRAHUE	M	18	-	-	-	-	-
35	QUICIO	M	15	+	-	-	-	+
36	SIMBAD	M	10	-	-	-	-	-
37	MACHUCAO	M	6	+	+	-	-	-
38	KERIMA	H	9	+	+	+	-	+
39	IMPERIOSA	M	13	-	-	-	-	-
40	MATAHARI	H	10	-	-	-	-	-

GRUPO III								
N°	NOMBRE	SEXO	EDAD	Día	Día	Día	Día	Día
				1	2	3	4	5
41	NAVIDAD	H	1	-	-	-	-	-
42	COPO	M	19	-	-	-	-	-
43	JULIANITO	M	12	-	-	+	-	+
44	NANGATON	M	9	-	-	-	-	-
45	GUIJOSO	M	15	-	-	-	-	-
46	EPUCURA	H	17	+	-	-	-	-
47	IFULCO	M	13	-	-	-	-	-
48	DESFILADERO	M	19	-	-	-	-	-
49	JATITA	H	12	-	-	-	-	-
50	GARRUDA	H	16	-	-	-	-	-
51	KABUKI	M	12	-	-	-	-	-
52	DESTELLO	M	18	-	-	-	-	-
53	LINCAY	M	10	-	-	-	-	-
54	ESTUCO	M	17	-	-	-	-	-
55	KEPI	M	12	-	-	-	-	-
56	DOÑA BARBARA	H	23	-	-	-	-	-
57	HUALLIJARO	M	14	-	-	-	-	-
58	BENI	M	21	-	-	+	-	-
59	DEMÓSTELES	M	18	-	-	-	-	-
60	JERARQUIA	H	13	-	-	-	-	-

GRUPO IV								
N°	NOMBRE	SEXO	EDAD	Día	Día	Día	Día	Día
				1	2	3	4	5
61	NAPELO	M	9	-	-	-	-	-
62	HUILLICHE	M	15	+	+	+	+	+
63	NOCIVA	H	9	-	-	+	+	+
64	QUECHA	H	6	-	-	-	-	-
65	MAHUINCHA	H	10	-	+	+	+	+
66	OLFATIVA	H	8	+	+	+	+	+
67	EPUCHI	M	18	-	-	-	-	-
68	JILGUERO	M	13	-	-	-	-	-
69	INCLEMENTE	M	13	-	-	-	-	-
70	ESPERANZA	H	18	+	+	+	+	+
71	GARDEL	M	16	+	+	+	+	+
72	HUENCHECO	M	14	-	-	-	-	-
73	QUINQUÉ	H	5	-	-	-	-	-
74	MADREPORICO	M	9	-	-	-	-	-
75	INCIDIOSA	H	14	-	+	+	+	-
76	HALAGADA	H	15	+	+	+	+	+
77	KILOVOLTIO	M	11	-	-	-	-	-
78	QUIOSCO	M	6	+	-	-	+	+
79	ESCARLATA	H	18	-	-	-	-	-
80	QUILLANGO	M	5	-	-	-	-	-