

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL

DETERMINACIÓN DE *Cryptosporidium* spp. EN HECES DE LOBO MARINO  
COMÚN (*Otaria flavescens* SHAW 1800) EN UNA COLONIA URBANA DE  
VALDIVIA, CHILE

Memoria de título presentada como parte de  
los requisitos para optar al TÍTULO DE  
MEDICO VETERINARIO

LUIS ALIRO CORNEJO GALAZ  
VALDIVIA-CHILE

2017

**PROFESOR PATROCINANTE**



---

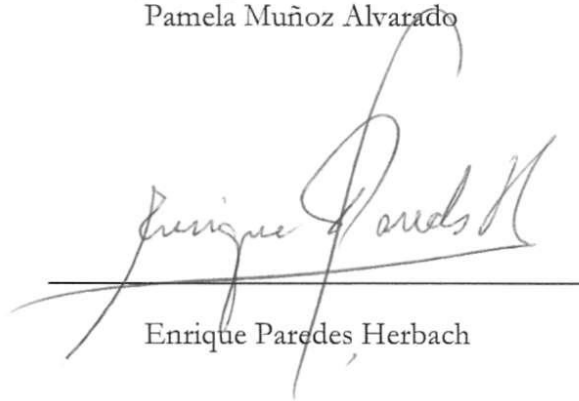
María José Navarrete Talloni

**PROFESOR INFORMANTES**



---

Pamela Muñoz Alvarado



---

Enrique Paredes Herbach

**FECHA DE APROBACIÓN: 11 de septiembre de 2017**

# ÍNDICE

Capítulos	Página
1. RESUMEN .....	1
2. SUMMARY .....	2
3. INTRODUCCIÓN .....	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	11
5. RESULTADOS .....	13
6. DISCUSIÓN .....	14
7. REFERENCIAS .....	18
8. ANEXOS .....	21

## 1. RESUMEN

En la ciudad de Valdivia habita una colonia de lobos marinos comunes (*Otaria flavescens*) que se ha establecido desde hace más de 20 años, logrando adaptarse a la vida en agua dulce debido en parte a su dieta variada, alimentándose principalmente de peces y crustáceos del río Calle-Calle, como aquellos brindados por los trabajadores del mercado fluvial de la zona. Además, no solo se han adaptado al medio ambiente natural, sino que también a las distintas actividades deportivas náuticas que se llevan a cabo diariamente en el río que habitan y al flujo de personas que transita cerca de estos, transformándolos en uno de los atractivos turísticos de la ciudad. Dada sus características fisiológicas, esta especie puede ser utilizada como un bio-indicador permitiendo evaluar así el estatus sanitario del área, en este caso de la ciudad y sus alrededores. Dentro de la información que se puede obtener de ellos está el detectar diversos microorganismos que pueden constituir riesgo para la población humana. Entre ellos se encuentra *Cryptosporidium* spp., que corresponde a un protozoo entero-patógeno estudiado en humanos y mamíferos terrestres. En el caso de los lobos marinos, se describe su presencia debido a que es capaz de sobrevivir en ambientes acuáticos.

El objetivo principal de este estudio fue detectar ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en muestras de heces de los lobos marinos durante la primavera del año 2015, para lo cual se recolectaron 30 muestras de material fecal obtenidas en el sector donde habitan estos animales en la ciudad de Valdivia. Las muestras fueron depositadas en tubos Falcon de 50 ml con alcohol al 70% y fueron procesadas con la técnica de Ziehl-Neelsen para la detección del parásito protozoario *Cryptosporidium* spp. en el Laboratorio de Parasitología Veterinaria del Instituto de Patología Animal de la Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. Como resultado, se determinó la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en 8 de las muestras analizadas, representando el 27% del total de las muestras.

Estudios anteriores en la misma colonia también determinaron la presencia del parásito, lo que nos indica que con el paso de los años éstos se han mantenido presentes en los lobos marinos, lo que aumenta la probabilidad de que también estén presentes tanto en los ríos que habitan como en los espacios donde transitan. La importancia de esta determinación en estos animales está dada por las distintas interacciones inter-especies que ocurren en el espacio donde habitan, que toma mayor importancia considerando el constante flujo peatonal-turístico que hay en la zona, como también las actividades recreacionales-deportivas que se llevan a cabo en el río, pudiendo significar una fuente de infección para humanos, transformándose en un tema de interés para la salud pública.

*Palabras clave:* lobo marino común, *Cryptosporidium* spp., *Otaria flavescens*, Valdivia.

## 2. SUMMARY

### DETERMINATION OF *Cryptosporidium* spp. IN FECES OF SOUTH AMERICAN SEA LION (*Otaria flavescens*) IN A URBAN COLONY OF VALDIVIA, CHILE

In the city of Valdivia, a colony of sea lions (*Otaria flavescens*) has been settled in for 20 years, managing to adapt to life in fresh water due in part to its varied diet, feeding mainly on fish and crustaceans from the Calle-Calle river, as provided by the workers from the fish market on the area. Not only they have adapted to the natural environment, but also to the different nautical sports activities that take place daily in the river where they inhabit and to the transit of people nearby, transforming them into one of the tourist attractions of the city. Given its physiological characteristics, this species can be used as a bio-indicator allowing for assessment of the health status of an area, in this case of the city and its surroundings. Part of the information that can be obtained is the presence of microorganisms that may constitute a health risk to the human population. Among them is *Cryptosporidium* spp., an entero-pathogen protozoan studied in humans and terrestrial mammals. In case of sea lions, its presence is explained because it is capable to survive in aquatic environments.

The main objective of this study was to detect oocyst of *Cryptosporidium* spp. in fecal samples of sea lions during the spring of 2015, for which 30 samples of fecal material were collected in the area where these animals inhabit, in the city of Valdivia. The samples were deposited in 50 ml Falcon tubes with 70% alcohol, then processed with Zhihl-Neelsen technique for the detection of the protozoan parasite *Cryptosporidium* spp. at the Animal Parasitology Laboratory on the Animal Pathology Institute from the Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. The results showed the presence of *Cryptosporidium* spp. oocyst in 8 of the analyzed samples, representing 27% of the total samples.

Previous studies in the same colony also found the presence of this parasite, indicating that, with the passage of the years, this parasite has been present in the colony, which increases the probability that they are also present in the rivers that they inhabit, as well as the places where they transit. The importance of its presence in these animals is due to the different inter-species interactions that occur in the area that they inhabit, this takes more importance considering the constant pedestrian-tourist transit in the area, as well as recreational-sport activities that are carried out daily in the river, being a possible source of infection for humans, making it a source of interest regarding the public health.

*Key words:* sea lion, *Cryptosporidium* spp., *Otaria flavescens*, Valdivia.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 ANTECEDENTES GENERALES

Los lobos marinos son mamíferos adaptados a la vida de mar, caracterizados por tener periodos de vida en mar y otros de permanencia en tierra firme o hielo, por lo que sus cuerpos poseen modificaciones que les permiten moverse tanto en tierra como para nadar en el mar (Rodríguez y Bastida 2004), siendo estas modificaciones de carácter morfológicos, fisiológicos y conductuales principalmente (Sepúlveda 1991).

Debido a diversas características tales como su vida prolongada, la posición que ocupan en la cadena alimenticia y sus abundantes depósitos de tejido adiposo, se considera a los mamíferos marinos como bio-indicadores u organismos centinelas, que cumplen con alertar de manera temprana sobre potenciales amenazas contaminantes o impactos negativos que se encuentren afectando el ambiente acuático donde éstos habitan (Pedraza 2011).

Como está descrito por Capella y Gibbons (2008) los mamíferos marinos se distribuyen en 3 órdenes: Carnivora, Cetacea y Sirenia. Dentro del orden Carnivora se encuentra la familia Otariidae correspondientes a los lobos marinos cuyas 5 especies ejemplares son: lobo fino austral (*Arctocephalus australis*), lobo fino antártico (*Arctocephalus gazella*), lobo fino de Juan Fernández (*Arctocephalus philippii*), lobo fino subantártico (*Arctocephalus tropicalis*) y lobo marino común (*Otaria flavescens*).

