

Ibero-Latinoamericana de Parasitología

CONTINUACIÓN DE PARASITOLOGÍA LATINOAMERICANA Y REVISTA IBÉRICA DE PARASITOLOGÍA

ARTÍCULOS ORIGINALES

- Diagnóstico molecular de la infección con *Trypanosoma cruzi* en ratones.
- Estructura secundaria y mapa de variabilidad de la subunidad pequeña del ARNr de *Entamoeba*. Posibles implicaciones para la taxonomía del género.
- Tegumental ultrastructure of *Echinostoma caproni* adults (Trematoda: Echinostomatidae).
- Parasitismo intestinal, anemia y estado nutricional en niños de la comunidad de Yantaló, San Martín, Perú.
- Rol de la Imagenología en el diagnóstico de las parasitosis.
- Modificación de la célula nodriza de *T. spiralis* en ratas long Evans inmunizadas con antígeno soluble total de *T. spiralis* y sacrificadas en diferentes tiempos.
- Frecuencia de esquistosomiasis y otras enfermedades parasitarias en Zuata, Edo Aragua, Venezuela 2008-2009.
- Prevalencia de *Ornithonyssus bursa* en aves passeriformes.

COMUNICACIONES

- Prevalencia de parásitos gastrointestinales en equinos Pura Sangre de Carrera durante el período de cuarentena 2012 en el hipódromo "La Rinconada" Caracas, Venezuela.
- Efecto de un inmunomodulador comercial en combinación con oxitetraciclina, imidocarb y diminazeno en el tratamiento de piroplasmosis en equinos Pura Sangre de Carrera.



ORGANO OFICIAL
DE LA FEDERACIÓN
LATINOAMERICANA
DE PARASITÓLOGOS



SOCIEDAD
ESPAÑOLA DE
PARASITOLOGÍA

Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología

Volumen 71 Nº 2 - 2012



Órgano oficial de la Federación Latinoamericana de Parasitólogos
y de la Sociedad Española de Parasitología

Producción:

EDITORIAL  iku

María Cristina Illanes H.
mcristina@editorialiku.cl

Prohibida su reproducción total o parcial sin autorización del editor.

REVISTA IBERO-LATINOAMERICANA DE PARASITOLOGIA

Editor

Héctor Alcaíno Contador (Chile)

Editor Alterno

Antonio Osuna Carrillo de Albornoz (Universidad de Granada - España)

Co-Editores (Receiving Editors)

A. Martínez Fernández (UCM - España)

F. Martínez Ubeira (USC - España)

M^a D. Bagues (UV - España)

F. Rojo Vazquez (ULE - España)

W. Apt (Universidad de Chile)

Secretaria de Edición

Dra. Susana Vilchez Tornero

(Universidad de Granada - España)

Comité Editorial

Alejandro G. Schijman (Argentina)

Ana Espino (Univ de Puerto Rico)

Anne F. Petavy (Lyon, Francia)

Benjamín Cimerman (Brasil)

César Náquira (Perú)

Claudio Genchi (Italia, Milán)

Christian Epe (Hannover, Alemania)

David Rollinson (Natural History Museum
London, UK)

Douglas Colwell (Lethbridge, Alberta. Canadá)

David Botero (Colombia)

Edoardo Pozio (Roma, Italia)

Els Meeusen (Monash University, Australia)

George Hillyer (Puerto Rico, USA)

Guillermo Denegri (Argentina)

Heinz Mehlhorn (Bochum, Alemania)

Hernán Reyes (Chile)

Jacques Cabaret (INRA, Tours, Francia)

Jack Frenkel (Nueva México, USA)

Jean Dupouy-Camet (Paris)

Jorge Guerrero (Filadelfia, USA)

Jorge Sapunar (Chile)

J.P. Dubey (Iowa. USA)

JM Correia da Costa (Portugal)

J. Guisantes del Barco (Univ. del País Vasco, España)

Luca Rossi (Turín, Italia)

Michel Tibayrenc (Montpellier, Francia)

Naftale Katz (Belo Horizonte, Brasil)

Osvaldo Ceruzzi (Uruguay)

Pascal Boireau (Francia)

Paul de Rycke (Gent, Bélgica)

Peter Schantz (Atlanta, USA)

Philippe Dorchies (Toulouse, Francia)

Ramón Carreño Passow (Ohio Wesleyan
University, USA)

Ramón Lazo (Ecuador)

Raúl Romero Cabello (México)

Rodrigo Zeledón (Costa Rica)

Thomas Schnieder (Director Institute for
Parasitology, Hannover, Alemania)

Yves Carlier (Bruselas, Bélgica)

Contenido**ARTÍCULOS ORIGINALES**

- Diagnóstico molecular de la infección con *Trypanosoma cruzi* en ratones.
Zúñiga P., Ponzano P., Romo G., Paláu M.T., Larenas J., García A. y Vergara, U. 117
- Estructura secundaria y mapa de variabilidad de la subunidad pequeña del ARNr de *Entamoeba*. Posibles implicaciones para la taxonomía del género.
Alfonso S., Martínez-Díaz R.A. y Ponce-Gordo F...... 125
- Tegumental ultrastructure of *Echinostoma caproni* adults (Trematoda: Echinostomatidae).
Sotillo J., Trudgett A., Cortés A. T., Trelis M., Fried B, Marcilla A., Esteban J. G and Toledo R. 138
- Parasitismo intestinal, anemia y estado nutricional en niños de la comunidad de Yantaló, San Martín, Perú.
Garaycochea O., Acosta-García G, Vigo-Ames N., Heringman K., Dyer A., Jerí S. y Siancas G. 143
- Rol de la Imagenología en el diagnóstico de las parasitosis.
Canals M. 152
- Modificación de la célula nodriza de *T. spiralis* en ratas long Evans inmunizadas con antígeno soluble total de *T. spiralis* y sacrificadas en diferentes tiempos.
Laredo S. V., Martínez M. P., Reveles R. G., Muñoz J. J. y Moreno M. A...... 160
- Frecuencia de esquistosomiasis y otras enfermedades parasitarias en Zuata, Edo Aragua, Venezuela 2008-2009.
González A., Montenegro I., Navarro M., De Noya B. y López M. 167
- Prevalencia del ácaro *Ornithonyssus bursa* Berlese, 1888 (Mesostigmata: Macronyssidae) en un ensamble de aves (Passeriformes) de bosques del centro de la Provincia de Santa Fe, Argentina.
Arrabal J. P., Manzoli D. E., Antoniazzi L. R., Lareschi M. y Beldomenico P. M. 172

COMUNICACIONES

- Prevalencia de parásitos gastrointestinales en equinos Pura Sangre de Carrera durante el periodo de cuarentena 2012 en el hipódromo “La Rinconada” Caracas, Venezuela.
Morales A A., Bello H y Villoria D...... 179
- Efecto de un inmunomodulador comercial en combinación con oxitetraciclina, imidocarb y diminazeno en el tratamiento de piroplasmosis en equinos Pura Sangre de Carrera.
Morales A., Villoria D., Romero N., Morales G., Kassar M., Arrieta D. y Requíz F...... 183
- Índice de Autores 2012 188
- Normas de publicación 190

Diagnóstico molecular de la infección con *Trypanosoma cruzi* en ratones

ZÚÑIGA C.¹, PONZANO P.¹, ROMO G.¹, PALÁU M.T.⁴, LARENAS J.³, GARCÍA A.⁵ y VERGARA U.^{1,2}

¹ Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Chile. Avenida Santa Rosa 11735. La Pintana, Santiago - Chile.

² Escuela de Postgrado, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Avenida Independencia 1027, Santiago- Chile.

³ Departamento de Patología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Avenida Santa Rosa 11735, La Pintana, Santiago - Chile.

⁴ Carrera de Nutrición, Universidad Autónoma de Chile, Santiago - Chile.

⁵ Escuela de Tecnología Médica, Universidad Pedro de Valdivia, La Serena - Chile.

ABSTRACT

MOLECULAR DIAGNOSIS OF *TRYPANOSOMA CRUZI* INFECTION IN MICE

Mice from CF1 and A.Sw strains were experimentally infected with 2000 Dm28c trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Although both mouse groups showed a similar prepatent period of three days after initial infection, the number of free parasites in bloodstream and the percentage of accumulated mortality were significantly different. Nine days after infection, the CF1 mice showed a maximum parasitemia level of only $8,7 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^3$ parasites/mL, while A.Sw mice reached a significant higher level of $24,7 \times 10^4 \pm 2,5 \times 10^3$ parasites/mL ($p < 0,0069$), at the seventeenth day of infection. After the peak of parasitemia, the number of parasites rapidly decreased and the bloodstream became negative in a seven days time period, in both groups of infected animals. The results of accumulated mortality, used as a criteria to establish susceptibility or resistance to *T. cruzi* infection, showed that CF1 mice are highly susceptible to the parasite, reaching 100% of accumulated mortality at 25 days after initial infection. On the contrary, A.Sw mice appear to be resistant to Chagas disease since they showed a significantly lower 20% of accumulated mortality ($p < 0,0023$) at twenty fifth day of infection and 70% survived longer than six months after initial infection. However, when we performed a conventional polymerase chain reaction using the *T. cruzi* specific minicircle primers 121 and 122, the 330-basepair parasite.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, mice strains, PCR

Recibido: 16 de Agosto de 2012. Aceptado: 30 de Octubre de 2012.

Correspondencia : C. Zúñiga.

Email: clzuniga@uchile.cl

U. Vergara

Email: uvergara@uchile.cl

RESUMEN

Ratones de las cepas CF1 y A.Sw fueron experimentalmente infectados con 2000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *Trypanosoma cruzi*. Aunque ambos grupos mostraron una prepatencia similar de tres días, el número de parásitos libres en el torrente sanguíneo y el porcentaje de mortalidad acumulada fueron significativamente diferentes. Nueve días después de la infección inicial los ratones CF1 mostraron un nivel máximo de parasitemia de sólo $8,7 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^3$ parásitos/mL, mientras los ratones A.Sw alcanzaron un nivel significativamente más alto de $24,7 \times 10^4 \pm 2,5 \times 10^3$ parásitos/mL ($p < 0,0069$), al décimo séptimo día de infección. Después del pico de parasitemia, el número de parásitos circulantes disminuyó rápidamente y la sangre se hizo negativa en un lapso de siete días, en ambos grupos. Los resultados de mortalidad acumulada, utilizados como criterio para establecer susceptibilidad o resistencia a la infección con *T. cruzi*, mostraron que los ratones CF1 son altamente susceptibles, alcanzando un 100% de mortalidad acumulada a los 25 días post infección. Por el contrario, los ratones A.Sw se comportaron como resistentes a la Enfermedad de Chagas, alcanzando una mortalidad significativamente más baja de sólo 20% ($p < 0,0023$), en el mismo periodo y, el 70% sobrevivió más allá de los seis meses post infección. Sin embargo, al utilizar los partidores específicos 121 y 122 de los minicírculos de *T. cruzi*, en el método convencional de reacción en cadena de la polimerasa, se detectó el fragmento parasitario de 330 pares de bases en corazón, intestino, músculo esquelético, cerebro, hígado y riñón, de todos los animales experimentalmente infectados, a pesar de la ausencia de parásitos en el torrente sanguíneo, al examen directo por microscopía óptica convencional.

Palabra clave: *Trypanosoma cruzi*, cepas de raton, PCR.

INTRODUCCIÓN

El parásito *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la Enfermedad de Chagas y debido a su amplia distribución y alta prevalencia en el hombre y diversos animales (Guhl, 2007; Rodríguez y Albajar, 2010; Costa y Lorenzo, 2009), constituye un importante problema de salud pública en Centro y Sudamérica (Dias *et al.*, 2002) causando anualmente la muerte de casi 15.000 personas (Rodríguez y Albajar, 2010). En humanos la enfermedad es una condición inflamatoria crónica, que afecta principalmente corazón y tracto gastrointestinal (WHO, 2002) y su patogénesis es todavía controversial, aún cuando ha sido atribuida a la persistencia del parásito (Tarleton *et al.*, 1999, Tarleton, 2001), autoinmunidad (Kierszenbaum, 1999, 2005), cambios en la microvasculatura tisular (Rossi, 1990) y trastornos neurogénicos (Dávila, *et al.*, 1998). A pesar de los enormes esfuerzos realizados en la investigación de la enfermedad, su patogénesis es todavía poco clara debido a que no existe evidencia definitiva si alguno de estos factores es por si solo necesario y suficiente para causar la enfermedad. Aún cuando la persistencia del parásito parece la hipó-

tesis más ampliamente aceptada, se desconocen los mecanismos mediante los cuales la presencia del parásito en los tejidos afecta la respuesta inmune del hospedero y promueve el desarrollo de una inflamación crónica. Sin embargo, se ha sugerido que el parásito proporciona un estímulo continuo de antígenos, que presentan reactividad cruzada con antígenos propios del hospedero e inducen una respuesta autoinmune, afectan la tolerancia local y promueven la inflamación crónica del tejido infectado.

El modelo de infección experimental en ratones ha sido uno de los modelos más ampliamente utilizados en el estudio de la infección con *T. cruzi*, debido al fácil manejo de estos animales y a que ellos imitan muchos aspectos de la enfermedad humana, incluyendo los mecanismos de daño tisular ((Díaz *et al.*, 2004; Valenzuela *et al.*, 2010; Andrade y Magalhaes, 1996; Andrade *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2002) y los mecanismos de respuesta inmune celular y humoral, involucrados en el control del parásito (Zúñiga *et al.*, 2002; Andersson *et al.*, 2003). Por otra parte, distintas cepas puras de ratones difieren en la susceptibilidad o resistencia a la infección con *T. cruzi*, existiendo

al parecer un complejo control genético de los niveles de parasitemia y de la supervivencia de los animales infectados (Zúñiga *et al.*, 1998; Zúñiga *et al.*, 2007).

Después de ingresar en el hospedero vertebrado, el parásito puede infectar distintas poblaciones celulares, incluyendo macrófagos, células de músculo liso y músculo estriado, fibroblastos y virtualmente todas las células nucleadas del hospedero (Andrade *et al.*, 2010). Aún cuando se desconoce por qué pacientes infectados con *T. cruzi* pueden desarrollar distintas formas clínicas de la enfermedad, una compleja interacción de factores como aislado o cepa del parásito, tropismo tisular del mismo, número o carga infectante del parásito, tiempo de evolución de la infección y el repertorio genético y naturaleza de la respuesta inmune del hospedero, parecen jugar un rol importante en la patogénesis de la enfermedad. (Dutra y Gollob, 2008, Dutra *et al.*, 2009).

En este contexto, el uso de métodos de diagnóstico que permitan demostrar la presencia del parásito, es una condición necesaria en el estudio de los mecanismos involucrados en la patogénesis de la enfermedad. Así, en el presente trabajo se analizó la evolución de la infección experimental con el clon Dm28c de *T. cruzi* en dos cepas de ratones A.Sw y CF1, a través de la evaluación del período de prepatencia, niveles de parasitemia y mortalidad y su correlación con la presencia del parásito en distintos tejidos (corazón, riñón, cerebro, hígado, músculo esquelético e intestino grueso), detectada mediante la técnica convencional de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos. La infección experimental se realizó utilizando tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi* (Contreras *et al.*, 1988). Esta cepa de parásito es mantenida *in vivo* en el bioterio de la Unidad de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, mediante el traspaso semanal de tripomastigotes en ratones Balb/c.

Ratones Se utilizaron dos grupos de 10 ratones hembras de 10 semanas de edad, de las cepas A.Sw y CF1, respectivamente. La cepa A.Sw proviene originalmente de Jackson Laboratory, Bar Arbor,

Maine, U.S.A., mientras que las cepas CF1 (11) y Balb/c fueron adquiridas en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Modelo de infección experimental. Para la obtención de parásitos, se extrajo 0,6 mL de sangre mediante punción cardíaca de un ratón Balb/c infectado con el clon Dm28c de *T. cruzi*, y sacrificado cumpliendo con las normas bioéticas establecidas en el Manual de Normas de Biseguridad de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT), Chile. La sangre así extraída se colocó en un tubo estéril conteniendo 0,1 mL de citrato de sodio, como anticoagulante. Luego se realizó una dilución de 10 uL de sangre infectada en 490 uL de suero fisiológico estéril y se hizo un recuento de parásitos en cámara de Neubauer. Este procedimiento permitió determinar la cantidad total de parásitos en los 0,6 mL de sangre, extraídos del ratón experimentalmente infectado. Posteriormente se realizaron las diluciones requeridas para obtener 2.000 parásitos en 0,2 mL que fue, finalmente, la cantidad y volumen inoculado por vía intraperitoneal, en cada uno de los ratones de los grupos experimentalmente infectados con *T. cruzi*. Se utilizó, además, como control negativo un grupo de 5 ratones hembras de la cepa A.Sw de 10 semanas de edad y otro grupo de hembras de 10 semanas de edad de la cepa CF1, los que fueron inoculados con 0,2 mL de sangre de ratones Balb/c no infectados y diluida similar a los grupos infectados. Estos ratones se sangraron en forma paralela a los grupos experimentalmente infectados, para establecer que las alteraciones y eventual muerte de los animales experimentales se debe a la infección con *T. cruzi* y no a variables como una eventual anemia provocada por las sucesivas sangrías.

Estudio de Parasitemia. Los ratones experimentalmente infectados se sangraron, desde la vena caudal, cada dos días a partir del tercer día postinfección (p.i) y, la prepatencia y los niveles de parasitemia, se analizaron hasta la muerte de los ratones o la negatividad en los niveles de parásitos en circulación. La sangre se recolectó en tubos de micro hematocrito heparinizados y las muestras se centrifugaron a 700 g por 5 minutos, para luego de reposar por 30 minutos en estufa a 37° C, medir el volumen de sangre en cada tubo. Finalmente, cada una de las muestras se colocó en un portaobjeto para determinar el número de parásitos en 50 campos elegidos al azar y utilizando un aumento de

400x. Los resultados se expresaron como el promedio de parasitemia del grupo y la desviación estándar correspondiente, de acuerdo al método descrito por Arias y Ferro (1988).

Extracción de DNA y Técnica de PCR convencional. Distintos métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por Polymerase Chain Reaction) han sido utilizados, para la amplificación del DNA del kinetoplasto o del DNA nuclear, en el diagnóstico de infección con *T. cruzi*. El kinetoplasto contiene cerca del 20% del ácido desoxirribonucleico (DNA) total del parásito e incluye al menos 50 copias idénticas maxicírculos de DNA de 1,6 kpb y entre 10.000 y 30.000 minicírculos de 1,4 kpb. (Botero, *et al.*, 2008; Ferrer, *et al.*, 2009).

Para realizar PCR convencional, a partir de distintos tejidos, ratones de la cepa A.Sw se sacrificaron los días 14, 25 y 100 p.i., mientras los ratones CF1 se sacrificaron sólo los días 14 y 25 p.i., puesto que no sobrevivieron a la infección experimental con *T. cruzi*. Se extrajeron muestras de hígado, cerebro, corazón, riñón, intestino grueso y músculo esquelético de la cara posterior del fémur (músculo isquiotibial y bíceps femoral), de cada uno de los ratones sacrificados para realizar el diagnóstico molecular del parásito. Como control positivo, se utilizaron muestras de tejido cardíaco de dos ratones Balb/c histopatológicamente positivos a la infección (presencia de pseudoquistes), (Figura 1) y como control negativo, se utilizó tejido cardíaco de dos ratones A.Sw y de dos ratones CF1 de los grupos control no infectados.

Para la obtención de DNA de *T. cruzi*, 25 mg de tejido se colocaron en microtubos eppendorf de 1,5 mL y se lavaron con fosfato buffer salino (PBS), pH 7,2. Al día siguiente, se agregó a cada tubo 200 mL de buffer de lisis conteniendo 6M guanidina HCl/200mM EDTA, mezclando mediante agitación, en vortex por 15 segundos, para luego calentar las muestras a 70°C por 10 minutos, centrifugar a 6.000 x g en una microcentrífuga CAPSULE TOMY HF-120 y, finalmente, agregar 200 mL de etanol absoluto 100%. El proceso de extracción se realizó de acuerdo al protocolo del Kit QIAamp®, proporcionado por el fabricante (Lab. QIAGEN, Miami-USA) y una vez extraído el DNA, la detección del parásito en las distintas muestras de tejido, se realizó mediante la técnica convencional de reacción en cadena de la polimerasa, amplificando un fragmento específico de 330 pares de bases (330

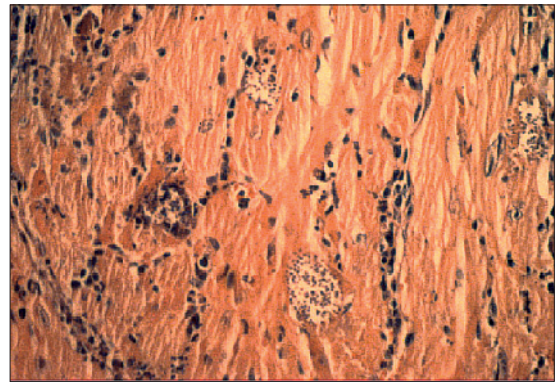


Figura 1. Tejido cardíaco de ratón Balb/c, dos semanas post infección con 2.000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi*. El tejido fue fijado en Bouin-formalina e incluido en parafina. Corte de 5 µm teñido con hematoxilina-eosina, en el que se observan tres pseudoquistes. Aumento 400X.

pb), correspondiente a las 4 regiones variables de los minicírculos de DNA del kinetoplasto de *T. cruzi*. Para ello, se agregó 20 µL de muestra a tubos de PCR conteniendo 80 µL de Master Mix, constituido por 10x buffer; 10 mM de una mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados: dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 50 mM de cloruro de magnesio 10 mM; MgCl₂ 50 mM; *Taq* DNA Polimerasa (2,5 unidades/µL); 0,5 µM de oligonucleótidos del primer 121 (5'-AAA TAA TGT ACG GGG GAG ATG CAT GA-3') y del primer 122 (5'-GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA-3') y agua bidestilada. La amplificación se realizó en un Termociclador Minicicler (Lab. M.J. Research, USA), programado con 1 ciclo inicial de denaturación a 94° C por 5 minutos, 40 ciclos de amplificación (cada uno de los cuales incluye denaturación a 94° C por 20 segundos, alineamiento de los primers a 57° C por 10 segundos y extensión de los mismos a 72° C por 10 segundos) y un ciclo final de extensión a 72° C por 7 minutos.

