



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETECCIÓN DE *Cryptosporidium* spp. EN GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) DE LA CIUDAD DE SANTIAGO, CHILE.

CAROLINA ANDREA ROJAS ROJAS

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

PROFESOR GUÍA: FERNANDO FREDES MARTÍNEZ

SANTIAGO, CHILE
2013



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETECCIÓN DE *Cryptosporidium* spp. EN GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) DE LA CIUDAD DE SANTIAGO, CHILE.

CAROLINA ANDREA ROJAS ROJAS

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: LORETO MUÑOZ

SANTIAGO, CHILE
2013

*Con esa primera y temerosa caricia que le diste a mi mano, te convertiste en parte de mí,
y prometí que te amaría y cuidaría por el resto de tu vida...*

*El pronóstico del tiempo anunciaba que mañana estaría frío y nublado,
al igual que el resto de la semana.*

*Hoy, mi santo, hoy era el día,
tomé la última decisión posible, la correcta, la difícil
ésta que algunos, soberbiamente decían que debía tomarse, pero nadie se atrevía,
sólo yo podría, con todo mi amor por ti, por sobre todo el dolor de decirte adiós, para siempre
fue como una doctora amiga una vez me dijo, tú me avisarías y yo lo sabría.*

*Esperé hasta el anochecer, para que disfrutaras los últimos rayos de sol que sentirías,
y recibiste las últimas caricias que te darían
y esperamos... como si el tiempo pudiera convertirse en milagro, y entonces tuviéramos otra
opción... más tiempo... más días... más horas... algunos minutos más, sólo un poco más...
pero esperar no lo haría menos difícil, el tiempo nunca sería suficiente.*

*Nunca lista y nunca preparada
te coloqué sobre mi regazo, y entendiste que era hora de dormir,
entonces traicioné tu confianza, con esa dosis de veneno benévolo y eficaz, cerraste tus ojos
por última vez,
con la esperanza de que llegaras a ese lugar donde se dice que no existe el dolor.*

*Mil veces adiós,
con flores de lavanda y esa frazadita de polar rojo que con tanto amor te regalaron.*

*Te amo todos los días,
mi amiga...mi hija...mi viejita...mi Luly.*

MEMORIA DE TÍTULO

“DETECCIÓN DE *Cryptosporidium* spp. EN GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) DE LA CIUDAD DE SANTIAGO, CHILE”.

“*Cryptosporidium* spp. DETECTION IN DOMESTIC CATS (*Felis catus*) FROM SANTIAGO CITY, CHILE”.

Carolina Andrea Rojas Rojas*

*Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Resumen

En el presente estudio se analizaron 153 muestras de heces frescas de gatos domésticos sanos, habitantes de la ciudad de Santiago, Chile, en busca del protozooario zoonótico, *Cryptosporidium* spp. Las muestras fueron recolectadas en el periodo abril 2009-septiembre 2010, y luego procesadas en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, mediante tinción de Ziehl-Neelsen y posterior observación con microscopía óptica, obteniéndose una muestra positiva (0,65%), y cinco sospechosas (3,3%). La muestra positiva pertenecía a una hembra, de 6 meses de edad (grupo etario Kitten), *outdoor*, de la comuna El Bosque.

Palabras clave: gato, zoonosis, cryptosporidiosis, *Cryptosporidium* spp., *Ziehl-Neelsen*.

Abstract

In the present study, in order to search for the zoonotic protozoan, *Cryptosporidium* spp. in fresh faeces of healthy domestic cats inhabitants of Santiago, Chile, 153 samples were collected and analyzed. From April 2009 to September 2010, samples were collected and then processed in the Parasitology Laboratory of the Faculty of Veterinary and Animal Sciences of the University of Chile using Ziehl-Neelsen staining and microscopy observation, resulting in one positive sample (0.65%) and five suspect samples (3.3%). The positive sample was from a six months old (Kitten age group) female outdoor feline from the El Bosque commune.

Key words: cat, zoonoses, cryptosporidiosis, *Cryptosporidium* spp., *Ziehl-Neelsen*.

Introducción

La acción del ser humano ha sido uno de los principales determinantes en la evolución y supervivencia de las especies domésticas, especialmente de aquellas que se clasifican como animales de compañía, como lo son el perro (*Canis familiaris*) y el gato (*Felis catus*).

Felis catus pertenece al orden de los carnívoros (proveniente del latín *caro*, carne + *voro*, devorar) y se alimenta típicamente de pequeños mamíferos y aves, siendo un eficaz cazador (Storer *et al.*, 1986).

En relación a la estrecha vinculación entre el ser humano y estas especies animales, se plantean diversas ventajas y desventajas (Ibarra *et al.*, 2003). Entre las ventajas de tener mascotas, se incluyen mejoras tanto en lo físico, como en lo social, así como en lo emocional y en lo cognitivo de sus amos. Estudios han confirmado que los animales influyen de forma positiva en la calidad de vida de las personas solas, enfermas, deprimidas, confinadas y de las que de una u otra manera se encuentran desplazadas de la sociedad (Cattan y Canals, 2006).

La relación humano-animal de compañía también tiene aspectos negativos, como es el riesgo de transmisión de enfermedades al ser humano (Ibarra *et al.*, 2003), ya que tanto el humano como los animales pueden considerarse verdaderos museos ambulantes, en cuyas “dependencias” (órganos, cavidades, tejidos, líquidos orgánicos, etc.) se coleccionan enormes cantidades de otros organismos, como virus, bacterias, hongos y parásitos, algunos de los cuales, infectan sólo a la especie humana, mientras que otros infectan a una o varias especies animales. También existe más de un centenar de agentes que afectan tanto al humano como a otros animales vertebrados (Alcaíno y Gorman, 1998). Cuando una enfermedad tiene su origen en la transmisión de agentes infecciosos entre los animales y el ser humano, esto corresponde a una zoonosis (Cattan y Canals, 2006). Las zoonosis, que en su mayoría son de origen parasitario (Woolhouse y Gowtage-Sequeira, 2005), son un fenómeno natural que acompaña a la especie humana desde su origen (Cattan y Canals, 2006), con efectos negativos variados (Acha y Szyfres, 2003) y pudiendo ser la dirección de la transmisión desde los animales al ser humano o viceversa (Cattan y Canals, 2006).

