



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSGRADO y POSTÍTULO

***Cryptosporidium* spp. EN ROEDORES SILVESTRES DE
DISTINTOS HÁBITATS EN LA REGIÓN DEL MAULE**

Sofía Oettinger Arteaga

Tesis para optar al Título
de Magíster en Ciencias
Animales y Veterinarias.

Departamento de Medicina
Preventiva Animal.

Santiago, Chile
2018



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSGRADO y POSTÍTULO

***Cryptosporidium* spp. EN ROEDORES SILVESTRES DE
DISTINTOS HÁBITATS EN LA REGIÓN DEL MAULE**

Sofía Oettinger Arteaga

Tesis para optar al Título
de Magíster en Ciencias
Animales y Veterinarias.

Departamento de Medicina
Preventiva Animal.

PROFESOR GUÍA: FERNANDO FREDES
CO-GUÍA: ANDRÉ RUBIO

Santiago, Chile
2018



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSGRADO y POSTÍTULO

INFORME DE APROBACION DE TESIS DE MAGISTER

SE INFORMA A LA DIRECCION DE POSTGRADO Y POSTITULO DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS QUE LA TESIS DE
MAGISTER PRESENTADA POR LA CANDIDATA

SOFÍA OETTINGER ARTEAGA

HA SIDO APROVADA POR LA COMISION EVALUADORA DE TESIS COMO
REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS ANIMALES Y
VETERINARIAS EN EXAMEN DE DEFENSA DE TESIS RENDIDO EL DIA 4 DE
MAYO DE 2018

DIECTOR DE TESIS

Dr. Fernando Fredes M.

Dr. André Rubio C. (Co-director)

COMISIÓN EVALUADORA E INFORMANTE

Dr. Cristóbal Briceño U.

Dr. Pedro Cattán A.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

La presente Tesis fue financiada en su totalidad a través de:

- **Proyecto FONDECYT Postdoctorado 3160037**

El trabajo en laboratorio y los análisis realizados fueron realizados en el laboratorio de la Unidad de Parasitología del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

AGRADECIMIENTOS

Corresponde agradecer a Fondecyt y a los profesores de la comisión evaluadora Dr. Fernando Fredes, Dr. André Rubio, Dr. Cristóbal Briceño, Dr. Pedro Cattán y Dr. Cristian Torres por hacer posible este trabajo y por las sugerencias y recomendaciones; también a don Patricio Toro por todo el apoyo en el laboratorio con el análisis de las muestras

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
1. Descripción del agente.....	8
Taxonomía.....	8
Ciclo biológico y morfología.....	10
2. Infección en el Hospedero.....	12
Localización en el hospedero.....	12
Presentación clínica y patogenia.....	12
3. Diagnóstico.....	13
4. Aspectos ecológicos.....	14
5. <i>Cryptosporidium</i> en roedores	15
6. Antecedentes ecológicos.....	18
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25

RESULTADOS	30
1. Capturas y descripción de la comunidad de pequeños mamíferos.....	30
2. Tasa de infección.....	34
3. Asociación de la tasa de infección con variables ambientales y de los hospederos	39
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXOS	63

INDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS

I. Índice de Cuadros

Cuadro 1. 30 especies válidas de <i>Cryptosporidium</i> con sus distintos tipos de hospederos.....	7
Cuadro 2. Tasas de infección por <i>Cryptosporidium</i> en roedores de diversas partes del mundo.....	17
Cuadro 3. Resultados del análisis de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis para las diferencias en la abundancia de roedores silvestres entre los distintos hábitats.....	33
Cuadro 4. Número de muestras de heces de roedores analizadas según especie.....	35
Cuadro 5. Modelos lineales generalizados usando las variables que obtuvieron menor AIC y que presentaron un valor de $P \leq 0.05$	39
Cuadro 6. Variables utilizadas para los modelos lineales generalizados. En la tabla se encuentran las variables con menor AIC.....	39
Cuadro 7. Modelos lineales generalizados con menor AIC para comunidades. En la tabla se muestra que los valores de p no fueron significativos.....	40
Cuadro 8. Modelos lineales generalizados con menor AIC para la especie <i>A. longipilis</i>	41

II. Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo biológico del protozoo <i>Cryptosporidium</i> spp.....	11
Figura 2. Número de eventos de enfermedades emergentes según distintas causas (Extraído de Loh <i>et al.</i> , 2015).....	19
Fig. 3. a) Mapa político de la región de estudio, el punto indica la ubicación de la Reserva Nacional Los Queules (LQNR).....	25
b) Imagen satelital del área de estudio.....	26
Figura 4. Número de individuos capturados según hábitat de origen.....	31
Figura 5. Abundancia relativa de individuos capturados según hábitat de origen.....	32
Figura 6. Diferencias en la abundancia de roedores silvestres entre los distintos hábitats según test de Kruskal-Wallis.....	33
Figura 7. Número de individuos capturados según estación del año.....	34
Figura 8. Tasa de infección según especie hospedero e intervalos de confianza (95%) obtenidos mediante la prueba de Clopper-Pearson.....	36
Figura 9. Tasa de infección según hábitat e intervalos de confianza (95%) obtenidos mediante la prueba de Clopper-Pearson.....	37
Figura 10. Tasa de infección según estación e intervalos de confianza (95%) obtenidos mediante la prueba de Clopper-Pearson.....	37
Figura 11. Ooquiste de <i>Cryptosporidium</i> encontrado en una muestra de roedor, mediante tinción de Ziehl-Neelsen.....	38

RESUMEN

Cryptosporidium spp. (Familia Cryptosporidiidae), es un grupo de protozoos y parásitos obligados intracelulares que afectan a un amplio rango de vertebrados. En diversos estudios se han descrito a los roedores como hospederos de *Cryptosporidium* spp., señalando que estos mamíferos presentan la infección de manera natural. Esto los convierte en un riesgo potencial para la salud pública, sobretodo porque muchos roedores contribuyen a la contaminación de agua, suelo y alimentos, al dejar sus deposiciones en todo lugar en donde se desplazan y alimentan. En nuestro conocimiento no existe en Chile ningún registro sobre infección de *Cryptosporidium* en roedores silvestres.

Dado que los cambios en el uso de suelo pueden modificar la estructura y composición de especies, y a su vez, modificar la transmisión de patógenos, en este trabajo se evaluó la presencia y la tasa de infección de *Cryptosporidium* spp. en heces de roedores silvestres en un área de la zona central de Chile donde existen extensas superficies de plantaciones forestales de pino Monterrey (*Pinus radiata*). Se analizó si la tasa de infección de *Cryptosporidium* spp. mostraba variación según distintas variables ambientales (tipo de hábitat, estación del año) y propias de los hospederos (e.g. diversidad de especies, especie de roedor, sexo). Se hipotetizó que las variaciones estructurales en poblaciones y comunidades de roedores silvestres modulan la tasa de infección de *Cryptosporidium* spp.

Se muestrearon roedores silvestres en la Reserva Nacional Los Queules (Región del Maule) y zonas aledañas de plantaciones de pino Monterrey (*Pinus radiata*) durante el año 2016. Los sitios de muestreo correspondieron a bosque nativo, plantaciones de pino adulta y plantaciones de pino jóvenes. La detección

de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en las heces de los animales se realizó mediante la técnica modificada de tinción de Ziehl-Neelsen.

De las 614 muestras analizadas, se detectaron un total de 29 positivas (4,7%) a *Cryptosporidium* spp., pertenecientes a heces de 4 especies nativas de roedores (5,5% *Abrothrix longipilis*; 4% *Abrothrix olivaceous*; 6,6% *Oligoryzomys longicaudatus* y 3,9% *Phyllotis darwini*). No se encontraron diferencias en la tasa de infección entre las especies de roedores, tampoco entre los distintos tipos de hábitats ni entre las distintas estaciones del año muestreadas. Se rechazó la hipótesis de esta tesis dado que no hubo evidencia clara en los análisis estadísticos de que la abundancia, riqueza y diversidad de especies puedan modular la tasa de infección de *Cryptosporidium* spp.

Este hallazgo es el primer reporte de *Cryptosporidium* spp. en roedores silvestres en Chile. La tasa de infección fue comparativamente baja a otros estudios en roedores de otros países, los que pueden llegar a tasas de infección de hasta 68,5%. Las plantaciones de pino no estarían aumentando la tasa de infección de este parásito en roedores, ya que ésta se encontró en porcentajes parecidos en roedores del bosque nativo del área de estudio. Posiblemente otras variables no consideradas en este estudio podrían estar modulando la tasa de infección.

Dada la presencia de *Cryptosporidium* spp. en roedores chilenos, futuros estudios sobre este protozoo en roedores deberían enfocarse en zonas más cercanas a asentamientos humanos para determinar posibles riesgos de infección en la interfaz humano-animales domésticos-animales silvestres.

Palabras clave: *Cryptosporidium* spp., roedores silvestres, zoonosis

SUMMARY

Cryptosporidium spp. (Family Cryptosporidiidae), is a group of protozoa and obligate intracellular parasite, which affect a wide range of vertebrates. Several studies sustain that *Cryptosporidium* spp. is the most prevalent gastrointestinal parasite in domestic animals and humans. In many studies, rodents have been described as hosts for *Cryptosporidium* spp., pointing that these mammals present the infection in a natural way. This turns them into a potential risk for public health, mainly because many rodents contribute to water, food and soil contamination as they leave their feces at every place they move around and feed. To our knowledge, there is no record of *Cryptosporidium* infection in wild rodents in Chile.

Due to the fact that land use change can modify species structure and composition and also modify pathogen transmission, this work aimed to evaluate the presence and infection rate of *Cryptosporidium* spp. in wild rodents from an area of central Chile where vast plantations of Monterrey pine (*Pinus radiata*) exist. *Cryptosporidium* spp. infection rate was analyzed from faeces aiming to detect variation according to different environmental variables (habitat type and season) and host variables (e.g. species diversity, rodent species, gender). The hypothesis was that structural variations in rodent populations and communities modulate *Cryptosporidium* spp. infection rates.

Wild rodents from Reserva Nacional Los Queules (Región del Maule) and surrounding areas of Monterrey pine plantations were sampled during 2016. Sampling sites were in native forest, adult pine plantations and young pine plantations. *Cryptosporidium* spp. oocyst detection in feces was performed by acid-fast method (Ziehl Neelsen).

Out of the 614 analyzed samples, 29 were positive to *Cryptosporidium* spp. (4.7%), belonging to 4 different native rodent species (5,5% *Abrothrix longipilis*, 4% *Abrothrix olivaceous*, 6,6% *Oligoryzomys longicaudatus* y 3,9% *Phyllotis darwini*). No differences were found on infection rates between rodent species, habitat type, or season. Thus, the hypothesis was rejected, because there was no clear evidence from statistic results that species' abundance, richness, and diversity can modulate *Cryptosporidium* spp. infection rates.

This finding is the first report of *Cryptosporidium* spp. in wild rodents in Chile. Infection rate was low compared to other studies in rodents from other different parts of the world, in which it can reach up to 68.5%. Pine plantations are not increasing the infection rates of this parasite in rodents as infection rate in these habitats were similar than the ones from native forest. Presumably other variables not considered in this work could be modulating the infection rate.

Given the presence of *Cryptosporidium* spp. in Chilean wild rodents, future studies about this protozoa in wild rodents should focus in areas closer to human settlements, in order to determine possible risks of infection at the human-domestic animals-wildlife interface.

Key words: *Cryptosporidium* spp., wild rodents, zoonosis

INTRODUCCION

El mundo está experimentando un aumento en la emergencia de enfermedades infecciosas como resultado de cambios antropogénicos en la biósfera y la globalización. Jones *et al.*, (2013) indican que los eventos de enfermedades infecciosas emergentes (EIEs) son en su mayoría correspondientes a zoonosis (73%), y a su vez, gran parte de éstas (71,8%) tienen su origen en la fauna silvestre (Jones *et al.*, 2008). Estos eventos de EIEs provenientes de fauna silvestre han aumentado significativamente en los últimos años, lo que sugiere una importante amenaza a la salud global (Jones *et al.*, 2008) y su expansión es consecuencia de los disturbios antropogénicos derivados de la continua irrupción de los humanos en ecosistemas naturales (Zahedi *et al.*, 2016b). Por ejemplo, el avance de actividades silvoagropecuarias hacia ambientes naturales produce que las personas y los animales domésticos entren en contacto con animales silvestres, lo que puede favorecer la expansión y transmisión de agentes infecciosos y parásitos, hacia o desde nuevos ambientes y hospederos (Holsback *et al.*, 2013).

Un ejemplo de EIEs es la cryptosporidiosis, la cual está considerada dentro de las causas más comunes de diarrea en el mundo, afectando sobre todo a niños y personas inmunodeprimidas (Savioli *et al.*, 2006). Su distribución es cosmopolita, encontrándose en los cinco continentes (Apt, 2006), incluyendo la Antártica (Fredes *et al.*, 2007; 2008). El agente causal es *Cryptosporidium* spp., (Familia Cryptosporidiidae), un grupo de protozoos parásitos obligados intracelulares (Lv *et al.*, 2009), que afecta a un amplio rango de vertebrados, incluyendo a más de 150 especies de mamíferos y al ser humano (Georgi y Georgi, 1990; Laubach *et al.*, 2004; Lv *et al.*, 2009). Diversos estudios sostienen

que *Cryptosporidium* spp. es el parásito gastrointestinal más prevalente en animales domésticos y humanos, y últimamente se ha reconocido como un parásito común en varios animales silvestres, los cuales se presume podrían tener un rol como reservorio (Appelbee *et al.*, 2005; Holsback *et al.*, 2013).

Los roedores han sido descritos como hospederos de *Cryptosporidium* spp. en numerosos estudios (Lv *et al.*, 2009; Meerburg *et al.*, 2009; Kilonzo *et al.*, 2013; Perec-Matysiak *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2015; Dall'Olio y Franco, 2004), señalando que estos mamíferos presentan la infección de manera natural. Esto los convierte en un riesgo potencial para la Salud Pública, sobretodo porque contribuyen a la contaminación de agua, suelo y alimentos al dejar sus heces en todo lugar en el que forrajean (Perec-Matysiak *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2015). Además los roedores corresponden al orden más abundante y diversificado dentro de los mamíferos y en muchas partes del mundo éstos se encuentran adaptados a vivir en contacto cercano con las personas. Por otro lado, las especies periurbanas de roedores poseen un rol como nexo entre las poblaciones de fauna silvestre y las comunidades humanas, llevando de esta manera, el riesgo de exposición a distintas enfermedades zoonóticas que pueden resultar comunes en aquellos ecosistemas naturales (Meerburg *et al.*, 2009).