Para detectar la presencia de DNA del parásito, 15 µL de los amplificados del fragmento de 320 pb se mezclaron con tampón de PCR (glicerol 30%, azul de bromofenol 0,25%, xileno-cianol 0,25% y H₂O bidestilada cantidad suficiente para 100 mL) y se separaron por electroforésis en un gel de agarosa al 2% embebido en buffer TBE (Tris/borato/EDTA pH 8,3) y 10 µL de Bromuro de etidio. La electroforésis se realizó a 110 Volts por una hora en una cámara Modelo M&U-402T. Como marcador

de peso molecular se utilizó 1 Kb de DNA Leader. Finalmente, para visualizar el fragmento de 330 pb de la región hipervariable del kinetoplasto de *T. cruzi*, se utilizó un transiluminador TFP-10M (Vilbes Lourmat).

Análisis estadístico. Los resultados de los niveles máximos de parasitemia, se analizaron mediante una prueba de t. El análisis de supervivencia se realizó de acuerdo al método de Kaplan y Meier (1958).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio del número de parásitos en circulación sanguínea, como expresión del desarrollo de la infección en ratones CF1 y ratones A.Sw, inoculados con 2.000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi* (Figura 2), mostró que, aún cuando ambos grupos presentaron una prepatencia similar de tres días, los ratones CF1 (grupo A), presentaron un menor nivel de parásitos en circulación, alcanzando una parasitemia máxima de sólo $8,7 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^3$ parásitos/mL al día 9 post infección, la que resultó significativamente más baja ($p < 0,0069$), que el nivel máximo de $24,7 \times 10^4 \pm 2,5 \times 10^3$ parásitos/mL, alcanzado por los ratones A.Sw (grupo B) al día 17 post infección. La figura muestra, además que, mientras la parasitemia de los ratones CF1 fue detectable sólo hasta el día 13 post infección, en el grupo de ratones A.Sw, la presencia

de parásitos sanguíneos pudo detectarse hasta el día 23 post infección.

Como los dos grupos de ratones fueron experimentalmente infectados con 2.000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c, se utilizó la mortalidad o supervivencia, como criterio para establecer la susceptibilidad o resistencia de cada grupo, a la infección con *T. cruzi*. La Figura 2 muestra que los ratones CF1 presentaron un 100% de mortalidad acumulada a los 25 días post infección, mientras los ratones A.Sw, no sólo presentaron una mortalidad significativamente más baja, del 20% en el mismo período ($p < 0,0023$), sino que el 70% de ellos sobrevivió más allá de los 6 meses post infección (aún cuando en las primeras tres semanas mostraron decaimiento y el pelo erizado como expresión de un síndrome de enfermedad). No se observó mortalidad en los grupos control, de ratones CF1 y A.Sw, inoculados con sangre normal de ratones Balb/c sanos, no infectados.

Estos resultados de mortalidad acumulada indican claramente que los ratones CF1, a pesar del bajo nivel de parásitos en circulación sanguínea, son altamente sensibles a la infección con el clon Dm28c de *T. cruzi*. Los ratones A.Sw, en cambio, se comportan como resistentes y, no desarrollan enfermedad, a pesar de la paradoja de presentar altos niveles de parasitemia, como ha ocurrido con otros resultados de infección experimental en el modelo murino (Minoprio *et al.*, 1989, Zúñiga *et al.*, 1998, Zúñiga *et al.*, 2002) y sugiriendo

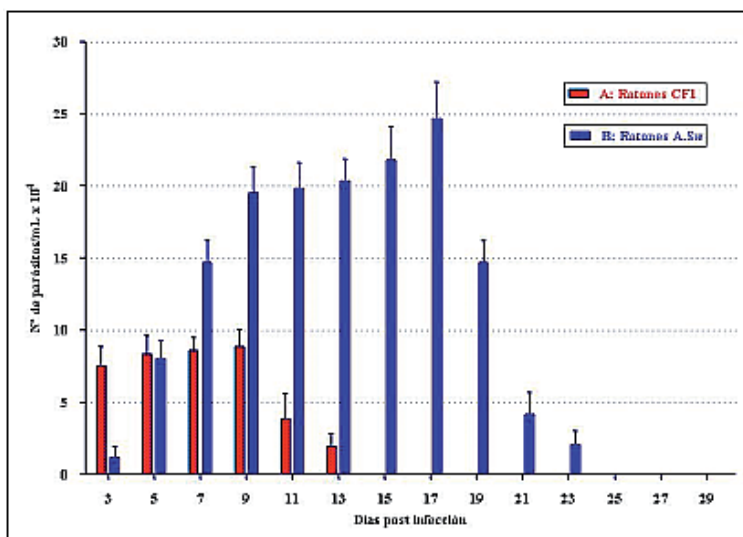


Figura 2. Evolución de los niveles de parasitemia en ratones CF1 (A) y A.Sw (B), experimentalmente infectados con 2.000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi*. El nivel máximo de parasitemia ($24,7 \times 10^4 \pm 2,5 \times 10^3$ parásitos/mL), alcanzado por los ratones A.Sw al día 17 post infección, es significativamente más alto ($p < 0,0069$), que el nivel máximo ($8,7 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^3$ parásitos/mL), alcanzado por los ratones CF1, al día 9 post infección.

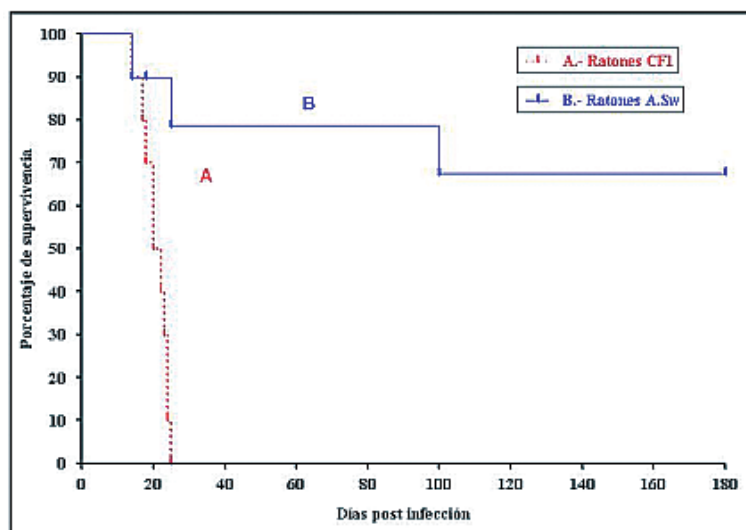


Figura 3. Porcentaje de mortalidad acumulada en ratones CF1 (A) y ratones A.Sw (B), infectados con 2.000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi*. La diferencia en las curvas de supervivencia de estas dos cepas de ratones es altamente significativa ($p < 0,0023$). Los ratones CF1 alcanzaron 100% de mortalidad a los 25 días post infección, mientras el 70% de los ratones A.Sw, sobrevivió más allá de los seis meses post infección.

que no existe una relación directa entre niveles de parasitemia y susceptibilidad o resistencia a la infección con *T. cruzi*. Por el contrario, el uso de diferentes cepas de ratones y de distintos aislados del parásito, han permitido establecer que la evolución de la enfermedad parece depender tanto de la virulencia del parásito, como del repertorio genético del hospedero (Trischmann y Bloom, 1982; Wrightsman, *et al.*, 1982; Brice y Zeledon, 1970). Así, aún cuando el parásito está presente en el tejido cardíaco de ratones C3H infectados con el clon Miranda M/78, las lesiones titulares son mínimas comparadas con aquellas observadas en ratones C3H infectados con el clon Sylvio X10/4 (Postan *et al.*, 1987). Ahora bien, puesto que la necesaria persistencia de *T. cruzi* parece la hipótesis más ampliamente aceptada, para explicar la evolución de la Enfermedad de Chagas, el uso de métodos de diagnóstico que permitan demostrar la presencia del parásito, es una condición necesaria en el estudio de los mecanismos involucrados en la patogénesis de la enfermedad. La detección del DNA de *T. cruzi*, mediante técnicas de biología molecular, ha sido utilizada para establecer una relación entre la presencia del parásito, la severidad de las lesiones tisulares y la evolución de la enfermedad en pacientes humanos (Marcon *et al.*, 2011).

Así, en el presente trabajo hemos utilizado los partidores específicos 121 y 122 de los minicírculos del DNA kinetoplastídico de *T. cruzi*, en el método convencional de reacción en cadena de la polí-

merasa, para amplificar el fragmento parasitario de 330 pares de bases del kinetoplasto (kDNA). Los resultados mostraron la presencia del parásito en corazón, intestino, músculo esquelético, cerebro,

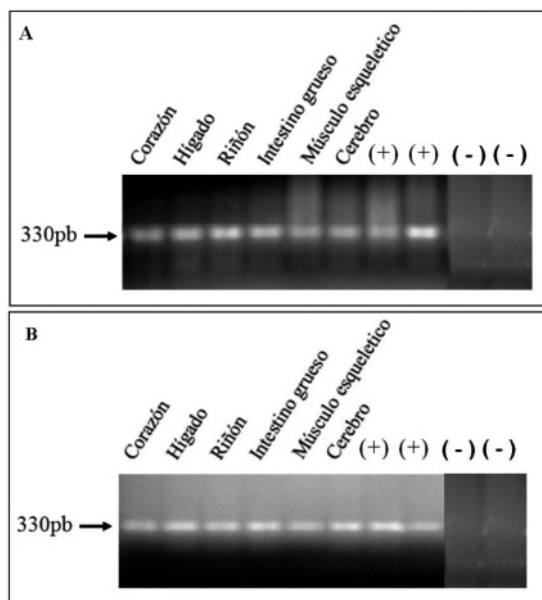


Figura 4. PCR de distintos tejidos de un ratón CF1 (A) y de un ratón A.Sw (B), a los 14 días post infección. Se muestra la presencia del fragmento de 330 pares de bases de kDNA de *T. cruzi*. Como control positivo, se utilizaron muestras de tejido cardíaco de dos ratones Balb/c histológicamente positivos a la infección (presencia de pseudoquistes), (Figura 1) y como control negativo, se utilizó tejido cardíaco de un ratón A.Sw y de un ratón CF1 de los grupos control no infectados.

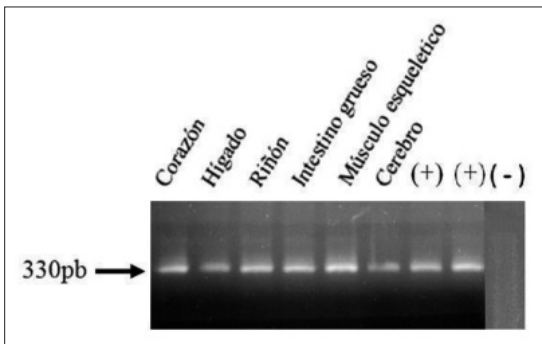


Figura 5. PCR de distintos tejidos de uno de los ratones A.Sw a los 100 días post infección. Se muestra la presencia del fragmento de 330 pares de bases de kDNA de *T. cruzi*. Como control positivo, se utilizaron muestras de tejido cardíaco de dos ratones Balb/c histopatológicamente positivos a la infección (presencia de pseudoquistes), (Figura 1) y como control negativo, se utilizó tejido cardíaco de un ratón A.Sw del grupo control no infectado.

hígado y riñón, de todos los ratones CF1 y A.Sw experimentalmente infectados, a pesar de la ausencia de parásitos en el torrente sanguíneo, al examen directo por microscopía óptica convencional. La Figura 4 muestra los resultados obtenidos en uno de los ratones CF1 (A) y uno de los ratones A.Sw (B), a los 14 días post infección y la Figura 5 muestra los resultados de uno de los ratones A.Sw, a 100 días de la infección inicial con el clon Dm28c de *T. cruzi*. No se muestran los resultados del día 25 post infección, que fueron similares a los del día 14.

Ahora bien, aún cuando el examen directo de las muestras de sangre permitió detectar la presencia de parásitos circulantes sólo hasta los 13 días post infección en los ratones susceptibles CF1 y no más allá de los 21 días en los ratones A.Sw, la técnica de PCR ha permitido demostrar su persistencia en el 100% de las muestras de tejidos tanto de los ratones CF1 (14 y 25 días post infección inicial), como de los ratones A.Sw. (en los días 14, 25 y 100 post infección). A pesar de los bajos niveles de parasitemia observados en los ratones CF1, parece claro que la persistencia de *T. cruzi* en sus tejidos, en particular en el tejido cardíaco, y su predisposición genética, conducen inevitablemente al desarrollo de una severa y progresiva enfermedad, probablemente inflamatoria, que termina rápidamente con la muerte de los individuos. Los ratones A.Sw en cambio, a pesar del elevado número de parásitos en su torrente sanguíneo y a la persistencia de *T. cruzi*

en sus tejidos logran controlar la infección y sobrevivir a la misma, como consecuencia de la ventaja evolutiva que le confiere su repertorio genético, evitando la inducción de un cuadro secundario e inespecífico de hipersensibilidad, desencadenado por la infección inicial con *T. cruzi* y el eventual desarrollo de autoinmunidad como consecuencia del daño tisular. En otras palabras, los bajos niveles de parasitemia observados en los ratones CF1, puede explicarse por el temprano desarrollo de una respuesta inmune que logra controlar la infección, pero que secundariamente conduce al desarrollo de hipersensibilidad y luego a un cuadro de autoinmunidad como consecuencia del daño tisular y la liberación de antígenos propios del hospedero.

Finalmente, es importante señalar que la demostración, mediante la técnica de PCR, de la presencia del parásito en los tejidos de los ratones A.Sw, no es necesariamente indicación de viabilidad de los mismos, pero si estos parásitos fueran viables, no puede descartarse la posibilidad de que se trate de formas quiescentes, en equilibrio con la respuesta inmune del hospedero.

REFERENCIAS

- ANDERSSON J, ENGLUND P, SUNNEMARK D, DAHLSTEDT A, WESTERBLAD H, NENNESMO I, OORN A, LUNDBERG IE. 2003. CBA/J mice infected with *Trypanosoma cruzi*: an experimental model for inflammatory myopathies. *Muscle Nerve* 27: 442-448.
- ANDRADE LO, GALVAO LMC, MEIREL LES, M CHIARI E, PENA S, MACEDO A. 2010. Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: An *in vitro* study. *Mem Inst. Oswaldo Cruz* 105: 834-837.
- ANDRADE LO, MACHADO CR, CHIARI E, PENA SD, MACEDO AM. 1999. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol. Biochem Parasitol* 100: 163-172.
- ANDRADE LO, MACHADO CR, CHIARI E, PENA SD, MACEDO AM. 2002. *Trypanosoma cruzi*: role of the host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp. Parasitol* 100: 269-275.
- ANDRADE SG, MAGALHAES JB. 1996. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 27-35.
- ARIAS A, FERRO E. 1988. Quantification of *Trypanosoma cruzi* parasitemia by direct micromethod. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 82: 248.
- BICE DE, ZELEDON R. 1970. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909). *J. Parasitol.* 56: 663-670.
- BOTERO D, RESTREPO P. 2008. Parasitosis Huma-

- nas. Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Medellín, Colombia, pp 19-206.
9. CONTRERAS V, ARAUJO-JORGE T, BONALDO M, THOMAZ N, BARBOSA H, MEIRELLES M, GOLDENBERG S. 1988. Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 83: 123-133.
10. COSTA J, LORENZO M. 2009. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104 (SUPPL 1): 46-51.
11. DAVILA DF, INGLESSIS G, DAVILA CAM. 1998. Chagas-heart disease and the autonomic nervous system. Int. J. Cardiol. 66: 123-127.
12. DÍAS JCP, SILVEIRA A, SCHOFIELD CJ. 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America- A review. Mem Inst Oswaldo Cruz 97: 603-612.
13. DÍAZ E, ESCALANTE H, JARA C. 2004. Niveles de parasitemia y alteraciones histopatológicas en *Mus musculus* BALB/c infectado con *Trypanosoma cruzi* obtenido de *Panstrongylus chinai* del Valle Chamán, La Libertad - Perú. Parasitol Latinoam. 59: 153-158.
14. DUTRA WO, GOLLOB KJ. 2008. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. Curr. Opin. Infect. Diss. 27: 287-292.
15. DUTRA WO, SILVA CA, AMARAL FN, da COSTA GG, da SILVEIRA AB, d'AVILA REIS D, GOLLOB KJ. 2009. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. Mem. Oswaldo Cruz 104 (Suppl.1): 208-218.
16. FERRER E, DA CONCEICAO F, CAMPIOLI P, LARES M, LÓPEZ M, RIVERA M, VIETTRI M, MEDINA M, SALCEDO M, MOROCOIMA A, HERRERA L. 2009. Validación de protocolos de PCR para el diagnóstico molecular de la Enfermedad de Chagas. Salus online Sup. 1 Biología molecular 12: 163-174.
17. GUHL F. 2007. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica y Colombia En: Enfermedad de Chagas. Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. 1ª ed. Bogotá, Colombia, pp 7-14.
18. KIERSZENBAUM F. 1999. Chagas disease and the autoimmunity hypothesis. Clin. Microbiol Rev 12: 210-223.
19. KIERSZENBAUM F. 2005. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease?. Trends Parasitol. 21: 513-516.
20. MARCON CEB, DE ALBUQUERQUE DM, BATISTA AM, ANDRADE PD, ALMEIDA EA, GUARIENTO ME, TEIXEIRA MABN, COSTA SCB. 2011. *Trypanosoma cruzi*: parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patient. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 106: 85-91.
21. MINOPRIO P, ITOHARA S, HEUSSER C, TONEGAWA S, COUTINHO A. 1989. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: The predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI cells. Immunol Rev 112: 183-207.
22. POSTAN M, BAILEY JJ, DVORAK JA, MCDANIEL JP, POTTALA EW. 1987. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. III. Histological and Electrophysiological Responses to Chronic Infection, Am. J. Trop. Med. Hyg. 37: 541-549.
23. RODRÍGUEZ J, ALBAJAR P. 2010. Chagas disease a new worldwide challenge. Nature 465: S6-S7.
24. ROSSI MA. 1990. Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chagas disease. Am. Heart J. 120: 233-236.
25. TARLETON RI. 2001. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. Int. J. Parasitol. 31: 550-554.
26. TARLETON RI, et al. 1989. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence?. Parasitol Today 15: 94-99.
27. TRISCHMANN TM, BLOOM BR. 1982. Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 35: 546-551.
28. VALENZUELA L, BARRIA C, SEPÚLVEDA S, GALANTI N, CABRERA G. 2010. Enfermedad de Chagas crónica: estrés oxidativo y miocarditis chagásica asociada a la persistencia parasitaria. Av Cs Vet 1: 35-44.
29. WHO, Expert Comité. 2002. Control of Chagas disease. WHO Tech Rep. Ser. 905: 1-109.
30. WRIGHTSMAN R, KRASSNER S, WATSON J. 1982. Genetic control of response to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. Infect Immun. 36: 637-644.
31. ZÚÑIGA C, PARRA A, VELA H, COURCELLES T, VARGAS R, VERGARA U. 1998. Estudio histopatológico en ratones infectados experimentalmente con *Trypanosoma cruzi*. Parasitol al Día. 22: 23-28.
32. ZÚÑIGA C, VARGAS R, VERGARA U. 2002. Evolución de la infección con *Trypanosoma cruzi* en cepas susceptibles y resistentes de ratones. Arch Med Vet. 2: 183-188.
33. ZÚÑIGA C, CEPEDA R, PALAU MT, VERA A, MEJIA J, VERGARA U. 2007. Efecto protector de una cepa no virulenta contra la infección con una cepa virulenta de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino. Arch. Med. Vet. 1: 77 - 82.