En la actualidad se ha introducido el concepto de enfermedades, o zoonosis, emergentes o re-emergentes para aquellas enfermedades infecciosas que han elevado su prevalencia, probablemente a consecuencia de un conjunto de situaciones que se enmarcan en el llamado cambio global (Cattan y Canals, 2006).

La cryptosporidiosis es considerada una enfermedad zoonótica (re) emergente a nivel mundial, causada por protozoos del género *Cryptosporidium*, pertenecientes al Phylum Apicomplexa, clase Coccidia, orden Eucoccidiorida, familia Cryptosporidiidae (Fayer y Xiao, 2008).

Tanto anfibios, como reptiles, aves, peces y mamíferos, sirven de hospedadores para 19 especies de *Cryptosporidium*, todas las cuales han sido confirmadas mediante información morfológica, biológica y molecular. Además, existe información genómica secuenciada de más de 40 aislados obtenidos desde varios hospedadores vertebrados, los cuales ya fueron reportados en la literatura científica, o bien, listados en el GenBank. Tales aislados carecen de estatus taxonómico y son nombrados como genotipos basados en el hospedador de origen, pero indudablemente, algunos de ellos, eventualmente serán reconocidos como especies (Fayer, 2010).

En la tabla 1 se presentan las especies reconocidas de *Cryptosporidium*, junto al hospedador donde fue descrito y ubicado por primera vez, así como también junto al tamaño de su respectivo ooquiste (adaptado de Fayer, 2010; Smith *et al.*, 2005; Zanaro y Garbossa, 2008).

De las 19 especies reconocidas de *Cryptosporidium*, tres de ellas han sido descritas en el gato, *C. felis*, *C. muris* (Fayer y Xiao, 2008) y *C. parvum* (Neira *et al.*, 2010), las que también ya fueron reportadas en seres humanos. Sin embargo, estas no son la únicas especies que pueden infectar a la especie humana, ya que existen otras cuatro con características zoonóticas, como son: *C. meleagridis*, *C. andersoni*, *C. canis* y *C. suis*; mientras que la única especie propia del ser humano es *C. hominis* (Fayer, 2010).

En cuanto a *C. felis*, este ha sido reportado en 58 humanos a nivel mundial (Iseki, 1979, citado por Fayer, 2010), así como en un bovino (Bornay-Llinares *et al.*, 1999, citado por Fayer, 2010). Sin embargo, cabe destacar que también se ha descrito su incapacidad de infectar ratones, ratas, cobayos y perros (Fayer, 2010).

En cuanto a su ciclo biológico, *Cryptosporidium* spp. es un parásito monógeno (monoxeno) y heterogenético, lo primero debido a que necesita de un solo hospedador para desarrollar su ciclo biológico, y lo segundo, a que dicho ciclo incluye fases de multiplicación asexual y sexual (Ortega *et al.*, 1999).

El ciclo biológico comienza con la ingestión de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp., los cuales, previamente esporulados en el hospedador, y conteniendo cada uno cuatro esporozoitos desnudos en su interior, son eliminados por las heces de los animales infectados (Urquhart *et al.*, 2001). La ingestión es seguida por el desenquistamiento en el tracto gastrointestinal del hospedador, quedando así en libertad los esporozoitos. Los factores que influyen más en esta fase, son la temperatura corporal de los mamíferos, las sales biliares y, posiblemente, la tripsina. Los esporozoitos liberados, mediante movimientos de contracción-extensión y deslizamiento, alcanzan el borde luminal de los enterocitos, en donde son invaginados y englobados por la membrana de la célula hospedadora, formándose una vacuola parasitófora, con el parásito en su interior (Ortega *et al.*, 1999).

Las etapas de reproducción incluyen dos fases de multiplicación asexual (esquizogonia) y una sexual (gametogonia), así como también la fase de esporogonia, la cual ocurre al interior de la célula hospedadora, y tiene como consecuencia la formación de los esporozoítos. Se reconocen dos tipos de ooquistes, los de pared gruesa o doble pared ooquistica, que corresponden al 80% de ellos y son las formas de resistencia del parásito, responsables de la transmisión entre hospedadores, mientras que el 20% restante corresponden a ooquistes de pared fina, responsables de la autoinfección (Ortega *et al.*, 1999).

Los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. son muy resistentes a las condiciones medio ambientales, ya que por ejemplo, son capaces de resistir cinco minutos de exposición a 60°C, 20 semanas a 0°C, cuatro semanas a -5 °C, hasta una semana a -10°C o 24 hrs. a -20°C. Así también, se ha comprobado la resistencia de estas estructuras a varias sustancias químicas, muchas de las cuales son usadas como desinfectantes, tales como Lysol® (orto-di cloro-para-fenol), productos yodados, formalina, creolina, amonio cuaternario, hipoclorito, etanol, etc. Por otro lado, el ozono es considerado uno de los desinfectantes químicos más efectivos en el tratamiento de agua potable contra este agente parasitario (Fayer y Xiao, 2008).

La cryptosporidiosis es la infección causada por protozoos del género *Cryptosporidium* spp., la que afecta a gran número de animales vertebrados, incluyendo al ser humano. Es considerada una enfermedad parasitaria de distribución cosmopolita (Fayer y Xiao, 2008) y una zoonosis (re) emergente (Ecker *et al.*, 2005), capaz de generar distintos grados de afección gastrointestinal sobre todo en animales y seres humanos jóvenes, así como en individuos inmunocomprometidos (Fayer y Xiao, 2008).