Los cambios en el uso del suelo por actividades antropogénicas son la principal causa de eventos de EIEs en el mundo (Loh *et al.*, 2015). Uno de los mecanismos por los cuales pueden aparecer brotes de infecciones debido a los cambios en las coberturas de la tierra son las modificaciones en los ensambles de especies. Las especies reservorios pueden aumentar o disminuir sus densidades, al igual que las especies no hospederas o poco competentes para ciertos agentes infecciosos, modificando así las dinámicas de patógenos en los hospederos (Keesing *et al.*, 2010; Gottdenker *et al.*, 2014). Es así como los cambios en diversidad de especies puede influir en la transmisión de patógenos. Por ejemplo, una mayor diversidad de especies puede disminuir (hipótesis del

efecto de dilución), aumentar (hipótesis del efecto de amplificación) o no influir en la transmisión de agentes infecciosos entre hospederos silvestres (Keesing *et al.*, 2010; Cardinale *et al.*, 2012; Ostfeld y Keesing 2012). Esto va a depender de las características de los hospederos, así como del tipo de agente y los ecosistemas en que habitan (Wood *et al.*, 2014).

Un ejemplo de cambios en el uso de la tierra son las plantaciones comerciales de pino Monterrey (*Pinus radiata*), una actividad forestal importante a nivel mundial que representa el 32% de la producción de plantaciones productivas en el mundo (FAO 2007). En Chile, estas plantaciones cubren aproximadamente 1,5 millones de hectáreas (INFOR 2013), siendo el principal cambio de uso de suelo en algunas regiones de la zona centro-sur del país (Echeverría *et al.*, 2006). Las plantaciones de pino Monterrey en Chile pueden modificar las comunidades de diversas taxas, por ejemplo de roedores (Saavedra y Simonetti 2005). Debido a esto, es de relevancia a nivel país conocer el potencial efecto de las plantaciones forestales sobre la prevalencia de patógenos zoonóticos en fauna silvestre. A la fecha, existe muy poca investigación al respecto (Rubio, 2017)¹.

En este contexto, en la presente tesis se analizó la infección de *Cryptosporidium* spp. en roedores silvestres en distintos hábitats en un paisaje en la región del Maule dominado por plantaciones forestales de pino Monterrey. En nuestro conocimiento, este es el primer estudio sobre *Cryptosporidium* spp. en roedores silvestres nativos de Chile.

¹ RUBIO, A. 2017. [Datos no publicados]. U. de Chile, Fac. de Ciencias.

REVISION BIBLIOGRAFICA

1. Descripción de *Cryptosporidium*

Taxonomía

El género *Cryptosporidium* comprende a parásitos intracelulares protozoarios, pertenecientes al phylum Apicomplexa, que incluye a otros géneros de patógenos de los seres humanos (*Plasmodium*, *Isospora*, *Cyclospora*, *Toxoplasma*), ganado bovino (*Theileria*, *Babesia*), animales domésticos y aves de corral (*Eimeria*, *Sarcocystis*, *Neospora*). Forma parte de la clase Conoidasida, orden Eucoccidiorida, familia Cryptosporidiidae, cuyo ciclo de vida incluye etapas de reproducción asexual y sexual, que es completada en un solo hospedero (Smith y Nichols, 2010; Zanaro y Garbosa, 2008). Sin embargo, trabajos recientes sugieren que deberían catalogarse en un grupo taxonómico separado al de las coccidias, debido a ciertas diferencias como la falta de un esporoquiste y su localización epicelular en la célula hospedero; y a que –según estudios de biología molecular para caracterización genética- se encuentran más relacionados con las gregarinas (Barta y Thompson, 2006; Clode *et al.*, 2015; Melicherová *et al.*, 2016; Ryan y Hijawi, 2015).

La primera especie descrita fue *Cryptosporidium muris*, en 1907 por Ernest Edward Tyzzer en ratones de laboratorio (Dall’Olio y Franco, 2004; Xiao *et al.*, 2004; Tzipori y Ward, 2002; Zahedi *et al.*, 2016), quien más adelante describió a *Cryptosporidium parvum* como una segunda especie en 1912 (Xiao *et al.*, 2004). Actualmente, 31 especies de *Cryptosporidium* se han reconocido como válidas en el mundo (Zahedi *et al.*, 2016a) (Cuadro 1), y hasta la fecha son 20 las especies capaces de producir infección en humanos (Kahn *et al.*, 2017).

Cuadro 1. Especies válidas de *Cryptosporidium* con sus distintos tipos de hospederos. M = mamíferos; B= aves; R= reptiles; F = peces; A = anfibios. Adaptado de Šlapeta, (2013).

Nr. de especie	Nombre válido de la especie	Rango de hospedero
I	<i>C. muris</i> Tyzzer, 1907	M B
II	<i>C. parvum</i> Tyzzer, 1912	M
III	<i>C. meleagridis</i> Slavin, 1955 (syn. <i>C. tyzzeri</i> Levine, 1961)	M B
IV	<i>C. wairi</i> Vetterling, Jervis, Merrill & Sprinz, 1971	M
V	<i>C. agni</i> Barker & Carbonell, 1974 (syn. <i>C. xiaoi</i> Fayer & Santín, 2009)	M
VI	<i>C. bovis</i> Barker & Carbonell, 1974	M
VII	<i>C. cuniculus</i> Inman & Takeuchi, 1979	M
VIII	<i>C. felis</i> Iseki, 1979	M
IX	<i>C. serpentis</i> Levine, 1980	R M
X	<i>C. natoris</i> Hoover, Hoerr, Carlton, Hinsman & Ferguson, 1981	F
XI	<i>C. baileyi</i> Current, Upton & Haynes, 1986	B
XII	<i>C. varanii</i> Pavlásek, Lávicřková, Horák, Král & Král, 1995 (syn. <i>C. saurophilum</i> Koudela & Modry´ , 1998)	R
XIII	<i>C. cichlidis</i> (Paperna & Vilenkin, 1996)	F
XIV	<i>C. reichenbachklinkei</i> (Paperna & Vilenkin, 1996)	F
XV	<i>C. galli</i> Pavlásek, 1999	B
XVI	<i>C. andersoni</i> Lindsay, Upton, Owens, Morgan, Mead & Blagburn, 2000	
XVII	<i>C. canis</i> Fayer, Trout, Xiao, Morgan, Lal & Dubey, 2001	M
XVIII	<i>C. hominis</i> Morgan-Ryan, Fall, Ward, Hijjawi, Sulaiman, Fayer, Thompson, Olson, Lal & Xiao, 2002	M
XIX	<i>C. molnari</i> Alvarez-Pellitero &	F

	Sitjà-Bobadilla, 2002	
XX	<i>C. suis</i> Ryan, Monis, Enemark, Sulaiman, Samarasinghe, Read, Buddle, Robertson, Zhou, Thompson & Xiao, 2004	M
XXI	<i>C. scophthalmi</i> Alvarez-Pellitero, Quiroga, Sitjà-Bobadilla, Redondo, Palenzuela, Padrós, Vázquez & Nieto, 2004	F
XXII	<i>C. pestis</i> Šlapeta, 2006	M
XXIII	<i>C. fayeri</i> Ryan, Power & Xiao, 2008	M
XXIV	<i>C. ryanae</i> Fayer & Santín, Trout, 2008	M
XXV	<i>C. fragile</i> Jirku ^o , Valigurová, Koudela, Krížek, Modry ^o & Šlapeta, 2008	A
XXVI	<i>C. macropodum</i> Power & Ryan, 2008	M
XXVII	<i>C. ducismarci</i> Traversa, 2010	R
XXVIII	<i>C. ubiquitousum</i> Fayer, Santín & Macarisin, 2010	M
XXIX	<i>C. viatorum</i> Elwin, Hadfield, Robinson, Crouch & Chalmers, 2012	M
XXX	<i>C. scrofarum</i> Kváč ^o , Kestránová, Pinková, Kveřtonová, Kalinová, Wagnerová, Kotková, Vítovec, Ditrich, McEvoy, Stenger & Sak, 2013	M

Ciclo biológico y morfología

Cryptosporidium sp. tiene un ciclo biológico complejo (Fig. 1), es un ciclo de tipo monoxeno que consiste en varias fases asexuales y sexuales. El ooquiste esporulado infectante es excretado por la heces, este estado es muy resistente a las adversidades del medio y posee en su interior 4 esporozoítos. Una vez ingeridos los ooquistes por el hospedero, se liberan los esporozoítos en el intestino e ingresan a las células del epitelio, principalmente en yeyuno e íleon. Luego de ser invadidas las células, los esporozoítos se transforman en trofozoítos, los que entran en una etapa de reproducción asexual. En esta etapa

se producen dos tipos diferentes de merontes, que a su vez dan origen a merozoítos. Los merozoítos producidos por merontes tipo I invaden otras células aledañas, donde pueden desarrollarse a merontes tipo II, como también repiten o completan otro ciclo de merontes tipo I. Por otro lado, los merozoítos provenientes de merontes tipo II se multiplican intracelularmente por reproducción sexual, etapa en la que producen microgametos y macrogametos. Los microgametos fertilizan a los macrogametos para producir cigotos intracelulares, los que finalmente maduran a ooquistes (Tzipori y Ward, 2002; Apt, 2006; Gomes Borges *et al.*, 2007; Ryan y Hijawi, 2015).

Mediante este ciclo se producen dos tipos de ooquistes, los de pared delgada y los de pared gruesa (Gomes Borges *et al.*, 2007; Urquhart *et al.*, 2001). Los primeros son responsables de la autoinfección, lo que lleva a la cronicidad de la enfermedad y los segundos son eliminados por las heces para completar el ciclo en otros individuos (Georgi y Georgi, 1990; Urquhart *et al.*, 2001).

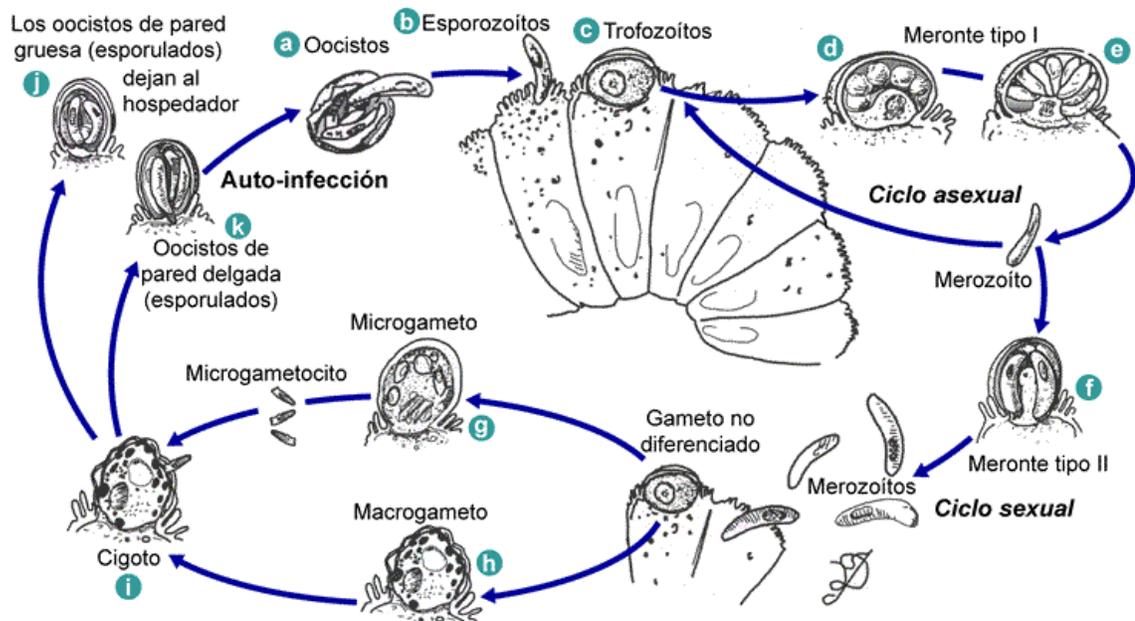


Figura 1. Ciclo biológico del protozoo *Cryptosporidium* spp. Fuente: CDC Centers for Disease Control and Prevention (<http://phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=3386>).

El ooquiste que es eliminado con las heces, es inmediatamente infeccioso y posee alta resistencia al medio ambiente. Presenta forma esférica u oval, con un tamaño aproximado de 3 a 8,5 μm de diámetro, dependiendo de la especie de *Cryptosporidium* (Xiao y Fayer, 2008). Tiene 4 esporozoítos desnudos en su interior, sin esporoquistes (Barriga, 1997; Gomes Borges *et al.*, 2007) y es ácido-alcohol resistente (Barriga, 1997; Kosek *et al.*, 2001; Xiao y Fayer, 2008).

2. Infección en el hospedero

Localización en el hospedero

Este parásito infecta el epitelio gastrointestinal, desarrollándose y multiplicándose en los bordes de las microvellosidades, pero también en epitelios de la vesícula biliar, respiratorio y renal, especialmente en hospederos inmunocomprometidos (Smith y Nichols, 2010). La posición en la célula hospedero ocurre en la superficie apical, por lo que se le denomina intracelular, pero extra citoplasmática (Ryan y Hijjawi, 2015).

La infección puede diseminarse en el tracto digestivo, abarcando la mucosa gástrica, intestino delgado y grueso, como también puede mantenerse localizada solamente en alguno de estos segmentos. Mientras más proximal sea la infección en el intestino delgado, más severa será la presentación de los signos (Tzipori y Ward, 2002).