#### 3.2 LOBO MARINO COMÚN (*Otaria flavescens*)

##### 3.2.1 Características Generales

En Chile se describen cerca de 50 especies de mamíferos marinos, siendo el lobo marino común (*O. flavescens*) y el lobo fino austral (*A. australis*) las especies más abundantes de la familia Otariidae tanto en Chile como en el hemisferio sur (Bartheld y col 2008). En Chile, los principales estudios sobre esta especie se encuentran relacionados con su biogeografía, ecología, comportamiento, historia natural y conservación (Capella y Gibbons 2008).

Como características morfológicas claves para su reconocimiento y diferenciación del resto de los pinnípedos se describe por la National Audubon Society (Reeves y col 2002) que son animales de cuerpos grandes con cabeza y cuello macizo, su hocico es corto pero contundente y en dirección hacia arriba. Su pinna o pabellón auditivo es pequeña en relación al tamaño de su cabeza. Además, poseen una gran melena robusta, considerada la característica principal para diferenciarlos del resto de lobos y leones marinos del hemisferio Sur. Con respecto al resto del cuerpo posee un par de aletas delanteras largas y anchas, mientras que las aletas traseras son más cortas en relación a su gran torso.

Sobre sus hábitos alimenticios se sabe que son una especie generalista, cuya dieta consta de peces, crustáceos y moluscos principalmente (Weinberger 2013). A su vez se ha descrito por George-Nascimento y col (1985) que *O. flavescens* es capaz de componer su dieta en base a aquellas presas de mayor disponibilidad en la zona en la que se encuentren, actuando como una especie oportunista capaz de adaptarse al medio que habita. En el caso de las costas de Chile, éstos tienden a preferir alimentarse de peces de nado lento que viven en el fondo marino por sobre especies pelágicas más abundantes de nado más rápido, consumiendo así una gran variedad de peces, cefalópodos y calamares (Reeves y col 2002).

### 3.2.2 Distribución

Dentro de la familia de los otáridos, el lobo marino común o lobo de un pelo, *O. flavescens* es la especie más frecuente del litoral chileno. Se distribuye desde el norte de Perú (4°S) hasta el Cabo de Hornos e Isla Diego Ramírez por el océano Pacífico; y desde Tierra del Fuego hasta el sur de Brasil (29°S) por parte del océano Atlántico (Weinberger 2013) (Figura 1).

Se estima un total de 140.000 ejemplares de distribuidos a lo largo de la costa chilena, lo que corresponde al 35% de la población mundial de lobos marinos (Sepúlveda y col 2011). Esta abundancia de lobos en la zona puede atribuirse a la influencia de la corriente de Humboldt como una de las áreas más productivas de pesca en el mundo, convirtiéndose en una fuente de diversos recursos alimenticios para esta especie (Neira y Arancibia 2004).



Figura 1. Distribución del lobo marino común (*Otaria flavescens*, azul). Modificado de: Reeves 2002.

### 3.3 FAUNA PARASITARIA EN MAMIFEROS MARINOS

Especies carnívoras silvestres como *O. flavescens* son hospederos competentes de una gran variedad de parásitos, los cuales mediante procesos tales como autoinfección y reinfección son capaces de permanecer en sus hospederos. La permanencia de los parásitos en sus hospederos y en el medio ambiente también se ve afectada por factores como la condición sanitaria en la que se encuentren los animales y el alimento que consumen, además la presencia de hospederos intermedios o de vectores en el lugar que estos parásitos se encuentran van a favorecer su permanencia en el ambiente (Acosta y col 2015).

Generalmente los parásitos pesquisados en mamíferos marinos que suelen ser de interés veterinario por los problemas de salud que conllevan para los animales, suelen no expresar una signología clínica clara en estos animales. Esto dado por diversos factores como ambientales, inherentes del parásito, fisiológicos e inmunológicos del hospedero, encontrándose estos parásitos principalmente de manera accidental mediante exámenes clínicos de rutina, necropsias y/o en individuos con problemas de salud graves (Painean 2014). Morgades y col (2006) también plantean que altas cargas de parásitos gastrointestinales parecen tener escaso efecto patógeno sobre la salud de estos hospedadores, siendo común encontrarlos en lobos marinos con buen estado corporal.

En Latinoamérica se han realizado diversos estudios que han registrado la presencia de diversos parásitos en *O. flavescens*, como es el caso de Uruguay donde se pesquisaron helmintos del phylum acantocephalos: *Corynosoma spp.* (Holcman-Spector y col 1977; George-Nascimento y Marin 1992) y *Bolbosoma spp.*, además de los nematodos *Uncinaria spp.* (Holcman-Spector y col 1977) y *Contracaecum spp.* (López Fernández 1967). Por su parte, en las costas de Chile y Argentina también se han descrito especies de trematodos (*Ogmogaster heptalineatus*), cestodos (*Diphyllobothrium pacificum* y *Phyllobothrium delphini*) y nematodos (*Phocanema decipiens* y *Pseudoterranova caltani*) (George-Nascimento y Carvajal 1981; Morgades y col 2006).

#### 3.3.1 *Cryptosporidium spp.*

**3.3.1.1 Generalidades** *Cryptosporidium spp.* corresponde a un parásito del phylum de los protozoos, del grupo de los apicomplexos, por lo que posee en su extremo anterior un aparato apical que permite la invasión de su célula hospedera (Barriga 2002). Se encuentran de manera intracelular, pero extracitoplasmática en las células epiteliales del tracto digestivo dentro del hospedero. Corresponde a una especie monoxena, por lo que requiere solo de un hospedero para realizar su ciclo biológico y heterogenética teniendo una fase de reproducción asexual y una sexual para poder reproducirse. Los ooquistes de este género son los más pequeños en comparación a otros coccidios, midiendo entre 4 a 6  $\mu\text{m}$  de tamaño aproximadamente (Barriga 2002, Parte-Pérez y col 2005). Posee un amplio rango de hospederos, parasitando a más de 150 especies de mamíferos incluyendo humanos, como también a aves, reptiles, anfibios y peces (Fayer 2008).

Es un agente zoonótico que produce infección intestinal, transmitido por vía fecal-oral en donde el agua y los alimentos juegan un rol epidemiológico importante. Se ha detectado este patógeno en aguas marinas y se ha determinado que infecta mamíferos marinos en distintas partes del mundo



(Sturm 2011). Dentro de su patogenicidad destacan por ser organismos inmediatamente infectantes al momento de ser eliminados por las heces del hospedero, los ooquistes son capaces de mantenerse viables y pueden sobrevivir por semanas o meses en el ambiente, terrestre y acuático, llegando de esa manera a ser un riesgo de infección para los mamíferos marinos (Cacciò y col 2005). Para destruir a los ooquistes se requiere de una exposición de 30 minutos a 65°C y -25°C, formalina al 10%, amoníaco al 50% o hipoclorito de sodio al 70% (Barriga 2002).

**3.3.1.2. Ciclo biológico** *Cryptosporidium* spp. es una especie monoxena y heterogenética por lo que para completar su ciclo de vida requiere de un solo hospedero y para su desarrollo incluye una fase de reproducción asexual como una sexual. Del punto de vista del desarrollo del parásito se puede identificar una fase exógena que involucra el ooquiste infectante libre en el medio ambiente y una endógena que corresponde a todos los procesos que ocurren dentro del hospedero (Barriga 2002) (Figura 2). En base a esto se pueden describir seis etapas según el acontecimiento ocurrido principalmente en cada una (Cacciò y Putignani 2014).