Si bien el parásito fue primero descrito como un hallazgo biológico por Tyzzer (1907) en ratones (citado por Fayer y Xiao, 2008), sin relacionarlo con patología alguna, sólo en 1955 fue reportado por primera vez como agente patógeno, en pavos, y luego, durante la década del setenta, se lo reporta como causa de diarrea neonatal en terneros. Los primeros dos casos de cryptosporidiosis humana se registraron durante la misma década, uno en una niña con enterocolitis y el otro, en un paciente con SIDA. Posteriormente, con el desarrollo pandémico de esta última durante los años ochenta, más casos de cryptosporidiosis fueron identificados, así como también se vio a *Cryptosporidium* spp. como agente causal de diarreas en individuos inmunocompetentes (Fayer y Xiao, 2008). En Chile, la cryptosporidiosis se reconoce como causa de diarrea en animales desde la década del ochenta, y en humanos se la asocia a cuadros digestivos a partir de 1985 (Retamal *et al.*, 2010).

El cuadro clínico de cryptosporidiosis en humanos, va desde una diarrea leve, autolimitante, hasta una enteritis fulminante “cólera-like” complicada con enfermedad extraintestinal, sin embargo, también existe la infección asintomática, pero se desconoce su frecuencia (Fayer y Xiao, 2008). La signología clínica de la enfermedad sintomática incluye diarrea acuosa, dolor abdominal, fatiga, náuseas, vómitos, flatulencia, hinchazón, urgencia de evacuación, incontinencia, anorexia, pérdida de peso, fiebre leve (hasta 38°C), calosfríos, sudoraciones, mialgias y dolores de cabeza. La severidad y duración del cuadro, varían según el estado inmunológico del individuo afectado. En caso de que la función inmunológica esté intacta, la cryptosporidiosis es usualmente explosiva al comienzo, con una duración de aproximadamente 10 a 14 días, antes de una completa recuperación clínica y parasitológica. Ahora bien, si se trata de un hospedero inmunocomprometido, el inicio de la cryptosporidiosis generalmente es insidioso, en que la diarrea y sus síntomas preceden en semanas o meses a la detección del organismo en las heces. En estos últimos individuos, la enteritis se vuelve crónica, y la severidad puede aumentar o disminuir. Sin embargo, la cryptosporidiosis también puede resolver espontáneamente en pacientes de cualquier espectro de infección con VIH. Aún así, para la mayor parte de los enfermos de SIDA, la cryptosporidiosis es una complicación devastadora, ya que contribuye significativamente a la morbilidad de esta parasitosis y acelera la muerte del paciente. Además del SIDA, existen otras condiciones asociadas con cryptosporidiosis prolongada como son la hipogammaglobulinemia congénita, la deficiencia de IgA, las infecciones virales concurrentes y la malnutrición e inmunosupresión exógena, como la generada por el uso de corticoesteroides. En caso de inmunosupresión exógena, si ésta puede discontinuarse, la cryptosporidiosis se resolverá (Fayer y Xiao, 2008).

La cryptosporidiosis biliar, es una de las presentaciones extraintestinales descritas en seres humanos para esta enfermedad, la cual ha sido bien documentada sólo en hospederos inmunocomprometidos. Dado que el diagnóstico de ésta requiere de procedimientos invasivos que no se justifican en ausencia de opciones terapéuticas útiles, la verdadera incidencia de esta complicación es desconocida. Pancreatitis y artritis reactiva asociada a cryptosporidiosis ha sido también descrita en pacientes inmunocompetentes, así como en aquellos con SIDA. Cryptosporidiosis respiratoria, bien reconocida en aves, ha sido diagnosticada en unos pocos humanos, pero en estos casos, no se ha descartado la contaminación de secreciones respiratorias a partir de una infección intestinal (Fayer y Xiao, 2008).

Ahora bien, en el caso de los animales carnívoros específicamente, la enfermedad ha sido comunicada pocas veces y siempre en animales muy jóvenes, desarrollando una fuerte inmunidad a la reinfección (Barriga, 2002).

En el caso del gato, si bien la mayoría de los que se encuentran excretando al parásito no desarrollan enfermedad clínica, en caso de sí presentarse el cuadro, dentro de los signos clínicos comunes se incluyen: diarrea (crónica o intermitente), anorexia, pérdida ponderal, debilidad y deshidratación. Los animales con mayor riesgo de infección y de generar la consecuente enfermedad, son los gatos jóvenes y los gatos inmunosuprimidos (por ejemplo gatos con linfoma alimentario, enfermedad intestinal inflamatoria, o aquellos con infección por virus de la leucemia felina o virus de la inmunodeficiencia felina). No existe predilección sexual ni racial. Es posible la coinfección con otros parásitos intestinales, tales como *Giardia* y *Tritrichomonas foetus*, lo que conduciría a una enfermedad clínica de mayor gravedad (Crystal, 2009).

La transmisión de *Cryptosporidium* spp. ocurre a través de la ingestión de alimentos y/o agua contaminados con material fecal de individuos infectados, o bien, mediante el contacto directo con heces contaminadas. Algunos grupos que poseen un alto riesgo de infección a través de esta última vía son: niños, pacientes postrados y quienes los atienden, así como personas que trabajan con infantes que aún usan pañales (personal de salas cuna, por ejemplo) e individuos que practican sexo anal (Acha y Szyfres, 2003).

En cuanto a la fuente de infección, para los animales domésticos, son otros animales domésticos, mientras que para el ser humano son otras personas infectadas, o bien, bovinos infectados, y aunque no existe evidencia de que otros animales sean una fuente importante de infección para la especie humana, se han encontrado gatos infectados por *Cryptosporidium*

spp. en asociación con una mujer embarazada, y con enfermos de SIDA, sin embargo, en dichos casos se desconoce el sentido en que ocurrió la infección (Acha y Szyfres, 2003; Neira *et al.*, 2010).

El periodo de prepatencia varía según el hospedero, la especie de *Cryptosporidium* spp., y su dosis infectiva. Periodos de prepatencia experimentalmente obtenidos, van desde un mínimo de dos hasta un máximo de 24 días, dependiendo de los factores de variación antes mencionados (Fayer y Xiao, 2008).

Periodos de patencia, obtenidos de forma experimental, resultaron en rangos que van desde uno hasta 20 días, dependiendo de la especie de hospedero y *Cryptosporidium* spp. utilizado (Fayer y Xiao, 2008).