Presentación clínica y patogenia

El principal signo es la diarrea, que puede variar de leve a severa dependiendo del hospedero (Song *et al.*, 2015). En individuos inmunocompetentes la enfermedad es autolimitante y puede durar alrededor de 2 semanas. En pacientes inmunocomprometidos puede provocar una condición severa, crónica e incluso puede llegar a ser fatal en ciertos casos (Rašková *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2015).

Además de la diarrea acuosa, otros signos comunes son dolor abdominal, náusea, vómito, calambres y fiebre (Apt, 2006; Ryan y Hijawi, 2015). Si la diarrea dura más de 7-10 días, ocurre una deshidratación y pérdida de peso importantes (Barriga, 1997; Tzipori y Ward, 2002).

Al ubicarse la infección en el borde apical de las células epiteliales, donde se encuentran las microvellosidades (Xiao *et al.*, 2004), se produce una rápida pérdida de superficie epitelial y las lesiones más importantes consisten en atrofia de las microvellosidades debido su acortamiento, engrosamiento y fusión. Además se produce de un alargamiento o hipertrofia de las glándulas de Lieberkühn (también conocidas como criptas), esto acompañado también de inflamación (Urquhart *et al.*, 2001; Tzipori y Ward, 2002; Apt, 2006).

3. Diagnóstico

El diagnóstico de rutina de la criptosporidiosis se basa en la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en muestras fecales (Apt, 2006), esto se puede realizar a partir de diversos métodos (Fayer *et al.*, 2000; Tzipori y Ward, 2002; Rekha *et al.*, 2016), siendo la tinción de Ziehl-Neelsen el más utilizado debido a su sencillez y bajo costo. Otras formas de diagnóstico/detección, además de las tinciones, incluyen técnicas inmunológicas como la inmunofluorescencia o ELISA y las técnicas moleculares como PCR (Reacción

en cadena de la polimerasa) (Fayer *et al.*, 2000). Incluso es posible detectarlo en muestras de tejidos, por ejemplo, cortes histológicos de intestino, estómago o vesícula biliar entre otras (Woods y Walker, 1996; Kilonzo *et al.*, 2013).

4. Aspectos epidemiológicos

Cryptosporidium spp. es un parásito de distribución mundial y ha sido reportado en todos los continentes, incluyendo la Antártica (Fredes *et al.*, 2007, 2008). Tiene la capacidad de infectar anfibios, peces, reptiles, aves y mamíferos (Fayer, 2004). La mayoría de las especies de *Cryptosporidium* tienen un rango variable de hospederos, infectando un hospedero principal y otros secundarios. Por otro lado, una especie animal puede ser infectada por diferentes especies de *Cryptosporidium* (Smith y Nichols, 2010).

Las siguientes características de este agente, influyen en su epidemiología y lo convierten en un riesgo sustancial para la salud (Kosek *et al.*, 2001; Urquhart *et al.*, 2001; Dillingham *et al.*, 2002; Cacciò *et al.*, 2005; Del Cocco *et al.*, 2009; Lal *et al.*, 2013):

- 1) El ooquiste es muy resistente al medio ambiente (sobrevive desde semanas a meses) y a desinfectantes, como cloro y ácidos.
- 2) El ooquiste es de pequeño tamaño (3 a 8,5 μm de diámetro).
- 3) Tiene una baja dosis infectante (entre 1 - 10 ooquistes) y alta carga de excreción.
- 4) El ooquiste es inmediatamente infectante cuando es excretado al medio.
- 5) Muchas especies tienen potencial zoonótico.
- 6) Su dispersión en el medio ambiente puede contaminar fuentes de agua y alimentos para consumo humano y otros animales.
- 7) El ciclo es completado dentro de un mismo hospedero.

8) Los ooquistes de pared delgada son los responsables de la autoinfección, lo que lleva a la cronicidad de la infección en el individuo y con ello a la contaminación constante del ambiente.

La cryptosporidiosis es una de las infecciones entéricas más comunes en países desarrollados y en vías de desarrollo (Tzipori y Ward, 2002; Ryan y Hijjawi 2015). A pesar de ello, la Organización Mundial de la Salud la considera dentro de las “enfermedades desatendidas” (Savioli *et al.*, 2006). Este patógeno se ha identificado en más del 60% de los brotes de parasitosis protozoarias adquiridas por consumo de agua contaminada en todo el mundo entre 2004 - 2010 y también se ha estimado que es el causante del 30% a 50% de las muertes de niños menores de 5 años en todo el mundo. Actualmente es considerado como la segunda causa principal de diarrea y muerte en niños después del rotavirus (Ryan y Hijjawi, 2015).

Las personas pueden adquirir la infección a través de variadas formas (Xiao *et al.*, 2004). El contagio por el consumo de agua, es considerado un modo principal de transmisión (Tzipori y Ward, 2002; Ryan y Hijjawi, 2015). Las otras vías son a través de alimentos contaminados o el contacto directo con heces de individuos infectados (contacto persona-persona, animal-persona o animal-animal). Por último, también existe la transmisión por uso de agua recreacional (Fayer *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2016). De todas las especies, *Cryptosporidium hominis* y *C. parvum* son los responsables de la mayoría de los casos de criptosporidiosis en humanos (Xiao *et al.*, 2004; Rašková *et al.*, 2013; Ryan y Hijjawi, 2015; Song *et al.*, 2015).

5. Cryptosporidium en roedores

Dentro de la gran diversidad de hospederos, se han descrito a los roedores como posibles reservorios, quienes pueden transferir la infección tanto a las

personas como al ganado doméstico (Rašková *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2015). Estudios sobre *Cryptosporidium* en roedores se han realizado en varios países, existiendo variadas prevalencias de infección (Cuadro 2). Por ejemplo, en China se encontró un 6,3% y 18,2% de tasa de infección de *Cryptosporidium* sp. en la rata asiática (*Rattus tanezumi*) y rata noruega (*Rattus norvegicus*) respectivamente (Lv *et al.*, 2009). En Reino Unido, la tasa de infección en el ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*) fue de 22% (Meerburg *et al.*, 2009). En California central, Estados Unidos, se encontró un 26% de muestras positivas en roedores silvestres, principalmente *Peromyscus maniculatus*, que resultó ser la especie más prevalente en la zona (Kilonzo *et al.*, 2013). En Polonia, Perec-Matysiak *et al.*, (2015), reportaron tasas de infección de 61,7%, 68,3% y 68,15% en *Apodemus agrarius*, *Apodemus flavicollis* y *Myodes glareolus*, respectivamente. Song *et al.*, (2015) detectaron tasas de infección en roedores silvestres de Corea del Sur de 33,1% en *A. agrarius* y 31,6% en *A. chejuensis* y mencionan que en otros estudios realizados en distintos países como China, Japón, España y Filipinas, ésta ha variado entre 1% y 63%. En Brasil, Dall'Olio y Franco (2004), han detectado un 10,3% de prevalencia en muestras de roedores silvestres (*Akodon serrensis* y *Oryzomys ratticeps*). En Chile solamente existe un estudio, donde Araya *et al.*, (1987) analizaron muestras de heces de roedores exóticos sinantrópicos (*Mus musculus* y *Rattus rattus*) en la zona centro-norte de Chile y encontraron tres individuos positivos de *M. musculus* de nueve analizados, mientras que ningún individuo de *R. rattus* (n = 9) fue positivo.

La prevalencia de *Cryptosporidium* en roedores puede cambiar estacionalmente (Chalmers *et al.*, 1997; Atwill *et al.*, 2004; Kilonzo *et al.*, 2013). Por ejemplo, Kilonzo *et al.*, (2013) encontraron que la mayor liberación de ooquistes por parte de los roedores fue durante otoño, tal vez relacionado con la mayor dispersión de los individuos durante esa estación del año, lo que podría facilitar la dispersión de parásitos. También pueden existir diferencias en prevalencia entre sexos, ya que Atwin *et al.*, (2004) encontró una mayor

prevalencia en ardillas machos (*Spermophilus beecheyi*) en Norte América, lo que también se sugiere que puede deberse al mayor grado de dispersión de los machos.

Las especies de *Cryptosporidium* que se han reportado en roedores son las siguientes: *C. parvum*, *C. muris*, *C. tyzerri*, *C. wairi*, *C. scrofarum*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. ubiquitum*, *C. cuniculus*, *C. viatorum* (Song *et al.*, 2015; Zahedi *et al.*, 2016).

Cuadro 2. Tasas de infección por *Cryptosporidium* en roedores de diversas partes del mundo. (Adaptado de Dall'Olio y Franco, 2004; Lv *et al.*, 2009; Meerburg *et al.*, 2009; Kilonzo *et al.*, 2013; Perek-Matysiak *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2015).

Lugar	Tasa de infección	Hospedero
China	6,3%	<i>Rattus tanezumi</i>
	18,2%	<i>Rattus norvegicus</i>
Reino Unido	22%	<i>Apodemus sylvaticus</i>
California central	26%	<i>Peromyscus maniculatus</i>
Polonia	61,7 %	<i>Apodemus agrarius</i>
	68,5 %	<i>Apodemus flavicollis</i>
	68,15%	<i>Myodes glareolus</i>
Korea del Sur	33,1%	<i>Apodemus agrarius</i>
	31,6%	<i>Apodemus chejuensis</i>
Brasil	10,3%	<i>Akodon serrensis</i>
		<i>Oryzomys ratticeps</i>

6. Antecedentes ecológicos

Cambio de uso de suelo y transmisión de enfermedades zoonóticas

A lo largo de la historia, la humanidad ha generado alteraciones en el medio ambiente, las que en los últimos siglos han sobrepasado los niveles locales, alcanzando niveles globales (Gottdenker *et al.*, 2014).

Dentro de estas actividades denominadas como “cambio de uso de suelo” se incluye a la expansión de la agricultura, deforestación, irrigación, construcción de caminos, instalación de represas, relleno/modificación de humedales, minería, expansión de zonas urbanas, degradación de zonas costeras, entre otras (Patz *et al.*, 2004). Todas éstas prácticas han transformado una enorme proporción de la superficie del planeta (Foley *et al.*, 2005). Y esta evolución del enlace entre la agricultura y el medio ambiente se encuentra íntimamente relacionada con la emergencia y/o reemergencia de enfermedades zoonóticas (Jones *et al.*, 2013), cuya incidencia y frecuencia ha aumentado dramáticamente en los últimos 30 años (Wilcox y Gubler, 2005).

Diversos estudios aseveran que el cambio de uso de suelo, debido a actividades antrópicas, es la principal y más citada causa de la ocurrencia de estos brotes y eventos de EIEs (Patz *et al.*, 2004; Loh *et al.*, 2015) (Fig. 2). Esto debido a que se puede modificar la ecología y la transmisión de patógenos (Pérez *et al.*, 2016), tanto directa como indirectamente, generando alteraciones en la abundancia, demografía, comportamiento, movimiento/desplazamiento, respuesta inmune de los hospederos, cambios en la frecuencia de contacto entre especies hospedero y vectores, y también cambios en la composición de comunidades de hospederos (Gottdenker *et al.*, 2014).

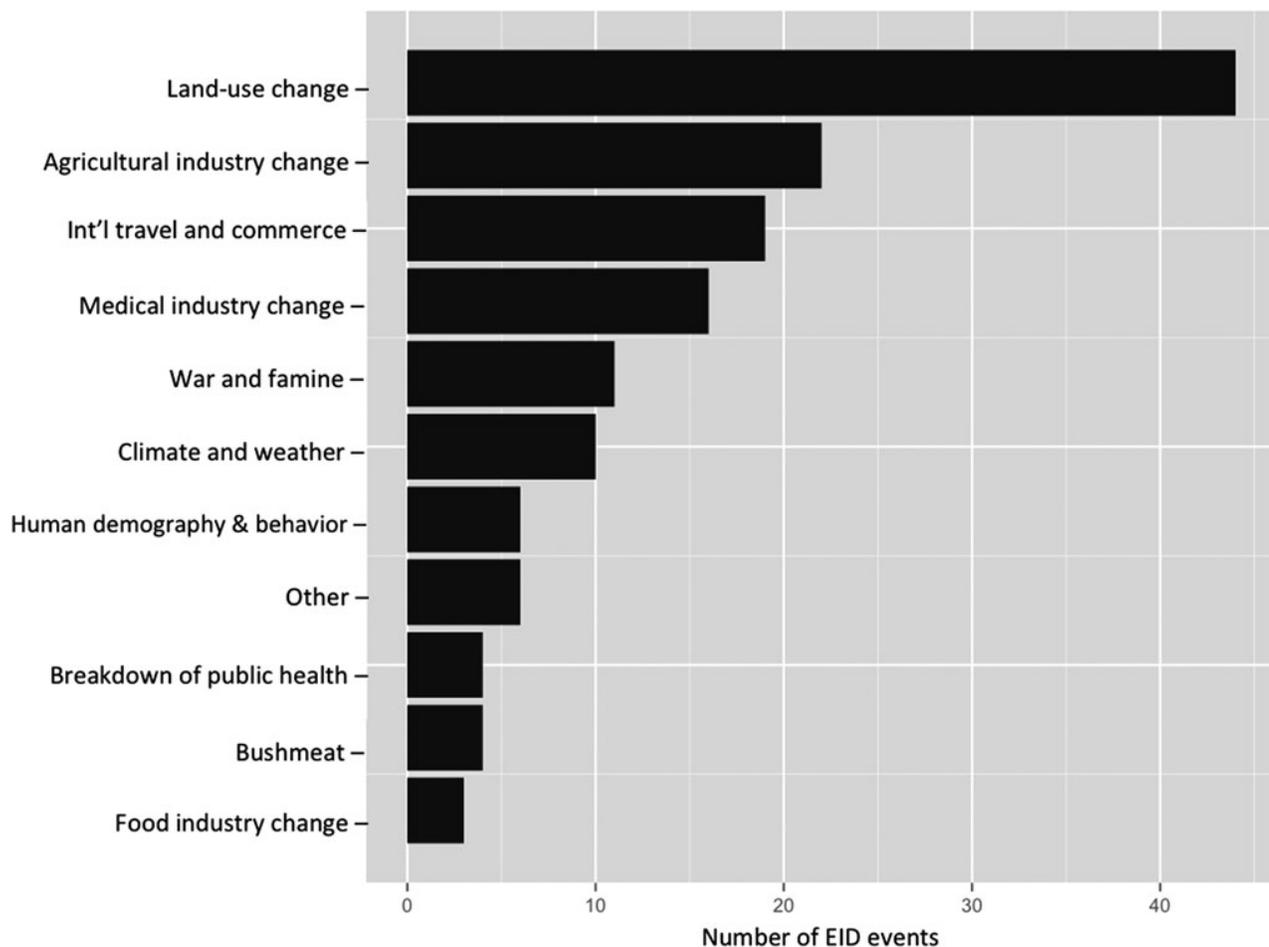


Figura 2. Número de eventos de enfermedades emergentes según distintas causas (Extraído de Loh *et al.*, 2015).