Estructura secundaria y mapa de variabilidad de la subunidad pequeña del ARNr de *Entamoeba*. Posibles implicaciones para la taxonomía del género

ALFONSO S.¹, MARTÍNEZ-DÍAZ R.A.² y PONCE-GORDO, F.¹

¹ Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040 Madrid.

² Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma, 28029 Madrid.

ABSTRACT

SECONDARY STRUCTURE AND VARIABILITY MAP OF THE *ENTAMOEBEA* rRNA SMALL SUBUNIT. POSSIBLE TAXONOMIC IMPLICATION FOR THE GENUS

The molecular taxonomy of the genus *Entamoeba* based on sequence comparisons of the small subunit rRNA (16S-rRNA) is confused as there are different criteria regarding the number and importance of the sequence differences for species or subspecies identification. In the present work we analyze the importance of the sequence differences and we identify the regions that could be potentially useful for taxonomic studies. We propose a secondary structure model of the *Entamoeba* 16S-rRNA obtained by homology modeling after analysis of 25 complete sequences belonging to 19 species. From this model we have determined the variability map of this gene this allowing the identification of the helices accumulating most of the substitutions. These helices are located far from the mRNA and tRNA interaction sites in the tertiary structure. The sequence-structure analyses of the variable helices have shown the existence of numerous compensatory base changes (CBCs) between the different species. The accessory helix 45/e1 seems to be a good candidate for taxonomic studies. The relations between the *Entamoeba* species obtained after CBC comparisons between the analyzed sequences are basically the same that those published in phylogenetic studies where several evolution models have been used.

Key words: *Entamoeba*, 16S-rRNA, Secondary structure, Taxonomy.

RESUMEN

La taxonomía molecular del género *Entamoeba* basada en la secuenciación y comparación de la subunidad pequeña del ARNr (ARNr-16S) es confusa, ya que no existe un criterio uniforme respecto a qué o

Recibido: 31 de Octubre de 2012. Aprobado: 26 de Noviembre de 2012.

Correspondencia: Francisco Ponce Gordo

Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid.

E-mail: pponce@farm.ucm.es

cuántas diferencias entre secuencias permiten diferenciar especies o variantes subspecíficas. En este trabajo analizamos la importancia de las diferencias entre secuencias e identificamos las regiones potencialmente útiles para estudios taxonómicos. Proponemos un modelo de la estructura secundaria del ARNr-16S de *Entamoeba* obtenido mediante modelado homólogo de 25 secuencias completas pertenecientes a 19 especies. A partir de este modelo hemos determinado el mapa de variabilidad del gen, identificando las hélices en donde se acumulan las sustituciones entre secuencias. Dichas hélices se encuentran, en la estructura terciaria, en regiones alejadas de la zona de interacción con el ARNm y los ARNt. El análisis de la secuencia-estructura de las hélices variables muestra la existencia de numerosos cambios de base compensatorios (CBCs) entre las distintas especies; de ellas, la hélice accesoria 45/e1 parece una buena candidata para su uso en estudios taxonómicos. Las relaciones entre las distintas especies, obtenidas por comparación de los CBCs entre las secuencias analizadas, son básicamente las mismas que las publicadas en estudios filogenéticos con diversos modelos de evolución.

Palabras clave: *Entamoeba*, ARNr-16S, Estructura secundaria, Taxonomía.

INTRODUCCIÓN

El género *Entamoeba* incluye amebas parásitas de todos los grupos de vertebrados, siendo la mayoría de las especies de localización intestinal. La identificación de las distintas especies se ha realizado principalmente con criterios morfológicos o de especie de hospedador, lo que ha dado lugar a la propuesta de cerca de 80 especies, siendo posiblemente sinónimos muchas de ellas (Ponce-Gordo y Martínez-Díaz 2010). Levine (1961) propuso el agrupamiento de las distintas especies según las características (básicamente, el número de núcleos) de los quistes maduros, estableciéndose cuatro grupos: especies con quistes maduros uninucleados (grupo *bovis*), tetranucleados (grupo *histolytica*) u octonucleados (grupo *coli*), o especies no formadoras de quistes (grupo *gingivalis*). Si bien se consideró que los resultados obtenidos de análisis genéticos apoyaban este agrupamiento morfológico y que los distintos grupos eran monofiléticos (Clark y Diamond 1997; Silberman *et al.*, 1999), estudios posteriores han mostrado que ambas propuestas son incorrectas (Clark *et al.*, 2006; Ponce-Gordo *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2009; Stensvold *et al.*, 2010).

La falta de caracteres morfológicos que puedan ser empleados con fines taxonómicos en *Entamoeba* puede dar lugar a la existencia de especies crípticas si no se emplean otros criterios diferenciales, pero también a la aparición de sinonimias si los criterios utilizados son cuestionables (Ponce-Gordo y Martínez-Díaz 2010). Con el desarrollo de las téc-

nicas de Biología Molecular, la secuencia que codifica para el gen de la subunidad pequeña del ARNr (ARNr-16S/18S) se emplea habitualmente para estudios taxonómicos y filogenéticos. En el caso de *Entamoeba*, este marcador (ARNr-16S), junto con la especie de hospedador, ha servido para diferenciar algunas especies (Ponce-Gordo *et al.*, 2004; Tachibana *et al.*, 2007). Sin embargo, otros autores prefieren hablar de variantes genéticas dentro del género *Entamoeba* si las diferencias entre secuencias son pequeñas aunque las especies de hospedador sean diferentes y a veces no compartidas (Clark *et al.*, 2006; Stensvold *et al.*, 2010). En otros casos, secuencias de ARNr-16S claramente diferentes son consideradas como pertenecientes a una misma especie (es el caso de, p.e., dos aislados de humanos con quistes octonucleados identificados como *E. coli* y con una similitud del 87% en sus secuencias; Clark y Diamond 1997) mientras que en otras ocasiones se consideran como especies distintas (*E. suis* de cerdos vietnamitas, con una similitud del 81% con *E. polecki* de cerdos; Clark *et al.*, 2006). Dado que la morfología y la especie de hospedador no se pueden considerar como criterios diferenciales válidos en todos los casos (Ponce-Gordo y Martínez-Díaz 2010), se pone de manifiesto la falta de un criterio objetivo en la valoración de las diferencias entre secuencias para determinar si pueden corresponder a variantes de una misma especie o a especies distintas.

En todos los estudios genéticos llevados a cabo hasta ahora en *Entamoeba* empleando las secuencias del gen ARNr-16S, se ha considerado que cada

posición de la secuencia es independiente de las demás y por tanto la probabilidad de que se produzca y fije una mutación en una posición es independiente de las demás bases. Sin embargo, el ARNr-16S se pliega formando una estructura secundaria y terciaria que, junto con las estructuras formadas por las subunidades ARNr-5.8s y -28s, sirve de esqueleto para la formación de los ribosomas; el mantenimiento de la estructura es, por tanto, un elemento fundamental para mantener la funcionalidad de los ribosomas. En la estructura secundaria, las bases pueden estar emparejadas formando hélices dobles (ramas) de modo que una mutación en una posición de una rama puede o no afectar a la estabilidad de la misma en función de la base complementaria. Cuando una mutación en una posición emparejada de la secuencia es compensada por otra mutación en la posición complementaria, manteniéndose el emparejamiento (=la estructura), se produce un cambio de base compensatorio (CBC) (Figura 1). Para especies muy próximas, en las que puede no haber diferencias en las secuencias del ARNr-16S/18S, la presencia de CBCs en la estructura del espaciador interno 2 (ITS2; separa los genes ARNr-5.8s y -28s durante la transcripción) se considera, en eucariotas, como un criterio taxonómico diferencial (Muller *et al.*, 2007; Coleman 2008) y se ha aplicado para diferenciar especies morfológicamente indistinguibles (Ruhl *et al.*, 2010). La toma en consideración de la estructura secundaria para mejorar el alineamiento de secuencias del ARNr-16S/18S y las filogenias derivadas de dichos alineamientos ha sido usada en numerosos trabajos (p.e., Dixon y Hillis, 1993; Barta, 1997; Holmdahl *et al.*,

1999; Savill *et al.*, 2001; Guillespie *et al.*, 2005; Keller *et al.*, 2010), pero no se ha considerado todavía el análisis de la presencia de CBCs en las secuencias de ARNr-16S/18S como herramienta para diferenciar especies. En el presente trabajo analizamos las estructuras secundarias del ARNr-16S de las especies de *Entamoeba* para realizar el mapa de variabilidad del gen en este género y a partir de ahí identificar CBCs en las estructuras, con objeto de identificar las regiones que potencialmente pueden ser de utilidad para estudios taxonómicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El origen de las secuencias empleadas en este estudio figura en la Tabla 1. Como estructura secundaria de referencia del gen ARNr-16S de *Entamoeba* se ha utilizado el modelo propuesto para la secuencia de *E. histolytica* con número de acceso del GenBank X65163, disponible en el *Comparative RNA Web site and Project* (The Gutell Lab, University of Texas; <http://www.rna.cccb.utexas.edu>). La numeración de las ramas se ha realizado de acuerdo con la propuesta de Wuyts *et al.* (2002). El modelo fue transferido a las demás secuencias de *Entamoeba* mediante modelado homólogo, empleando el programa 4SALE (Seibel *et al.*, 2008). Para establecer la estructura secundaria del fragmento correspondiente a la región variable V4, que figura sin resolver en el modelo del *Comparative RNA Web site and Project*, se han utilizado como modelos las estructuras propuestas para esta región por Wuyts *et al.*, (2000) para *Trichomonas tenax*,

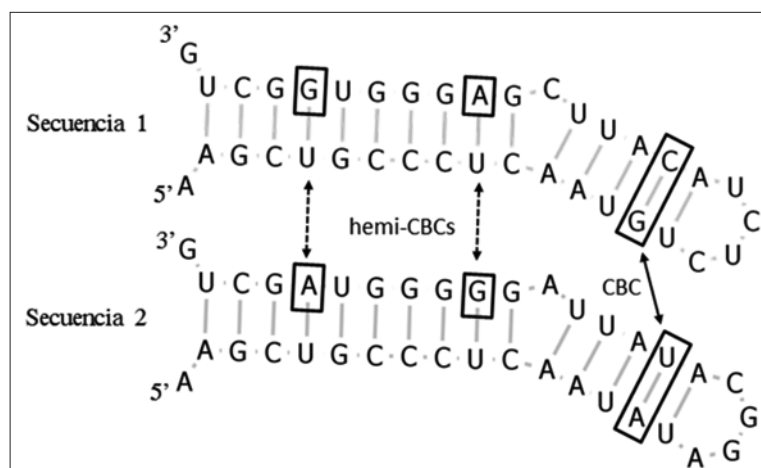


Figura 1. Ejemplo de cambios de base compensatorios completos (CBC) y parciales (hemi-CBC) entre la estructura secundaria de dos secuencias de ARN.

Tabla 1. Origen de las secuencias utilizadas en este estudio

Nº acceso			
Especie	hospedador	(Genbank)	Referencia
<i>E. gingivalis</i>	humano	D28490	Yamamoto <i>et al.</i> (1995)
<i>E. struthionis</i>	avestruz (<i>Struthio camelus</i>)	AJ566411	Ponce-Gordo <i>et al.</i> (2004)
<i>E. polecki</i>	cerdo	AF149913	Silverman <i>et al.</i> (1999)
<i>E. chattoni</i>	papión (<i>Papio cynomolgi</i>)	AF149912	Silberman <i>et al.</i> (1999)
<i>E. suis</i>	cerdo	DQ286372	Clark <i>et al.</i> (2006)
<i>E. bovis</i>	vaca	FN666248	Stensvold <i>et al.</i> (2010)
	vaca	FN666249	Stensvold <i>et al.</i> (2010)
	oveja	FN666250	Stensvold <i>et al.</i> (2010)
	oveja	FN666251	Stensvold <i>et al.</i> (2010)
	reno (<i>Rangifer tarandus</i>)	FN666252	Stensvold <i>et al.</i> (2010)
<i>E. equi</i>	caballo	DQ286371	Clark <i>et al.</i> (2006)
<i>E. histolytica</i>	humano	X65163	Sehgal <i>et al.</i> (1994)
<i>E. nuttalli</i>	macaco (<i>Macaca fuscata</i>)	AB485592	Tachibana <i>et al.</i> (2007)
<i>E. dispar</i>	humano	AB282661	Tachibana <i>et al.</i> (2007)
<i>E. hartmanni</i>	humano	AF149907	Silberman <i>et al.</i> (1999)
<i>E. moshkovskii</i>	humano	AF149906	Silberman <i>et al.</i> (1999)
<i>E. ecuadoriensis</i>	aguas residuales	DQ286373	Clark <i>et al.</i> (2006)
<i>E. invadens</i>	serpiente (<i>Natrix cyclopion</i>)	AF149905	Sogin <i>et al.</i> (sin publicar)
<i>E. terrapinae</i>	tortuga (<i>Chrysemys picta</i>)	AF149910	Silberman <i>et al.</i> (1999)
<i>E. insolita</i>	tortuga (<i>Geochelone carbonaria</i>)	AF149909	Silberman <i>et al.</i> (1999)
<i>E. ranarum</i>	rana (<i>Pyxicephalus adspersus</i>)	AF149908	Silberman <i>et al.</i> (1999)
<i>E. coli</i>	gorila (<i>Gorilla gorilla</i>)	AB444953	Kobayashi <i>et al.</i> (2009)
	humano	AF149914	Silberman <i>et al.</i> (1999)
	humano	AF149915	Silberman <i>et al.</i> (1999)
<i>E. muris</i>	gerbo (<i>Meriones unguiculatus</i>)	AB445018	Kobayashi <i>et al.</i> (2009)

Acanthamoeba castellanii y *Leishmania major*. En aquellas regiones en las que no fuese posible transferir la estructura a alguna de las secuencias, o el porcentaje de pares transferidos fuese bajo (inferior al 60%), la estructura fue revisada para valorar estructuras alternativas. Para ello, el fragmento de cada secuencia correspondiente a la región en cuestión fue plegado de forma independiente mediante el programa RnaFold del paquete Vienna versión 1.8.5 (Hofacker *et al.*, 1994). Las estructuras obtenidas para cada secuencia fueron comparadas en 4SALE y editadas a mano para corregir las posiciones de algunos pares y de algunas inserciones/deleciones (indels). En aquellas zonas en las que

la presencia de grandes indels no permitiese realizar el alineamiento de forma inequívoca, el alineamiento se realizó mediante la descomposición de las regiones problemáticas y la identificación de posiciones homólogas según el método descrito por Gillespie (2004). Finalmente, el programa 4SALE se utilizó también para realizar el alineamiento secuencia-estructura y para identificar los CBCs y hemi-CBCs presentes entre las distintas secuencias. Las estructuras secundarias han sido dibujadas usando el programa RNAviz 2.0 (de Rijk *et al.*, 2003). A partir del número de CBCs entre secuencias se determinaron sus relaciones filogenéticas mediante el algoritmo BIONJ (Gascuel, 1997)

implementado en el programa CBCAnalyzer (Wolf *et al.*, 2005).

A partir del alineamiento de las secuencias se realizó el mapa de variabilidad del gen, superponiéndolo a la estructura secundaria. El mapa de variabilidad se ha realizado considerando

la estimación de la tasa de sustitución relativa, o variabilidad, de cada posición de la secuencia (Van de Peer *et al.*, 1993); dicha variabilidad considera la probabilidad de que haya diferentes nucleótidos en posiciones homólogas de distintas secuencias en función de su distancia evolutiva. La determinación

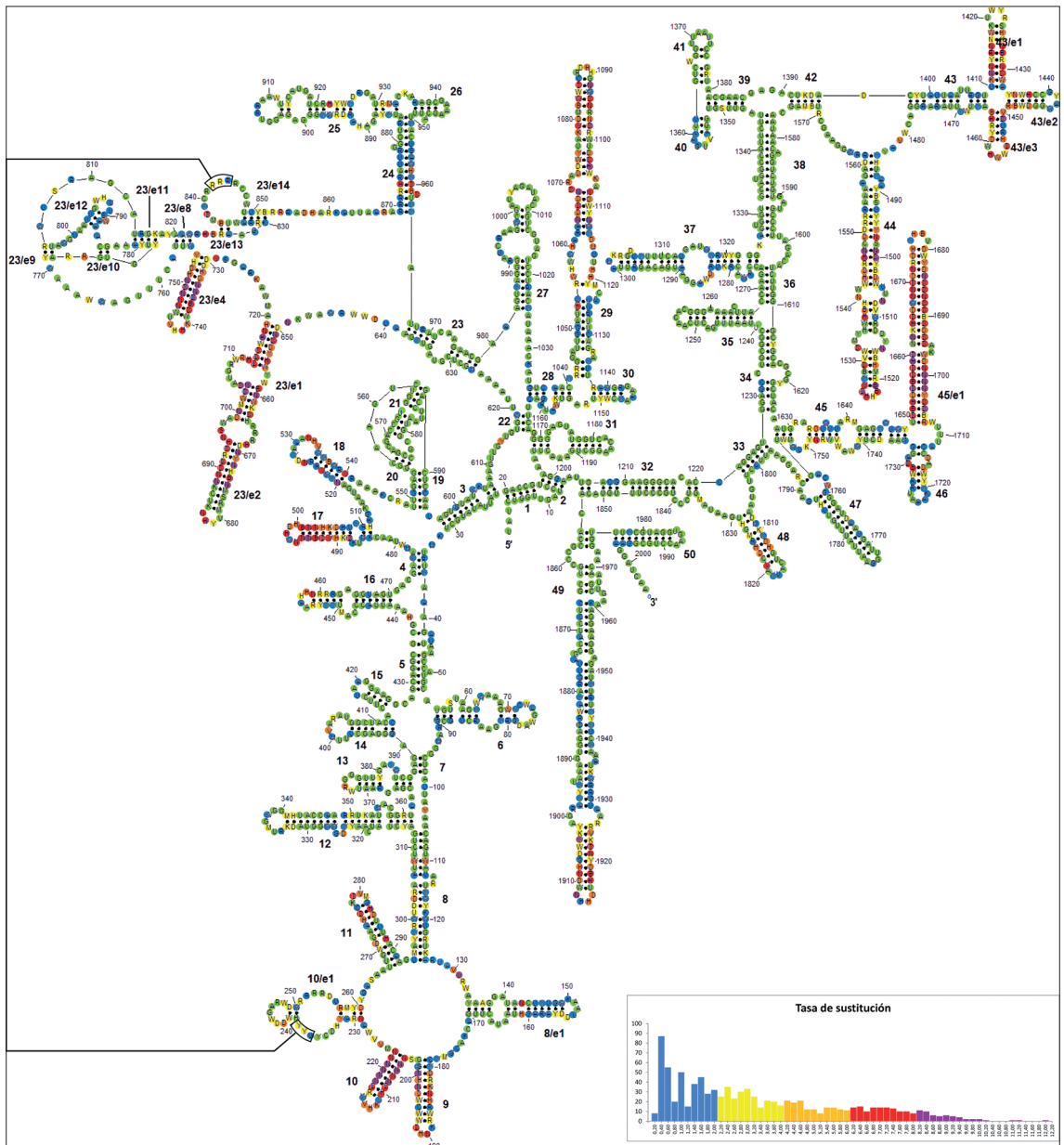


Figura 2. Modelo de estructura secundaria consenso del ARNr-16S de *Entamoeba* y mapa de variabilidad. La variabilidad de cada posición se representa según una escala de colores, desde el azul (menor variabilidad) al morado (mayor variabilidad); el verde corresponde a posiciones invariantes. El histograma insertado en la base de la figura indica el número de posiciones según su variabilidad (las posiciones invariantes no están incluidas).

de la variabilidad de cada posición se ha realizado con el programa Treecon versión 1.3b (Van de Peer y De Wachter, 1997). Para visualizar la localización de las regiones variables en la estructura terciaria se ha empleado el visor de estructuras químicas tridimensionales Jmol (<http://www.jmol.org>), marcando las hélices equivalentes en el modelo ribosomal de *Tetrahymena thermophila* (número de acceso del Protein Data Bank: 2XZM).

RESULTADOS

La estructura secundaria usada como punto de partida se ha podido transferir a las demás secuencias de *Entamoeba*, pero introduciendo algunas modificaciones en las regiones variables V2, V4 y V7; básicamente, en la región V2 proponemos dos hélices (10 y 10/e1) en vez de una única rama presente en el modelo de partida; proponemos la estructura secundaria de la región V4, no definida en el modelo de partida (hélices 23/e1 a 23/e14, con una rama más, 23/e15, presente sólo en las especies del grupo *coli*); y en la región V7 proponemos una estructura diferente para las ramas 43 (con tres ramas accesorias, 43/e1 a 43/e3) y 44 (más larga y sin la rama accesoria del modelo de partida). El modelo propuesto se muestra en la Figura 2. En el caso de la región V4, si bien la estructura propuesta sigue el modelo general para esta región en eucariotas, con

dos seudonudos (Wuyts *et al.*, 2000; Alkema y Nygard, 2006), también es posible una conformación alternativa con un solo seudonudo (Figura 3) similar a la que Wuyts *et al.*, (2000) propusieron para protozoos primitivos como los Parabasalidea. La superposición de la variabilidad de cada posición de la secuencia a la estructura secundaria consenso se muestra en la Figura 2. En la estructura terciaria, la localización de las hélices en donde hay zonas variables se muestra en la Figura 4.