Respecto al diagnóstico, como método de rutina en los laboratorios de parasitología veterinaria se utiliza la visualización de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en las deposiciones, los cuales son sub-esféricos y muy pequeños, con 4 esporozoítos “libres” en su interior (no contenidos dentro de esporoquistes), con un cuerpo residual grande que se ve como una mancha refringente, y positivos a la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN), gracias a su característica de ser ácido alcohol resistentes (Barriga, 2002). Con dicha tinción los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se tiñen rojos, mientras que levaduras o detritos fecales se tiñen de color rojo pálido (Fayer y Xiao, 2008). Otra posible técnica diagnóstica microscópica, basada en las características de ácido alcohol resistencia del parásito, y que ha sido utilizada y reportada con igual o mayor sensibilidad que ZN, es el método de aureamina, pero que tiene un mayor costo de implementación, ya que requiere de un microscopio de fluorescencia para analizar las muestras (Diaz-Lee *et al.*, 2011; Muñoz *et al.*, 2011).

Recientemente se han implementado técnicas inmunológicas, y moleculares, para el diagnóstico de este agente zoonótico. Las primeras de ellas, se basan en *kits* diagnósticos de alto precio, los que son utilizados en medicina humana y en algunos estudios de cryptosporidiosis animal (Diaz-Lee *et al.*, 2011; Muñoz *et al.*, 2011), en tanto que las moleculares, no necesariamente son más sensibles debido a múltiples factores como la inadecuada extracción del ADN desde los ooquistes del parásito (Wiedenmann *et al.*, 1998, citado por Muñoz *et al.*, 2011), a la degradación del ADN extraído, y a la presencia de inhibidores, en muestras de heces, de la actividad de la polimerasa responsable de la amplificación del material genético (Jaranillo *et al.*, 2008, citado por Muñoz *et al.*, 2011), sumado al escaso número de ooquistes que suelen ser eliminados por los animales sin

signología gastrointestinal. Por todo lo anterior, la técnica de ZN, sigue siendo la más utilizada para la detección de este agente parasitario zoonótico.

Debido a que las infecciones por *Cryptosporidium* spp. son iniciadas por la ingesta o inhalación de ooquistes, las medidas para prevenir o limitar la diseminación de la infección deben estar dirigidas a eliminar o reducir la contaminación ambiental dada por los ooquistes infecciosos (Fayer y Xiao, 2008).

La urgencia por encontrar una terapia medicamentosa efectiva contra la cryptosporidiosis en individuos con SIDA, ha llevado a la administración sin precedentes de una amplia gama de agentes quimioterápicos, inmunomoduladores y paliativos a esta población, que no han sido efectivos. Sin embargo, la Nitazoxanida (Alinia®), actualmente se encuentra aprobada por la FDA como tratamiento para la cryptosporidiosis en individuos inmunocompetentes (Fayer y Xiao, 2008).

Tanto en humanos como en animales, una terapia efectiva para la cryptosporidiosis considera la rehidratación con reposición de electrolitos, uso de drogas antidiarreicas, y el uso de drogas que por reputación son consideradas útiles contra *Cryptosporidium* spp. (Fayer y Xiao, 2008).

Dado que no hay drogas universalmente efectivas para la profilaxis o terapia en humanos o animales que prevenga o detenga la producción de ooquistes por parte de los individuos infectados, la higiene, incluyendo la desinfección, sigue siendo la herramienta de manejo más efectiva (Fayer y Xiao, 2008).

Debido a las características particulares de gran resistencia que presentan los ooquistes de *Cryptosporidium*, a la baja dosis infectante de ellos requerida para generar enfermedad, a la falta de especificidad de hospedero que presentan algunas especies del género, entre otros factores, hacen que la cryptosporidiosis sea una zoonosis capaz de generar brotes tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo. Lo anterior, sumado a que no se dispone de un agente quimioterápico efectivo, para la terapia de esta enfermedad en individuos inmunocomprometidos, y que hasta la fecha no hay estudios nacionales publicados, dedicados a la pesquisa de este protozoo parásito en el gato doméstico, es que resulta útil el indagar respecto al nivel de parasitismo de este agente en dicho animal de compañía y en diferentes comunas de la ciudad de Santiago, Chile, detectando su presencia, y describiéndola según edad, sexo y tipo de confinamiento.

Material y métodos

Para el presente estudio se analizaron 153 muestras de heces recolectadas desde gatos domésticos (periodo abril 2009 - septiembre 2010), de distintas comunas de la ciudad de Santiago (Región Metropolitana). Dichas muestras correspondieron a heces recién emitidas, fijadas en etanol al 70% y provenientes exclusivamente de gatos sin signos clínicos, o sin datos anamnésticos que indicaran una posible enfermedad gastrointestinal concurrente.

Tamaño de muestra:

El tamaño de muestra se determinó considerando un nivel de confianza de 95%, una prevalencia de *Cryptosporidium* spp. de un 1,9% y una población arbitraria de 1.000 felinos que consultaran una clínica veterinaria durante un año, calculado con el programa Win Episcopo 2.0. La información prevalencial de éste protozoo parásito, se obtuvo desde Gorman *et al.*, (2006), en donde la prevalencia fue obtenida en especie canina, debido a que actualmente no se registran estudios prevalenciales publicados a nivel nacional, de *Cryptosporidium* spp. en el gato doméstico.

Recolección de muestras:

Las muestras se obtuvieron de gatos de cualquier edad, de ambos sexos, y que habitasen en cualquier comuna de la ciudad de Santiago. Al momento de la recolección, las heces estaban frescas, es decir, habían sido recién emitidas, y se tomaron porciones del tamaño de una nuez aproximadamente, las que fueron colocadas en tubos plásticos, y luego homogenizadas en etanol al 70% como método de fijación, para ser almacenadas a temperatura de refrigeración hasta su procesamiento.