El ciclo comienza con el protozoo libre en el medio ambiente en forma de ooquiste (etapa 1) como fuente de infección. Este ooquiste esporulado en su interior posee 4 esporozoitos y es excretado por el hospedero infectado mediante las heces (Fayer 2008). Generalmente estas heces infectadas van a contaminar fuentes de aguas, potable y/o recreacionales, en donde otro hospedero ingerirá los ooquistes mediante el consumo, accidental y/o intencional, de agua contaminada (Cacciò y Putignani 2014).

Una vez ingerido dentro del hospedero comienza el desenquistamiento (etapa 2) en el estómago con la apertura de la pared del ooquiste a la altura de uno de sus polos gracias al debilitamiento de la pared, en parte por acción de enzimas gástricas, pancreáticas y sales biliares en el tracto gastrointestinal, permitiendo así la salida de los 4 esporozoitos infectantes hacia el lumen intestinal (Fayer 2008).

El ciclo continúa con la formación del trofozoíto (etapa 3), para esto los esporozitos móviles recién desenquistados se acercan al extremo apical de las células epiteliales del intestino delgado para invadir la célula. Al entrar en contacto con la membrana de la célula hospedera los esporozitos liberan enzimas mediante organelos secretorios que permiten su unión a la superficie de las células epiteliales. Por consecuencia se comienzan a formar vacuolas que van a agruparse y rodear al parásito fusionándose con la membrana de la célula hospedera formando una vacuola parasitófora en donde el esporozoito no está en contacto directo con el citoplasma de la célula encontrándose de manera intracelular pero extracitoplasmática en el hospedero. A medida que avanza el proceso de internalización el esporozoito se vuelve esférico y pasa a llamarse trofozoíto (Fayer 2008).

Finalizada la invasión celular e internalización viene el proceso de reproducción asexual, también llamado merogonia (etapa 4), en donde se divide el núcleo del trofozoíto originándose los merontes tipo I quienes poseen en su interior de 6 a 8 núcleos que cada uno dará origen a los merozoitos. Una vez maduros los merozoitos salen del meronte para poder invadir a otras células hospederas y desarrollarse como meronte tipo I o tipo II (Cacciò y Putignani 2014).

Al infectar nuevas células los merozoitos tipo II dan inicio a la fase de reproducción sexual o gametogonia (etapa 5). Para esto se diferencian en un microgamonte (masculino) o macrogamonte (femenino). Cada microgamonte se vuelve multinucleado y cada núcleo dará origen a un microgameto, mientras que el macrogamonte se mantiene con un sólo núcleo. El microgameto va a fertilizar al macrogamonte dando origen a un cigoto que se desarrollará pasando a ser un ooquiste (Fayer 2008).

Finalmente ocurre la esporogonia (etapa 6) en donde el ooquiste esporula dentro del hospedero contemplando 4 esporozoitos en su interior. Una vez esporulados son liberados al lumen intestinal para ser eliminados por las heces siendo inmediatamente infectantes para otras especies (Cacciò y Putignani 2014), siendo los ooquistes de gruesa pared doble aquellos capaces de salir al exterior con las deposiciones, mientras que el 20% restante de los ooquistes posee una delgada pared simple que se rompe dentro del intestino y permite que los esporozoitos infecten células vecinas en el proceso de autoinfección (Barriga 2002).

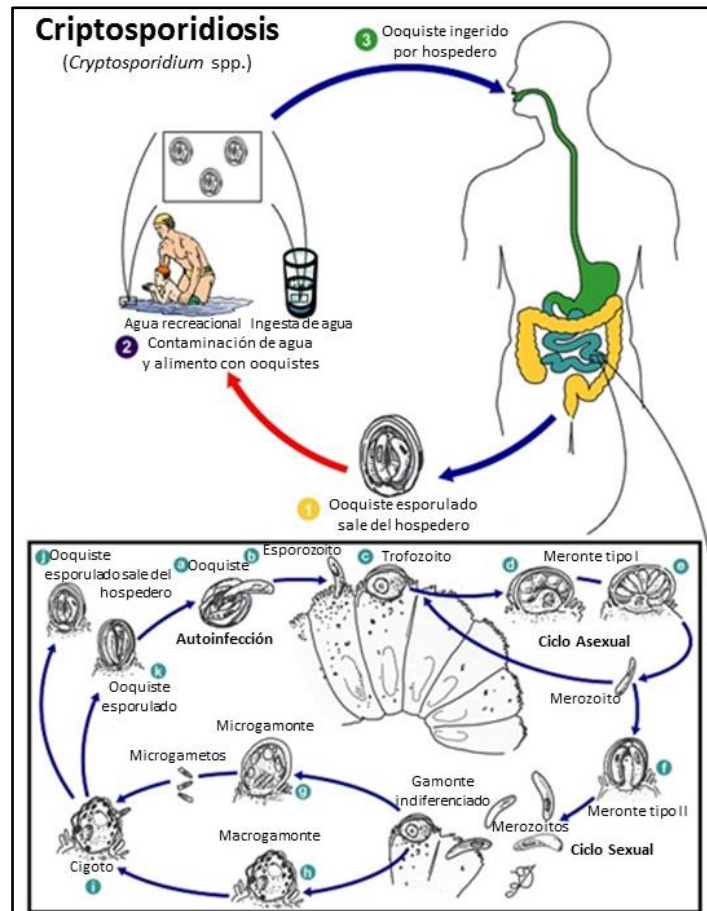


Figura 2. Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. Modificado de: Da Silva A, Moser M. 2002. En: CDC Public Health Image Library<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Fuente: Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp en <https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html> (Consultado: 11 de septiembre 2017)

**3.3.1.3 Presencia en mamíferos marinos** El género *Cryptosporidium* spp. está compuesto por 16 especies, dentro de éstas, tres se han descrito y diagnosticado en mamíferos marinos: *C. muris*, *C. hominis* y *C. parvum*, todos pesquisados tanto en animales vivos como muertos, en condición de cautiverio y también de vida libre (Gomes y col 2007).

Según Fayer y col (2004) su presencia en ríos y mares se asocia al manejo inadecuado de desechos orgánicos agrícolas provenientes de animales domésticos (destacando los bovinos principalmente), por tratamiento y/o eliminación ineficiente de aguas servidas, así como la formación de escorrentías en suelos utilizados en actividad agrícola en épocas de altas precipitaciones que hace que se comuniquen con cursos de agua aledaños, aumentando la posibilidad de infección de mamíferos marinos que habiten el lugar.

Se han reportado ooquistes de *Cryptosporidium* spp. tanto en la superficie marina como en aguas subterráneas (Fayer 2008). Aunque la presencia de éstos se asocia principalmente a aguas potables y recreacionales, la contaminación de ríos ocurre por descargas fecales de hospederos infectados, principalmente ganado y humanos, llevando así a la contaminación de otro tipo de aguas como lo son estuarios y zonas costeras. Se ha demostrado que los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. pueden permanecer viables hasta 1 año en agua salada (Molnar 2005).

Poco se sabe sobre la prevalencia y diversidad genética de las especies de *Cryptosporidium* spp. en ambientes marinos y el rol exacto que tienen los animales marinos en la transmisión directa de estos parásitos hacia los humanos (Cacciò y Putignani 2014). Como también se desconoce el papel exacto que cumplen los pinnípedos en el ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp., ni tampoco se ha podido identificar con claridad si hay desarrollo y presencia de un cuadro clínico que afecte o produzca la muerte del individuo (Paineau 2014).