Las relaciones entre secuencias basadas en el número de CBCs total entre ellas (Figura 5) muestra que las especies tetranucleadas y octonucleadas forman dos grupos monofiléticos, mientras que las especies uninucleadas están en dos grupos diferentes: las especies descritas en cerdos y humanos están en un subgrupo propio (al que denominamos *polecki*), mientras que las especies descritas en bóvidos forman un subgrupo (al que denominamos *bovis*) derivado de las especies tetranucleadas. La única especie considerada dentro del grupo *gingivalis* (sin quistes conocidos) está relacionada con las especies del subgrupo *polecki*. Dentro del grupo *histolytica*, las especies morfológicamente indistinguibles *E. histolytica*/*E. nuttalli*/*E. dispar*/*E. moshkovskii*/*E. ecuadoriensis* forman un subgrupo diferenciado, con las dos especies descritas inicialmente en aguas residuales (*E. moshkovskii* y *E. ecuadoriensis*) en posición basal dentro del subgrupo.

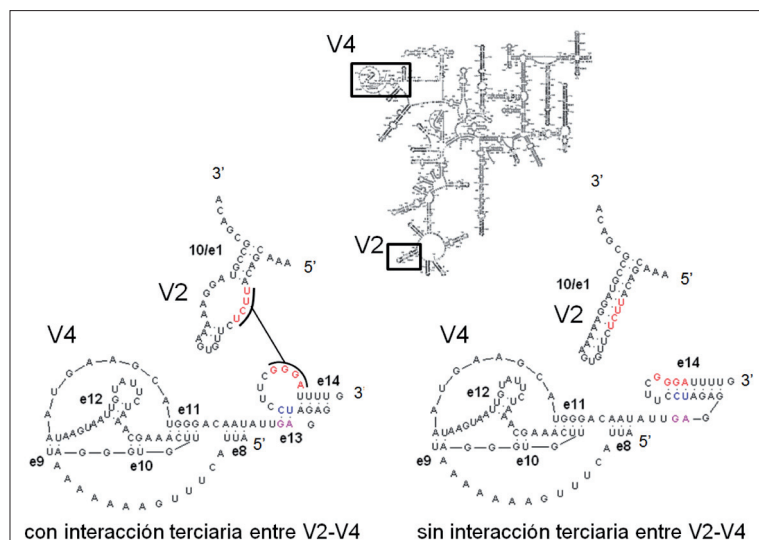


Figura 3. Posibles conformaciones de la interacción terciaria entre las regiones variables V2-V4 (ES3-ES6 de Alkema y Nygard, 2006) tomando como modelo la secuencia de *E. bovis* (número de acceso FN666248).

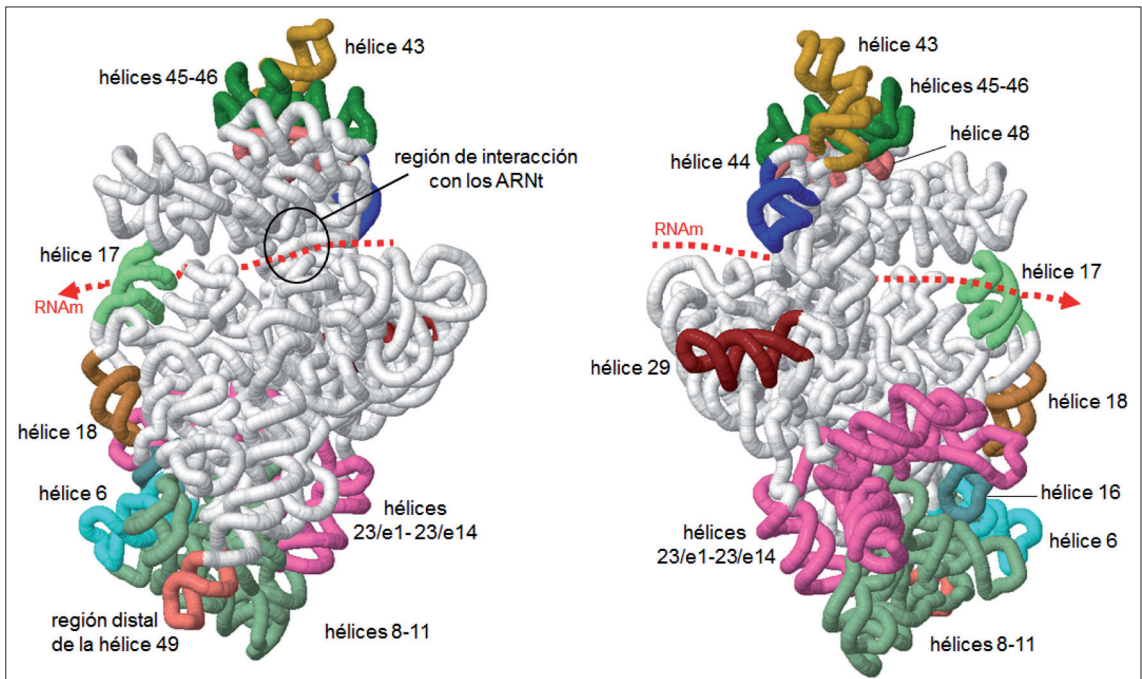


Figura 4. Localización de las hélices variables del ARNr-16S de *Entamoeba*, empleando como modelo la estructura terciaria del ARNr-18S de *Tetrahymena thermophyla*. La imagen de la izquierda corresponde al lado ribosomal (de interacción con la subunidad ARNr-28S), la imagen de la derecha corresponde al lado citoplásmico. Se indica (línea roja discontinua) la trayectoria del ARNm durante la traducción, y la región (círculo) de interacción entre la subunidad pequeña y los ARNt.

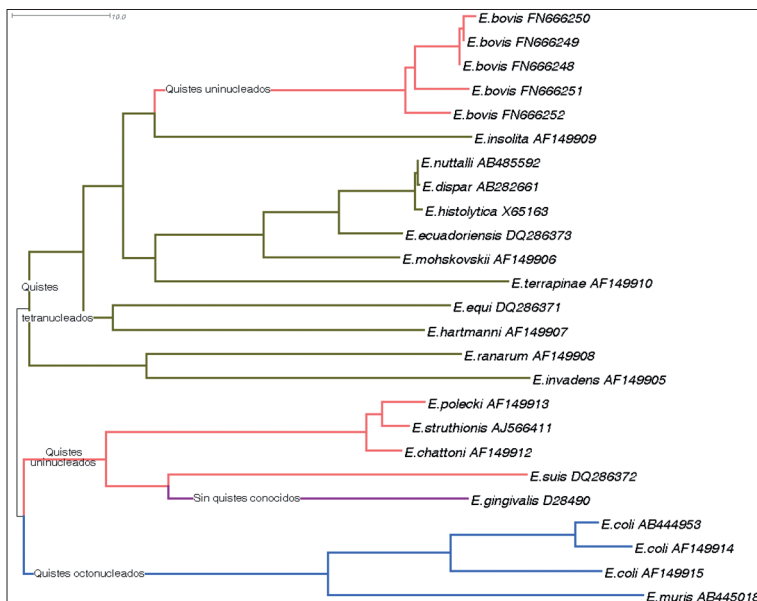


Figura 5. Relaciones entre secuencias obtenidas a partir del análisis de CBCs entre secuencias-estructuras completas. El color de las ramas indica el número de núcleos en los quistes maduros.

DISCUSIÓN

La estructura secundaria del ARNr-16S de

Entamoeba presenta las regiones de mayor variabilidad en las mismas zonas que el modelo de variabilidad publicado para eucariotas (Wuyts *et al.*,

2002), y que se corresponderían, en la estructura tridimensional, con zonas periféricas alejadas de los puntos de interacción del ARNm y de los ARNt con la subunidad menor del ribosoma (Wuyts *et al.*, 2001). La región V4 de la estructura secundaria de *Entamoeba* presenta una posible variabilidad conformacional que podría explicarse por la posición basal de estos protozoos en la evolución de los eucariotas. En bacterias sólo hay una hélice en la región V4, y en algunos eucariotas primitivos la estructura es también de una única hélice (como en los microsporidios) o de un seudonudo y una hélice (como en Parabasalidea), mientras que en eucariotas evolucionados hay dos seudonudos (Wuyts *et al.*, 2000), el segundo de los cuales tiene una interacción terciaria con la región variable V2, aumentando la estabilidad de la estructura (Alkemar y Nygard, 2006). La conformación de los eucariotas evolucionados es posible en *Entamoeba*, pero también es posible una estructura que podría considerarse más primitiva y semejante a la propuesta para Parabasalidea, al tener sólo un seudonudo y sin interacción terciaria. Dado que la estructura terciaria está afectada además por las proteínas ribosomales que pueden estabilizar la estructura, y mientras no se resuelva la estructura cristalográfica de los ribosomas de *Entamoeba*, no es posible por el momento saber si una o ambas conformaciones son posibles *in vivo* en los ribosomas de estos protozoos; incluso es posible que ambas conformaciones estén presentes y alternándose entre sí.

Cada vez es más frecuente el empleo de técnicas moleculares para los estudios taxonómicos y filogenéticos, y en ambos casos la calidad del alineamiento de las secuencias que sirve de base para los análisis posteriores es fundamental para que las conclusiones que se obtengan sean válidas. En el caso del ARNr, la estructura secundaria puede servir para ayudar a resolver dos problemas para los que no hay una solución unánime: el alineamiento objetivo de las regiones hipervariables, y el grado de similitud (o de divergencia) entre secuencias para considerarlas como pertenecientes a una misma especie o a especies distintas. En el presente trabajo, el análisis de la estructura secundaria del ARNr-16S de *Entamoeba* nos ha permitido determinar las posiciones homólogas en las regiones variables, haciendo posible obtener un alineamiento que incluye las secuencias completas. La existencia de frecuentes indels dificulta enormemente la iden-

tificación de posiciones homólogas en las regiones hipervariables. La aproximación más frecuente al problema consiste en la eliminación de estas regiones (Swofford, 1991; Swofford y Begle, 1993) al considerar que se trata de regiones de rápida evolución que contienen poca y poco fiable información filogenética; sin embargo, para otros autores se trata de zonas con alto interés que pueden ayudar a resolver tiempos de divergencia y tasas evolutivas (Lee, 2001). La inclusión de la estructura secundaria en los alineamientos facilita la identificación de posiciones homólogas (Wuyts *et al.*, 2000), pero posiblemente estas homologías sólo pueden establecerse a nivel de taxones basales (p.e., entre especies dentro de un mismo género). Así, por ejemplo, en el trabajo de Wuyts *et al.* (2000), el número y tamaño de las hélices presentes en la región hipervariable V4 difiere mucho dependiendo del taxón considerado, desde ninguna hélice o sólo una (en microsporidios) hasta 16 hélices (en kinetoplástidos). Para estos autores, el ARNr-16/18S presenta una estructura básica común a todos los eucariotas en la que se dan zonas de inserción de secuencias que dan lugar a nuevas hélices, y estas inserciones se han dado en distintos momentos de la evolución originando homoplasias entre los taxones en los que ocurren. En definitiva, la inclusión o no de las zonas hipervariables dependerá de la proximidad evolutiva entre las secuencias que se consideren; para especies próximas (p.e., de un mismo género, o de una misma familia), la determinación de la estructura secundaria puede facilitar la identificación de posiciones homólogas para incluir las regiones hipervariables en el estudio, mientras que para secuencias de taxones relativamente distantes, el alineamiento objetivo de las regiones hipervariables puede ser imposible y en tal caso deben eliminarse del análisis (Wuyts *et al.*, 2000).

Respecto a la comparación de secuencias con fines taxonómicos, el principal problema consiste en establecer un límite objetivo en el número (o porcentaje) de similitudes o divergencias entre secuencias que permita considerarlas como variantes de una misma especie, o especies distintas. Cada vez con más frecuencia se emplea la región que codifica para el espaciador interno 2 (*internal transcribed spacer 2*, ITS2) como herramienta taxonómica y para estudios filogenéticos entre especies próximas, dado que su rápida tasa de evolución puede permitir discriminar entre especies próximas

entre las que no haya diferencias en las secuencias de ARNr (Caisová *et al.*, 2011). En eucariotas evolucionados (animales, plantas y hongos), el ITS2 tiene una estructura conservada (Schultz *et al.*, 2005; Coleman, 2007) y la presencia de CBCs en su estructura permite diferenciar incluso especies crípticas entre las que no hay prácticamente diferencias en las secuencias del ARNr-18S (Müller *et al.*, 2007; Coleman, 2008). En el caso de los protozoos en general, y en los protozoos evolutivamente más primitivos en particular, este sistema tiene todavía que ser validado. Los estudios citados se han basado en el análisis comparado de eucariotas con reproducción sexual, en los que puede ser relativamente fácil comprobar si hay cruzamientos y descendencia entre individuos de poblaciones intra- o interespecíficamente diferentes. Sin embargo, la reproducción sexual no existe en muchos protozoos; en el caso de *Entamoeba* se considera que posee sólo reproducción asexual, aunque posee los genes implicados en la meiosis y quizá haya perdido secundariamente la capacidad de reproducción sexual (Lahr *et al.*, 2011). Por otro lado, es necesario disponer de las secuencias ITS2 para poder determinar su estructura secundaria y hacer comparaciones, y aunque el número de secuencias ITS2 disponibles en las bases de datos ha ido en aumento, son todavía pocos los datos disponibles sobre la estructura secundaria del ITS2 de protozoos parásitos. Además, en muchos casos la región ITS2 es muy corta. En *Entamoeba* sólo hay publicadas secuencias ITS2 de unas pocas especies (todas del grupo *histolytica*: *E. histolytica*, *E. nuttalli*, *E. dispar*, *E. moshkovskii* y *E. invadens*; Cevallos *et al.*, 1993; Katiyar *et al.*, 1995; Som *et al.*, 2000; Tachibana *et al.*, 2007; Takano *et al.*, 2009), con una longitud muy variable (desde aproximadamente 50 bases en *E. invadens* a 150 en *E. moshkovskii*, según los datos de Katiyar *et al.*, 1995, y Som *et al.*, 2000) y todavía no se ha propuesto ningún modelo de estructura secundaria; por tanto, la diferenciación de especies a nivel genético dentro de este género se limita, por el momento, a la comparación de las secuencias del ARNr-16S.

En el análisis comparado secuencia-estructura de las especies incluidas en este estudio, hay CBCs y hemi-CBCs (cambio de una de las bases del par, manteniéndose el par) entre todas las especies excepto *E. bovis* (FN666248)-*E. bovis* (FN666249) Y *E. nuttalli*-*E. dispar*, entre las que

sólo hay hemi-CBCs. Todos los CBCs y hemi-CBCs están localizados en las regiones variables, siendo especialmente interesante la rama 45/e1. Esta rama presenta una longitud similar en todas las especies de *Entamoeba* (18-25 pares) y es posible diferenciar entre todas las especies atendiendo sólo a la secuencia-estructura de esta rama; en ella hay CBCs que permiten diferenciar entre casi todas las especies, y en aquellos casos en los que en esta rama no hay CBCs, sí hay hemi-CBCs, excepto entre las dos secuencias antes indicadas de *E. bovis* (FN666248 y FN666249), que son idénticas en esta región (Tabla 2, Figuras 6 y 7). Sin embargo, al no disponer todavía de un modelo de la estructura secuencia del ITS2 que pueda servir para determinar CBCs en dicha región y comparar los resultados con los de la rama 45/e1 (u otras que albergan regiones variables), no es posible todavía confirmar la utilidad de esta rama en estudios taxonómicos dentro del género *Entamoeba*; en cualquier caso, y al tratarse de una rama accesoria que no está presente en todos los eucariotas, su posible validez no se puede generalizar a otros organismos y debe valorarse en cada caso.

En el análisis filogenético realizado basado en la existencia de CBCs entre secuencias, si bien el programa empleado no considera la realización de réplicas (bootstrap) y por tanto, no es posible valorar la robustez del árbol obtenido, los resultados son básicamente los mismos que los publicados en otros estudios en los que se han utilizado diversos modelos de evolución para determinar la filogenia del género (p.e., Clark *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2009; Stensvold *et al.*, 2010, 2011). En todos los casos, incluyendo el presente estudio, las especies del grupo *coli* forman un grupo monofilético con el que están relacionadas las especies del subgrupo *polecki* y *E. gingivalis*. Las distintas secuencias asignadas a *E. bovis* están claramente relacionadas con las especies tetranucleadas, siendo evidente que el grupo de especies uninucleadas es polifilético (Ponce-Gordo *et al.*, 2007; Ponce-Gordo y Martínez-Díaz, 2010; Stensvold *et al.*, 2010, 2011). Hay algunas diferencias entre los distintos estudios filogenéticos en las relaciones entre las especies del grupo *histolytica*, fundamentalmente entre *E. hartmanni*, *E. equi* y las especies de hospedadores poiquilotermos, cuyas posiciones varían en los distintos árboles. Las relaciones obtenidas en nuestro estudio son coincidentes con la filogenia

propuesta por Stensvold *et al.* (2011), con la única diferencia de que en nuestro estudio, *E. hartmanni*

Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol. (2012); 71 (2): 125-137

Tabla 2. Cambios de base compensatorios en la rama 45/e1 entre las distintas secuencias consideradas en este estudio. Se marcan con un sombreado las comparaciones entre secuencias en las que no hay CBCs en esta región. Abreviaturas: Eg, *E. gingivalis*; Ep, *E. polecki*; Ech, *E. chattoni*; Est, *E. struthionis*; Esu, *E. suis*; Eb8, *E. bovis* FN66248; Eb9, *E. bovis* FN66249; Eb0, *E. bovis* FN66250; Eb1, *E. bovis* FN66251; Eb2, *E. bovis* FN66252; Eeq, *E. equi*; Ehi, *E. histolytica*; En, *E. nuttalli*; Ed, *E. dispar*; Eha, *E. hartmanni*; Emo, *E. moshkovskii*; Eec, *E. ecuadoriensis*; Einv, *E. invadens*; Et, *E. terrapinae*; Eins, *E. insolita*; Er, *E. ranarum*; Ec4, *E. coli* AF149914; Ec5, *E. coli* AF149915; Ec3, *E. coli* AB444953; Emu, *E. muris*

Eq		
Ep	10	Ep
Ech	11	6 Ech
Est	9	3 1 Est
Esu	12	10 7 6 Esu
Eb8	12	9 13 11 16 Eb8
Eb9	12	9 13 11 16 0 Eb9
Eb0	13	9 13 12 16 0 0 Eb0
Eb1	11	11 13 12 13 2 2 3 Eb1
Eb2	8	11 12 10 15 5 5 3 Eb2
Eeq	9	10 8 7 9 11 11 10 8 Eeq
Ehi	13	13 15 13 11 8 8 9 8 9 9 Ehi
En	13	13 15 13 11 8 8 9 8 9 0 En
Ed	13	13 15 13 12 9 9 10 9 8 9 0 0 Ed
Eha	12	8 13 10 14 14 14 15 13 13 11 12 12 11 Eha
Emo	12	11 13 10 13 8 8 9 10 9 10 6 5 6 11 Emo
Eec	12	13 14 13 11 10 10 11 10 8 8 2 1 2 10 6 Eec
Einv	13	9 9 10 13 10 10 10 9 8 11 9 9 12 12 9 Einv
Et	19	13 15 12 13 12 12 13 13 15 12 12 12 13 12 13 12 12 Et
Eins	12	12 11 9 13 8 8 8 7 9 7 12 12 12 15 12 11 10 13 Eins
Er	15	8 12 9 15 13 13 14 14 14 11 11 11 12 11 11 12 10 10 Er
Ec4	13	13 11 11 9 13 13 14 13 13 9 11 11 12 16 18 12 12 13 13 15 Ec4
Ec5	13	13 10 9 12 13 13 13 11 10 6 14 14 14 12 16 13 8 13 13 15 Ec5
Ec3	14	13 12 12 9 13 13 14 14 14 10 10 10 11 13 17 11 12 14 15 14 2 6 Ec3
Em	14	13 13 10 14 16 16 17 16 17 13 15 15 15 14 16 15 14 11 14 11 12 14 12 Em

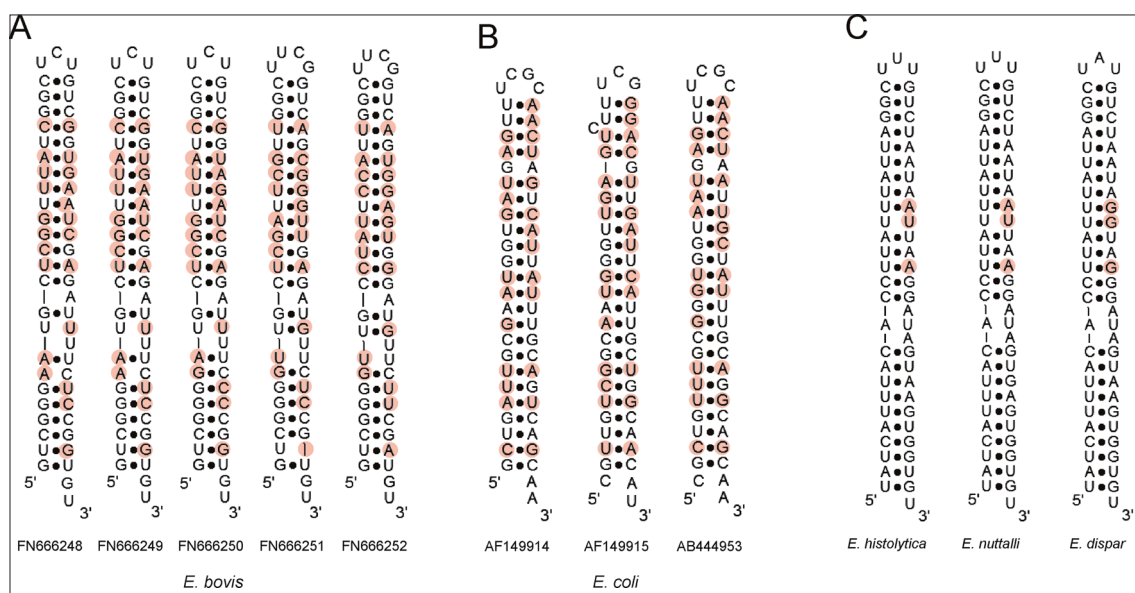


Figura 7. Comparación de la estructura secundaria de la hélice 45/e1 entre secuencias que han sido consideradas como de la misma especie o sin CBCs entre ellas: A) secuencias de *E. bovis*; B) secuencias de *E. coli*; C) secuencias de *E. histolytica*, *E. nuttalli* y *E. dispar*. Se indican las bases de los pares con diferencias entre las distintas secuencias.

está en la misma rama evolutiva que lleva al grupo *E. histolytica*/*E. nuttalli*/*E. dispar*; dependiendo del trabajo, *E. hartmanni* se encuentra también en esa rama evolutiva (Stensvold *et al.*, 2011) o en una rama derivada (Clark *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2009; Stensvold *et al.*, 2010).