Las muestras fueron obtenidas, previo consentimiento informado del propietario, mediante dos métodos, ya fuera a través de la extracción manual (con guante de látex) directamente desde el recto de los pacientes, aún estando bajo efecto anestésico, posterior a un procedimiento quirúrgico, o bien, recogiendo una porción de heces recién emitidas desde el suelo, caja de arena sanitaria, o jaula de hospitalización, según correspondiera. Para el segundo método, es importante considerar que las muestras correspondieron a porciones “limpias” de las heces, es decir, que no habían tenido contacto con ningún sustrato, para así evitar la posible contaminación de la muestra. Previo al almacenaje, las muestras fueron

claramente identificadas y enumeradas. Así también, fueron registradas en una planilla digital que incluyó información potencialmente relevante, como edad, sexo, tipo de confinamiento (*outdoor* o *indoor*)¹ y comuna de origen.

En cuanto a la edad de los gatos, estos fueron clasificados en seis grupos etarios, según lo establecido por la “Feline Advisory Bureau” (2008) en su programa “WellCat for life”.

Tales grupos correspondieron a:

- 1.- Etapa gatito (Kitten), desde el nacimiento hasta los seis meses.
- 2.- Etapa Junior, desde los siete meses a los dos años.
- 3.- Etapa Prime, desde los tres años a los seis años.
- 4.- Etapa Maduro, desde los siete años a los 10 años.
- 5.- Etapa Senior, desde los 11 años a los 14 años.
- 6.- Etapa Geriátrica, desde los 15 años en adelante.

Procesamiento de muestras:

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Éste incluyó una centrifugación a 1.500g por 15 minutos, la eliminación del sobrenadante, la homogenización y fijación de la mitad del pellet obtenido en formalina al 10%, por 20 minutos como mínimo. Cumplido dicho tiempo, se procedió a centrifugar a 1.500g por 15 minutos, eliminando el sobrenadante, y con el sedimento obtenido, se realizó un extendido de 1 x 0,5 cm² aproximadamente, sobre un portaobjetos, el cual se dejó secar a temperatura ambiente, para luego ser teñido mediante la técnica de Ziehl-Neelsen.

Tinción de Ziehl- Neelsen modificada (Henriksen y Pohlenz, 1981)

Una vez seco el extendido, se depositó fucsina básica sobre el portaobjetos, cubriéndolo completamente. Luego, éste fue calentado, hasta lograr emisión de vapores, lo anterior se logró utilizando un algodón embebido en alcohol y encendido, el cual se pasó repetidamente por

¹ *Outdoor*: gato con acceso al exterior; *Indoor*: gato sin acceso al exterior.

debajo del portaobjetos, teniendo la precaución de no hervir el colorante, el cual se dejó actuar por 20 minutos. Ya transcurrido dicho tiempo, el extendido fue lavado con agua potable, directamente bajo la llave, procurando colocar el portaobjetos de modo que su canto lateral atravesase el chorro de agua. Ya eliminado el exceso de colorante, y apoyando la placa por su canto lateral sobre papel absorbente, se retiró el exceso de agua. Posteriormente, se agregó alcohol ácido cubriendo el extendido, se esperó 30 segundos y luego se lavó con agua corriendo nuevamente. A continuación, el portaobjetos se cubrió con azul de metileno y se dejó actuar durante cinco minutos, volviéndose a lavar con agua potable, eliminando el exceso de colorante. Posteriormente se retiró el exceso de agua, apoyando la placa por su canto lateral sobre papel absorbente, y se dejó secar a temperatura ambiente. Con la tinción previamente realizada, y completamente seca, se procedió a la observación en microscopio óptico con un aumento de 100x utilizando aceite de inmersión.

Resultados

En el presente estudio se obtuvo un total de 153 muestras, de las cuales 55 (35,9%) pertenecían a gatos machos, y 98 (64,1%) a hembras. Respecto al número de muestras según grupo etario, la distribución fue la siguiente: 29 (19%) etapa Kitten, 66 (43,1%) etapa Junior, 34 (22,2%) etapa Prime, 17 (11,1%) etapa Maduro, 6 (3,9%) etapa Senior, y 1 (0,7%) etapa Geriátrica. En la figura 1, se presenta la distribución del número de muestras según comuna de origen.

De las 153 muestras analizadas, se determinó una muestra positiva (0,65%) (Figura 2), y cinco sospechosas (3,3%). Respecto a las muestras determinadas como sospechosas, estas poseen dicho estatus debido a que, si bien tanto el color como la morfología de las estructuras ooquisticas en ellas encontradas concuerdan con ooquistes de *Cryptosporidium* teñidos con Ziehl - Neelsen, el tamaño de dichas estructuras, no corresponde a los tamaños descritos para los ooquistes de ninguna de las 19 especies de *Cryptosporidium* actualmente reconocidas, aunque si se encuentran dentro de los rangos de medidas reportadas para esta especie parasitaria.

En la tabla 2, se presenta información tanto de la muestra positiva, como de las sospechosas, junto al tamaño de los ooquistes en ellas observados, además del sexo, grupo etario, tipo de confinamiento y comuna de hábitat del gato donador de la muestra.

Discusión

Mediante la presente memoria, fue posible detectar la presencia de *Cryptosporidium* spp. en la especie *Felis catus*, en individuos sin cuadro gastrointestinal concurrente y que habitan en distintas comunas de la ciudad de Santiago, corroborándose así la existencia de dicho parásito en el gato doméstico, en Chile. Lo anterior dado que a nivel nacional, ya había sido descrita la presencia de *Cryptosporidium* spp. en *F. catus* en dos estudios previos al presente, el primer reporte fue realizado por Araya *et al.* (1987), en el cual se muestrearon diferentes especies animales del Norte de Chile (I a V regiones) en busca del coccidio parásito, dicho trabajo incluyó únicamente a un gato, el cual resultó positivo al protozoo. El segundo hallazgo lo realizó Neira *et al.* (2010), durante la investigación de un caso clínico humano de diarrea prolongada en la V región del país, cuyo paciente era una mujer embarazada egresada de medicina veterinaria, quien dentro de sus mascotas poseía a tres gatos, dos de tres meses y una gata de un año de edad, de los cuales ambos cachorros resultaron positivos microscópicamente a *Cryptosporidium* y molecularmente a *C. parvum*, al igual que la mujer, en tanto que la gata de un año resultó negativa al protozoo. Por esto, el presente trabajo corresponde al tercer reporte de *Cryptosporidium* spp. en el gato doméstico en Chile, al primero realizado en la Región Metropolitana, puntualmente en la ciudad de Santiago, y al único destinado a la pesquisa de este coccidio en *F. catus*.