Es así entonces que la emergencia y reemergencia de enfermedades zoonóticas son controladas por cambios ecosistémicos a nivel de paisaje (Lambin *et al.*, 2010); y las más susceptibles a estos cambios son aquellas que se transmiten de forma indirecta, es decir, que requieren de un vehículo (enfermedades transmitidas por el consumo de agua o alimentos) o un

vector/hospedero intermediario (Patz *et al.*, 2008). En este contexto, las modificaciones antropogénicas sobre los ambientes naturales que más comúnmente se relacionan con la transmisión de patógenos son: deforestación y fragmentación de hábitat, desarrollo agropecuario (intensificación de la agricultura) y urbanización. Estos fenómenos afectan la dinámica ecológica evolutiva de las especies y favorecen la oportunidad de los patógenos de entrar en contacto con individuos con los que no tenían ninguna relación anteriormente, de esta manera se ve influenciada la dinámica hospedero/patógeno (Correa, 2013). En una revisión de Gottdenker *et al.*, (2014), se expresa que en respuesta a estos cambios antropogénicos, en más de la mitad de los trabajos analizados (56,9%) se reporta un aumento de la transmisión de patógenos, en un 10,4% de ellos se reporta una disminución de la transmisión de patógenos, un 30,4% obtuvo respuestas variables y complejas de los patógenos y sólo en un 2,4% no se detectaron cambios.

En cuanto a lo anterior, es destacable que el cambio de uso de suelo tiende a producir una disminución de la biodiversidad mediante la pérdida, modificación y fragmentación de hábitat; la degradación de suelo y agua y la sobreexplotación de especies nativas (Foley *et al.*, 2005). Ésta pérdida de biodiversidad puede tanto disminuir como aumentar la transmisión de patógenos, (Keesing *et al.*, 2010). Ejemplos de cómo funciona esta dinámica son los siguientes; en el caso que una especie hospedero adecuada para un patógeno sea la que persiste cuando disminuye la biodiversidad, entonces el riesgo de infección puede aumentar; por otro lado, si es el hospedero susceptible el que desaparece o bajan sus abundancias, entonces el riesgo disminuye (Keesing *et al.*, 2010). Bajo este contexto se formula la teoría del “efecto dilución”, cuya hipótesis dice que al aumentar la biodiversidad, disminuye el riesgo de infección, mientras que el efecto amplificación, indica lo contrario, a mayor diversidad de

especies, mayor es el riesgo de infección (Keesing *et al.*, 2006). Los mecanismos con que la pérdida de biodiversidad afecta la transmisión de enfermedades infecciosas tienen que ver con el cambio de la abundancia del vector u hospedero, el cambio del comportamiento del vector, hospedero o parásito y el cambio de la condición del vector u hospedero (Keesing *et al.*, 2010). Los ejemplos más estudiados en relación al cambio de uso de suelo y el efecto dilución son la enfermedad de Lyme, leishmania, malaria, virus del Nilo Oeste, entre otras (Gottdenker *et al.*, 2014).

En resumen, la emergencia de enfermedades infecciosas zoonóticas puede ser explicada en parte como una consecuencia de la interrupción de las comunidades ecológicas naturales, y el quiebre de las relaciones naturales de predador-presa, competencia y hospedero-parásito previamente existentes, que tienden a regular y estabilizar las abundancias de las especies (Wilcox y Gubler, 2005).

Bosque maulino

El bosque maulino costero es un tipo de bosque deciduo templado, endémico de la zona central de Chile (Bustamante *et al.*, 2005), sus principales componentes son especies esclerófilas y otras perennes acompañadas de estrato arbustivo herbáceo. Las especies dominantes de árboles que se encuentran ubicados en la costa de la zona centro sur de Chile ($35^{\circ}55'S-36^{\circ}20'S$) son: roble maulino (*Nothofagus glauca*, Fagaceae), olivillo (*Aextoxicum punctatum*, Aextoxicaceae), peumo (*Cryptocarya alba*, Lauraceae), avellano (*Gevuina avellana*, Proteaceae) y lingue (*Persea lingue*, Lauraceae). En este lugar se albergan varias especies endémicas de pequeños mamíferos de importancia en conservación, como por ejemplo, el monito del monte (*Dromiciops gliroides*) (Saavedra y Simonetti, 2005).

El paisaje del bosque maulino se ha enfrentado a drásticos cambios en las últimas décadas, debido a las actividades antrópicas. Hacia la década de los años 70 aún dominaba el bosque nativo, sin embargo, para comienzos del siglo XXI el reemplazo de bosque nativo, producto de actividades forestales, produjo un paisaje dominado por especies exóticas introducidas, como las plantaciones de pino Monterrey (Bustamante *et al.*, 2005; Echeverría *et al.*, 2006). Echeverría *et al.*, (2006) reportan que la deforestación del bosque maulino ha llegado hasta un 67% con una tasa anual de 4,5%.

HIPOTESIS

Las variaciones estructurales en poblaciones y comunidades de roedores silvestres modulan la tasa de infección de *Cryptosporidium* spp.

Predicciones:

1. Por lo anterior, las modificaciones del hábitat producen cambios en la riqueza y abundancia de estos roedores, lo que se reflejará en cambios de la tasa de infección de *Cryptosporidium* spp. en roedores.
2. En particular, los roedores que habitan sitios modificados por plantaciones forestales mostrarán diferencias significativas de la tasa de infección en comparación con los ejemplares del bosque nativo.

OBJETIVOS

1. General:

Determinar la presencia y la tasa de infección de *Cryptosporidium* spp. en heces de roedores silvestres en un área de la zona central de Chile y relacionarlas con variables ambientales y de los hospederos.

2. Específicos:

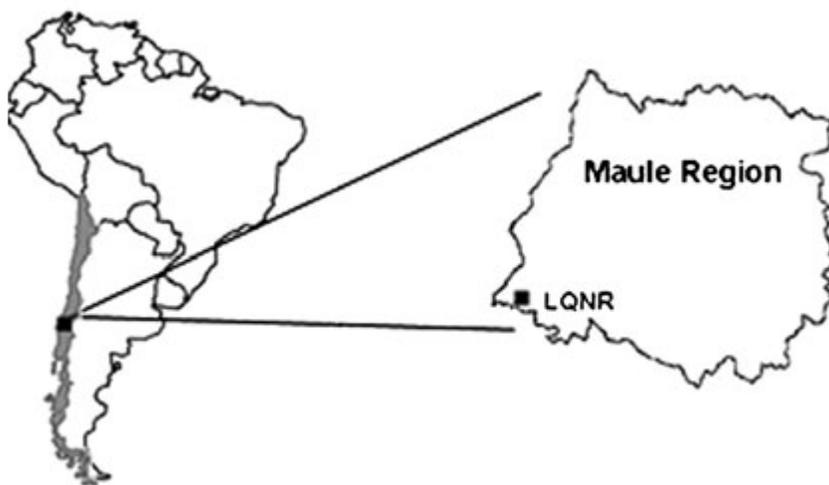
- a. Estimar la tasa de infección de *Cryptosporidium* spp. en roedores.
- b. Establecer una relación causa-efecto entre variables ambientales (estacionalidad, hábitat) con la tasa de infección de *Cryptosporidium* spp. en roedores.
- c. Establecer una relación causa-efecto entre variables de las comunidades de roedores (abundancia, riqueza, diversidad) con la tasa de infección de *Cryptosporidium* spp. en heces de roedores.
- d. Establecer una relación causa-efecto entre variables biológicas de los roedores (especie, edad, sexo) con la tasa de infección de *Cryptosporidium* spp. en roedores.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Área de estudio

El área de estudio está ubicada en el Sitio Prioritario Tregualemú ($35^{\circ}59'S$, $72^{\circ}41'O$), aproximadamente a 15 km de la localidad de Tregualemú, en la costa de la Región del Maule. El paisaje se encuentra conformado por remanentes de bosque Maulino y extensas plantaciones forestales de pino Monterrey. El bosque nativo del área de estudio incluye la Reserva Nacional Los Queules y bosques contiguos que conforman un área de 600 hectáreas.

a)



b)



Fig. 3. a) Mapa político de la región de estudio, el punto indica la ubicación de la Reserva Nacional Los Queules (LQNR). **b)** Imagen satelital del área de estudio.

2. Diseño de estudio y toma de muestras

Los sitios de muestreo correspondieron a cuatro tipos de hábitat: (1) bosque nativo, (2) plantaciones de pino adulta, (3) plantaciones de pino jóvenes (2 años) que fueron anteriormente sometidas a tala rasa y presentan escaso estrato arbustivo, y (4) plantaciones de pino jóvenes (3 años) que fueron anteriormente sometidas a tala rasa y presentan mayor estrato arbustivo. En cada hábitat se seleccionaron tres sitios (12 en total), separados al menos 400 metros entre sí. En cada sitio se instaló un cuadrante de trampas tipo Sherman

para la captura de roedores. Se utilizaron 70 trampas Sherman espaciadas a intervalos de 10 metros en un cuadrante de 7 X 10 (7.000 m²), el cual fue determinado de acuerdo al éxito de captura en trabajos previos en el área de estudio (ej. Saavedra y Simonetti, 2005). En cada cuadrante las trampas estuvieron activadas 4 noches. Los ejemplares capturados se identificaron por especie y se obtuvieron datos de sexo, peso, medidas morfométricas y estado reproductivo. Se colectaron heces directamente del animal o de las trampas, las que se conservaron en etanol al 70%. Posteriormente en el laboratorio se mantuvieron en refrigeración. Después de la toma de muestras, cada ejemplar fue marcado con etiquetas metálicas numeradas en las orejas y se liberó a cada uno en su correspondiente sitio de captura. Se realizaron cuatro muestreos en el período de un año (uno por cada estación), durante el 2016.

Todos los procedimientos de captura y manejo de los animales siguieron las directrices para el uso de mamíferos silvestres de la Sociedad Americana de Mastozoología (Sikes *et al.*, 2011), así como las medidas de bioseguridad recomendadas por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (Mills *et al.*, 1998). Para este estudio se contó con el permiso de captura con fines científicos del SAG (n. 6831/2015), la autorización de CONAF para trabajar en áreas silvestres protegidas (n. 04-15) y los certificados de bioética de la Facultad de Ciencias y Facultad de Cs. Veterinaria y Pecuarias de la Universidad de Chile.

3. Análisis de las comunidades de roedores

Para el análisis de las comunidades se usaron las variables abundancia, riqueza y diversidad. La abundancia se calculó como el número mínimo de individuos vivos capturados, la riqueza como el número de especies capturadas y finalmente la diversidad se estimó mediante el índice de Shannon. Este último es el más utilizado para cuantificar la biodiversidad específica y corresponde conceptualmente a una medida del grado de incertidumbre asociada a la

selección aleatoria de un individuo en la comunidad, además refleja la heterogeneidad de una comunidad teniendo en base a la riqueza y la abundancia relativa (Pla, 2006).

Posteriormente estos datos se sometieron a la prueba de Kruskal-Wallis, para evidenciar diferencias de estas tres variables según tipo de hábitat.

4. Detección de *Cryptosporidium* spp. y determinación de la tasa de infección

Para cumplir con el objetivo 1, la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en las heces de los animales se realizó mediante la técnica modificada de tinción de Ziehl-Neelsen (Henriksen y Pohlenz, 1980). Primero se sometieron los crotines a maceración y posteriormente se suspendieron en éter para luego ser centrifugadas por 10 minutos a 2.000 RPM. Finalizada esa preparación se procedió con la tinción (procedimiento detallado en ANEXOS).

La tasa de infección fue estimada como el cociente entre los individuos que resultaron positivos y el total de individuos analizados. Se estimaron también los intervalos de confianza (95%) de la tasa de infección mediante la prueba de Clopper-Pearson.

Estos análisis fueron realizados en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

5. Determinación de variables biológicas y ambientales

Para identificar las variables que puedan explicar la tasa de infección de *Cryptosporidium* spp. en roedores silvestres y cumplir con los objetivos 2, 3 y 4, se utilizaron modelos lineales generalizados (MLG) con respuestas binarias (regresión logística) con función de vínculo "Logit". Como variable dependiente se utilizó el resultado de los análisis de muestra (0 = negativo, 1 = positivo). Las variables explicativas a analizar fueron (a) ambientales: hábitat y estación del año, (b) atributos de los hospederos: especie de roedor, peso, tamaño y sexo; y (c) atributos de las comunidades de roedores: abundancia, riqueza y diversidad de especies. Primero se realizaron MLGs a nivel de comunidad de hospederos (todas las especies juntas) y después se realizaron MLGs a nivel de poblaciones (cada especie de roedor por separado).

Para los MLGs de las comunidades, primero se realizó un análisis univariado con las variables hábitat, estación, especie, abundancia, diversidad y riqueza; luego se eligieron aquellas que mostraron un $p > 0,1$ y menor valor de criterio de información de Akaike (AIC) para formar parte del modelo en conjunto en el análisis multivariado. En el caso de las poblaciones, el procedimiento fue del mismo modo, para cada una de las especies por separado, y las variables analizadas fueron diversidad, abundancia, riqueza, sexo, tamaño, peso, hábitat y estación. Además se determinó el ajuste de cada modelo con el valor de la devianza (D^2 o pseudo-R), el cual nos indica la proporción de la varianza explicada por el modelo.