**3.3.1.4 Importancia zoonótica** *Cryptosporidium* spp. es responsable tanto de infecciones zoonóticas como oportunistas en humanos y también antropozoonóticas (Molnar 2005), siendo más común la transmisión de humano a humano por sobre la zoonosis (Barriga 2002). Dentro de las especies de *Cryptosporidium* spp., *C. parvum* es el principal agente zoonótico de la especie, el cual se encuentra mayoritariamente en terneros, principalmente lactantes (Barriga 2002; Cacci y Putignani 2014). También se encuentra en el intestino de humanos, rumiantes, porcinos, equinos, roedores, otros mamíferos y ocasionalmente aves, debido a que es un agente poco específico para su hospedero (Barriga 2002). A pesar de ser descrito originalmente como un agente comensal, se fue asociando al parásito a brotes importantes de diarrea en terneros en 1970, considerándose a partir de aquí un patógeno importante tanto del ganado doméstico como del hombre, siendo causa común de gastroenteritis aguda auto-limitante en hospederos inmunocomprometidos (Barriga 2002; Molnar 2005). En el hombre se han registrado brotes de criptosporidiosis transmitidos por los alimentos desde el comienzo de 1980, encontrándose ooquistes en diversos productos alimenticios, principalmente frutas, vegetales y bivalvos filtradores, los que al ser consumidos frecuentemente crudos actúan como medio de transporte para los ooquistes infectantes. La mayoría de los brotes se asocian a la transmisión por ingestión de ooquistes mediante consumo de agua contaminada y por contacto directo persona a persona, registrándose también en los últimos años un aumento en los brotes asociados al contacto con aguas recreacionales (Fayer 2008). Por otra parte, a modo experimental se han realizado estudios con

ratones recreando la enfermedad en estos para calcular la dosis infectante del parásito en individuos inmunocomprometidos, no se ha logrado establecer pero los resultados demostraron que puede que sea tan baja como un solo ooquiste infectante (Molnar 2005).

Con respecto a la signología que cursan las personas infectadas esta se caracteriza por diarrea repentina acuosa y profusa con dolor abdominal, náuseas, vómitos, fiebre, anorexia, fatiga y pérdida de peso (Cacciò y Putignani 2014). En el caso de infecciones severas es más característico el desarrollo de una diarrea líquida muy intensa, con dolor abdominal y baja notable de peso que dura de 1 a 3 semanas, llegando a ser causa posible de muerte en pacientes con inmunodeficiencia adquirida (Barriga 2002). No posee algún signo patognomónico que permita asociar inmediatamente el cuadro al agente parasitario.

### 3.4 REALIDAD LOCAL

En la ciudad de Valdivia, ubicada en la Región de Los Ríos, se ha establecido en los últimos 20 años una colonia de lobos marinos, los cuales a pesar de ser animales de ambiente marino, logran encontrarse en ríos de agua dulce distribuyéndose a lo largo de los ríos Valdivia, Calle-Calle y Cau-Cau. Esta colonia se encuentra formada por más de 70 individuos, exclusivamente machos, cuyo rango etario va de los 2 a 15 años de edad. Su alimentación en la zona está dada principalmente por peces, ya sean capturados por ellos mismos, tales como carpas, truchas y salmones; o aquellos brindados como restos de la feria fluvial por los mismos trabajadores de la feria. (Hermosilla y col 2016).

Para autores como Hermosilla y col (2016) llama la atención la capacidad de los lobos marinos de poder adaptarse no sólo al medio ambiente natural que los rodea, sino que también a toda actividad humana-deportiva que se lleva comúnmente a cabo en el río, como lo son las actividades de remo y kayak, además del constante acercamiento de turistas a las balsas donde los lobos habitan y descansan, en busca de poder fotografíarlos y observarlos de manera directa (Figura 3).



Figura 3. Colonia de lobo marino común (*O. flavescens*) en la ciudad de Valdivia, Región de Los Ríos, Chile. (A) Balsa donde habitan en la costanera de la ciudad. (B) Ejemplares en los puestos comerciales en la feria fluvial de la ciudad.

Considerando que *Cryptosporidium* spp. es un parásito resistente al medio ambiente que posee una amplia gama de hospederos y que se ha pesquisado en mamíferos marinos como *O. flavescens*, es de interés actualizar la información respecto a la presencia o ausencia de este parásito en la colonia urbana de lobos marinos presentes en la ciudad de Valdivia. Debido a las actividades turísticas, deportivas y náuticas que se llevan a cabo en el río Calle-Calle y sus alrededores, al tránsito constante de personas y de mascotas en los alrededores que éstos habitan, junto con la presencia de aves y peces en el río con los que cohabitan, hacen que exista una mayor probabilidad de transmisión del parásito entre estas especies, por la gran interacción entre todos estos factores en un espacio geográfico reducido, aumentando el riesgo de zoonosis hacia la población.

### **3.5 OBJETIVOS**

#### **3.5.1 Objetivo General**

Detectar la presencia de *Cryptosporidium* spp. en muestras de materia fecal de lobo marino común (*Otaria flavescens*), recolectadas en el sector costanera de la ciudad de Valdivia, Chile, durante la primavera del año 2015.

#### **3.5.2 Objetivo Específico**

Determinar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en muestras de materia fecal de lobo marino común mediante la técnica de Ziehl-Neelsen.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Material biológico y recolección de muestras

Se trabajó con una colonia de lobo marino común (*O. flavescens*) presente en la ciudad de Valdivia, la cual consta de aproximadamente 70 ejemplares machos. Habitan una plataforma ubicada en el río Calle-Calle (39°48'S, 73°14'W) acoplada a la costanera de la ciudad. Se encuentran en estrecha relación con las actividades humanas por el constante flujo de transeúntes en el lugar, como también con la feria fluvial donde se comercializan productos alimenticios marinos. Además, el río que habitan es una zona de gran importancia turística para la región ya que se realizan actividades como deporte náutico y pesca deportiva, entre otros.

Se recolectaron muestras de heces frescas (de 5 a 7 g cada una aproximadamente), de manera directa de la plataforma ubicada en el río Calle-Calle y de sus alrededores (Figura 4), correspondientes al sector peatonal de la costanera durante septiembre y octubre del año 2015. La recolección fue durante la mañana, previo a que el Servicio de Aseo y Ornato de la ciudad interviniera limpiando los restos de las heces frescas. Mediante el uso de guantes, se recolectaron las heces en frascos de toma de muestra estériles de boca ancha de 100 ml de capacidad, fueron preservadas en alcohol 70% y rotulados con el número de muestra respectivo para su identificación. Las muestras fueron trasladadas y procesadas en el Laboratorio de Parasitología Veterinaria del Instituto de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile, posteriormente fueron analizadas en el Laboratorio de Anatomía Patológica Veterinaria.

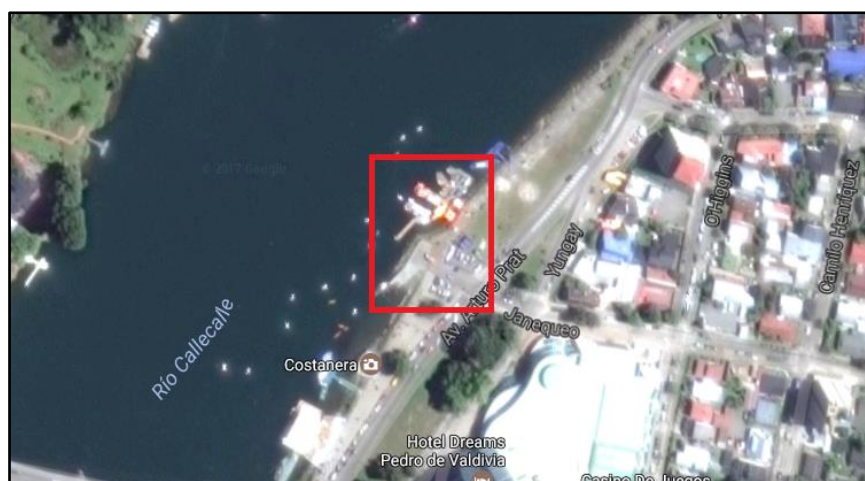


Figura 4. Mapa de la zona de muestreo en la ciudad de Valdivia. El recuadro rojo indica la plataforma donde habita la colonia de lobos marinos comunes (*Otaria flavescens*).