Debido al bajo porcentaje de positividad encontrado en este estudio (0,65%), se puede inferir que probablemente, en gatos sanos de la ciudad de Santiago, la frecuencia de infección es baja, similar a lo reportado por Paoletti *et al.* (2011), en donde se examinaron muestras de material fecal de 181 gatos (126 con propietario y 55 callejeros) habitantes de la zona central de Italia, mediante técnica de inmunofluorescencia, y PCR, obteniéndose sólo muestras negativas. Muy distinto a lo encontrado por Funada *et al.* (2007), quienes trabajaron con heces de 327 gatos, con propietario, provenientes de la ciudad de São Paulo, estudio que arrojó un número de 103 muestras positivas, es decir un 31,5% de positividad, para lo cual es importante mencionar que en dicho trabajo no se realizaron técnicas de tinción especiales para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., por lo tanto cabe la posibilidad de que muestras que contenían estructuras similares al parásito, fueran dadas como positivas.

Por otro lado, si las cinco muestras consideradas como sospechosas en el presente estudio, fueran analizadas por ejemplo, mediante técnicas moleculares y resultaran positivas a *Cryptosporidium*, la frecuencia de positividad de este trabajo sería de 3,9%, es decir, aún muy por debajo de lo obtenido por Funada *et al.* (2007), pero superior a lo descrito por Gorman *et al.*

(2006), que correspondía a un 1,9% de positividad (n=582) para *Cryptosporidium* spp. en muestras de heces de perros, habitantes de la ciudad de Santiago de Chile.

Debido a que en este trabajo, se utilizaron animales gastrointestinalmente sanos, tanto anamnésica como clínicamente, era de esperarse que no se obtuviera una alta frecuencia de muestras positivas, ya que está descrito que en el caso de los animales carnívoros, específicamente, la cryptosporidiosis es pocas veces comunicada (Barriga, 2002).

La muestra positiva del presente estudio pertenecía a una gata de seis meses de edad (etapa Kitten), similar a lo ocurrido en el caso clínico de Neira *et al.* (2010), en el cual, resultaron positivos a *C. parvum* sólo los dos gatos de etapa Kitten (3 meses de edad), y no la gata de etapa Junior (1 año de edad), a pesar de que convivían y que probablemente todos tenían el mismo riesgo de infección, lo cual corroboraría lo ya descrito en la literatura respecto a que precisamente tienen mayor riesgo de infección los gatos jóvenes (Crystal, 2009), los que luego, desarrollarían una fuerte inmunidad frente a la reinfección (Barriga, 2002).

Es necesario indicar que la muestra positiva del presente trabajo, provenía de un felino con acceso al exterior (*outdoor*), lo cual, podría aumentar el riesgo de contraer parásitos gastrointestinales transmitidos por vía fecal-oral, simplemente por incrementar el contacto con diversas fuentes de infección.

Dado que no existían estudios previos a nivel nacional destinados a la pesquisa de *Cryptosporidium* spp. en el gato doméstico, es que este trabajo resulta relevante, sentando un precedente para futuras investigaciones en el tema, para lo cual debiera considerarse que si bien, el gato no pareciera ser una especie de gran importancia epidemiológica para el contagio de seres humanos, sí se han encontrado gatos infectados por *Cryptosporidium* en asociación con una mujer embarazada, y con enfermos de SIDA, desconociéndose el sentido en que ocurrió dicha infección (Acha y Szyfres, 2003; Neira *et al.*, 2010), y por lo tanto, esta especie doméstica podría ser una fuente más de contaminación ambiental. Por otro lado, sería interesante realizar una investigación en individuos diarreicos, o bien, exclusivamente en individuos jóvenes, en busca de *Cryptosporidium* spp., ya que como se indicó anteriormente los gatos jóvenes son los que tienen mayor riesgo de infección por dicho agente (Crystal, 2009).

Finalmente, junto con informar por primera vez la presencia de *Cryptosporidium* spp. en *F. catus* sin signología gastrointestinal, habitantes de la ciudad de Santiago de Chile, y sugerir un bajo nivel de infección en ellos, con el presente trabajo no es posible determinar si estamos

ante una parasitosis de tipo emergente o re emergente en el caso del felino doméstico, ya que se carece de información prevalencial previa en dicha zona geográfica y en dicho animal.

REFERENCIAS

- **ACHA, P. N.; SZYFRES, B.** 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3ª edición. Organización panamericana de la salud. Washington DC., EUA. v.3. 413 p.
- **ALCAÍNO, H.; GORMAN, T.** 1998. Enfermedades parasitarias transmitidas por el perro y el gato al hombre. In: Atias, A. Parasitología Médica. Ed. Mediterráneo Ltda. Santiago, Chile. pp. 547-557.
- **ARAYA, J.; GONZÁLEZ, J.; SAGUA, H.; OLIVARES, W.; RIMASSA, C.; VIDELA, M.** 1987. Cryptosporidiosis en el Norte de Chile. I. Prevalencia en animales domésticos, sinantrópicos y silvestres. Bol Chil Parasitol. 42:7-11.
- **BARRIGA, O.** 2002. Infecciones por Protozoos. In: Las enfermedades parasitarias de los animales domésticos en la América Latina. Ed. Germinal. Santiago, Chile. pp. 167-200.
- **CATTAN, P.; CANALS, M.** 2006. Zoología médica: una visión de las especies potencialmente peligrosas. Editorial Universitaria, S.A. Santiago, Chile. 159 p.
- **CRYSTAL, M.** 2009. Diarrea por *Cryptosporidium* (criptosporidiosis). In: Norswoworthy, G.; Crystal, M.; Grace, S.; Tilley, L. El paciente felino. 3ª edición. Inter-medica. Buenos Aires, Argentina. pp. 77-78.
- **DÍAZ-LEE, A.; MERCADO, R.; ONUOHA, E.; OZAKI, L.; MUÑOZ, P.; MUÑOZ, V.; MARTÍNEZ, F.; FREDES, F.** 2011. *Cryptosporidium parvum* in diarrheic calves detected by microscopy and identified by immunochromatographic and molecular methods. Vet. Parasitol. 176(2-3): 139-144.
- **ECKER, D.J.; SAMPATH, R.; WILLETT, P.; WYATT, J.R.; SAMANT, V.; MASSIRE, C.; HALL, T.A.; HARI, K.; McNEIL, J.A.; BÜNCHEN-OSMOND, C.; BUDOWLE, B.** 2005. The Microbial Rosetta Stone Database: a compilation of global and emerging infectious microorganisms and bioterrorist threat agents. [en línea]. BMC Microbiol. 5:19 <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/5/19>> [consulta 23-04-2011].