REFERENCIAS

1. ALKEMAR G, NYGARD O. 2006. Probing the secondary structure of expansion segment ES6 in 18S ribosomal RNA. *Biochemistry* 45: 8067-8078.
2. BARTA JR. 1997. Investigating phylogenetic relationships within the Apicomplexa using sequence data: the search for homology. *Methods* 13: 81-88.
3. CAISOVÁ L, MARIN B, MELKONIAN M. 2011. A close-up view on ITS2 evolution and speciation - a case study in the Ulvophyceae (Chlorophyta, Viridiplantae). *BMC Evol Biol* 11: 262.
4. CEVALLOS MA, PORTA H, ALAGON AC, LIZARDI PM. 1993. Sequence of the 5.8S ribosomal gene of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Nucleic Acids Res* 21: 355.
5. CLARK CG, DIAMOND LS. 1997. Intraspecific variation and phylogenetic relationships in the genus *Entamoeba* as revealed by riboprinting. *J Euk Microbiol* 44: 142-154.
6. CLARK CG, KAFFASHIAN F, TAWARI B, WINDSOR JJ, TWIGG-FLESNER A, DAVIES-MOREL MCG, BLESSMANN J, EBERT F, PESCHEL B, LE VAN A, JACKSON CJ, MACFARLANE L, TANNICH E. 2006. New insights into the phylogeny of *Entamoeba* species provided by analysis of four new small subunit rRNA genes. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 2235-2239.
7. COLEMAN AW. 2007. Pan-eukaryote ITS2 homologues revealed by RNA secondary structure. *Nucleic Acids Res* 35: 3322-3329.
8. COLEMAN AW. 2008. Is there a molecular key to the level of "biological species" in eukaryotes? A DNA guide. *Mol Phylogenet Evol* 50: 197-203.
9. DE RIJK P, WUYTS J, DE WACHTER R. 2003. RNA-Viz2: an improved representation of RNA secondary structure. *Bioinformatics* 19: 299-300.
10. DIXON MT, HILLIS DM. 1993. Ribosomal RNA secondary structure: compensatory mutations and implications for phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 10: 256-267.
11. GASCUEL O. 1997. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol Biol Evol* 14: 685-695.
12. GILLESPIE JJ. 2004. Characterizing regions of ambiguous alignment caused by the expansion and contraction of hairpin-stem loops in ribosomal RNA molecules. *Mol Phylogenet Evol* 33: 936-943.
13. GILLESPIE JJ, YODER MJ, WHARTON RA. 2005. Predicted secondary structure for 28S and 18S rRNA from Ichneumonidea (Insecta: Hymenoptera: Apocrita): impact on sequence alignment and phylogeny estimation. *J Mol Evol* 61: 114-137.

14. HOFACKER IL, FONTANA W, STADLER PF, BON-HOEFFER LS, TACKER M, SCHUSTER P. 1994. Fast folding and comparison of RNA secondary structures. *Monatsh Chem* 125: 167-188.
15. HOLMDAHL OJM, MORRISON DA, ELLIS JT, HUONG LTT. 1999. Evolution of ruminant *Sarcocystis* (Sporozoa) parasites based on small subunit rDNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 11: 27-37.
16. KATIYAR SK, VISVESVARA GS, EDLIND TD. 1995. Comparisons of ribosomal RNA sequences from amitochondrial protozoa: implications for processing, mRNA binding and paromomycin susceptibility. *Gene* 152: 27-33.
17. KELLER A, FÖRSTER F, MÜLLER T, DANDEKAR T, SCHULTZ J, WOLF M. 2010. Including RNA secondary structures improves accuracy and robustness in reconstruction of phylogenetic trees. *Biol Direct* 5: 4.
18. KOBAYASHI S, SUZUKI J, TAKEUCHI T. 2009. Establishment of a continuous culture system for *Entamoeba muris* and analysis of the small subunit rRNA gene. *Parasite* 16: 135-139.
19. LAHR DJG, PARFREY LW, MITCHELL EAD, KATZ LA, LARA E. 2011. The chastity of amoebae: re-evaluating evidence for sex in amoeboid organisms. *Proc R Soc B* 278: 2081-2090.
20. LEE MSY. 2001. Unalignable sequences and molecular evolution. *Trends Ecol Evol* 16: 681-685.
21. LEVINE ND. 1961. Protozoan parasites of domestic animals and of man. Burgess Publishing Co., Minneapolis.
22. MÜLLER T, PHILIPPI N, DANDEKAR T, SCHULTZ J, WOLF M. 2007. Distinguishing species. *RNA* 13: 1469-1472.
23. PONCE-GORDO F, MARTÍNEZ-DÍAZ RA. 2010. Taxonomía y filogenia del género *Entamoeba*. Una revisión histórica. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol* 69: 5-37.
24. PONCE-GORDO F, MARTÍNEZ-DÍAZ RA, HERRERA S. 2004. *Entamoeba struthionis* n.sp. (Sarcomastigophora: Endamoebidae) from ostriches (*Struthio camelus*). *Vet Parasitol* 119: 327-335.
25. PONCE-GORDO F, JIMÉNEZ-RUIZ E, MARTÍNEZ-DÍAZ RA. 2007. Relaciones filogenéticas entre las especies del género *Entamoeba*: una revisión basada en el análisis de nuevas secuencias. *Actas del X Congreso Ibérico de Parasitología (CIP 10)*, 2007 Madrid. Servicio de Publicaciones de la Universidad Complutense de Madrid.
26. RUHL MW, WOLF M, JENKINS TM. 2010. Compensatory base changes illuminate morphologically difficult taxonomy. *Mol Phylogenet Evol* 54: 664-669.
27. SAVILL NJ, HOYLE DC, HIGGS PG. 2001. RNA sequence evolution with secondary structure constraints: comparison of substitution rate models using maximum-likelihood methods. *Genetics* 157: 399-411.
28. SCHULTZ J, MAISEL S, GERLACH D, MÜLLER T, WOLF M. 2005. A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota. *RNA* 11: 361-364.
29. SEIBEL PN, MÜLLER T, DANDEKAR T, WOLF M. 2008. Synchronous visual analysis and editing of rna sequence and secondary structure alignments using 4SALE. *BMC Res Notes* 1:91.
30. SILBERMAN JD, CLARK CG, DIAMOND LS, SOGIN ML. 1999. Phylogeny of the genera *Entamoeba* and *Endolimax* as deduced from small-subunit ribosomal RNA sequences. *Mol Biol Evol* 16: 1740-1751.
31. SOM I, AZAM A, BHATTACHARYA A, BHATTACHARYA S. 2000. Inter- and intra-strain variation in the 5.8S ribosomal RNA and internal transcribed spacer sequences of *Entamoeba histolytica* and comparison with *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii* and *Entamoeba invadens*. *Int J Parasitol* 30: 723-728.
32. STENSVOLD CR, LEBBAD M, CLARK CG. 2010. Genetic characterization of uninucleated cyst-producing *Entamoeba* spp. from ruminants. *Int J Parasitol* 40: 775-778.
33. STENSVOLD CR, LEBBAD M, VICTORY EL, VERWEIJ JJ, TANNICH E, ALFELLANI M, LEGARRAGA P, CLARK CG. 2011. Increased sampling reveals novel lineages of *Entamoeba*: consequences of genetic diversity and host specificity for taxonomy and molecular detection. *Protist* 162: 525-541.
34. SWOFFORD DL. 1991. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1. Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.
35. SWOFFORD DL, BEGLE, DP. 1993. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1. User's manual. Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.
36. TACHIBANA H, YANAGI T, PANDEY K, CHENGA XJ, KOBAYASHI S, SHERCHAND JB, KANBARA H. 2007. An *Entamoeba* sp. Strain isolated from rhesus monkey is virulent but genetically different from *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 153: 107-114.
37. TAKANO JI, TACHIBANA H, KATO M, NARITA T, YANAGI T, YASUTOMI Y, FUJIMOTO K. 2009. DNA characterization of simian *Entamoeba histolytica*-like strains to differentiate them from *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res* 105: 929-937.
38. VAN DE PEER Y, DE WACHTER R. 1997. Construction of evolutionary distance trees with TREECON for Windows: accounting for variation in nucleotide substitution rate among sites. *Comput. Applic. Biosci.* 13, 227-230.
39. WOLF M, FRIEDRICH J, DANDEKAR T, MÜLLER T. 2005. CBCAnalyzer: inferring phylogenies based on compensatory base changes in RNA secondary structures. *In Silico Biology* 5: 0027.
40. WUYTS J, DE RIJK P, VAN DE PEER Y, PISON G, ROUSSEUW P, DE WACHTER RP. 2000. Comparative analysis of more than 3000 sequences reveals the existence of two pseudoknots in area V4 of eukaryotic small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 28: 4698-4708.
41. WUYTS J, VAN DE PEER Y, DE WACHTER R. 2001. Distribution of substitution rates and location of insertion sites in the tertiary structure of ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 29: 5017-5028.
42. WUYTS J, VAN DE PEER Y, WINKELMANS T, DE WACHTER R. 2002. The European database on small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 30: 183-185.

Tegumental ultrastructure of *Echinostoma caproni* adults (Trematoda: Echinostomatidae)

SOTILLO J.¹, TRUDGETT A.², CORTÉS A.¹, TRELIS M.¹, FRIED B.³, MARCILLA A.¹, ESTEBAN J.G.¹ and TOLEDO R.¹

¹ Deparramento Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot - Valencia, Spain.

² Parasite Proteomics Research Group. School of Biological Sciences, The Queen's University of Belfast, Belfast, Northern Ireland.

³ Department of Biology, Lafayette College, Easton, Pennsylvania 18042, U.S.A.

ABSTRACT

The *Echinostoma caproni*-rodent model has been extensively used to determine the factors implicated in the expulsion or the establishment of chronic infections in the definitive host. Although several studies regarding the tegumental sensory papillae and spines or the spined collar have been conducted on the *E. caproni* adult, none of them has correlated these morphological features with the expulsion or the establishment of the parasite in its definitive host. In order to investigate the role of the collar spines and sensory papillae more fully we have performed scanning electron microscopy studies. We have studied the tegumental morphology in specimens collected from hosts displaying different degrees of compatibility with the parasite. No differences between the collar and the types of sensory papillae have been found between specimens, although some differences on tegumental spines have been confirmed. This approach may be informative with regard to the study of the *Echinostoma*-host relationships.

Key words: *Echinostoma caproni*, trematode, tegument, surface electron microscopy (SEM), sensory papillae, tegumental spines, collar.

RESUMEN

El modelo *Echinostoma caproni*-roedor ha sido ampliamente utilizado para determinar los factores implicados en la expulsión o el establecimiento crónico de las infecciones en el hospedador definitivo. A pesar de que diversos autores han estudiado tanto las papilas sensoriales y las espinas del tegumento como el collar de espinas, ninguno de ellos ha podido relacionar estas características morfológicas con la expulsión del adulto. En el presente estudio hemos analizado la morfología de diversos ejemplares de *E.*

Received: 10 August 2012. Accepted: 21 September 2012.

Corresponding: Dr Javier Sotillo

Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100-Burjassot, Valencia, Spain.

Tel.: 34-963543093; Fax: 34-963544769

E-mail: javier.sotillo@uv.es

caproni obtenidos de hospedadores definitivos con diferente compatibilidad frente al parásito mediante microscopía electrónica de superficie (SEM). No se han encontrado diferencias en relación al collar de espinas o a las papilas sensoriales, sin embargo, sí que se han confirmado diversas diferencias en las espinas del tegumento de especímenes obtenidos de hospedadores con diferente compatibilidad. El presente estudio proporciona más información en las relaciones *E. caproni*-hospedador.

Palabras clave: *Echinostoma caproni*, trematodo, tegumento, microscopía electrónica de superficie (SEM), papilas sensoriales, tegumento, collar de espinas.

INTRODUCTION

The tegument of echinostomes represents the major interface between the parasite and the host and is intimately involved in the relationship between the host and the parasite. The tegument can be implicated in different processes such as the attachment to the host intestinal mucosa, the interaction with the medium or the motility of the parasite. In this regard, several studies have been done to determine the relation between collar spine and parasite expulsion (Kruse *et al.*, 1992; Fujino *et al.*, 1994), or the differences in tegumental spines development in relation to the host species (Sotillo *et al.*, 2010). Kruse *et al.*, (1992) and Fujino *et al.*, (1994) reported that retraction of collar spines might play an important role in the expulsion of *Echinostoma trivolvis* from ICR mice. Few studies regarding sensory papillae have been conducted, and most of them have been done either with cercariae or with other echinostomatids (Toledo *et al.*, 2000; Maldonado *et al.*, 2001; Nakano *et al.*, 2003). Furthermore, most of the studies about the ultrastructure in echinostomatids are purely descriptive, as the authors do not compare the tegument between parasite species in order to correlate differences with host species. In this sense, only Sotillo *et al.*, (2010) correlated differences in the development of tegumentary spines with the type of definitive host.

Echinostoma caproni is a flatworm trematode that belongs to the family Echinostomatidae and presents an aquatic triheteroxen cycle. After infection, metacercariae excyst in the duodenum of the definitive host, and the juvenile worms migrate to the posterior third of the small intestine where they attach to the mucosa by the ventral sucker (Ursone and Fried 1995; Fried and Graczyk 2004). The *E. caproni*-rodent model has been extensively

used to elucidate aspects of the host-parasite relationships in intestinal infections. Although *E. caproni* has a wide range of definitive hosts, its compatibility differs considerably between host species in regard to worm establishment or survival. Mice are considered as high-compatibility hosts in which chronic infections are established, whereas rats are low-compatibility hosts and the parasite is rapidly rejected (Toledo and Fried 2005).

In the present study, we compare the ultrastructure of *E. caproni* adult worms obtained from two hosts with different compatibility to the worm (rats and mice). The description and characterization of the morphological features could be of importance in the study of the interactions in the *E. caproni*-host system as well as in the differentiation of species prior to DNA analysis in phylogenetic studies.

MATERIALS AND METHODS

Parasites, hosts and experimental infections:

The strain of *E. caproni* used in this study has been previously described (Hosier and Fried 1991). Encysted metacercariae of *E. caproni* were removed from the kidneys and pericardial cavities of experimentally infected *Biomphalaria glabrata* snails and used to infect ICR mice (*Mus musculus*) and Wistar rats (*Rattus norvegicus*). Three animals of each host species were necropsied at 28 days postinfection and ten specimens of *E. caproni* of each definitive host were randomly selected for scanning electron microscopy (SEM) studies.

Surface electron microscopy (SEM): The specimens selected for SEM study were fixed as described by McConville *et al.*, (2008). Briefly, the worms were flat-fixed for 30 minutes at room temperature in 4% (w/v) glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) containing 3%

(w/v) sucrose and then free-fixed in fresh fixative for 3.5 h at 4 °C. The adults were washed 3 times in 70% (v/v) ethanol and dehydrated in an ascending series of ethanol after a post-fixation in 1% osmium tetroxide for 1 h. The parasites were then dried in hexamethyldisilazane, mounted on aluminium stubs and sputter-coated with gold-palladium. The specimens were analyzed in an FEI Quanta 200 SEM, operating at 10 keV.

RESULTS AND DISCUSSION

The main morphological features of *E. caproni* can be observed in Figure 1A and 1B. The 28-day-old worms of *E. caproni* recovered from mice and rats showed a slender and elongate body and were slightly curved ventrally (Figure 1A), though it was smaller and narrower in the case of adults obtained from rats than in those recovered from mice, which was in accordance to that described by Toledo (2009). The worms obtained from mice and rats were very similar with the whole body covered by tegumentary spines except its dorsal part. The oral sucker, ventral sucker and genital apparatus were located in the anterior part of the body, which was very spinose (Figure 1B). However, the spines in the posterior part of the body were less numerous, and only the excretory pore was located in this zone.

One of the main differences between adults obtained from different compatible hosts was observed in tegumental spines. Although both specimens presented an aspinose dorsal part of the body, the ventral part (especially the anterior third of the ventral body) of adults recovered from rats had sharper and pointing spines. In contrast, the adults obtained from mice presented blunter spines. This feature was correlated by Sotillo *et al.*, (2010) with a greater expression of actin by the adults obtained from rats as a response to the stress produced by the expulsion of *E. caproni* from low-compatible hosts, compared with the long-term establishment that occurs in mice. The differences in the shape and size of the spines could be a response to the expulsion of the parasite, and to the cause, and the adults in rats would express more actin and would make the spines sharper to try to get attached to the intestinal mucosa of their host.

The species of the “*revolutum*” group of

Echinostoma are characterized by presenting 37 spines in their collar. This morphological feature is a distinctive characteristic of the species belonging to this group. However, several authors have published different and contradictory studies relative to the arrangement of collar spines (Kanev *et al.*, 2009). It seems that loss or retraction of these spines into pockets might be in part responsible for the contradictory literature (Fried *et al.*, 2009). In the case of adults obtained from different compatible hosts, the spines from the collar were retracted in all the specimens from both hosts (Figure 1C) and five corner spines were arranged 3 oral and 2 aboral and were partially covered by the tegument with the distal part of the spines emerging from the tegument (Figure 1D). The mechanisms of spinal extension and retraction were elucidated by Kruse *et al.*, (1992) and Fujino *et al.*, (1994) using different microscopical techniques such as SEM and TEM in *E. trivolvis*. The retraction of a collar spine may result from the relaxation of the muscle bundles associated with the spine (Fujino *et al.*, 1994), and although these authors correlated extended and retracted spines to external factors such as the culture medium, in our case, the reason for the retraction of collar spines in adults obtained from high and low compatible hosts may be the conditions of fixation procedures for SEM done in this study.

The collar of the specimens obtained from both hosts had an important number of sensory papillae, which were numerous between the collar spines and the sucker lips (Figures 1C-F). Two types of sensory papillae were observed: unciliated papillae and dome non-ciliated papillae. The dome non-ciliated papillae were only present on the ventral sucker and on the oral sucker of *E. caproni*, and were not found on the tegument of the adult (Figures 1E, 1F). In contrast, the ciliated papillae, and some undeveloped ciliated papillae, were represented on the tegument and, to a lesser extent, on the oral sucker of *E. caproni* (Figures 1G, 1H). Only a few studies regarding the sensory papillae have been done in echinostomatids and, particularly, in *E. caproni*. The nomenclature of the different types of sensory papillae is different depending on the author. For example, Han *et al.*, (2003) described two types of sensory papillae (type I, type II) in the echinostomatid *Himasthla alincia*, whereas Maldonado *et al.*, (2001), Toledo et al.