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Técnica de Ziehl-Neelsen para *Cryptosporidium* spp.

La técnica utilizada para la detección de *Cryptosporidium* spp. fue la técnica de tinción de Ziehl-Neelsen. Esta técnica consistió en realizar frotis, mediante el uso de tórula estéril, de las muestras fecales en un portaobjeto, los cuales se dejaron secar por 24 horas. Se agregó metanol a las muestras y se dejó actuar por 5 minutos, eliminando el exceso. Luego se tiñó con fucsina básica y se calentó con una tórula impregnada de alcohol al 70%, esto hasta que los frotis emitieron los primeros vapores, con la finalidad de fijar los ooquistes. Se dejó actuar por 20 minutos para permitir que ocurriera la fijación y luego se lavó sumergiendo el frotis en 3 frascos con agua potable. Se le agregó alcohol ácido para eliminar el exceso de fucsina básica y se procedió a sumergir nuevamente en los frascos con agua. Finalmente, se agregó azul de metileno para que actuará durante 5 minutos tiñendo la muestra. Luego, se pasó por un último lavado con agua potable y se dejaron secar. Una vez secos se observaron al microscopio con el aumento de 100x utilizando aceite de inmersión.

Las muestras se examinaron de manera sistemática, observándose en un comienzo con el lente objetivo 4x para observar la muestra completa. Luego se analizó en profundidad con el lente objetivo de inmersión (100x) esquemáticamente comenzando por el ángulo superior izquierdo de la muestra, moviéndose por el portaobjetos de izquierda a derecha hasta llegar al borde, para luego bajar una altura de campo y dirigirse en dirección contraria, y así sucesivamente hasta visualizar toda la muestra. Los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se presentan como discos de 4-6  $\mu\text{m}$  de forma ovoide o amorfos teñidos de color rojo en un fondo azul. Mediante esta técnica no se puede determinar la especie de criptosporidio presente. Se utilizó como control positivo heces de terneros positivos a *Cryptosporidium* spp. diagnosticados previamente en el Laboratorio de Parasitología Veterinaria de la Universidad Austral de Chile.

### 4.2.2 Análisis de datos

Se generó una tabla de frecuencias en el programa Microsoft Excel 2016 con los datos obtenidos para el estudio, tales como número total de muestras (n) y N° de identificación. Junto a esto, se anexó el resultado de la determinación de los parásitos a través de la técnica de Ziehl-Neelsen, clasificándose como Ausente o Presente. Se realizó el registro fotográfico mediante el programa Micrometrics SE premium.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Resultados Tinción de Ziehl-Neelsen

Se analizaron en total 30 muestras fecales de lobo marino común del sector costanera de la ciudad de Valdivia, presentándose los resultados en el Cuadro 1. Del total de las 30 muestras analizadas con la técnica de Tinción de Ziehl-Neelsen, 8 muestras resultaron positivas (27%) a la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (Anexo 1) (Figura 5).

Cuadro 1: Presencia o ausencia de *Cryptosporidium* spp. en heces de lobo marino común (*O. flavescens*) de una colonia urbana de la ciudad de Valdivia, Chile (n=30).

Resultado Ziehl-Neelsen	Nº de muestras	%
Positivo	8	27
Negativo	22	73
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>100</b>

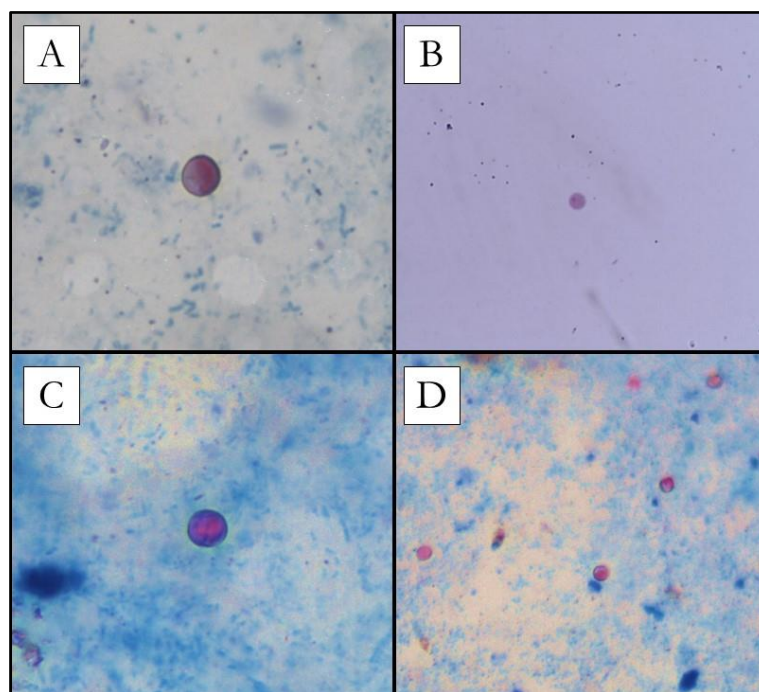


Figura 5. Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. positivos a la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN). (A) Muestra 2: en la imagen se observa un ooquiste presente en heces de lobo marino común (*O. flavescens*). ZN, 100x. (B) Muestra 15: se observa un ooquiste aislado en heces de *O. flavescens*. ZN, 40x. (C) Muestra control: ooquiste presente en heces de ternero positivo a *Cryptosporidium* spp. ZN, 100x. (D) Muestra control: varios ooquistes en muestra de heces de ternero. ZN, 40x.



## 6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio determinaron la presencia del parásito *Cryptosporidium* spp. debido a la detección de ooquistes del parásito en muestras de heces de *O. flavescens*, lo cual puede tener relevancia en el área de salud pública debido al potencial zoonótico de este protozoo. En un estudio previo realizado en la ciudad de Valdivia (Hermosilla y col 2016), cuyo objetivo era la detección de éste y de otros parásitos de importancia zoonótica presentes en los lobos marinos que habitan la costanera de la ciudad, se realizó una toma de muestras fecales durante el verano del año 2012, abarcando las mismas áreas de toma de muestras que el presente estudio, obteniendo como resultado que del total de las 40 muestras procesadas, un 10% de muestras resultaron positivas a *Cryptosporidium* spp.; a diferencia del 27% de positivos obtenidos en este estudio, Hermosilla y col (2016) obtuvieron un porcentaje menor de positivos, con un n mayor. La diferencia observada en este caso puede ser atribuida, entre algunas causas, a las técnicas utilizadas para la detección, así como también a un aumento de los individuos infectados. Con respecto a la técnica, Hermosilla y col (2016) realizaron las técnicas diagnósticas de solución de acetato de sodio-ácido acético-formaldehído (SAF) y tinción carbol-fucsina (CFS) para sus muestras coproparasitarias, además de una prueba de ELISA coprofeca para la detección de antígenos a *Cryptosporidium* spp. junto con la identificación morfológica de los ooquistes, siendo un estudio que abarco una mayor cantidad de pruebas diagnósticas para la detección de sus resultados positivos. Por su parte, en este estudio se utilizó la técnica de Ziehl-Neelsen, ya que corresponde a la prueba estándar de rutina para la detección de ooquistes de estos parásitos, en donde se describe por Barriga (2002) que la objetividad y el criterio de evaluación del evaluador pueden jugar un rol importante en su detección, por lo que en este estudio para la obtención de estos resultados se utilizó el mismo criterio en todas las muestras para considerar lo que sería una muestra positiva, guiándose en base a la comparación con distintas imágenes de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y también con el apoyo de un frotis positivo al mismo parásito en muestras fecales de terneros positivos al parásito, brindado por el Laboratorio de Parasitología Veterinaria de la Universidad Austral de Chile. En relación a los individuos y las muestras obtenidas, es de interés analizar el hecho que luego de 5 años se obtenga un porcentaje mayor de muestras positivas a este parásito, comparado al estudio previamente nombrado. Esta diferencia puede deberse a una mayor cantidad de individuos infectados, pero también se debe considerar que al ser muestras fecales sin identificación del individuo puede ocurrir que se haya muestreado más de una vez al mismo animal y que eso se vea reflejado como un mayor número de casos positivos en los resultados.