- **FAYER, R.; XIAO, L.** 2008. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2ª edición. CRC Press. Boca Raton, EUA. 560 p.
- **FAYER, R.** 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. Exp. Parasitol. 124: 90–97.
- **FELINE ADVISORY BUREAU.** 2008. Life Stages Redefined. [en línea] cap.5. **In:** WellCat for life. <http://www.fabcats.org/well_cat/publications/WellCat%20Veterinary%20Handbook.pdf>. [consulta: 11-01- 2012].
- **FUNADA, M.R.; PENA, H.F.J.; SOARES, R.M.; AMAKU, M.; GENNARI, S.M.** 2007. Freqüência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos atendidos em hospital-escola veterinário da cidade de São Paulo. Arq Bras Med Vet Zootec. 59(5):1338-1340.
- **GORMAN, T.; SOTO, A.; ALCAINO, H.** 2006. Parasitismo gastrointestinal en perros de comunas de Santiago de diferente nivel socioeconómico. Parasitol. Latinoam. 61(3-4):126-132.
- **HENRIKSEN, S.A.; POHLENZ, J.F.L.** 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. Acta Vet. Scand. 22:594-596.
- **IBARRA, L.; MORALES, M.; ACUÑA, P.** 2003. Aspectos demográficos de la población de perros y gatos en la ciudad de Santiago, Chile. Av. Cienc. Vet. 18(1):13-20.
- **MUÑOZ, P.; FREDES, F.; DÍAZ-LEE, A.; MERCADO, R.; OZAKI, L.** 2011. Detección de *Cryptosporidium* spp. en terneras de lecherías de la Región Metropolitana mediante Ziehl Neelsen y confirmada por inmunocromatografía y ensayo molecular. Arch Med Vet. 43: 111-116.
- **NEIRA, P.; MUÑOZ, N.; ROSALES, M.J.** 2010. Infección por *Cryptosporidium parvum* en una mujer embarazada, inmunocompetente, con riesgo ocupacional. Rev Chil Infect. 27(4): 345-349.
- **ORTEGA, L.M.; GÓMEZ, M.; ROJO, F.A.** 1999. Parasitosis del aparato digestivo. **In:** Cordero, M.; Rojo, F.A.; Martínez, A.R.; Sánchez, M.C.; Hernández, S.; Navarrete, J.; Díez, P.; Quiroz, H.; Carvalho, M. Parasitología Veterinaria. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid, España. pp. 213-221.

- **PAOLETTI, B.; OTRANTO, D.; WEIGL, S.; GIANGASPERO, A.; DI CESARE, A.; TRAVERSA, D.** 2011. Prevalence and genetic characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* in cats from Italy. *Res. Vet. Sci.* 91:397-399.
- **RETAMAL, P.; ÁBALOS, P.; FREDES, F.** 2010. Criptosporidiosis bovina. In: Enfermedades animales producidas por agentes biológicos. Editorial Universitaria, S.A. Santiago, Chile. pp. 42-48.
- **SMITH, H.V.; NICHOLS, R.A.B.; GRIMASON, A.M.** 2005. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends Parasitol.* 21(3):133-142.
- **STORER, T.; USINGER, R.; STEBBINS, R.; NYBAKKEN, J.** 1986. Clase mamíferos. In: Zoología General. 6ª edición. Ediciones Omega S.A. Barcelona, España. pp. 818-854.
- **URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W.** 2001. Protozoología Veterinaria. In: Parasitología Veterinaria. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. pp. 239-290.
- **WOOLHOUSE, M.; GOWTAGE-SEQUERIA, S.** 2005. Host Range and Emerging and Reemerging Pathogens. [en línea]. *Emerging Infect. Dis.* Vol. 11. N°12: 1842-1847. <<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol11no12/05-0997.htm>> [23-04-2011].
- **ZANARO, N. L.; GARBOSSA, G.** 2008. *Cryptosporidium*: cien años después. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 42(2):195-201.

FIGURAS

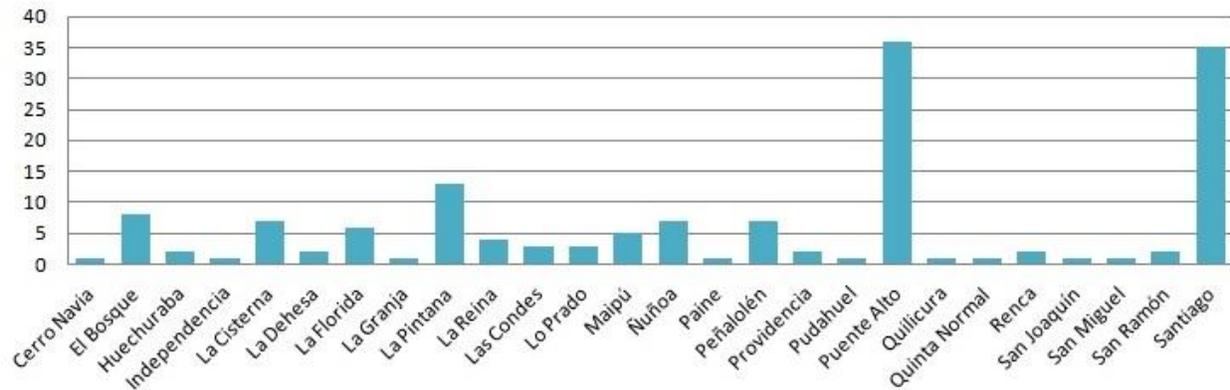


Figura 1: Número de muestras de heces de gatos obtenidas según comuna de la ciudad de Santiago (2009-2010).