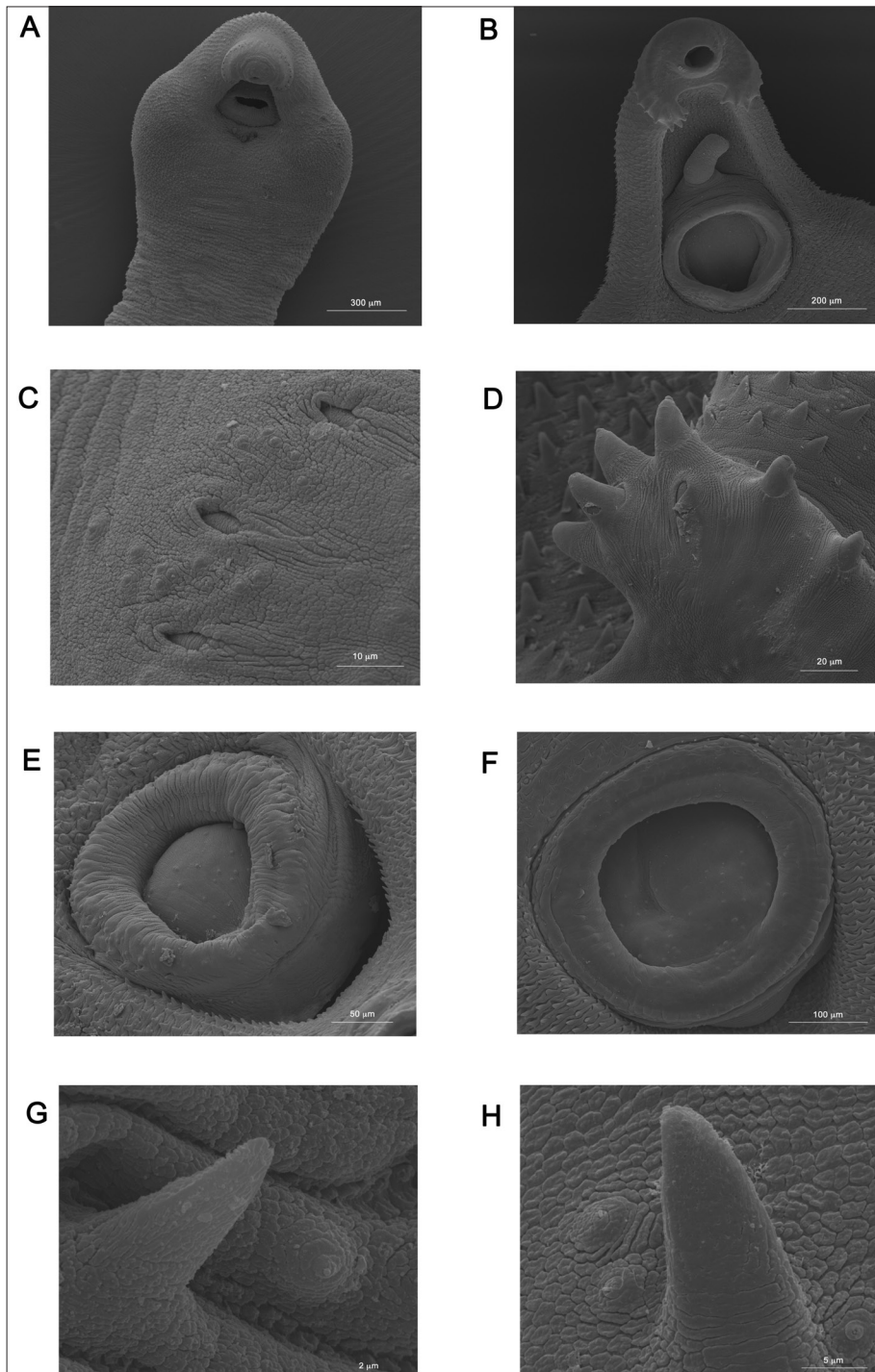


Figure 1. SEM photographs of *Echinostoma caproni* adult worms collected from mice and rats. (A) Anterior part of the body showing oral sucker and ventral sucker of an adult obtained from rat. (B) Anterior part of the body with oral sucker, ventral sucker and cirrus of an adult obtained from mouse. (C) Detail of collar spines retracted into pockets and unciliated sensory papillae around the pocket. (D) Detail of corner spines from collar, distributed 3 oral and 2 aboral. (E) Ventral sucker from adult obtained from rat with dome conical papillae in the lip and inside the ventral sucker. (F) Ventral sucker from adult obtained from mouse with dome conical papillae in the lip and inside the ventral sucker. (G) Tegumental spine and unciliated sensory papilla from adult collected from rat. (H) Tegumental spine and unciliated sensory papilla from adult collected from mouse.

(2000) and Nakano *et al.*, (2003) used a descriptive nomenclature in different species from the genus *Echinostoma*. In this regard, unciliated papillae would correspond to type I, whereas non-ciliated papillae would correspond to type 2 papillae. Furthermore, Nakano *et al.*, (2003) described a third type of papillae (multiciliated papillae), although this type has been only described in cercariae.

Two types of sensory papillae (unciliated and dome non ciliated) have been detected in our study on the tegument and on the oral and ventral sucker of adults obtained from high and low-compatible hosts. In the case of dome non-ciliated papillae, this type of sensory papillae could be found on the ventral and oral sucker lips, whereas the unciliated papillae could be found both in the tegument and the oral sucker of *E. caproni*. The unciliated papillae may function as mechano-, rheo-, tango-, and chemoreceptors, whereas the non-ciliated papillae have been suggested to function as a contact or stretch receptor and may have a secretory function (Smales and Blankespoor 1984).

In summary, we have compared several morphological features such as tegumental spines, collar or sensory papillae between *E. caproni* adult worms obtained from hosts with different compatibility for the parasite. We have shown that the ultrastructure was very similar between adults from both types of hosts, and only differences in tegumental spines can be observed. However, further studies regarding the sensory papillae should be undertaken as their shape and distribution are of importance in the differentiation of species within the family Echinostomatidae. These studies may report important information about the *E. caproni*-host interactions and the mechanisms involved in parasite expulsion.

REFERENCES

1. FRIED B, KANEV I, REDDY A. 2009. Studies on collar spines of echinostomatid trematodes. *Parasitol Res*, 105: 605-608.
2. FUJINO T, FRIED B, HOSIER DW. 1994. The expulsion of *Echinostoma trivolvis* (Trematoda) from ICR mice: extension/retraction mechanisms and ultrastructure of the collar spines. *Parasitol Res*, 80: 581-587.
3. HAN ET, HAN KY, CHAI JY. 2003. Tegumental ultrastructure of the juvenile and adult *Himasthla alincia* (Digenea: Echinostomatidae). *Korean J of Parasitol*, 41: 17-25.
4. HOSIER DW, FRIED B. 1991. Infectivity, growth, and distribution of *Echinostoma caproni* (Trematoda) in the ICR mouse. *J Parasitol*, 77: 640-642.
5. KANEV I, FRIED B, RADEV V. 2009. Collar spine models in the genus *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitol Res*, 105: 605-608.
6. KRUSE DM, HOSIER DW, FRIED B. 1992. The expulsion of *Echinostoma trivolvis* (Trematoda) from ICR mice: scanning electron microscopy of the worms. *Parasitol Res*, 78: 74-77.
7. MALDONADO A JR, LOKER ES, MORGAN JA, REY L, LANFREDI RM. 2001. Description of the adult worms of a new Brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. *Parasitol Res*, 87: 840-848.
8. MCCONVILLE M, BRENNAN GP, FLANAGAN A, EDGAR HW, MCCOY M, CASTILLO A, HERNÁNDEZ-CAMPOS A, FAIRWEATHER I. 2008. Surface and internal tegumental changes in juvenile *Fasciola hepatica* following treatment in vivo with the experimental fasciolicide, compound alpha. *Vet Parasitol*, 153, 52-64.
9. NAKANO T, FUJINO T, WASHIOKA H, TONOSAKI A, GOTO K, FRIED B. 2003. Tegumentary papillae of *Echinostoma caproni* cercariae (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitol Res*, 89: 446-450.
10. SMALES LR, BLANKESPOOR HD. 1984. *Echinostoma revolutum* (Froelich, 1902) Looss, 1899 and *Isthmiophora melis* (Schrunk, 1788) Luhe, 1809 (Echinostomatinae, Digenea): Scanning electron microscopy of the tegumental surfaces. *J Helminthol*, 58: 187-195.
11. SOTILLO J, TRUDGETT A, HALFERTY L, MARCILLA A, ESTEBAN JG, TOLEDO R. 2010. *Echinostoma caproni*: differential tegumental responses to growth in compatible and less compatible hosts. *Exp Parasitol*, 125: 304-309.
12. TOLEDO R. 2009. Echinostomes in the definitive host: A model for the study of host-parasite relationships. In *The Biology of Echinostomes, From the molecule to the Community* (Fried, B. and Toledo, R., Eds.). Springer, 1-34.
13. TOLEDO R, FRIED B. 2005. Echinostomes as experimental models for interactions between adult parasites and vertebrate hosts. *Trends Parasitol*, 21: 251-254.
14. TOLEDO R, MUNOZ-ANTOLI C, ESTEBAN JG. 2000. The life-cycle of *Echinostoma friedi* n. sp. (Trematoda: Echinostomatidae) in Spain and a discussion on the relationships within the 'revolutum' group based on cercarial chaetotaxy. *Syst Parasitol*, 45: 199-217.
15. URSONE RL, FRIED B. 1995. Light and scanning electron microscopy of *Echinostoma caproni* (Trematoda) during maturation in ICR mice. *Parasitol Res*, 81: 45-51.

Acknowledgments: This work was supported by the Conselleria d'Educació, Generalitat Valenciana (PROM-ETEO/2009/081), by the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) (PS09/02355), by the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2010-16263), and by the Universitat de València (UV-AE-10-23739). **This research complies with the current laws for animal health research in Spain.**

Parasitismo intestinal, anemia y estado nutricional en niños de la comunidad de Yantaló, San Martín, Perú

GARAYCOCHEA O.¹, ACOSTA-GARCÍA G.¹, VIGO-AMES N.¹, HERINGMAN K.¹, DYER A.¹, JERÍ S.¹ y SIANCAS G.²

¹ Estudiantes de Medicina Humana. Facultad de Medicina. Universidad de San Martín de Porres. Lima, Perú.

² Facultad de Medicina. Universidad Científica del Sur. Lima, Perú.

ABSTRACT

INTESTINAL PARASITISM, ANEMIA AND NUTRITIONAL STATUS IN CHILDREN OF YANTALÓ DISTRICT, SAN MARTIN, PERU

Objectives: To establish the relationship between intestinal parasitic infections and the nutritional condition of children from 5 to 17 years from a town in the Peruvian jungle. **Materials and Methods:** We examined 120 children from the district of Yantalo, located in the department of San Martin, in the northeastern area of the Peruvian jungle. We analyzed their stool samples using the spontaneous sedimentation-in-tube technique, Kato-Katz and Harada-Mori methods. The nutritional status was determined by obtaining their height-for-age index and the presence of anemia was detected with their hemoglobin results. **Results:** We found 64 (53,3%) of the children had positive stool samples, 59,38% of which came from a helminth infection, while 43,75% came from a protozoarian infection: *Trichuris trichura* (37,5%), *Ascaris lumbricoides* (12,5%), *Ancylostomidae* (7,8%), *Entamoeba histolytica* (12,5%), *Giardia lamblia* (10,9%), *Hymenolepis nana* (7,8%) and *Blastocystis hominis* (7,8%). All of the infections, according to the Kato-Katz method, were due to a mild worm load. The measurement of hemoglobin levels showed that 28,3% of the students presented some degree of anemia, mild (15,8%) and moderate (12,5%). Of the 120 children, 44 (36,7%) were positive for some degree of chronic malnutrition, of which 68,18% also presented an intestinal parasitic infection. We suggest that the government and other involved institutions improve existing strategies and implement new ones regarding environmental sanitation and education. This is crucial to reduce the rates of anemia, chronic malnutrition and intestinal parasitic infections in populations with similar epidemiologic characteristics.

Key words: Parasitic infections, Nutritional Status, Anemia, Sanitation, Perú.

Recibido: 15 de Octubre de 2012. Aceptado: 30 de Noviembre de 2012.

Correspondencia: Octavio Garaycochea Mendoza del Solar

Teléfono: (511) 372-1238

Dirección: Calle Monte Carlo 212 Dpto 302, Chacarilla, Santiago de Surco, Lima, Perú.

E-mail: garaycocheaoctavio@gmail.com

RESUMEN

Objetivos: Conocer la relación entre la parasitosis intestinal y el estado nutricional en niños de 5 a 17 años en una zona de la selva del Perú. **Materiales y Métodos:** Se examinaron 120 escolares de la localidad de Yantaló ubicada en el departamento de San Martín, zona nororiental de la selva del Perú. A los 120 escolares se les realizó un examen de heces por los métodos de sedimentación espontánea en tubo, Kato-Katz y Harada-Mori. El estado nutricional fue examinado mediante la obtención del índice de talla/edad y la presencia de anemia fue detectada por la medición de los niveles de hemoglobina. **Resultados:** Se encontraron 64 escolares con heces positivas (53,3%). De estos, el 59,38% presentaron infección por helmintos, mientras que el 43,75% presentaron infección por protozoarios: *Trichuris trichura* (37,5%), *Ascaris lumbricoides* (12,5%), *Anquilostomideos* (7,8%), *Entamoeba histolytica* (12,5%), *Giardia lamblia* (10,9%), *Hymenolepis nana* (7,8%) y *Blastocystis hominis* (7,8%). Todas las infecciones presentaron una carga parasitaria leve al emplear el método de Kato-Katz. El dosaje de hemoglobina sanguínea de los 120 escolares mostró que el 28,3% presentaron algún grado de anemia: leve (15,8%) y moderada (12,5%). Se encontraron 44 (36,7%) escolares con algún grado de desnutrición crónica, y de este total el 68,18% cursaban con una parasitosis intestinal. Se sugiere que el gobierno y las instituciones competentes mejoren e implementen nuevas estrategias en saneamiento ambiental y educación, siendo esto crucial para disminuir las tasas de anemia, desnutrición crónica y parasitosis intestinal en poblaciones de similares características epidemiológicas.

Palabras clave: Enfermedades Parasitarias, Estado Nutricional, Anemia, Saneamiento, Perú (Fuente: DeCS BIREME).

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades entéricas siguen siendo una importante causa de morbilidad y mortalidad en los países latinoamericanos, siendo los niños los más afectados debido a que tienen mayor posibilidad de contacto con parásitos y un sistema inmune inmaduro (Gómez *et al.*, 1999. Se estima que 46 millones de niños en edad preescolar y escolar corren el riesgo de contraer una infección por geohelmintos en América Latina y el Caribe, debido a que no tienen acceso a instalaciones mejoradas de saneamiento (Organización Panamericana de la Salud 2011).

La prevalencia de enteroparásitos se incrementa en pobladores que habitan en zonas rurales de bajas condiciones socioeconómicas debido a que están expuestos a mayores factores de riesgo, como el saneamiento ambiental básico deficiente, inadecuada eliminación de excretas, deficiencia de higiene personal y tendencia a permanecer descalzos (Zamaliah *et al.*, 1998; Gamboa *et al.*, 2009). De esta manera, las principales medidas para disminuir la tasa de infección parasitaria son la prevención y promoción de la salud, educación sobre el adecuado lavado de manos, higiene

personal y tratamiento del agua (Ngni, *et al.*, 2012: Hemocue®).

Las infecciones parasitarias de larga data, principalmente en niños, pueden ocasionar diversos grados de desnutrición y deficiencias en el desarrollo cognitivo y físico. Asimismo, las enfermedades parasitarias contribuyen a la alta prevalencia de anemia, en particular las infecciones por *Ancylostomideos* y *Trichuris trichura* (Ngni, *et al.*, 2012; Jonker *et al.*, 2012). En un estudio realizado en Jamaica por Hutchinson *et al.*, 1997, se llegó a la conclusión que los niños que tenían mayor tasa de infección, anemia y menor peso tenían un peor desempeño escolar, medido con la capacidad de escribir, deletrear y resolver problemas de aritmética.

Las infecciones por enteroparásitos son un problema de salud pública muy común, sobre todo en países en desarrollo como el Perú. Su prevalencia en distintas regiones del país ha sido objeto de estudio de diversas investigaciones, donde se halló relación entre parasitosis intestinal y deficiencias nutricionales, en especial en poblaciones de bajos ingresos (Buck *et al.*, 1968; Gárate, 1998). Otras determinantes, como edad, sexo, tamaño familiar y baja escolaridad de los padres han mostrado una

asociación significativa con anemia y deficiencia de hierro en las poblaciones rurales y pobres de los países en desarrollo (Ngni, *et al.*, 2012). Durante el año 1997 se observó que uno de cada tres peruanos porta uno o más parásitos intestinales (Náquira, 1997).

Buck, *et al.*, en el año 1968, realizaron un estudio en la selva peruana, en los pueblos San Antonio y Cachicoto (Iquitos y Huánuco respectivamente). El estudio halló que los parásitos más comunes en la región eran, en orden de frecuencia: *A. lumbricoides* (79,7%), *T. trichura* (76,6%) y *Ancylostomides* (49,4%).

En 1998, Gárate evaluó el estado nutricional de la población infantil del pueblo de Neshuya, en la selva del Perú, y la correlacionó con la helmintiasis intestinal. Se examinó a 85 niños menores de 6 años, encontrando que el 43,5% estuvo parasitado por helmintos. *A. lumbricoides* fue el de mayor prevalencia (29,41%), seguido de *T. trichura* (27,05%) y *Ancylostomides* (2,35%). En todos los casos, lo más frecuente fue que los afectados presentaran infecciones leves. El 27,3%, de los casos presentó anemia, pero no se observó asociación entre anemia y parasitosis. Otro estudio realizado el año 1998 en dos localidades de Yurimaguas, en el departamento de Loreto, reveló también que la helmintiasis más común era por *A. lumbricoides* (Pascual *et al.*, 2010).

Debido a la importancia del tema, y la falta de estudios actualizados en poblaciones selváticas, en el presente trabajo se realizó una evaluación de la parasitosis intestinal, la anemia y el estado nutricional en niños entre 5 y 17 años de edad, que habitaban en la comunidad de Yantaló.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el mes de febrero de 2011 en Yantaló, uno de los seis distritos que conforman la provincia de Moyobamba en el departamento de San Martín, en la selva peruana (Fotos 1 y 2). Yantaló se encuentra a 15 minutos por carretera de la ciudad de Moyobamba, la capital del departamento de San Martín. El clima tropical varía poco a lo largo del año, se distinguen dos estaciones: una seca, que comienza en junio, y una lluviosa, que se instala completamente a fines del mes de noviembre (Municipalidad Provincial de Moyobamba, 2007). La mayoría de pobladores son dueños de terrenos ubicados fuera del distrito, donde se dedican a la agricultura y a la crianza de animales. Su alimentación consiste principalmente de menestras, cereales, frutas y aves de corral. En cuanto a los servicios de salud con los que cuenta la comunidad, existe un Centro de Salud de atención primaria ubicado en la plaza del distrito que ofrece servicios de hospitalización, laboratorio y centro obstétrico. Los casos más complejos son derivados al Hospital MINSA de Moyobamba. En Yantaló trabaja una organización no gubernamental llamada Fundación Yantaló, que apoya a la comunidad de distintas maneras desde el 2005. Entre sus actividades, destacan la entrega de suplementos vitamínicos a todos los niños que asisten al colegio, la realización de charlas educativas, la instalación de tachos de basura cada 100 metros, entre otras.

Según el censo realizado por la Fundación Yantaló en el año 2010, este distrito cuenta con una población de 3.500 personas, de los cuales 274 son niños entre 5 y 17 años. Esta fue nuestra



Foto 1. Vista panorámica de Yantaló.



Foto 2. Niños de Yantaló.

población objetivo, ubicando a 124 niños de los cuales descartamos a 4 por contar con los siguientes criterios de exclusión: uso de antiparasitarios en los últimos 3 meses (3) y falta de colaboración con el estudio (1). Así, se realizaron finalmente 120 encuestas.

Se realizó un estudio observacional, transversal y descriptivo. Para la recolección de las variables del estudio, se dividió el mapa del distrito en tres secciones, cuidando que la distribución geográfica de las casas fuera uniforme. Los investigadores fueron repartidos y recorrieron estas secciones preguntando casa por casa por los niños de edades entre 5 y 17 años. Al encontrar algún niño, se procedió a conversar con el apoderado y conseguir su consentimiento (el cual fue firmado), así como el asentimiento del niño. Seguidamente, se obtuvieron las siguientes variables:

Condiciones sanitarias y evaluación nutricional: Se realizó un cuestionario exploratorio de las condiciones sanitarias. Este incluyó el tratamiento del agua, deposición de excretas y eliminación de basura. Para la evaluación nutricional se realizó una encuesta nutricional dirigida.

Medición de Hemoglobina: Se realizó la toma de muestra de sangre capilar por punción del pulpejo del dedo, previa limpieza del sitio, utilizando lancetas especiales para su posterior lectura utilizando un hemoglobímetro automatizado modelo *HemoCue® Hb 201 DM*, 2011 La clasificación de anemia se realizó según la Organización Mundial de la Salud, 2011).