RESULTADOS

1. Capturas y descripción de la comunidad de pequeños mamíferos

Durante el período de estudio (enero a noviembre de 2016) se obtuvo un total de 1000 capturas de pequeños mamíferos, correspondientes a 881 individuos de los cuales el 98% pertenecen a especies nativas (7 especies) y el 2% a especies exóticas (1 especie). De las especies nativas, 484 correspondieron a *Abrothrix olivaceus*, 149 a *Abrothrix longipilis*, 181 a *Oligoryzomys longicaudatus*, 42 a *Phyllotis darwini*, 3 a *Octodon bridgesi* y 1 *Irenomys tarsalis*. En cuanto a las introducidas, se obtuvieron 17 *Rattus rattus*. Además se obtuvieron 3 individuos del marsupial nativo *Thylamys elegans*.

La especie dominante en bosque nativo fue *O. longicaudatus*, en plantación de pino adulto es *A. longipilis*, y en el caso de los pinos jóvenes con y sin estrato arbustivo correspondió a *A. olivaceus* (Fig. 4 y 5). La mayor abundancia de individuos se encontró en las plantaciones de pino jóvenes con mayor estrato arbustivo ($H= 18,09$; $p= 0,0004$) (Fig. 6 y Cuadro 3). Con respecto a la riqueza y diversidad de especies, no hubo diferencias significativas entre los distintos tipos de hábitats (riqueza; $H= 3,52$; $p= 0,32$; diversidad: $H= 3,96$; $p= 0,27$).

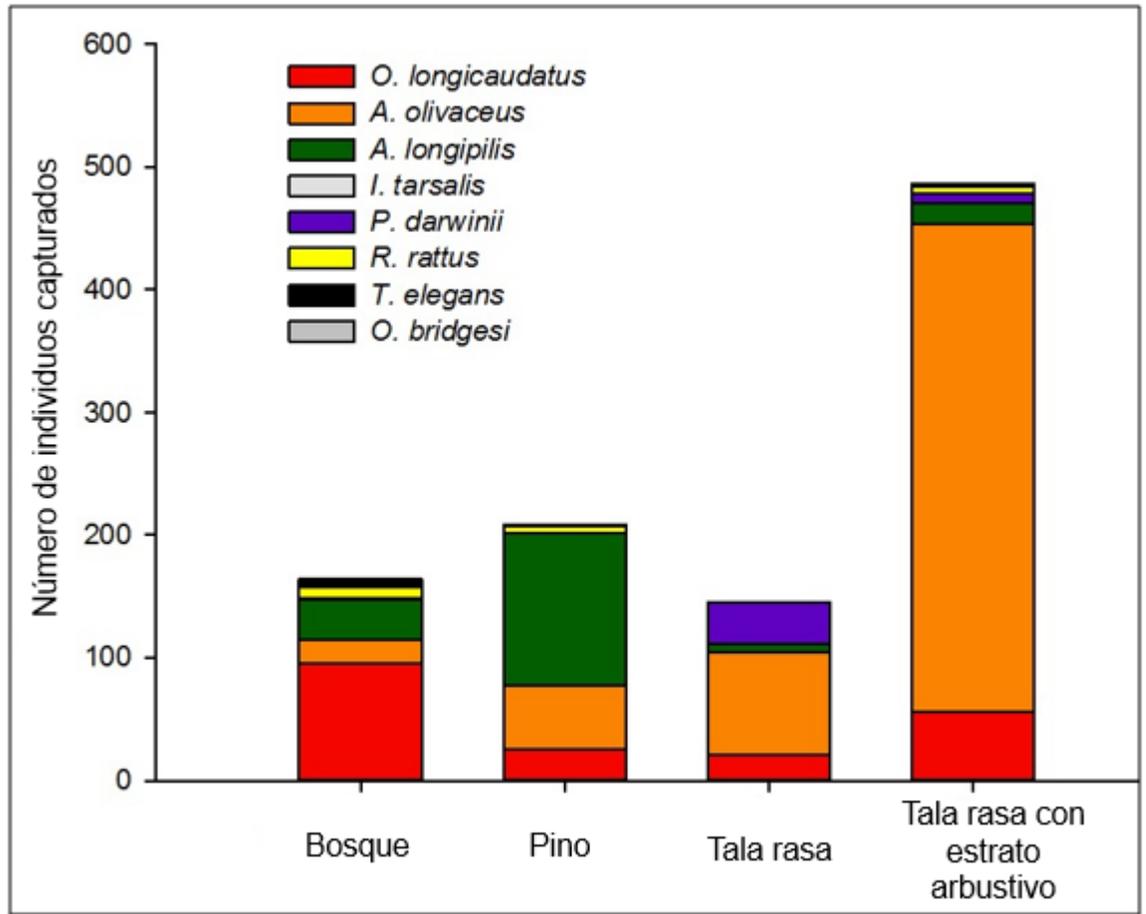


Figura 4. Número de individuos capturados según hábitat de origen. Cada color indica el número de individuos de cada especie.

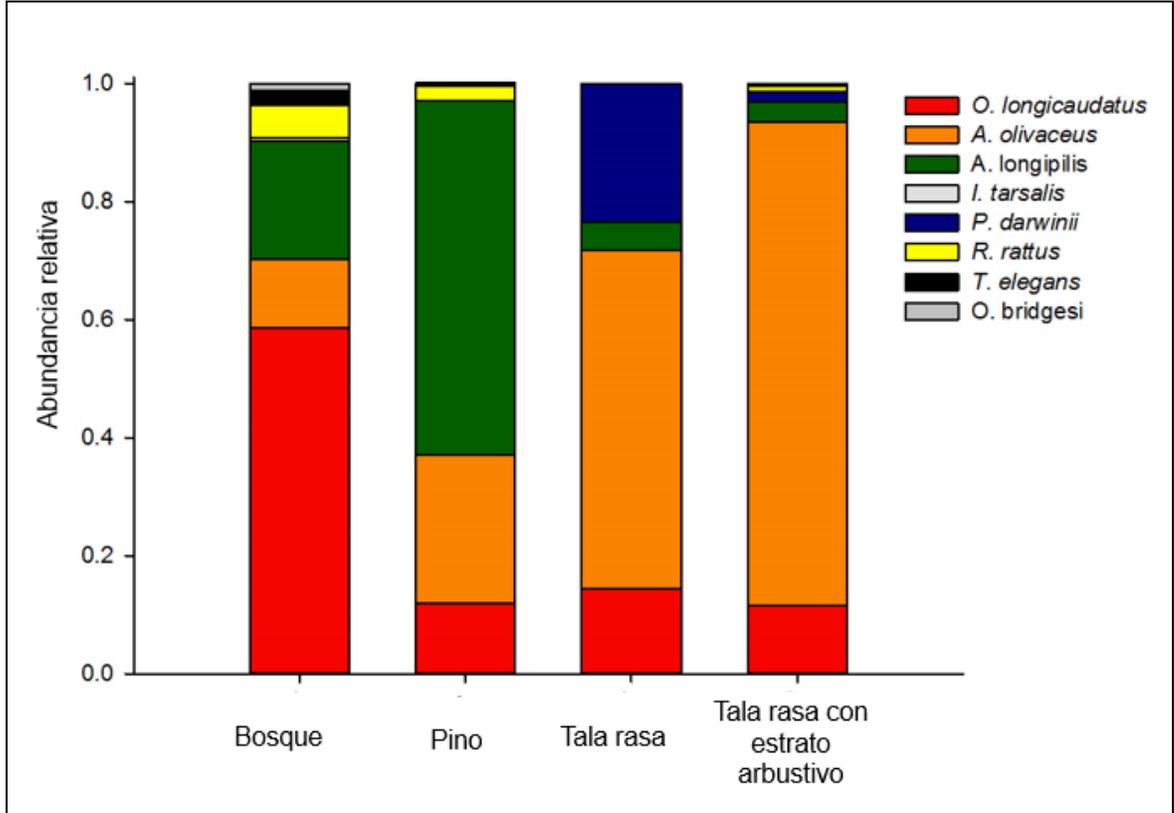


Figura 5. Abundancia relativa de individuos capturados según hábitat de origen. Cada color indica la proporción de cada especie dentro del total de individuos capturados.

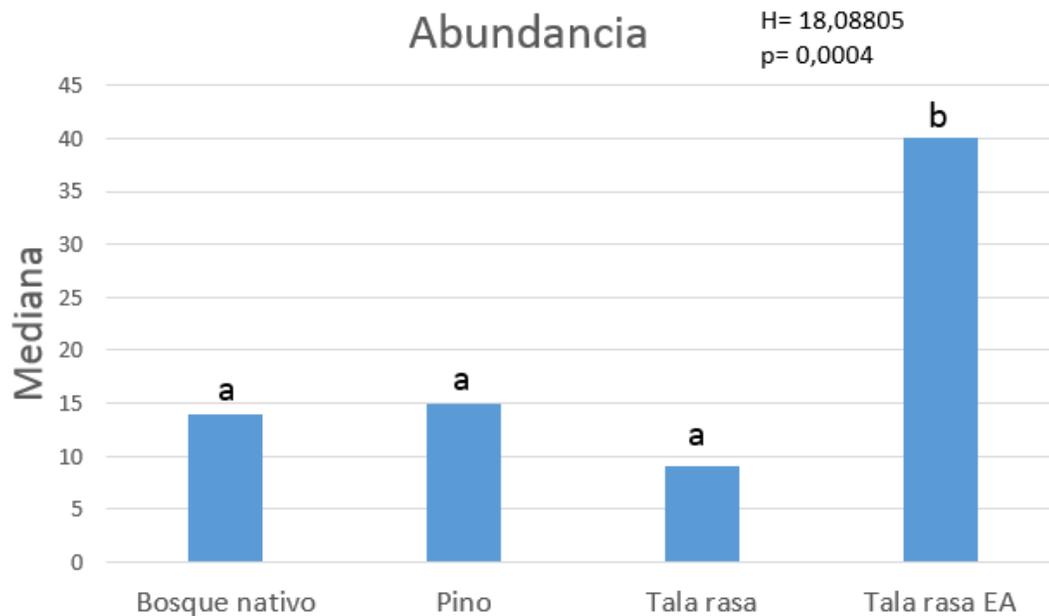


Figura 6. Diferencias en la abundancia de roedores silvestres entre los distintos hábitats según test de Kruskal-Wallis. Letras distintas significan diferencias entre los hábitats.

Cuadro 3. Resultados del análisis de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis para las diferencias en la abundancia de roedores silvestres entre los distintos hábitats. Letras en negritas significan $P \leq 0,05$.

Test de Kruskal Wallis (H= 18.1; p= 0.0004)

ABUNDANCIA	Bosque	Pino	Tala rasa	Tala rasa EA
Bosque	-	1,0	1,0	0,002
Pino	1,0	-	1,0	0,05
Tala rasa	1,0	1,0	-	0,001
Tala rasa EA	0,002	0,05	0,001	-

Con respecto a la estacionalidad, se obtuvo mayores abundancias en el mes de otoño, lo que se observó marcadamente en *O. longicaudatus* y también en *A. olivaceus* (Fig. 7).

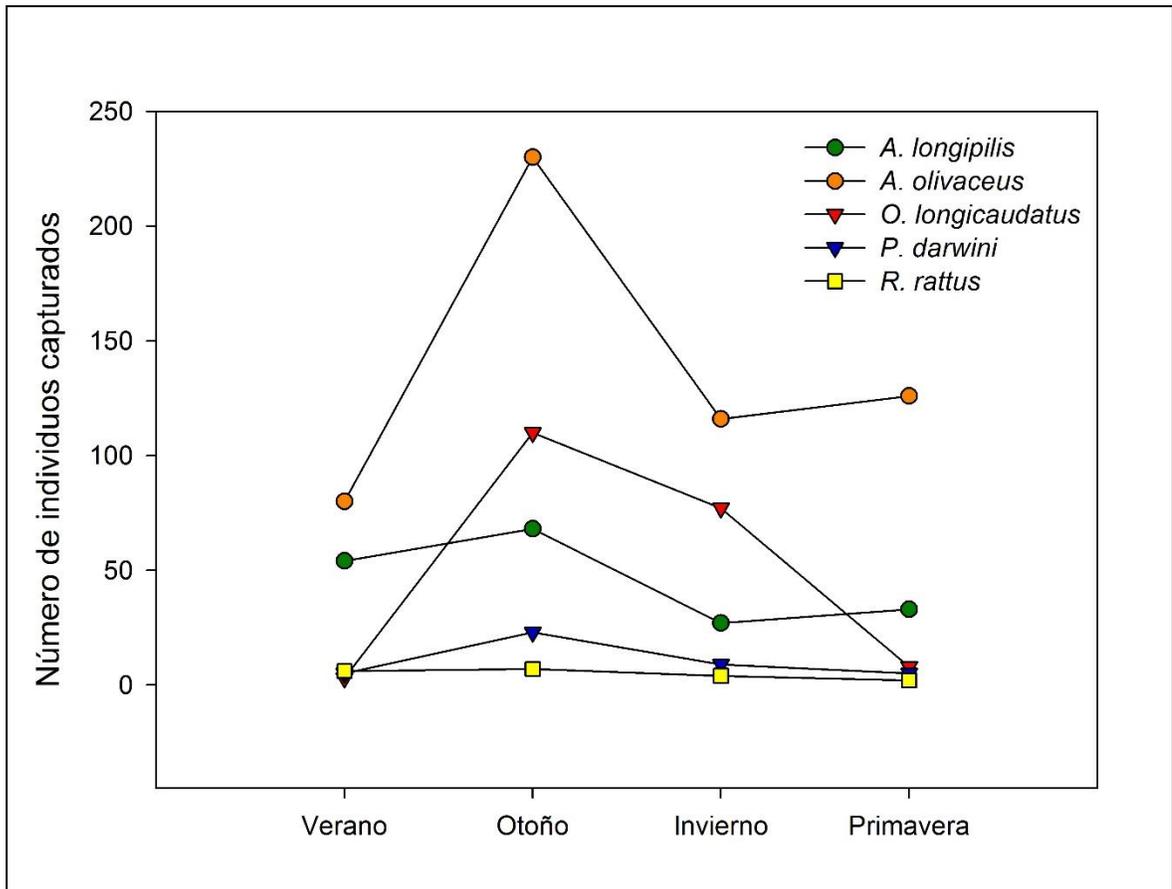


Figura 7. Número de individuos capturados según estación del año.