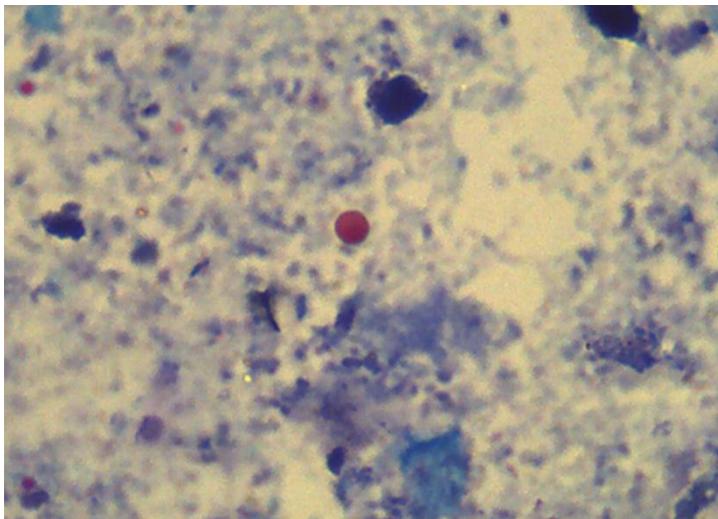


Figura 2: Ooquiste de *Cryptosporidium* detectado mediante Ziehl- Neelsen modificado en heces de gato doméstico de la ciudad de Santiago (1.000 x).

TABLAS

Tabla 1: Especies de *Cryptosporidium* con su hospedador, ubicación primaria y tamaño de ooquiste (µm).

Especie	Hospedador	Ubicación	Tamaño del ooquiste
<i>C. muris</i>	<i>Mus musculus</i> (Ratón)	Estómago	5.6 x 7.4
<i>C. parvum</i>	<i>Mus musculus</i> (Ratón)	Intestino	4.5 x 5.5
<i>C. wrairi</i>	<i>Cavia porcellus</i> (Cobayo)	Intestino	4.0-5.0 x 4.8-5.6
<i>C. felis</i>	<i>Felis catus</i> (Gato)	Intestino	4.5 x 5.0
<i>C. andersoni</i>	<i>Bos Taurus</i> (bovinos)	Abomaso	5.5 x 7.4 (5.0-6.5 x 6.0-8.1)
<i>C. canis</i>	<i>Canis familiaris</i> (Perro)	Intestino	4.95 x 4.71
<i>C. hominis</i>	<i>Homo sapiens</i> (Humano)	Intestino	4.5 x 5.5
<i>C. suis</i>	<i>Sus scrofa</i> (Cerdo)	Intestino	5.05 x 4.41
<i>C. bovis</i>	<i>Bos Taurus</i> (bovinos)	Desconocida	4.76-5.35 x 4.17-4.76
<i>C. fayeri</i>	<i>Macropus rufus</i> (Canguro rojo)	Desconocida	4.5-5.1 x 3.8-5.0
<i>C. ryanae</i>	<i>Bos Taurus</i> (bovinos)	Desconocida	Sin información
<i>C. macropodum</i>	<i>Macropus giganteus</i> (Canguro gris oriental)	Desconocida	Sin información
<i>C. meleagridis</i>	<i>Meleagris gallopavo</i> (Pavo)	Intestino	4.0-4.5 x 4.6-5.2
<i>C. baileyi</i>	<i>Gallus gallus</i> (Gallo doméstico)	Intestino	4.6 x 6.2
<i>C. galli</i>	<i>Gallus gallus</i> (Gallo doméstico)	Proventriculo	8.0-8.5 x 6.2-6.4
<i>C. serpentis</i>	<i>Elaphe guttata</i> (Serpiente del maíz)	Estómago	4.8-5.6 x 5.6-6.6
<i>C. varanii</i>	<i>Varanus prasinus</i> (Varano esmeralda)	Estómago	4,2-5,2 x 4,4-5,6
<i>C. fragile</i>	<i>Duttaphrynus melanostictus</i> (Black-spined Toad)	Estómago	Sin información
<i>C. scophthalmi</i>	<i>Scophthalmus maximus</i> (Rodaballo, Turbot)	Intestino	3,7-5,03 x 3,03-4,69

Adaptado de Fayer, 2010; Smith *et al.*, 2005; Zanaro y Garbossa, 2008.

Tabla 2: Muestras de heces de gatos positiva y sospechosas a la presencia de *Cryptosporidium*, con su tamaño de ooquiste e información respecto al animal donador.

Muestra (N°)	Diagnóstico	Tamaño del ooquiste (µm)	Sexo	Grupo Etario	Tipo de confinamiento	Comuna
50	Sospechosa	3.5 x 3.4	M	Junior (1a)	<i>outdoor</i>	Las Condes
111	Sospechosa	A= 4 x 3.8 B= 7.3 x 6.7	H	Junior (8m)	<i>indoor</i>	La Pintana
127	Positiva	4.7 x 4.5	H	Kitten (6m)	<i>outdoor</i>	El Bosque
128	Sospechosa	6.9 x 6.3	M	Maduro (7a)	<i>outdoor</i>	Lo Prado
132	Sospechosa	3.5 x 3.2	M	Kitten (3m)	<i>indoor</i>	El Bosque
152	Sospechosa	4.2 x 3.6	H	Junior (1a5m)	<i>indoor</i>	Providencia

M: macho; H:hembra; a: años; m: meses.