Evaluación copro-parasitológica: Se recolectó una muestra de heces frescas a la que se aplicaron los métodos de a) Concentración por sedimentación espontánea en tubo, utilizando lugol para su posterior observación al microscopio (de alto rendimiento, simplicidad técnica y bajo costo, Pajuelo, *et al.*, 2006); b) Cuantitativo o de Kato-Katz, el cual determina el número de huevos de helmintos por gramo de heces y permite establecer la intensidad de infestación parasitaria, y c) Harada-Mori, que permite el desarrollo de huevos a estadios larvales, principalmente de anquilostomídeos (Beltrán *et al.*, 2003).

Desnutrición: Se midió la talla y el peso de cada niño para establecer el índice talla/edad, indicador de desnutrición crónica. La clasificación de la desnutrición crónica se realizó según la descrita por Waterlow, 1973.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico SPSS versión 16 para Windows, calculándose medidas de tendencia central y de dispersión. Para las variables categóricas se utilizó la prueba de T de Student.

RESULTADOS

Se analizó un total de 120 niños con edades entre 5 a 17 años, que habitaban en el distrito de Yantaló. De este total, 56 (46,7%) fueron niños, y 64 (53,3%) fueron niñas. La mediana de su edad fue de 10 años (rango intercuartílico: 7 - 13).

La media de la hemoglobina fue de $12,3 \pm 1,3$ g/dL (rango: 9,4 g/dL - 16,6 g/dL). El 28,3% (34) de los niños presentó algún grado de anemia, 19 (15,8%) de grado leve y 15 (12,5%) de grado moderado; ninguno presentó anemia severa. En cuanto a la evaluación del estado nutricional, un total de 44 niños (36,7%) presentaron algún grado de desnutrición, 35 (29,2%) de grado leve, 7 (5,8%) de grado moderado y 2 (1,7%) de grado severo, como se muestra en la Tabla 1.

El 100% de la población no contaba con agua potable -obtenían agua de un camión cisterna que la recolectaba de un río cercano- aunque solo el 42,5% solía hervir el agua para beber. En cuanto a la deposición de excretas, la mayoría lo hacía en un *water* o letrina (77,5%), 25 (20,8%) en un pozo ciego y 2 (1,7%) en campo abierto. La basura se eliminaba principalmente (88,3%) por un camión basurero, aunque otros métodos fueron en basural (4,2%), por quemado (3,3%), en una acequia (1,7%), en un huerto (1,7%) y peridomiciliario (0,8%), como figura en la Tabla 1.

En total se encontraron 64 niños parasitados (53,3%), de los cuales 13 (20,31%) estuvieron poliparasitados. Del total de niños parasitados, 38 (59,38%) presentaron infección por helmintos y 28 (43,75%) por protozoarios. El parásito patógeno más frecuentemente encontrado fue *T. trichura* en 24 niños (37,5%), seguido por *A. lumbricoides* en 8 niños (12,5%) y de los *Anquilostomídeos* en 5 niños (7,8%). En relación a los protozoarios, el más prevalente fue *Entamoeba histolytica* en 8 niños (12,5%), seguido por *Giardia lamblia* en 7 (10,9%), como se muestra en la Figura 1.

El promedio de carga parasitaria al emplear el método de Kato-Katz fue de 327,03 huevos

Tabla 1. Características generales de los niños de 5 a 17 años que habitan en la comunidad de Yantaló (n = 120)

	n	%
Características del niño		
Sexo masculino	56	46,7
Sexo femenino	64	53,3
Desnutrición crónica		
No presenta	76	63,3
Leve	35	29,2
Moderada	7	5,8
Severa	2	1,7
Anemia		
Sin anemia	86	71,7
Anemia leve	19	15,8
Anemia Moderada	15	12,5
Anemia Severa	0	0,0
Características de la vivienda		
Suelen hervir el agua que van a beber	51	42,5
Deposición de excretas		
Wáter o Letrina	93	77,5
Pozo ciego	25	20,8
Campo abierto	2	1,7
Eliminación de basura		
Basurero	106	88,3
Basural	5	4,2
Quemado	4	3,3
Acequia	2	1,7
Huerto	2	1,7
Peridomicilario	1	0,8

por gramo de heces (hpg), con un valor máximo de 4.948 hpg y un mínimo de 24 hpg. Todas las infecciones por *A. lumbricoides*, *T. trichura* y *Anquilostomideos* presentaron una carga parasitaria leve. De los 120 niños, 44 (36,7%) tuvieron algún grado de desnutrición crónica, y de estos el 68,18% estaban parasitados, como se aprecia en la Figura 2.

Se presentó un mayor porcentaje de anemia en aquellos niños parasitados con *Anquilostomas*, *T. trichura*, y en los poliparasitados, como se observa en la Figura 3. La cantidad de larvas observadas en la técnica de Harada-Mori en los cinco niños positivos a anquilostomideos fue escasa como para determinar la prevalencia de *Ancylostoma* o *Necator*.

DISCUSIÓN

Es importante entender que las principales medidas para disminuir la tasa de infección parasitaria son la prevención y promoción de la salud, educación sobre el adecuado lavado de manos, higiene personal y tratamiento del agua. Como se expuso anteriormente, el 100% de la población no cuenta con agua potable; por el contrario, recolectan agua de una vertiente llamada “El Morro”. Existen diferentes medidas para poder reducir la contaminación del agua que podrían ser empleadas por los pobladores, como hervir el agua (Niñez *et al.*, 2003; Londoño *et al.*, 2009; Sodha *et al.*, 2011), la filtración lenta en arena (Solarte *et al.*, 2006), el uso de coagulantes naturales (Mbogo, 2008) y la radiación y calor producido por el sol (Mbogo, 2008; Mtapuri-Zinyowera *et al.*, 2009:). Se conocen también otras medidas para el tratamiento de agua más

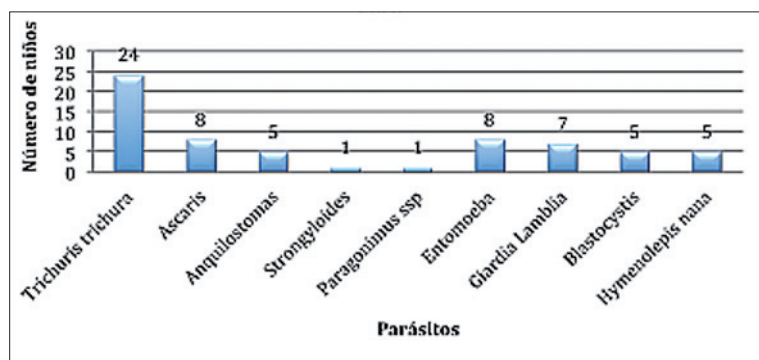


Figura 1. Prevalencia de parasitosis intestinales según especie. Provincia de Yantaló. Departamento de San Martín, Perú.

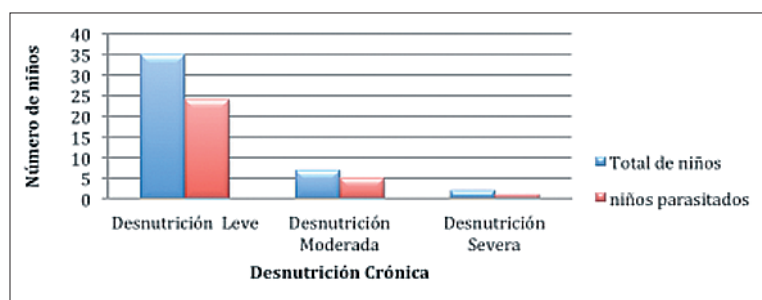


Figura 2. Prevalencia de desnutrición crónica en el total de niños y en niños con parasitosis intestinal. Provincia de Yantalo. Departamento de San Martín, Perú.

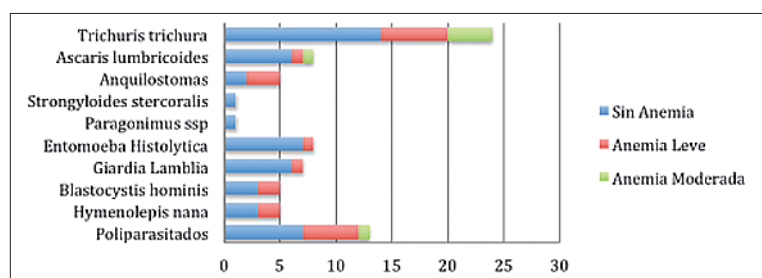


Figura 3. Distribución de parásitos encontrados en los niños de 5 a 17 años de la comunidad de Yantalo y su grado de anemia.

complejas, caras y de menor acceso por parte de los pobladores como la cloración (Solarte *et al.*, 2006 D'Acunzo *et al.*, 2012; Plewa *et al.*, 2012), la ozonificación (Solarte *et al.*, 2006 (Solarte *et al.*, 2006, Rosemblum *et al.*, 2012) y el uso de radiación UV (Plewa *et al.*, 2012).

Un estudio en Tanzania (Knopp *et al.*, 2010) demostró que el lavado de manos después de cada deposición es un factor protector contra las helmintiasis y esta es la intervención más efectiva y menos costosa en la prevención de transmisión de una gran cantidad de enfermedades infecciosas (Pérez *et al.*, 2007). Otras medidas que pueden ser empleadas para disminuir las parasitosis son el lavado de frutas y vegetales, evitar el desbordamiento de fosas y desagües, proteger a los alimentos de suciedades, preparar y conservar los alimentos limpios, mantener la higiene personal y mantener limpio el hogar y sus alrededores (Estrada-Rodríguez *et al.*, 2011). Por lo tanto, es necesario continuar con la concientización y educación de la población, a fin de disminuir los niveles de infección.

Otra causa común de parasitosis es la contaminación de los suelos con heces humanas, que quedan expuestas al contacto de animales y personas. Sin embargo, en la comunidad de Yantalo la mayoría de pobladores cuentan con *Waters o letrinas*,

reduciendo la posibilidad de infección por geo-helminthos al interrumpir su ciclo. A pesar de no haber encontrado una relación significativa entre el uso de letrinas y carga parasitaria, estudios paralelos han demostrado que su uso disminuye la prevalencia de infecciones por geo-helminthos (Sangronis *et al.*, 2008; Xuan *et al.*, 2012). Además, se sabe que las infecciones parasitarias están más asociadas al uso de letrinas que al de baños (Mayor-Puerta *et al.*, 2000; Milano *et al.*, 2007), concluyendo así que si bien el uso de letrinas frente al fecalismo libre ha ayudado a esta población a disminuir los índices de infección, sería conveniente fomentar el cambio de estas letrinas por baños e incentivar el correcto uso de estas desde edades tempranas.

Por otro lado, se observó que el destino final de la basura es un descampado aldeaño al poblado, lo que conlleva a mayor polución y atracción de animales como ratas creando una fuente potencial de infecciones, entre ellas las parasitarias (Adeyeba y Akinbo, 2003). De esta manera, sería recomendable educar e incentivar a la población para que comience a reciclar y reusar los desechos, estas dos medidas son muy eficientes ya que disminuyen una potencial fuente de infección, el daño ecológico y pueden llegar a ser una fuente de ingresos económicos (Hamidul-Bari *et al.*, 2012).

En el presente estudio se encontró que el

35% de niños presentaron infecciones por geohelmintos: el agente causal mas común fue *T. trichura* (37,50%) seguido por *A. lumbricoides* (12,5%) y por *Anquilostomideos* (7,8%). Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Pascual *et al.*, 2010, en los asentamientos humanos de Buena Vista, La Molina, Madeiros y Natividad, en el distrito de Yurimaguas, provincia del Alto Amazonas. Sin embargo, estos resultados difieren a los hallazgos de otros dos estudios locales en donde la infección por *A. lumbricoides* fue la de mayor prevalencia (Gárate, 1998; Pascual *et al.*, 2010). Por lo tanto, se podría concluir que todavía existe una tendencia a la parasitosis en la selva baja, pero su distribución varía entre las distintas comunidades y tiempo. En relación a los protozoarios, las infecciones más comunes fueron por *E. histolítica* y *G. lamblia*, resultados que concuerdan con los hallados por Pascual *et al.*, 2010.

No se observan diferencias estadísticamente significativas al comparar la carga parasitaria en los distintos grupos étnicos, sugiriendo que en los individuos estudiados el sistema inmunitario no ofrece una buena respuesta, asociando las condiciones de alimentación, la consecuente inmunodepresión y la importancia de la vivienda y su entorno como sitio de transmisión, pues todos los individuos se encuentran expuestos de igual forma a los factores de riesgo (Gabaldón, 1967; Sangronis *et al.*, 2008).

La anemia es una condición médica que sigue siendo un problema de gran impacto en el mundo, sobre todo en países en vías de desarrollo. Actualmente en el Perú el porcentaje de anemia en niños de 6 a 36 meses de edad es de 50,3%, siendo la sierra la región natural con valores más elevados (60,1%), seguida por la selva con 52,5% y la costa con un 41,5% (Instituto Nacional de Estadística e Informática, 2010). De los niños estudiados, 28,3% tuvieron algún grado de anemia, según se indica en la Tabla 1 y la Figura 3, siendo este porcentaje menor al encontrado por ENDES en el departamento de San Martín (44,8%) (Instituto Nacional de Estadística e Informática, 2010). Esta diferencia de porcentajes se podría deber a que en la comunidad estudiada, los niños tienen acceso a suplementos de hierro, ácido fólico y cianocobalamina (vitamina B12) en los colegios, auspiciados por una ONG que trabaja en la localidad.

En el presente estudio no se encontró una relación directa entre la anemia y la parasitosis in-

testinal. Estos resultados son opuestos a estudios realizados en Malasia (Ngui *et al.*, 2012, Filipinas (Ezeamama *et al.*, 2005) y Nigeria (Osazuwa *et al.*, 2011) donde sí se pudo evidenciar una asociación significativa entre los individuos con infecciones helmínticas y la presencia de anemia. Esto se debe probablemente a que nuestra población de estudio, como se mencionó previamente, tiene acceso a suplementos vitamínicos, pudiendo compensar así la posible anemia causada por la parasitosis. Además, la carga parasitaria no fue lo suficientemente alta en ninguno de los casos como para atribuirle una relación de causalidad (Farid *et al.*, 1969).

Es sabido que la infección por *T. trichura* puede llevar a una pérdida significativa de sangre debido a su ubicación intestinal; se ha demostrado que en niños infectados severamente se puede llegar a una pérdida diaria de 8,6 ml de sangre y que una infección por más de 800 parásitos puede ocasionar una anemia significativa (Farid *et al.*, 1969). Asimismo, la infección por *T. trichura* se considera un factor de riesgo para desarrollar anemia por deficiencia de hierro (Ngui *et al.*, 2012), ya sea por la ingestión de este por parte del parásito o por su deficiente absorción en la superficie intestinal (Robertson *et al.*, 1992). En diferentes estudios se ha logrado determinar una relación directa entre la infección por *T. trichura* y la presencia de anemia (Quihui-Cota *et al.*, 2010; Ngui *et al.*, 2012). En nuestro estudio, el 41,7% de casos de *T. trichura* presentaron algún grado de anemia.

Respecto a los niños infectados por *Anquilostomideos*, 60,0% de ellos presentó algún grado de anemia. Se ha demostrado que, al igual que la infección por *T. trichura*, los *Anquilostomideos* producen anemia por deficiencia de hierro (Jonker *et al.*, 2012); cada parásito, individualmente, puede llegar a causar una pérdida diaria de 0,2 ml de sangre (Farid *et al.*, 1969). En el estudio realizado por Robertson *et al.*, (Robertson *et al.*, 1992) se encontró que las infecciones de baja intensidad por más de un parásito aumentan el riesgo de anemia. Nosotros encontramos que el 46,2% de niños poliparasitados presentaron algún grado de anemia.

La desnutrición crónica es un proceso por el cual las reservas orgánicas que el cuerpo ha ido acumulando mediante la ingesta alimentaria se agotan debido a una carencia calórico-proteica. El último reporte realizado por el INEI-ENDES (2010) indicó que en el Perú existe un 17,9% de

desnutrición crónica (21,7% en la selva). En el estudio realizado se detectó que un 36,7% de niños presentó algún grado de desnutrición crónica, como se muestra en la Tabla 1 y la Figura 2, siendo este valor mayor al reportado en el departamento de San Martín (19,7%) (INEI-ENDES, 2010). El 68,8% de niños con desnutrición crónica se encontraban parasitados. El principal mecanismo por el cual la infección por helmintos causa o agrava un cuadro de malnutrición e inhibe el crecimiento es mediante su efecto anorexigénico, disminuyendo el consumo de nutrientes en los pobladores afectados Stephenson *et al.*, 2000.

La principal limitación de este estudio fue el muestreo por conveniencia que se realizó, y que solo pudo cubrir a 124 de los 274 niños que habitan en dicha comunidad. Además, no podemos saber si los suplementos proporcionados por la ONG han modificado los valores de anemia en la población.

Podemos concluir que a pesar del apoyo brindado por la ONG mencionada, la zona estudiada, debido a sus características medioambientales y sanitarias, sigue siendo un área endémica de diversas parasitosis.

Por último, se sugiere que el gobierno y las instituciones competentes mejoren e implementen nuevas estrategias en saneamiento ambiental y educación, siendo esto crucial para disminuir las tasas de anemia, desnutrición crónica y parasitosis intestinal en poblaciones de similares características epidemiológicas.

REFERENCIAS

1. ADEYEBA OA, AKINBO JA. 2003. Profile of potentially pathogenic intestinal parasites and bacterial agents in solid wastes in Ibadan Municipality. *Afr J Clin Exp Microbiol.* 4(1): 31-43.
2. BELTRÁN M, TELLO R, NÁQUIRA C. 2003.- Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.
3. BUCK A, SASAKI T, ANDERSON R. 1968. In: Health and disease in four Peruvian villages; contrasts in epidemiology. Baltimore: The John Hopkins Press.
4. D'ACUNZO F, DEL CIMMUTO A, MARINELLI L, et al. 2012. Ready-to-eat vegetables production with low-level water chlorination. An evaluation of water quality, and of its impact on end products. *Ann Ist Super Sanita.* 48(2): 151-160.
5. ESTRADA-RODRÍGUEZ J, AMARGÓS-RAMÍREZ J, CABRERA-FERNÁNDEZ S, PEÑA-MARRERO M, RUBIO-LÓPEZ E. 2011. Estrategia educativa para la prevención del parasitismo en edades pediátricas. *Revista AMC.* 15(1): 1-11.
6. EZEAMAMA AE, FRIEDMAN JF, OLVEDA RM, ACOSTA LP, KURTIS JD, MOR V, et al. 2005. Functional significance of low-intensity polyparasite helminth infections in anemia. *J Infect Dis;* 192(12): 2160-2170.
7. FARID Z, PATWARDHAN VN, DARBY WJ. 1969. Parasitism and Anemia. *Am J Clin Nutr.* 22(4): 498-503.
8. GABALDÓN A. 1967.- Papel del pediatra en un programa nacional de control de la ascariasis. *Arch Venez Puer Ped* 30: 215-253.
9. GAMBOA MI, KOZUBSKY LE, COSTAS ME, GARRAZA M, CARDOZO MI, SUSEVICH ML, et al. 2009. Associations between geohelminths and socio-environmental conditions among different human populations in Argentina. *Rev Panam Salud Publica* 26(1): 1-8.
10. GÁRATE I. 1998. Geohelminthiasis y estado nutricional en la población infantil de una localidad de la amazonia. [Tesis Doctoral]. Lima: Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- 11.- GÓMEZ M, ORIHUELA J, ORIHUELA M. 1999.- Parasitismo intestinal en círculos infantiles. *Rev Cubana Med Gen Integr.* ;15(3):266-269.
12. HAMIDUL-BARI Q, MAHBUB-HASSAN K, EHSANUL-HAQUE M. 2012. Solid waste recycling in Rajshahi city of Bangladesh. *Waste Manag.*
13. HEMOCUE®. 2011. A Quest Diagnostics Company [homepage en Internet]. HEMOCUE® AB [Actualizado en el 2011, citado el 23 de julio del 2012]. Disponible en: http://www.hemocue.com/international/Products/The_Method-1151.html
14. HUTCHINSON SE, POWELL CA, WALKER SP, CHANG SM. 1997. Grantham-McGregor SM. Nutrition, anaemia, geohelminth infection and school achievement in rural Jamaican primary school children. *Eur J Clin Nutr.* 51(11): 729-735.
15. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA E INFORMÁTICA. 2010. Perú: Indicadores de resultados de los programas estratégicos, 2010. Encuesta Demográfica y de Salud Familiar - ENDES.
16. JONKER FAM, CALIS JCJ, PHIRI K, BRIENEN EAT, KHOFFI H, BRABIN BJ, et al. 2012. Real-time PCR demonstrates *Ancylostoma duodenale* is a key factor in the etiology of severe anemia and iron deficiency in Malawian pre-school children. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(3): e1555.
17. KNOPP S, MOHAMMAD KA, STOTHARD JR, KHAMIS IS, ROLLINSON D, et al. 2010. Patterns and risk factors of helminthiasis and anemia in a rural and a peri-urban community in Zanzibar, in the context of helminth control programs. *PLoS Negl Trop Dis.* 4(5): e681.
18. LONDOÑO A, MEJÍA S, GÓMEZ-MARÍN J. 2009. Prevalencia y factores de riesgo asociados a parasitismo intestinal en preescolares de zona urbana en Calarcá, Colombia. *Rev Salud Pública.* 11(1): 72-81.
19. MAYOR-PUERTA AM, SÁNCHEZ-ÁLVAREZ ML, PÉREZ-RODRÍGUEZ N, GÓMEZ-PERALTA C. 2000. El laboratorio en la investigación-acción de la