Hay que tener en consideración que esta colonia urbana de lobos es hospedera no sólo de este parásito, sino que también de varias especies entero-patógenas. Los lobos marinos pasan a funcionar como un reservorio importante de distintos agentes por la proximidad que tienen estos animales con la costanera de la ciudad y en consecuencia con las personas y mascotas que transitan constantemente, como también con las aves y peces con lo que cohabitan el mismo ecosistema, y el posible contacto con los productos del mercado fluvial (Hermosilla y col 2016). Con respecto a su relación con perros callejeros y en menor grado mascotas, es similar a la interacción con humanos, debido a que son lugares en que estos también circulan frecuentemente,

pero en menor cantidad que las personas. Por su parte los peces y aves están en contacto por el medio acuático que estos habitan correspondiente al río Calle-Calle principalmente. En el caso de las personas, estas tienen acceso a gran parte del hábitat terrestre donde transitan los lobos marinos, como lo es la vereda de la costanera en donde se desplazan y descansan en este lugar de constante flujo de personas, especialmente en época de verano en donde se instala comercio ambulante de venta de comida rápida y productos varios al aire libre. También, durante el estudio se registró la presencia de lobos marinos en el sector de embarque de los barcos y catamaranes de turismo. Es de gran importancia la relación que tienen los lobos marinos con la feria fluvial, lugar correspondiente a un mercado con exposición al aire libre de diversos productos pesqueros hasta frutales, en donde los lobos han encontrado una fuente de alimentación diaria, ya que los trabajadores los alimentan con los productos que no venden. La problemática se asocia a que estos animales pueden defecar en estos lugares donde se desplazan, liberando de esa manera ooquistes hacia el medio ambiente (Fayer 2008). Cuando se realiza la limpieza de estos espacios, principalmente por agua a presión, las heces pueden salpicar al personal de la feria o al personal de aseo de la ciudad y finalmente terminan volviendo al río o siendo esparcidas en un área mayor a la inicial. Se debe tener en cuenta además la dispersión de las heces en el río, tanto de manera directa (por las heces de los lobos), así como indirecta (por la limpieza de las heces), ya que se realizan diversas actividades en los ríos de la ciudad en donde destacan los deportes náuticos, como el remo, el kayak y stand up paddle. También, se observó durante el periodo de muestreo y posterior análisis del lugar, que el río corresponde a una fuente de provisión de agua no bebestible, pero sí para uso de limpieza por parte del personal de la feria fluvial, quienes se abastecen con baldes de agua directamente del río y luego los esparcen en los mesones y suelos de la feria. En ambos casos, existe la posibilidad que individuos se contagien accidentalmente no solo de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp., si no que de cualquier otro agente que exista en el caudal del río (Fayer y col 2004).

La presencia de *Cryptosporidium* spp. se asocia en gran parte a la intervención y actividad humana y del ganado porque son especies que liberan ooquistes al medio ambiente y en este caso podrían contribuir a la contaminación del río (Cacciò y Putignani 2014). Hay que considerar, que geográficamente el río pasa en su trayecto por las localidades de San José de la Mariquina, Punucapa y Valdivia y que el río Valdivia nace en la ciudad de Valdivia, donde confluyen los ríos Calle-Calle y Cau-Cau en el sureste de la Isla Teja, luego este fluye hacia el sur de la isla recibiendo las aguas del río Cruces, desembocando en el mar en la Bahía de Corral (Cade-Idepe 2004). A lo largo de este recorrido se pueden considerar factores alterantes de la composición natural del río, llevando a la presencia de diversos microorganismos en este. Río arriba se encuentra una planta de faenamiento, cuyos riles son tratados y luego descargados directamente al río. Mientras que río abajo, al límite de la ciudad se encuentra la planta de tratamiento de aguas servidas Aguas Décima que posee como cuerpo receptor al río Valdivia y sus afluentes. Esto toma importancia en estudios como el de Jara (2017) en donde se señala que en los afluentes del río Valdivia se vierte una cantidad constante de enterobacterias *E. coli* (patógenas y comensales) que a pesar del tratamiento efectuado en la planta de tratamiento de aguas servidas para nivelar la carga bacteriana, no se regula la presencia de bacterias que posean genes de resistencia a antibióticos, por lo que se puede considerar al río como una fuente de obtención y diseminación al ambiente de enterobacterias resistentes a antibióticos a la que la población de lobo marino presente en el estudio se encuentra constantemente expuesta. En relación a parásitos como *Cryptosporidium* spp. se describe por Barriga (2002) que plantas procesadoras de agua potable que tienen filtros de

arena remueven del 91 al 99% de los ooquistes del medio acuático que procesan, mientras que aquellas que no los poseen remueven solo del 74 a 78% de ooquistes presentes. Siguiendo el recorrido río abajo, se encuentran en actividad cuatro salmoneras, lo que toma importancia al considerar que la acuicultura tiene un efecto negativo sobre el medio acuático en el que se desarrolla por el constante empleo de antibióticos de manera industrial en estos sistemas, lo que pueden permanecer en el ambiente por más de dos semanas luego de ser suministrados y encontrarse así en organismos que consuman restos de alimentos con residuos de antibióticos (Cabello 2004), siendo estos potencialmente depredados por los lobos marinos de la zona. Todo esta actividad a lo largo del río Valdivia hace que este sea una fuente de exposición a diversos agentes como microorganismos resistentes y patógenos para los lobos marinos, ya que *O. flavescens* tiene como hábitat natural las aguas superficiales, siendo éstas las que están en constante exposición a cuerpos de agua potencialmente contaminados e/o intervenidos (Jara 2017).

La influencia de la actividad humana en la presencia de agentes como *Cryptosporidium* spp. ha sido ampliamente descrita. En el caso de Chile, Painean (2014) realizó un estudio en la Isla Guafo, procesando heces de lobo marino fino austral (*A. australis*) con la técnica de Ziehl-Neelsen, sin detectarla presencia de este parásito. Ese resultado es atribuible principalmente a la poca o nula intervención humana en el ecosistema de la isla, cuya lobera se encuentra alejada de la eliminación de desechos tanto humanos, así como de especies en contacto con humanos, además de encontrarse geográficamente apartada y protegida por barreras naturales. En la presente investigación, hay una diferencia con esos resultados, por la ubicación de la colonia de los lobos en plena área urbana de la ciudad de Valdivia.

Es de utilidad realizar estudios con individuos de la familia Otariidae ya que estos poseen una ventaja principal que recae en cumplir con varias de las características para poder ser considerados organismos centinelas, destacándose el estar posicionados en un lugar alto de la cadena trófica de su ecosistema acuático y poseer un promedio de vida relativamente largo en donde se registran rangos de 25-30 años para las hembras y 15-20 años para los machos (Siefeld y col 1997), lo que les permite encontrarse expuestos durante largo tiempo a diversos factores químicos y/o biológicos presentes en el ambiente cuya detección o estudio de éstos sea de interés científico, como por ejemplo el caso de toxinas que puedan estar presentes en la capa gruesa de tejido adiposo subcutáneo de estas especies debido a su capacidad de depositarse en ellas a largo plazo (Pedraza 2011). En este caso particular de estudio, a pesar de no conocerse exactamente el rol de los pinnípedos en el ciclo de *Cryptosporidium* spp., sí se sabe que actúan como hospederos de los parásitos (Painean 2014) siendo indicador de que éstos se encuentran y son excretados por las heces hacia el medio ambiente periódicamente, manteniéndose así una carga ambiental de la fuente de infección, en este caso en particular, principalmente en los ríos de la ciudad de Valdivia.