2. Tasa de infección

Para el análisis de laboratorio se utilizaron 614 muestras de roedores debido a que éstas contaban con el volumen suficiente (Cuadro 4). Del total de muestras analizadas, se obtuvieron 29 muestras positivas, lo que resulta en una

tasa de infección de 4,72 % (Figuras 8, 9 y 10). Cabe destacar que las muestras fueron escasamente positivas, detectándose sólo entre uno a cinco ooquistes por muestra (Fig. 11).

Cuadro 4. Número de muestras de heces de roedores analizadas según especie.

Especie	N° de muestras
<i>Abrothrix olivaceus</i>	308
<i>Abrothrix longipilis</i>	146
<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	122
<i>Phyllotis darwini</i>	26
<i>Rattus rattus</i>	6
<i>Octodon bridgesi</i>	3
<i>Thylamys elegans</i>	3
Total	614

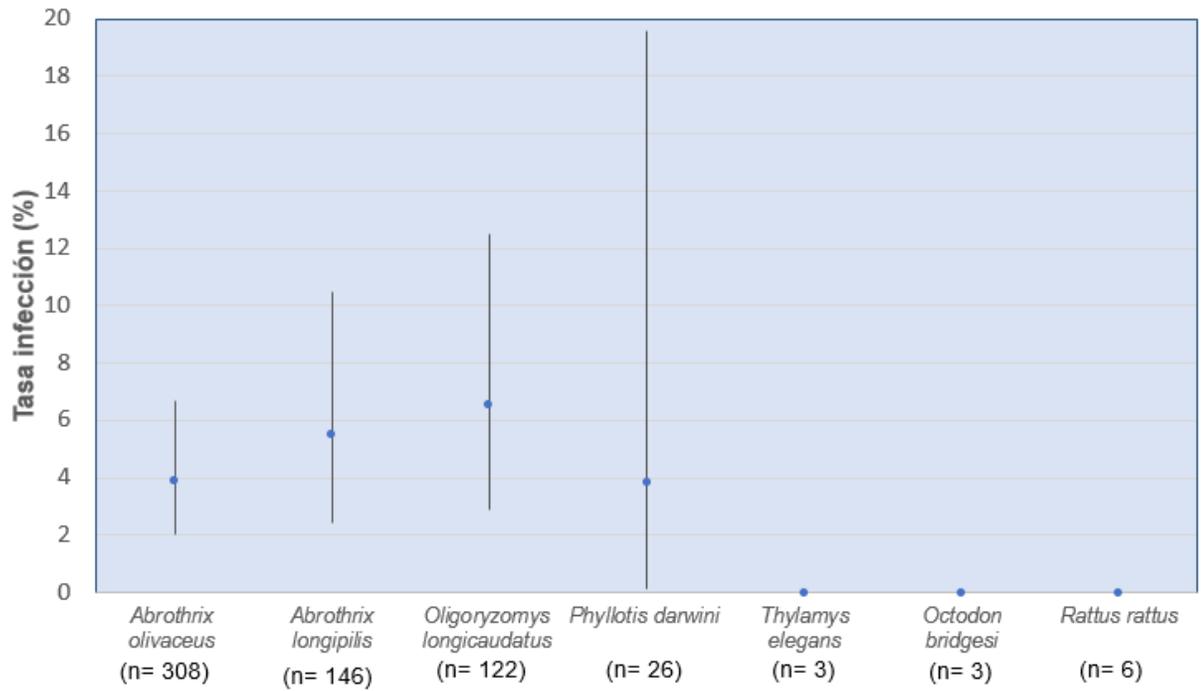


Figura 8. Tasa de infección según especie hospedero e intervalos de confianza (95%) obtenidos mediante la prueba de Clopper-Pearson.

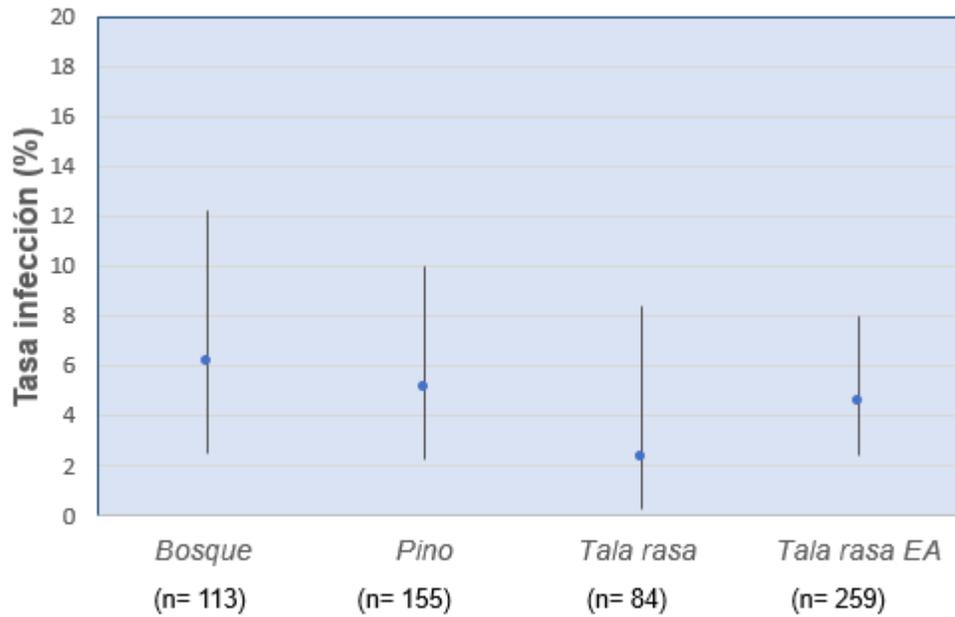


Figura 9. Tasa de infección según hábitat e intervalos de confianza (95%) obtenidos mediante la prueba de Clopper-Pearson.

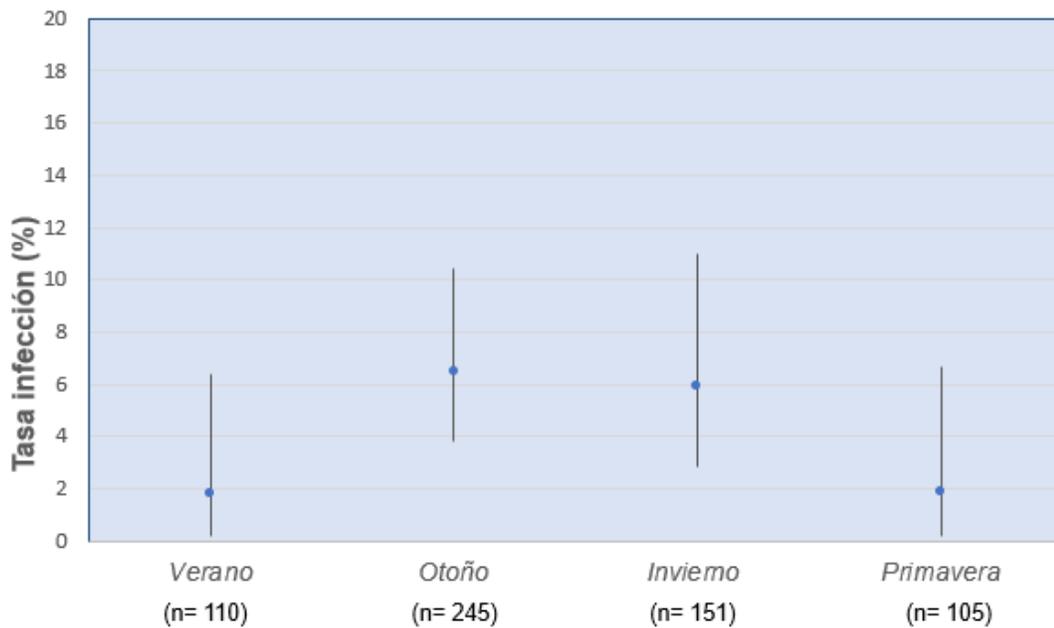


Figura 10. Tasa de infección según estación e intervalos de confianza (95%) obtenidos mediante la prueba de Clopper-Pearson.

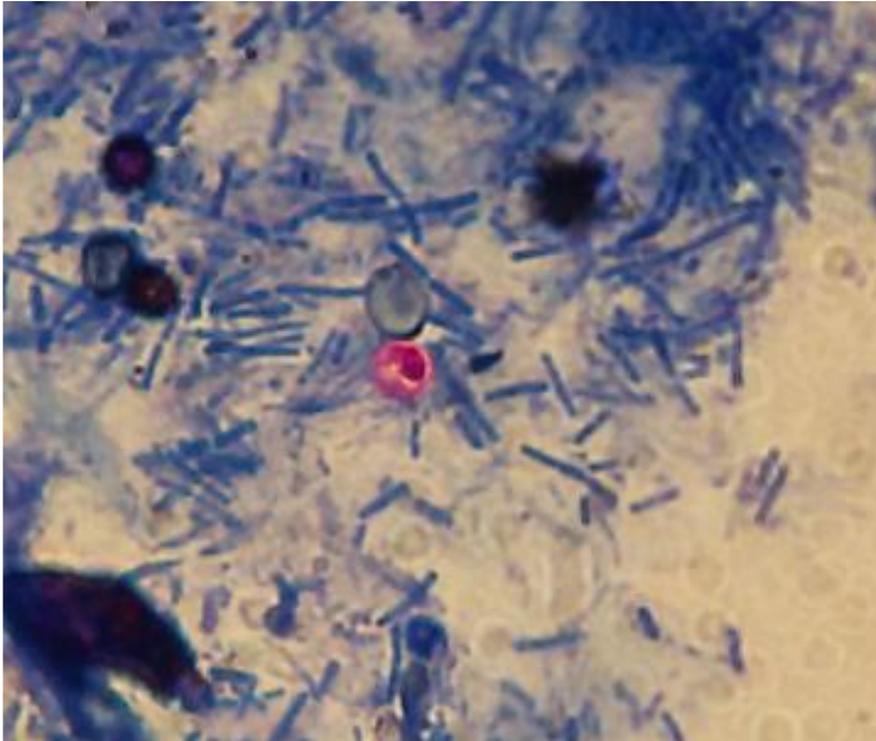


Figura 11. Ooquiste de *Cryptosporidium* encontrado en una muestra de roedor, mediante tinción de Ziehl-Neelsen. Color fucsia, tamaño del ooquiste 4,54 x 3,94 μm .

3. Asociación de la tasa de infección con variables ambientales y de los hospederos.

A nivel de comunidades, de los análisis MLG univariados, sólo resultaron significativos las variables diversidad ($p= 0,034$) y riqueza ($p= 0,0269$) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Modelos lineales generalizados usando las variables que obtuvieron menor AIC y que presentaron un valor de $P \leq 0.05$. D^2 = ajuste del modelo.

Desempeño del modelo			Componentes del modelo			
Modelo	D^2	AIC	Variables	Estimado	p	OR
Todas las especies	2,1	232,56	(Intercepto)	-4,0564	1,13e-12	0,02
			Diversidad	1,4131	0,0344	4,11
Todas las especies	2,1	232,43	(Intercepto)	-4,2246	9,5e-12	0,01
			Riqueza	0,3532	0,0269	1,42

Para hacer los MLG multivariados, las variables que resultaron escogidas al tener un valor de $p < 0,1$ y menor AIC fueron: estación, abundancia, riqueza y diversidad (Cuadro 6). De éstos, los mejores modelos según AIC incluyeron las variables estación y riqueza o diversidad (Cuadro 6), sin embargo ningún resultado fue significativo (Cuadro 7).

Cuadro 6. Variables utilizadas para los modelos lineales generalizados. En la tabla se encuentran las variables con menor AIC. D^2 = ajuste del modelo.

Componentes del modelo			
Variable dependiente	Variables explicativas	AIC	D^2
Infección <i>Cryptosporidium</i>	diversidad + estación + abundancia + hábitat	240,20	4,8
	diversidad + abundancia + estación	236,14	4,0
	riqueza + abundancia + estación	336,67	4,0
	diversidad + estación	235,73	3,3
	riqueza + estación	234,71	4,0

Cuadro 7. Modelos lineales generalizados con menor AIC para comunidades. En la tabla se muestra que los valores de p no fueron significativos. D^2 = ajuste del modelo.

Desempeño del modelo			Componentes del modelo		
Modelo	D^2	AIC	Variables	Estimado	p
Todas las especies de roedores	4,0	234,71	(Intercepto)	-3,5403	9,76e-07
			Estación otoño	-0,1878	0,701
			Estación primavera	-1,0227	0,201
			Estación verano	-1,1590	0,144
			Riqueza	0,2555	0,208
Todas las especies de roedores	3,3	235,73	(Intercepto)	-3,25471	1,99e-05
			estacionotoño	-0,04226	0,929
			estacionprimavera	-0,96662	0,247
			estacionverano	-1,05861	0,198
			Diversidad	0,68673	0,463

A nivel de poblaciones, las variables que resultaron significativas en los análisis univariados por especie fueron sólo para *A. longipilis*, y correspondieron a la abundancia de la comunidad ($p= 0,013$), riqueza ($p= 0,017$), diversidad ($p=0.036$) y abundancia de la propia especie ($p=0,018$). Para los análisis multivariados, los modelos con menor AIC fueron los que incluyeron la abundancia de *A. longipilis* y diversidad o riqueza (Cuadro 8).

Cuadro 8. Modelos lineales generalizados con menor AIC para la especie *A. longipilis*. En la Tabla se muestran los modelos que presentaron variables con $p \leq 0,05$ (en negrita). D^2 = ajuste del modelo.