Autores como Cacciò y col (2005) han logrado describir que los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. son capaces de mantenerse en el ambiente acuático por periodos prolongados superiores a los 6 meses y (Molnar 2005) registran periodos superiores a 1 año en agua salada (Cacciò y col 2005), por lo que es de importancia algunos autores como Fayer y col (2004) describen esta sobrevivencia de los ooquistes en el agua dulce y salada atribuible a 2 factores importantes que son la temperatura y la salinidad del agua, manteniéndose mayor tiempo viables a menor salinidad. En el caso del río Calle-Calle no existe un estudio concreto que analice estas variables en el área donde los lobos habitan, pero si existen estudios realizados por Toledo (2010) en donde se midió la salinidad y

temperatura del estuario del río Valdivia. Para esto utilizó dos puntos control, el primero llamado Estación Mancera situado cercano a la desembocadura del río Valdivia y el segundo llamado Estación San Carlos situado cercano a la porción marítima en la bahía de Corral. Debiendo ser el río Calle-Calle con valores similares a estos, o inferiores en el caso de la salinidad, por encontrarse río arriba, en comparación a la estación Mancera en donde la temperatura obtenida fue aproximada a los 12°C y la salinidad oscilo de 0 a 30 ups. Esto, junto a lo descrito anteriormente por Fayer y col (2004) significa que la viabilidad de ooquistes en el río Valdivia no se ve interferida por la salinidad de este.

Considerando los factores involucrados capaces de mantener, no solo este, sino que, a otros posibles agentes patógenos en el ambiente, es de importancia realizar estudios afines que involucren en conjunto mayor información sobre los diversos factores que pueden estar jugando un rol importante en la contaminación, con agentes patógenos, y su permanencia en la cuenca del río Valdivia. Es relevante también conocer la relación que existe entre el comercio ambulante, la feria fluvial y el tránsito de peatones y si se ha asociado algún brote o caso de enfermedad digestiva en la población que pueda ser atribuible a algún agente zoonótico. Con respecto a la relación inter-especies, sería de utilidad conocer la fauna parasitaria de estos distintos animales y que consecuencias tendrían el interactuar en un mismo ambiente unos con otros en el ciclo biológico del parásito. Todo esto con el fin de conocer las verdaderas causales de los distintos agentes presentes en los lobos marinos y además, el estatus sanitario en donde estos conviven con la sociedad y el medio ambiente, para así disminuir los riesgos de transmisión de posibles agentes de enfermedades zoonóticas considerando la importancia y constante actividad que posee el río y sus alrededores en la ciudad de Valdivia, donde es un pilar turístico y centro activo por parte de la comunidad lo que hace importante salvaguardar la salud pública en lugares como éstos.

## 6.1 CONCLUSIÓN

Se determinó la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en muestras de materia fecal de ejemplares de lobo marino común (*Otaria flavescens*) en la ciudad de Valdivia, mediante la técnica de Ziehl-Neelsen.

## 7. REFERENCIAS

- Acosta M, Tantalean M, Serrano-Martinez E. 2015. Identificación de parásitos gastrointestinales por coproscopía en carnívoro silvestres del Zoológico Parque de las Leyendas, Lima, Perú. *Rev Inv Vet Perú* 26, 282-290.
- Barriga O. 2002. Las enfermedades parasitarias de los animales domésticos en la América Latina. Editorial Germinal, Santiago, Chile, 167-192.
- Bartheld JL, Pavés H, Contreras F, Vera C, Manque C, Miranda D, Sepúlveda D, Artacho P, Ossman L. 2008. Cuantificación poblacional de lobos marinos en el litoral de la I a IV Región, Proyecto FIP N° 2006-50.
- Cabello FC. 2004. Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. *Rev Med Chile* 132, 1001-1006.
- Cacciò S, Thompson A, MacLauchlin J, Smith H. 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol* 21, 432-437.
- Cacciò S, Putignani L. 2014. Epidemiology of human cryptosporidiosis. In: Cacciò S, Widmer G (eds). *Cryptosporidium: parasite and disease*. Vienna, Austria. Springer, Pp: 43-79.
- Cade-Idepe Consultoría en Ingeniería. 2004. Diagnóstico y clasificación de los cursos y cuerpos de agua según objetivos de calidad “cuenca del río Valdivia”. Gobierno de Chile, Ministerio de obras públicas, Dirección General de Aguas.
- Capella J, Gibbons J. 2008. Diversidad de especies: mamíferos marinos. En: Saball P, Arroyo MTK, Castilla JC, Estades C, Larraín S, Moreno CA, Sierralta L, Rovira J, Guevara JM, Rivas F (eds). Biodiversidad de Chile, patrimonio y desafíos. Comisión Nacional del Medio Ambiente (CONAMA), Chile. Ocho Libros Editores, Santiago, Chile, Pp: 234-245.
- Fayer R, Dubey JP, Lindsay DS. 2004. Zoonotic protozoa: from Land to Sea; *Trends Parasitol* 20, 531-536.
- Fayer R. 2008. General biology. In: Fayer R, Xiao L (eds). In: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2nd edition. Boca Raton, FL, USA. CRC Press, Pp: 1-42.
- George-Nascimento M, Carvajal J. 1981. Helmintos parásitos de lobo marino *Otaria flavescens* en el Golfo de Arauco, Chile. *Parasitología* 36, 72-73.
- George-Nascimento M, Bustamante R, Oyarzun C. 1985. Feeding ecology of the South American Sea Lion *Otaria flavescens* SHAW, 1800: food contents and food selectivity. *Mar Ecol Prog Ser*, 21, 135-143.

- George-Nascimento M, Marin LS. 1992. Efecto de dos especies hospedadoras, el lobo fino austral *Arctocephalus australis* (Zimmerman) y el lobo marino común *Otaria byronia* (Blainville) (Carnivora; Otariidae), sobre morfología y la fecundidad de *Corynosoma* sp. (Acantocephala; Polymorphidae) en Uruguay. *Rev Chil His Nat* 65, 183-193.
- Gomes J, Alves L, Faustino M. 2007. Criptosporidiose: uma revisão sobre a sua implicação na conservação dos mamíferos aquáticos. *Biota Neotrop* 3, 92-96.
- Hermosilla C, Silva L, Navarro M, Taubert A. 2016. Anthroponotic endoparasites in free-ranging “urban” South American Sea Lions (*Otaria flavescens*). *J Vet Med*. 2016, 1-7.
- Holcman-Spector B, Botto C, Mañe-Garzón F. 1977. Estudio de la fauna parasitológica de *Arctocephalus australis* (Zimmermann, 1783) y *Otaria flavescens* (Shaw, 1800). Resúmenes del Séptimo Congreso Latinoamericano de Zoología (Tucumán, 15-21 de mayo de 1977), Pp: 28-29.
- Jara A. 2017. Caracterización de enterobacterias productoras de betalactamasas de amplio espectro en heces de lobo marino común (*Otaria flavescens* Shaw 1800) de una colonia urbana de la Región de los Ríos, Chile. *Memoria de Título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- López Fernández JR. 1967. Granuloma parasitario del estómago de *Otaria flavescens* (Shaw). *Revista Uruguaya de Patología Clínica* 5, 20-34.
- Molnar K. 2005. Protistan parasites and myxozoa. In: Rohde K (ed). *Marine parasitology*. CSIRO, Collingwood, Australia. Pp: 26-30.
- Morgades D, Katz H, Castro O, Capellino D, Casas L, Benítez G, Venzal J, Moraña A. 2006. Fauna parasitaria del lobo fino *Arctocephalus australis* y del león marino *Otaria flavescens* (Mammalia, Otariidae) en la costa Uruguaya. En: Menafra R, Rodríguez-Gallego L, Scarabino F, Conde D (eds). *Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya. Vida Silvestre Uruguay*, Montevideo, Uruguay, Pp: 89-96.
- Neira S, Arancibia H. 2004. Trophic interactions and community structure in the upwelling system off central Chile (33-39° S). *J Exp Mar Biol Ecol* 312, 349-366.
- Paine J. 2014. Determinación de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en lobo marino fino austral (*Archtophoca australis gracilis*) de Isla Guafo, Región de los Lagos, Chile. *Memoria de Título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Parte- Pérez MA, Bruzual E, Brito A. 2005. *Cryptosporidium* spp. y cryptosporidiosis. *Rev Soc Ven Microbiol* 25, 6-14.
- Pedraza S. 2011. Impacto de las actividades humanas en el estado sanitario de fócidos y otáridos en la Península Antártica. *Ecosistemas* 20, 87-93.
- Reeves P, Stewart B, Clapham P, Powell J. 2002. Pinnipeds: eared seals. In: Reeves P, Stewart B, Clapham P, Powell J (eds). *National Audubon Society Guide to marine mammals of the world*. Knopf, New York, USA Pp: 106- 109.

- Rodríguez D, Bastida R. 2004. Lobos marinos y focas. En: Boschi E, Cousseau MB (eds). La vida entre mareas: vegetales y animales de las costas de Mar del Plata, Argentina. Publicaciones Especiales INIDEP, Mar del Plata, Argentina, Pp: 309-322.
- Sepúlveda M. 1991. Fauna parasitaria en el lobo fino de Juan Fernandez (*Arctocephalus philippi*). *Memoria de título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Sepúlveda M, Oliva D, Urra A, Perez-Alvarez M, Moraga R, Schrader D, Inostroza P, Melo A, Díaz H, Sielfeld W. 2011. Distribución y abundancia del lobo marino común *Otaria flavescens* (Carnivora: Otariidae) en la costa de Chile central. *Rev Chil Hist Nat* 84, 97-106.
- Siefeld W, Guerra C, Duran R, Acuña E, Aguayo-Lobo A, Sepúlveda M, Palma F, Malinarich A, Cerda G, Bolvaran A, Grau R, Veloso X, Guerra Y, Vargas M, Amado N, Peredo R, Galaz J. 1997. Monitoreo de la pesquería y censo del lobo marino común en el litoral de la I a IV Regiones. Informe Técnico, Fondo de Investigación Pesquera. Proyecto F.I.P. N° 95-28, Pp: 119.
- Sturm N. 2011. Detección de los enteropatógenos *Cryptosporidium* spp. y *Salmonella enterica* en pinnípedos de Chile. *Memoria de título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Toledo S. 2010. Efectos del ciclo mareal en la abundancia y distribución del microzooplancton en el estuario del río Valdivia durante la primavera de 2009. *Memoria de Título*. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Weinberger C. 2013. El lobo marino común, *Otaria flavescens*, en Chile: distribución espacial, historia demográfica y estructura genética. *Tesis doctoral*, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

## 8. ANEXOS

**AbX c 1.** Resultados de técnica Ziehl-Neelsen a presencia o ausencia de *Cryptosporidium* spp. en muestras fecales de lobos marinos en una colonia en la ciudad de Valdivia.

Muestra	N° Identificación	Resultado Ziehl-Neelsen	
		Presente	Ausente
1	1	-	Ausente
2	2	Presente	-
3	3	-	Ausente
4	4	-	Ausente
5	5	-	Ausente
6	6	-	Ausente
7	7	Presente	-
8	8	-	Ausente
9	9	Presente	-
10	10	Presente	-
11	11	-	Ausente
12	12	-	Ausente
13	13	-	Ausente
14	14	-	Ausente
15	15	Presente	-
16	16	-	Ausente
17	17	-	Ausente
18	18	-	Ausente
19	19	-	Ausente
20	20	-	Ausente
21	21	-	Ausente
22	22	Presente	-
23	23	-	Ausente
24	24	-	Ausente
25	25	Presente	-
26	26	Presente	-



**AbYC&** Resultados de técnica Ziehl-Neelsen a presencia o ausencia de *Cryptosporidium* spp. en muestras fecales de lobos marinos en una colonia en la ciudad de Valdivia (Continuación).

Muestra	N° Identificación	Resultado Ziehl-Neelsen	
		Presente	Ausente
27	27	-	Ausente
28	28	-	Ausente
29	29	-	Ausente
30	30	-	Ausente

## 9. AGRADECIMIENTOS

Como diría mi querido tío Camilo, la familia es lo primero, no puedo dejar de agradecer a mi padres, Benjamín y Violeta, por todo lo que han hecho por mí, me vine lejos a cumplir un sueño no solo mío sino también suyo, se nos ha hecho difícil, nos tuvimos que acostumbrar a la distancia, pero es necesario estar lejos para extrañar y disfrutar más aún del reencuentro, los amo y me faltará vida para agradecerles todo lo que han hecho. A mis hermanos Macarena y Benjamín que me han apoyado a lo largo de mi vida, siendo un modelo a seguir siempre, no hay mejor momento que cuando nos encontramos, no pude pedir por mejores hermanos. A mi sobrina favorita Agustina, ver tus fotos y escuchar tu voz me dio energía para poder concretar esto y así estar más presente en tu vida, no me perderé nunca más un cumpleaños tuyo, lo juro.

A la doctora María José Navarrete que ha superado el límite de la paciencia y cualquier límite de normalidad que puede tener una profesora guía, dándome la oportunidad de poder salir adelante y seguir conmigo a pesar de todo el tiempo que me ha costado encontrarme, no sabe cuánto valoro todo lo que es usted como profesional y más aún como persona, gracias por todo el tiempo y palabras compartidas. También a Javier y la Dra. Muñoz junto a todos en el Laboratorio de Parasitología, por su ayuda y constante preocupación para que yo pudiera salir adelante.

Para Benjamín y Angelo, me han demostrado que independientemente la distancia, los problemas personales y el día a día de cada uno, los amigos son aquellos que siempre se van a reencontrar porque se mantienen en el corazón. Me han apoyado en todo y se han mantenido desde el inicio hasta el final, les agradezco con todo mi corazón pisciano por todas las risas, los abrazos, los llantos y por quedarse a mi lado durante todo este camino.

Para Gabriel por siempre confiar en mí, mucho más de lo que yo confié en mí mismo, gracias por ser el gran pilar que me ha sostenido durante todo este último proceso, no te toco fácil lo sé, pero gracias por ayudarme a cumplir mis sueños y por mostrarme y enseñarme mucho sobre las cosas buenas de la vida, eres una persona increíblemente talentosa que solo merece lo mejor.

A mis primos por ser parte fundamental de mi vida siempre, ustedes son mi hogar. En especial a Bárbara, Cesar, Jorge, Karina y Rocio que llegan a mí en el momento preciso con el consejo perfecto, su compañía lo es todo. Y obvio, como no todo son los Cornejo, a mi querida prima Paulina Ignacia, siempre te he visto como una hermana mayor con la que puedo contar y admirar.

Gracias Valdivia por mostrarme que este camino es el adecuado para mí y por abrirme las puertas de mi otro sueño, no sería nada de mí sin la Danza, gracias a mis profesores en esta área Diego y Sara por creer en mí y llevarme a crecer cada día más como bailarín.

Para los amigos que conocí en la carrera Camila D, Vanette, Cristian, Ricardo, Verónica, Camila O, Venus y tantos más con los que he cruzado camino y son parte de mi vida, a mis amigos de La Serena, de danza, a mis tíos, mis primos, mis profesores, para cada persona con la que he interactuado en estos largos años ... y también para ti Sebastián, cuando empezamos este viaje juntos nunca pensé que no lograrías terminarlo, muchas gracias por lo compartido en todos los años de amistad, no sé cómo lo haces, pero te la ingenias para estar presente cuando más te necesito, no hay día que pase que no te extrañe, estás donde estás, cuídate Chonchi.