Desempeño del modelo			Componentes del modelo			
Modelo	D^2	AIC	Variables	Estimado	p	OR
<i>A. longipilis</i>	18,6	56,51	(Intercepto)	-7,35212	0,000121	6,4E-04
			Abundancia AL	0,16119	0,035329	1,17
			Diversidad	3,01705	0.063170	20,43
<i>A. longipilis</i>	22	54,42	(Intercepto)	-8,6086	0,000157	1,8E-04
			Abundancia AL	0,1665	0,018000	1,18
			Riqueza	1,0959	0,022973	2,99

DISCUSION

En este estudio se pudo identificar *Cryptosporidium* spp. en roedores silvestres en Chile, lo que en nuestro conocimiento representa el primer reporte de este protozoo en roedores chilenos nativos. La tasa de infección de todas las especies juntas fue de 4,72%, lo cual es comparativamente baja a otros estudios en roedores de otros países, donde se han reportado tasas de infección de hasta 68,5% (Perec-Matysiak *et al.*, 2015). De todas maneras, la tasa de infección encontrada en el presente estudio está dentro del rango descrito en otras partes (Song *et al.*, 2015). De las siete especies de pequeños mamíferos muestreadas, en cuatro de ellas se encontró la presencia de *Cryptosporidium* spp. en sus heces. Sin embargo, el bajo tamaño muestral de las otras tres especies (seis o menos muestras) probablemente limitó la posible detección de *Cryptosporidium* spp. en esas especies. La tendencia fue que el ratón colilargo (*O. longicaudatus*) tuvo una mayor tasa de infección que las otras especies más abundantes (*A. olivaceus*, *A. longipilis* y *P. darwini*), sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en las tasas de infección entre especies.

En este estudio se encontraron diferencias en lo que respecta a la estructura y composición de especies hospederas en los distintos hábitats analizados. Si bien los análisis de MLGs a nivel de comunidades de roedores indicaron que a mayor riqueza o diversidad de especies aumenta la probabilidad de infección de *Cryptosporidium* spp. (efecto de amplificación), el ajuste de los modelos estadísticos fue bastante bajo, con lo cual no se puede concluir que exista una asociación entre la riqueza/diversidad de especies con la tasa de infección a nivel de comunidades de roedores. Una hipótesis sería que en este caso la riqueza o diversidad de especies puede jugar un papel de modulador de la infección, pero que interactúa con otras variables (Johnson *et al.*, 2015). Una posible variable sería el microclima, en cual no se analizó en el presente estudio.

Las otras variables analizadas que se incluyeron en los modelos multivariados (ej. estación del año, abundancia de especies, etc.) no arrojaron valores significativos, por lo que estas variables al parecer no estarían interactuando con la riqueza/diversidad de especies para influir en la tasa de infección de *Cryptosporidium*. Por otro lado, en los análisis a nivel de poblaciones de roedores, para la especie *A. longipilis* se encontró una asociación positiva entre la riqueza y diversidad de especies con la tasa de infección de *Cryptosporidium* en este roedor. El mejor modelo analizado fue el que incluyó la riqueza de especies y la abundancia de *A. longipilis*. El ajuste de este modelo fue claramente superior a los análisis a nivel de comunidades, aun así el modelo explicaría solamente el 22% de la probabilidad de infección, por lo que se sugiere nuevamente que otras variables no analizadas pueden estar influyendo en la tasa de infección.

Con respecto a la relación entre variables biológicas de los roedores y la tasa de infección de *Cryptosporidium* spp. no se encontraron diferencias entre estaciones, especies hospederos, sexo ni tamaño o peso de los individuos. Esto concuerda con Chalmers *et al.*, (1997), Bajer *et al.*, (2002), Lv *et al.*, (2009), Torres *et al.*, (2000) y Perez Matyziak *et al.*, (2015), quienes reportan no haber encontrado diferencias según el sexo del hospedero. Sin embargo, en cuanto a diferencias entre especies, hay estudios que encuentran diferencias marcadas entre distintas especies en una misma comunidad (ej. Torres *et al.*, 2000; Bajer *et al.*, 2002).

En lo que se refiere a estacionalidad, otros autores como, Chalmers *et al.*, (1997), Bajer (2008) y Kilonzo *et al.* (2013) han encontrado aumentos en la tasa de infección, ocurriendo principalmente en otoño. Los autores mencionan que esto se podría atribuir al hecho de que en otoño la densidad de roedores es mayor y que las condiciones de humedad y temperatura son más favorables para la persistencia del ooquiste en el ambiente; además, se sugiere que también influye

la temporada de crianza de terneros, que ocurre en la misma época, resultando estos como posible fuente de infección en áreas donde roedores y ganado co-ocurren (Chalmers *et al.*, 1997; Bajer, 2008; Kilonzo *et al.*, 2013).

Los cambios en el uso del suelo son un factor importante en los cambios de transmisión y dinámica de patógenos zoonóticos (Loh *et al.*, 2015). En el presente estudio, las plantaciones de pino no estarían aumentando la tasa de infección de *Cryptosporidium* spp. en roedores, ya que esta se encontró en porcentajes similares a los roedores que habitan el bosque nativo del área de trabajo. Por otro lado, existe un trabajo de Lal *et al.*, (2013) que relaciona la cryptosporidiosis con otros cambios de uso de suelo, como las prácticas ganaderas, donde han notificado una asociación positiva entre la incidencia de la enfermedad y la densidad del ganado en Nueva Zelanda, Escocia y Estados Unidos, además de una mayor tasa de infección en áreas rurales de Canadá. En este estudio los autores destacan la relación dosis-respuesta entre la ruralidad y la cryptosporidiosis humana (a mayor ruralidad, mayor riesgo de infección). Todo lo anterior sugiere que el ganado funciona como una importante fuente de infección y reservorio para la cryptosporidiosis en humanos.

De los diversos factores que podrían influir en la prevalencia de *Cryptosporidium* y que no fueron considerados en el presente estudio, se pueden mencionar: (1) la ocurrencia y abundancia de otros vertebrados silvestres (ej. carnívoros, ungulados, aves) y domésticos (ganado y equinos), que circulen o coexistan en los distintos hábitats, (2) la temporalidad del estudio, que fue solamente a lo largo de un año. Muchos agentes patógenos pueden tener variaciones interanuales en sus ciclos de transmisión, incluyendo a *Cryptosporidium* (Bajer *et al.*, 2002; Bajer, 2008). (3) Factores climáticos, como el fenómeno del Niño y la Niña, cuyos efectos se hacen notar en Chile desde la

zona norte hasta la zona central y que se asocian a la ocurrencia de precipitaciones y sequía respectivamente. Por ejemplo, en el año 2015 se desencadenó una sequía intensa, lo que podría haber generado condiciones adversas para las poblaciones de roedores y la transmisión de *Cryptosporidium*, reflejándose en una baja prevalencia de infección. (4) El microclima de los microhábitats de los roedores. Por ejemplo, se ha reportado que la temperatura es el factor crítico o el más importante para la viabilidad de los ooquistes en el ambiente (Jenkins *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2005; King y Monis, 2007). Estos estudios mencionan además el tipo de suelo y la radiación solar como factores relevantes para la viabilidad de los ooquistes. Por lo tanto, diferencias no solamente entre los distintos tipos de hábitats, si no también a nivel de microhábitat pueden ser variables importantes a la hora de evaluar las tasas de infección en los roedores del área de estudio. (5) El componente hídrico de los distintos sitios de estudios. *Cryptosporidium* puede ser transmitido a través del agua (Tzipori y Ward, 2002; Ryan y Hijjawi, 2015), por lo que a futuro se deberían realizar análisis que incluyan cursos de agua en la zona y además la humedad a nivel de suelo ya que los ooquistes son susceptibles a la desecación (King y Monis, 2007; Fayer y Xiao, 2008).

El hecho de que la carga parasitaria de las muestras positivas fue bastante baja se podría atribuir a una sobredispersión o agregación parasitaria (i.e. muchos hospederos con una baja carga parasitaria y unos pocos con una alta carga parasitaria). Este fenómeno se presenta en la gran mayoría de las poblaciones parasitarias (Shaw *et al.*, 1998; Bautista-Hernández *et al.*, 2015). Existen algunos estudios en los que se ha descrito esta situación para el agente *Cryptosporidium* en distintos hospederos como roedores, zarigüeyas y peces (Bajer *et al.*, 2002; Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2005; Hill *et al.*, 2008), donde la mayoría de los individuos presentaban baja eliminación de ooquistes y sólo unos pocos de ellos presentaron una eliminación alta.

La baja carga parasitaria encontrada en las muestras de este estudio también puede sugerir que estos roedores son hospederos ocasionales, en vez de actuar como reservorios. Para poder conocer el rol de estos roedores en la transmisión de *Cryptosporidium*, es fundamental realizar estudios moleculares que identifiquen la o las especies que infectan a los roedores del área de estudio. Esta información además permitirá profundizar en el estudio de la ecología de este agente patógeno tanto en roedores como en otras especies silvestres y domésticas que estén presentes en el área y también permitirá identificar si pertenecen a especies de *Cryptosporidium* descritas como zoonóticas.

Debido a la presencia de *Cryptosporidium* spp. en roedores chilenos, más estudios deberían realizarse en otras áreas geográficas. Futuros estudios sobre este protozoo en roedores deberían enfocarse en zonas más cercanas a asentamientos humanos para determinar posibles riesgos de infección en la interfaz humano-animales domésticos-animales silvestres.

CONCLUSIONES

Se detectó por primera vez la presencia de *Cryptosporidium* en roedores silvestres en Chile. La tasa de infección fue baja, pero se encuentra dentro del rango establecido en otros estudios en diversos países.

Las plantaciones de pino no estarían aumentando el potencial riesgo de infección de este patógeno dado que su tasa de infección no fue mayor al bosque nativo.

Se rechaza la hipótesis de esta tesis, dado que no hubo evidencia clara en los análisis estadísticos de que la abundancia, riqueza y diversidad de especies puedan modular la tasa de infección de *Cryptosporidium* spp.

Otras variables no estudiadas en esta tesis podrían influir en la tasa de infección junto con la estructura y composición de las comunidades de roedores, lo cual se debería estudiar en investigaciones futuras.

BIBLIOGRAFIA

- APPELBEE, A. J., THOMPSON, R. A., & OLSON, M. E.** (2005). Giardia and Cryptosporidium in mammalian wildlife—current status and future needs. *Trends in Parasitology*, 21(8), 370-376.
- APT, W.** (2006). De las amebas a los ciliados. En: *Zoología Médica: una visión de las especies potencialmente peligrosas desde la perspectiva de la biodiversidad. Generalidades y protozoos*. Ed. Canals y Cattán. Santiago, Chile. Editorial Universitaria. 208 pp.
- 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. *Boletín chileno de Parasitología*, 42(1/2), 7-11.
- ATWILL, E. R., PHILLIPS, R., PEREIRA, M. D. G. C., LI, X., & MCCOWAN, B.** (2004). Seasonal shedding of multiple Cryptosporidium genotypes in California ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*). *Applied and environmental microbiology*, 70(11), 6748-6752.
- BAJER, A., BEDNARSKA, M., PAWEŁCZYK, A., BEHNKE, J. M., GILBERT, F. S., & SINSKI, E.** (2002). Prevalence and abundance of Cryptosporidium parvum and Giardia spp. in wild rural rodents from the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitology*, 125(1), 21-34.

- BAJER, A.** (2008). Between-year variation and spatial dynamics of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. infections in naturally infected rodent populations. *Parasitology*, 135(14), 1629-1649.
- BARTA, J. R., & THOMPSON, R. A.** (2006). What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends in parasitology*, 22(10), 463-468.
- BARRIGA, O.** (1997). The class *Apicomplexa* or *Sporozoa*. En: *Veterinary parasitology for practitioners*. Second edition. Minnesota, USA. Burgess International Group. 430 pp.
- BAUTISTA-HERNÁNDEZ, C. E., MONKS, S., PULIDO-FLORES, G., & RODRÍGUEZ-IBARRA, A. E.** (2015). Revisión bibliográfica de algunos términos ecológicos usados en parasitología, y su aplicación en estudios de caso. *Estudios en Biodiversidad*, 1, 11-19.
- BUSTAMANTE, R. O., SIMONETTI, J. A., GREZ, A. A., & SAN MARTÍN, J.** (2005). Fragmentación y dinámica de regeneración del bosque maulino: diagnóstico actual y perspectivas futuras. *Historia, biodiversidad y ecología de los bosques costeros de Chile*, 555-564.
- CACCIÒ, S. M., THOMPSON, R. A., MCLAUCHLIN, J., & SMITH, H. V.** (2005). Unravelling cryptosporidium and giardia epidemiology. *Trends in parasitology*, 21(9), 430-437.

CARDINALE, B. J., DUFFY, J. E., GONZALEZ, A., HOOPER, D. U., PERRINGS, C., VENAIL, P. et al. (2012). Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature*, 486(7401), 59-67.

CHALMERS RM, STURDEE AP, BULL MILLER SAA, WRIGHT SE. (1997). The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domestics*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasitology Research*. 83:478–482.

CLODE, P. L., KOH, W. H., & THOMPSON, R. A. (2015). Life without a host cell: what is *Cryptosporidium*?. *Trends in parasitology*, 31(12), 614-624.

CORREA, J. P. (2013). *Efectos de las actividades agrícolas en la distribución de Leptospira spp. en roedores reservorios de la Región Metropolitana*. Tesis doctoral, Programa Doctorado en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias. Universidad de Chile.

DALL'OLIO, A. J., FRANCO, R. M. B. (2004). Occurrence of *Cryptosporidium spp.* in small wildlife mammals from three mountainous areas in the Brazilian Southeastern region. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 56(1), 25-31.

DAVIES, C. M., ALTAVILLA, N., KROGH, M., FERGUSON, C. M., DEERE, D. A., & ASHBOLT, N. J. (2005). Environmental inactivation of *Cryptosporidium* oocysts in catchment soils. *Journal of Applied Microbiology*, 98(2), 308-317.

DEL COCO, V. F., CÓRDOBA, M. A., & BASUALDO, J. A. (2009). Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. *Revista Argentina de Microbiología*, 41(3), 185-96.

DILLINGHAM, R. A., LIMA, A. A., & GUERRANT, R. L. (2002). Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection*, 4(10), 1059-1066.

ECHEVERRÍA, C., COOMES, D., SALAS, J., REY-BENAYAS, J. M., LARA, A., & NEWTON, A. (2006). Rapid deforestation and fragmentation of Chilean temperate forests. *Biological Conservation*, 130(4), 481-494.

FAYER, R. (2004). *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, 126(1), 37-56.

FAYER, R., XIAO, L. (2008). VIII. Prevention, Control, and Treatment: A. Physical Factors That Reduce Oocyst Viability. En: *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. Second edition. Boca Raton, USA. CRC Press. 560 pp.

- FAYER, R., MORGAN, U., & UPTON, S. J.** (2000). Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 30(12), 1305-1322.
- FOLEY, J. A., DEFRIES, R., ASNER, G. P., BARFORD, C., BONAN, G., CARPENTER, S. R., ...& HELKOWSKI, J. H.** (2005). Global consequences of land use. *Science*, 309(5734), 570-574.
- FOOD & AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO).** (2007). *State of the World's Forests 2007*. Food & Agriculture Organization of the United Nations. 140 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(04), 437-438.
- FREDES, F., DÍAZ, A., RAFFO, E., & MUÑOZ, P.** (2008). *Cryptosporidium spp.* oocysts detected using acid-fast stain in faeces of gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) in Antarctica. *Antarctic Science*, 20(05), 495-496.
- GEORGI, J. R., GEORGI M. E. & THEODORIDES, V. J.** (1990). En: *Parasitology for veterinarians*, Fifth edition. Ed. W. B. Saunders. pp 94-96.

GOMES BORGES, J. C., CÂMARA ALVES, L., & GLORIA FAUSTINO, M. A. D. (2007). Criptosporidiose: uma revisão sobre a sua implicação na conservação dos mamíferos aquáticos. *Biota Neotropica*, 7(3).

GOTTDENKER, N. L., STREICKER, D. G., FAUST, C. L., & CARROLL, C. R. (2014). Anthropogenic land use change and infectious diseases: a review of the evidence. *Ecohealth*, 11(4), 619–632.

HENRIKSEN, S. A., POHLENZ, J. F. (1980). Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 22(3-4), 594-596.

HILL, N. J., DEANE, E. M., & POWER, M. L. (2008). Prevalence and Genetic Characterization of *Cryptosporidium* Isolates from Common Brushtail Possums (*Trichosurus vulpecula*) Adapted to Urban Settings. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(17), 5549–5555.

HOLSBACK, L., CARDOSO, M. J. L., FAGNANI, R., & PATELLI, T. H. C. (2013). Natural infection by endoparasites among free-living wild animals. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22(2), 302-306.

INFOR. 2013. Boletín estadístico 140. Instituto Forestal, Ministerio de Agricultura, Santiago, Chile.

- JENKINS, M. B., BOWMAN, D. D., FOGARTY, E. A., & GHIORSE, W. C.** (2002). Cryptosporidium parvum oocyst inactivation in three soil types at various temperatures and water potentials. *Soil biology and Biochemistry*, 34(8), 1101-1109.
- JOHNSON, P. T., OSTFELD, R. S., & KEESING, F.** (2015). Frontiers in research on biodiversity and disease. *Ecology letters*, 18(10), 1119-1133.
- JONES, B. A., GRACE, D., KOCK, R., ALONSO, S., RUSHTON, J., SAID, M. Y. et al.** (2013). Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(21), 8399-8404.
- JONES, K. E., PATEL, N. G., LEVY, M. A., STOREYGARD, A., BALK, D., GITTLEMAN, J. L., & DASZAK, P.** (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451 (7181), 990-993.
- KEESING, F., HOLT, R. D., & OSTFELD, R. S.** (2006). Effects of species diversity on disease risk. *Ecology letters*, 9(4), 485-498.
- KEESING, F., BELDEN, L. K., DASZAK, P., DOBSON, A., HARVELL, C. D., HOLT, R. D et al.** (2010). Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature*, 468(7324), 647-652.
- KHAN, A., SHAIK, J. S., & GRIGG, M. E.** (2017). Genomics and molecular epidemiology of Cryptosporidium species. *Acta tropica*. 176: 349-354.

- KILONZO, C., LI, X., VIVAS, E. J., JAY-RUSSELL, M. T., FERNANDEZ, K. L., & ATWILL, E. R.** (2013). Fecal shedding of zoonotic food-borne pathogens by wild rodents in a major agricultural region of the central California coast. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(20), 6337-6344.
- KING, B. J., & MONIS, P. T.** (2007). Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment. *Parasitology*, 134(3), 309-323.
- KOSEK, M., ALCANTARA, C., LIMA, A. A., & GUERRANT, R. L.** (2001). Cryptosporidiosis: an update. *The Lancet infectious diseases*, 1(4), 262-269.
- LAL, A., BAKER, M. G., HALES, S., & FRENCH, N. P.** (2013). Potential effects of global environmental changes on cryptosporidiosis and giardiasis transmission. *Trends in parasitology*, 29(2), 83-90.
- LAMBIN, E. F., TRAN, A., VANWAMBEKE, S. O., LINARD, C., & SOTI, V.** (2010). Pathogenic landscapes: interactions between land, people, disease vectors, and their animal hosts. *International journal of health geographics*, 9(1), 54. <http://www.ij-healthgeographics.com/content/9/1/54>

LAUBACH H. E., BENTLEY C.Z, GINTER E. L., SPALTER J.S. & JENSEN J. A. (2004). A Study of Risk Factors Associated With the Prevalence of *Cryptosporidium* in Villages Around Lake Atitlan, Guatemala. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 8(4), 319-323.

LOH, E. H., ZAMBRANA-TORRELIO, C., OLIVAL, K. J., BOGICH, T. L., JOHNSON, C. K., MAZET, J. A., KARESH, W. & DASZAK, P. (2015). Targeting transmission pathways for emerging zoonotic disease surveillance and control. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15(7), 432-437.

LV, C., ZHANG, L., WANG, R., JIAN, F., ZHANG, S., NING, C., WANG, H., FENG, C., WANG, X., REN, X., QI, M & XIAO, L. (2009). *Cryptosporidium spp.* in wild, laboratory, and pet rodents in china: prevalence and molecular characterization. *Applied and environmental microbiology*, 75(24), 7692-7699.

MEERBURG, B. G., SINGLETON, G. R., & KIJLSTRA, A. (2009). Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(3), 221–270.

MELICHEROVÁ, J., MAZOUROVÁ, V., & VALIGUROVÁ, A. (2016). In vitro excystation of *Cryptosporidium muris* oocysts and viability of released sporozoites in different incubation media. *Parasitology research*, 115(3), 1113-1121.

- MILLS, J. N., CHILDS, J. E., KSIAZEK, T. G., & PETERS, C. J. (1998).** Métodos para trampeo y muestreo de pequeños mamíferos para estudios virológicos. En: *Métodos para trampeo y muestreo de pequeños mamíferos para estudios virológicos*. Organización Panamericana de la Salud.
- OSTFELD, R. S., & KEESING, F. (2012).** Effects of host diversity on infectious disease. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43, 157-179.
- PATZ, J. A., DASZAK, P., TABOR, G. M., AGUIRRE, A. A., PEARL, M., EPSTEIN, J. et al. (2004).** Unhealthy landscapes: policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. *Environmental health perspectives*, 112(10), 1092.
- PATZ, J. A., OLSON, S. H., UEJIO, C. K., & GIBBS, H. K. (2008).** Disease emergence from global climate and land use change. *Medical Clinics of North America*, 92(6), 1473-1491.
- PEREC-MATYSIAK, A., BUNKOWSKA-GAWLIK, K., ZALESNY, G., & HILDEBRAND, J. (2015).** Small rodents as reservoirs of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in south-western Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22(1), 1-5.

PÉREZ, G., BASTIAN, S., AGOULON, A., BOUJU, A., DURAND, A., FAILLE, F. *et al.* (2016). Effect of landscape features on the relationship between *Ixodes ricinus* ticks and their small mammal hosts. *Parasites & Vectors*, 9(1), 20. DOI 10.1186/s13071-016-1296-9

PLA, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*, 31(8), 583-590.

RAŠKOVÁ, V., KVĚTOŇOVÁ, D., SAK, B., MCEVOY, J., EDWINSON, A., STENGER, B., & KVÁČ, M. (2013). Human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* isolates presumably transmitted from wild mice. *Journal of clinical microbiology*, 51(1), 360-362.

REKHA, K. M. H., PUTTALAKSHMAMMA, G. C., & D'SOUZA, P. E. (2016). Comparison of different diagnostic techniques for the detection of cryptosporidiosis in bovines. *Veterinary World*, 9(2), 211-215.

RODRIGUES, R. D., GOMES, L. R., DE SOUZA, R. R., & BARBOSA, F. C. (2016). Comparação da eficiência das colorações de Ziehl-Neelsen modificado e Safranina modificada na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (*Eucoccidiorida*, *Cryptosporidiidae*) a partir de amostras fecais de bezerros de 0 a 3 meses. *Ciência Animal Brasileira*, 17(1), 119-125.

- RYAN, U., HIJJAWI, N.** (2015). New developments in *Cryptosporidium* research. *International journal for parasitology*, 45(6), 367-373.
- SAAVEDRA B. & SIMONETTI JA.** 2005. Small mammals of Maulino forest remnants, a vanishing ecosystem of south-central Chile. *Mammalia*, (69)337-348.
- SAVIOLI, L., SMITH, H., & THOMPSON, A.** (2006). Giardia and Cryptosporidium join the 'neglected diseases initiative'. *Trends in Parasitology*, 22(5), 203-208.
- SHAW, D. J., GRENFELL, B. T., & DOBSON, A. P.** (1998). Patterns of macroparasite aggregation in wildlife host populations. *Parasitology*, 117(6), 597-610.
- SIKES, R. S., & GANNON, W. L.** (2011). Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy*, 92(1), 235-253.
- SITJÀ-BOBADILLA, A., PADRÓS, F., AGUILERA, C., & ALVAREZ-PELLITERO, P.** (2005). Epidemiology of *Cryptosporidium molnari* in Spanish Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) and European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) Cultures: from Hatchery to Market Size. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 131–139.
- ŠLAPETA, J.** (2013). Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow?. *International journal for parasitology*, 43(12), 957-970.

- SMITH, H. V., NICHOLS, R. A.** (2010). Cryptosporidium: detection in water and food. *Experimental Parasitology*, 124(1), 61-79.
- SONG, J., KIM, C. Y., CHANG, S. N., ABDELKADER, T. S., HAN, J., KIM, T. H., OH, H. S., LEE, J. M., KIM, D.S., KIM, J. T., OH, H. S., HUR, M. S., SUH, J. H. & PARK, J. H.** (2015). Detection and Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. from Wild Rodents and Insectivores in South Korea. *The Korean journal of Parasitology*, 53(6), 737-743.
- TORRES, J., GRACENEA, M., GOMEZ, M. S., ARRIZABALAGA, A., & GONZALEZ-MORENO, O.** (2000). The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in wild rodents and insectivores in Spain. *Veterinary Parasitology*, 92(4), 253-260.
- TZIPORI, S., WARD, H.** (2002). Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*, 4(10), 1047-1058.
- URQUHART, G. M., ARMOUR, J., DUNCAN, J. L., DUNN, A. M. & JENNINGS, F. W.** (2001). En: *Veterinary Parasitology* (2nd edition). Ed. Blackwell Science Ltd.. Zaragoza, España. pp. 266-267.
- WILCOX, B. A., & GUBLER, D. J.** (2005). Disease ecology and the global emergence of zoonotic pathogens. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 10(5), 263-272.

WOOD, C. L., LAFFERTY, K. D., DELEO, G., YOUNG, H. S., HUDSON, P. J., & KURIS, A. M. (2014). Does biodiversity protect humans against infectious disease?. *Ecology*, 95(4), 817-832.

WOODS, G. L., & WALKER, D. H. (1996). Detection of infection or infectious agents by use of cytologic and histologic stains. *Clinical microbiology reviews*, 9(3), 382-404.

XIAO, L., FAYER, R., RYAN, U., & UPTON, S. J. (2004). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 72-97.

XIAO, L., FAYER, R. (2008). *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, Second Edi. ed. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA. 560 pp.

ZAHEDI, A., MONIS, P., AUCOTE, S., KING, B., PAPANINI, A., JIAN, F., YANG, R., OSKAM, C., BALL, A., ROBERTSON, I. & RYAN, U. (2016). Zoonotic *Cryptosporidium* species in animals inhabiting Sydney water catchments. *PloS one*, 11(12), e0168169.^a

ZAHEDI, A., PAPANINI, A., JIAN, F., ROBERTSON, I., & RYAN, U. (2016). Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: critical insights into better drinking water management. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 5(1), 88-109.^b

ZANARO, N. L., & GARBOSSA, G. (2008). Cryptosporidium: cien años después. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 42(2), 195-201.

ANEXOS

1. Preparación de reactivos para tinción de Ziehl-Neelsen:

1.1. Fucsina

Fucsina básica 10 g.

Alcohol etílico 95% 100 mL.

Acido fenico (Fenol) 50 g.

Agua destilada 1000 mL.

Procedimiento: Fundir a baño María el Fenol y agregar 10% (100 mL) de agua destilada, de esta mezcla obtenida sacar 50 mL. Disolver la fucsina en el alcohol etílico y luego agregar el Fenol disuelto en el agua destilada tibia.

1.2. Azul de Metileno

Azul de Metileno 2 g.

Ácido acético glacial 50 mL.

Agua destilada C. S. P. 1000 mL

1.3. Alcohol ácido

Ácido clorhídrico 30 mL

Alcohol etílico 96% 970 mL.

2. Tinción de Ziehl-Neelsen:

Para el diagnóstico de ooquistes del protozoo *Cryptosporidium*.

Procedimiento: Con una tórula se hace una extensión de la muestra sobre un portaobjeto. Una vez secado a temperatura ambiente, se cubre el frotis con fucsina y se fija exponiendo el portaobjeto al fuego por seis segundos (no permitir que la fucsina ebulle), para luego dejar reposar por 15-20 minutos. Se lava con agua destilada o potable. Se decolora con alcohol ácido (HCl con alcohol etílico), dejando actuar por 20 segundos y se lava nuevamente. Se agrega azul de metileno y se deja reposar por 5 minutos. Se lava por última vez y se deja secar a temperatura ambiente. Finalmente se procede con la lectura al microscopio con aceite de inmersión (100 X).

Se consideran como positivos basándose en tres criterios: (1) Los ooquistes se observan de **color** fucsia sobre un fondo azul, (2) de **forma** esférica, (3) con un **tamaño** de 3 a 8,5 μm .