- comunidad. Rev Cubana Hig Epidemiol. 38(1): 17-23.
20. MBOGO SA. 2008. A novel technology to improve drinking water quality using natural treatment methods in rural Tanzania. J Environ Health. 70(7): 46-50.
21. MILANO A, OSCHEROV EB, PALLADINO AC, BAR AR. 2007. Enteroparasitosis infantil en un área urbana del nordeste argentino. Revista Medicina (B. Aires). 67(3): 238-242.
22. MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ (MINSa). Oficina General de Estadística e Informática.
23. MTAPURI-ZINYOWERA S, MIDZI N, MUCHANETA-KUBARA CE, SIMBINI T, MDULUZA T. 2009. Impact of solar radiation in disinfecting drinking water contaminated with *Giardia duodenalis* and *Entamoeba histolytica*/dispar at a point-of-use water treatment. J Appl Microbiol.; 106(3): 847-52.
24. MUNICIPALIDAD PROVINCIAL DE MOYOBAMBA. 2007. Proyecto Especial Alto Mayo/Plan Vial Participativo de Moyobamba 2007-2011.
25. NÁQUIRA C. 1997. Diagnóstico y tratamiento de las enteroparasitosis. La Revista Médica. 3:18-26.
26. NÚÑEZ FA, LÓPEZ JL, DE LA CRUZ AM, FINLAY C. 2003. Factores de riesgo de la infección por *Giardia lamblia* en niños de guarderías infantiles de ciudad de la Havana, Cuba. Cad Saúde Pública. 19(2): 677-682.
27. NGUI R, LIM YAL, CHONG KIN L, SEK CHUEN C, JAFFAR S. 2012. Association between Anaemia, Iron Deficiency Anaemia, Neglected Parasitic Infections and Socioeconomic Factors in Rural Children of West Malaysia. PLoS Negl Trop Dis. 6(3): e1550.
28. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2011. Concentraciones de hemoglobina para diagnosticar la anemia y evaluar su gravedad. Sistema de información nutricional sobre vitaminas y minerales.
29. OSAZUWA F, AYO OM, IMADE P. 2011. A significant association between intestinal helminth infection and anaemia burden in children in rural communities of Edo state, Nigeria. N Am J Med Sci. 3(1): 30-34.
30. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. 2011. Un Llamado a la Acción: Hacer frente a helmintos transmitidos por el suelo en América Latina y el Caribe.
31. PAJUELO G, LUJÁN D, PAREDES M, TELLO R. 2006. Aplicación de la técnica de sedimentación espontánea en tubo en el diagnóstico de parásitos intestinales. Rev Biomed. 17(2): 96-101.
32. PASCUAL G, IANNAcone J, HERNÁNDEZ A, SALAZAR N. 2010. Parásitos intestinales en pobladores de dos localidades de Yurimaguas, Alto Amazonas, Loreto, Perú. Neotrop Helminthol. 4(2): 127-136.
33. PÉREZ MC, SÁNCHEZ ML, CUETO GA, MAYOR AM, FERNÁNDEZ N, ALEGRET M. 2007. Intervención educativa y parasitismo intestinal en niños de la enseñanza primaria. Rev Cubana Med Gen Integr. 23(2): 35-40.
34. PLEWA MJ, WAGNER ED, METZ DH, KASHINKUNTI R, JAMRISKA KJ, MEYER M. 2012. Differential toxicity of drinking water disinfected with combinations of ultraviolet radiation and chlorin. Environ Sci Technol. 46(14): 7811-7.
35. QUIHUI-COTA L, MORALES-FIGUEROA GG, ESPARZA-ROMERO J, VALENCIA ME. 2010. Astiazarán-García H, Méndez RO, et al. Trichuriasis and low-iron status in school children from Northwest Mexico. Eur J Clin Nutr. 64(10): 1108-1115.
36. ROBERTSON LJ, CROMPTON DWT, SANJUR D, NESHEIM MC. 1992. Haemoglobin concentrations and concomitant infections of hookworm and *Trichuris trichiura* in Panamanian primary school children. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 86(6): 654-656.
37. ROSENBLUM J, GE C, BOHREROVA Z, YOUSEF A, LEE J. 2012. Ozonation as a clean technology for fresh produce industry and environment: sanitizer efficiency and wastewater. J Appl Microbiol. 2012 Jul 13. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05393.x.
38. SANGRONIS MV, et al. 2008. Geohelmintiasis intestinal en preescolares y escolares de una población rural: realidad socio-sanitaria. Estado Falcón, Venezuela. Rev Soc Ven Microbiol. 28(1): 14-19.
39. SODHA SV, MENON M, TRIVEDI K, ATI A, FIGUEROA ME, AINSLIE R, et al. 2011. Microbiologic effectiveness of boiling and safe water storage in South Sulawesi, Indonesia. J Water Health. 9: 77-85.
40. SOLARTE Y, PEÑA M, MADERA C. 2006. Transmisión de protozoarios patógenos a través del agua para consumo humano. Colomb Med. 37(1): 74-82.
41. STEPHENSON LS, LATHAM MC, OTTESEN EA. 2000. Malnutrition and parasitic helminth infections. Parasitology. 121: S23-38.
42. WATERLOW W. 1973. Note on the assessment and classification of protein-energy malnutrition in children. Lancet. 2: 87.
43. XUAN LTT, HOAT LN, RHEINLÄNDER T, DALSGAARD A, KONRADSEN F. 2012. Sanitation behavior among schoolchildren in a multi-ethnic area of Northern rural Vietnam. BMC Public Health. 12: 140.
44. ZAMALIAH MM, MOHD N, MOHD T, KHOR G, TEE ES. 1998. Socio-economic determinants of nutritional status of children in rural peninsular Malaysia. Zamaliah Asia Pacific J Clin Nutr. 7(3): 307-310.

Agradecimientos: Al Dr. César Náquira por el asesoramiento durante toda la investigación y al apoyo brindado por el Dr. Juan Jiménez y nuestro compañero Álvaro Taype Rondán.

Financiamiento: El presente trabajo fue posible gracias al apoyo recibido por parte de la Fundación Yantaló (www.yantalo.org), y de la Dra. Paula E. North, Directora Médica del Laboratorio de Medicina y Patología del Children's Hospital of Wisconsin.

Rol de la Imagenología en el diagnóstico de las parasitosis

CANALS M.^{1,2,3}

¹ Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

² Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

³ Servicio de Radiología, Hospital del Salvador y F.A.L.P.

ABSTRACT

THE ROLE OF MEDICAL IMAGING IN THE DIAGNOSIS OF PARASITIC DISEASES

The involvement of medical images at different stages of diagnosis and treatment of various diseases has been progressing systematically. Parasitology is no stranger to this trend, becoming imaging diagnosis more and more relevant as diagnostic support. This study attempts to establish the current role of imaging by analyzing 72 parasitic diseases with multivariate analysis techniques. We found that imaging has a role in 53.2% and a high diagnostic specificity involvement in 17.8% of parasitic diseases. There are a group of parasites which involved imaging virtually all diagnostic stages such as hydatidosis, fascioliasis and neurocysticercosis and others in which imaging diagnosis has practically no role. The key role of imaging is in supporting diagnosis (40.3%) extension delimitation of (41.9%) and evaluation of complications and prognosis (43,5%).

Key words: Medical imaging, supporting diagnosis, imagen in parasitology.

RESUMEN

La participación de las imágenes médicas en las diferentes etapas del diagnóstico y tratamiento de diferentes enfermedades ha ido progresando sistemáticamente. La parasitología no es ajena a esta tendencia, siendo cada día más relevante como apoyo diagnóstico. En este estudio se intenta establecer el rol actual de la imagenología mediante el análisis de 72 parasitosis con técnicas de análisis multivariado. Encontramos que la imagenología tiene algún rol en el 53,2% y una participación diagnóstica de alta especificidad en un 17,8% de las parasitosis. Hay un grupo de parasitosis donde la imagenología participa prácticamente en todas las etapas diagnósticas como la hidatidosis, neurocisticercosis y fascioliasis y otras en las que prácticamente no tiene ningún rol. El rol fundamental se encuentra en el apoyo diagnóstico (40,3%), la extensión (41,9%) y complicaciones y pronóstico (43,5%).

Palabras clave: Imagenología en parasitología, apoyo al diagnóstico, diagnóstico.

Recibido: 14 de Septiembre de 2012. Aceptado: 12 de Noviembre de 2012.

Correspondencia: Mauricio Canals Lambarri. Departamento de Medicina, Facultad de Medicina y Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Las Palmeras 3425, Ñuñoa, Santiago, Chile.
E-mail: mcanals@uchile.cl

INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de W.K. Roentgen de los rayos X en 1895, la medicina ha sido fuertemente influenciada por las imágenes médicas. La capacidad de ver estructuras dañadas casi en forma directa ha sido una gran contribución al diagnóstico y seguimiento de las patologías. Esto ha sido especialmente relevante en los últimos años con el advenimiento de la ultrasonografía, la tomografía computada y la resonancia magnética. A esto hay que agregarle el progresivo incremento en la capacidad de almacenaje de información y procesamiento de imágenes médicas, que redundan en un mejor análisis de la información (Gundermann, 2005; Ghang, 2001). La imagenología participa activamente en el diagnóstico, etapificación, seguimiento y evaluación de complicaciones de diferentes patologías médicas y quirúrgicas.

La parasitología médica no es ajena a esta tendencia, existiendo cada día mas estudios e información en referencia a diferentes parasitosis (Martínez *et al.*, 2005; Palmer y Reeder, 2001; Haddad *et al.*, 2008). Así, en un análisis preliminar se ha propuesto que la imagenología tendría algún rol en aproximadamente 1/3 de las parasitosis y que tendría algún grado de especificidad en 1/3 de éstas (Canals, 1995). Sin embargo el rol de la imagenología en las etapas diagnósticas de las parasitosis no se encuentra suficientemente establecido ni cuantificado, siendo una incógnita para la mayoría de los médicos generales.

El objetivo de este estudio es estudiar y cuantificar el rol de la imagenología en las diferentes etapas diagnósticas de las parasitosis.

MATERIAL Y MÉTODO

Como muestra representativa se consideraron las parasitosis presentes en las publicaciones de Acha y Szifres (2003) y Atías (2006). En total fueron 72 parasitosis que se clasificaron en: i) Protozoosis; ii) Trematodiasis; iii) Cestodiasis; iv) Acanthocefalosis y helmintiasis y v) Enfermedades producidas por artrópodos. Se revisó en cada patología el rol de la radiología clasificándolo en participación en: 1) Complicaciones y pronóstico; 2) Delimitación de extensión; 3) Etapificación; 4) Diagnóstico fortuito; 5) Apoyo diagnóstico y 6) Diagnóstico de

alta probabilidad. Para las últimas tres categorías se utilizaron las siguientes definiciones operacionales:

a) Diagnóstico fortuito: aquel que se realiza durante un examen con baja sensibilidad para la detección de la parasitosis, pero que el hallazgo es altamente específico o casi inequívoco, como ocurre por ejemplo al descubrir un *Ascaris lumbricoides*, en un enema baritado; b) Apoyo diagnóstico: es aquel que se realiza con una buena sensibilidad pero con baja especificidad para la parasitosis, como ocurre por ejemplo en la colitis amebiana en un enema baritado, donde se detectan signos de colitis sin la suficiente especificidad para hacer diagnóstico; c) Diagnóstico de alta probabilidad: es aquel que se realiza con sensibilidad y especificidad suficientes para proponer el diagnóstico pero que no necesariamente lo confirma, como ocurre habitualmente con el diagnóstico de quiste hidatídico.

Con esta clasificación cada parasitosis quedó caracterizada por un vector de 6 componentes constituidos por 1 y ceros. Por ejemplo, el vector (1,1,1,1,1,1) indicaba que la radiología podía participar en todas las categorías definidas. Así, las categorías no eran excluyentes.

A continuación se realizó un análisis multivariado de conglomerados ("clusters") utilizando la distancia de Manhattan y el método de agrupación de Ward con técnicas Q y R (Crisci y López, 1983; Manley, 2004). La técnica Q permitió agrupar las categorías, determinando cuales de éstas es relevante la participación de la imagenología en las etapas diagnósticas de las parasitosis y la técnica R permitió reconocer grupos de parasitosis en los que la imagenología tiene diverso rol.

RESULTADOS

Excluyendo las enfermedades producidas por artrópodos que forman un grupo aparte la imagenología participa fundamentalmente en la evaluación de las complicaciones y pronóstico (43,5%), delimitación de extensión (41,9%) y apoyo diagnóstico (40,3%), teniendo un rol menor en la etapificación, diagnóstico fortuito y de alta probabilidad. Estos dos últimos que en su conjunto corresponden aquellos diagnósticos "muy probables" constituyen el 17,8%. Los tres primeros niveles de participación de la imagenología se mantienen en los diferentes tipos de parasitosis, aunque varían levemente los

Tabla 1. Participación de la imagenología en los diferentes tipos de parasitosis

	Protozoosis	Trematodiasis	Cestodiasis	Acantocéfalo- sis y Helmintiasis	Total
Complicaciones y pronóstico	46,7	50,0	25,0	43,5	43,5
Extensión	40,0	50,0	33,3	43,5	41,9
Etapificación	6,6	0,0	16,7	4,3	6,5
Apoyo					
Diagnóstico	26,7	50,0	33,3	47,8	40,3
Diagnóstico					
Fortuito	0,0	16,7	16,7	6,7	8,1
Diagnóstico de alta probabilidad	6,6	25,0	16,7	0,0	9,7

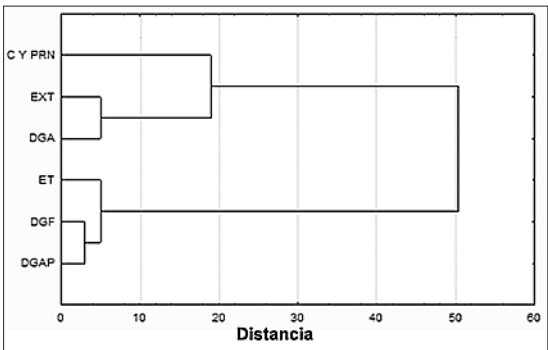


Figura 1. Agrupamiento de las variables imagenológicas relevantes en la evaluación de las parasitosis según distancia de Manhattan y agrupamiento con método de Ward. Complicaciones y pronóstico (CYPRN), Extensión (EXT), Diagnóstico de apoyo (DGA), Etapificación (ET), Diagnóstico fortuito (DGF) y Diagnóstico de alta probabilidad (DGAP).

porcentajes. Es decir en todos los grupos la imagenología cumple fundamentalmente el mismo rol. Sin embargo, llama la atención una mayor participación en diagnósticos de alta probabilidad en Trematodiasis (25%) y Cestodiasis (16,7%) lo que puede estar indicando imágenes más específicas o características (Tabla 1).

El análisis de conglomerados con técnica Q muestra dos grupos fundamentales: (apoyo diagnóstico-complicaciones y pronóstico-extensión) y (etapificación-diagnóstico fortuito-diagnóstico de alta probabilidad) (Figura 1). Esto indica que en la

mayoría de las parasitosis la imagenología participa en conjunto tanto en apoyo diagnóstico, evaluación de extensión y evaluación de complicaciones y pronóstico. El segundo cluster es consecuencia de las imágenes características de algunas parasitosis que a la vez permiten etapificar y realizar diagnósticos fortuitos y de alta probabilidad.

El análisis de conglomerados con técnica R muestra dos clusters fundamentales, uno donde la imagenología tiene un rol relevante incluyendo amebas, Trematodiasis, enfermedad de Chagas e hidatidosis entre otras relevantes, y otro cluster donde la imagenología tiene poco o ningún rol como en las enfermedades producidas por artrópodos, y algunas protozoosis y helmintiasis intestinales. Analizando mas en detalle es posible reconocer 4 grupos de patologías: Grupo I: La imagenología sólo tiene rol en detección de complicaciones y pronóstico; Grupo II: La imagenología no tiene ningún rol; Grupo III: La imagenología participa fundamentalmente en análisis de complicaciones y pronóstico, extensión y diagnóstico de apoyo, y grupo IV: La imagenología participa en prácticamente todas las etapas y tiene imágenes específicas (Figura 2).

DISCUSIÓN

La imagenología juega un rol relevante en alguna etapa diagnóstica en aproximadamente un 53,2% de las parasitosis, pudiendo proponer diagnóstico en cerca del 17,8% de éstas, lo que es un rol des-

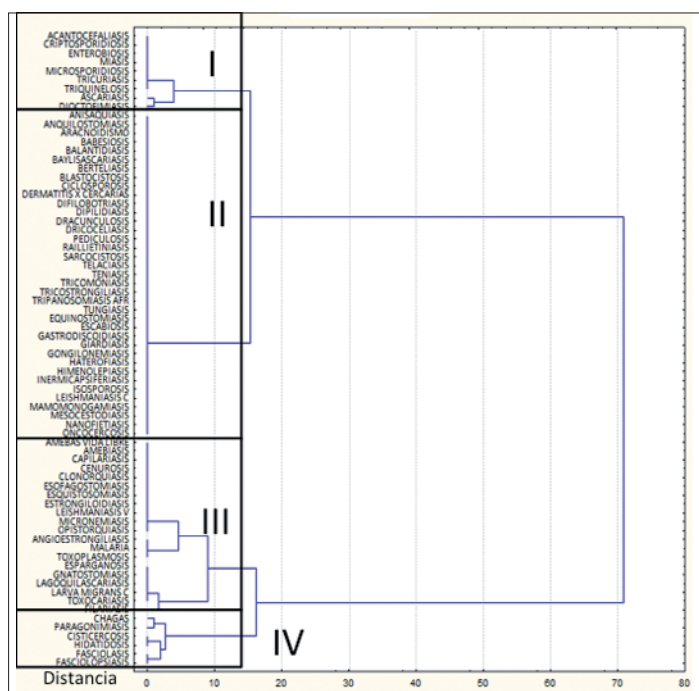


Figura 2. Agrupamiento de las parasitosis según la participación de las variables. Complicaciones y pronóstico (C Y PRN), Extensión (EXT), Diagnóstico de apoyo (DGA), Etapificación (ET), Diagnóstico fortuito (DGF) y Diagnóstico de alta probabilidad, según distancia de Manhatan y agrupamiento con método de Ward.

tacado. Desde este punto de vista, hay dos conglomerados claramente diferenciables de parasitosis: uno en que la imagenología es muy relevante participando fundamentalmente en el apoyo diagnóstico, la extensión y evaluación de complicaciones y pronóstico y puede tener imágenes específicas (grupos III y IV) y otro en el que la imagenología tiene un rol secundario o nulo (grupos I y II). El primer conglomerado coincide con las patologías más estudiadas, relevante y con mayor daño anatómopatológico (Palmer y Reeder, 2001; Haddad *et al.*, 2008) en el que destacan las trematodiasis, cisticercosis y la hidatidosis, que junto a la enfermedad de Chagas forman un cluster muy cercano (grupo IV). Las tres primeras producen imágenes de muy alta especificidad. Por ejemplo *Fasciola hepatica*, tiene imágenes muy características en la ecotomografía con zonas de parénquima heterogéneo, dilatación de la vía biliar e imágenes heterogéneas e hiperecogénicas en el interior de la vía biliar y o en la vesícula. Además esto se traduce en tomografía computada en imágenes hipodensas que dibujan trayectos periféricos subcapsulares y alteraciones

de la perfusión, lo que se encuentra asociado a los trayectos inflamatorios y microabscesos que deja la fasciola en su ingreso al hígado desde el peritoneo. Las imágenes en resonancia magnética son también muy sugerentes, apareciendo éstos trayectos de alta intensidad en las secuencias ponderadas en T2, y con la visión directa de defectos de llene lanceolados en el interior de la vía biliar (Cantisani *et al.*, 2010). Estos últimos corresponden a las fasciolas adultas que presentan una cutícula de baja intensidad de señal en las imágenes ponderadas en T1 y T2 pero con alta señal en los órganos internos del parásito (Figura 3). También la imagenología de la neurocisticercosis ha sido muy estudiada, con imágenes muy características e incluso sus etapas se han clasificado (Escobar 1983; Palmer y Reeder 2001, Del Brutto, 2005; Haddad *et al.*, 2008). Por ejemplo, en la neurocisticercosis parenquimatosa cerebral se han descrito las etapas i) vesicular; ii) coloidal; iii) nódulo-granular e iv) calcificada (Escobar, 1983), evolucionando desde un quiste simple hipodenso en la tomografía computada e hipointenso en T1 e hiperintenso en T2 en la RM, hasta calcificaciones

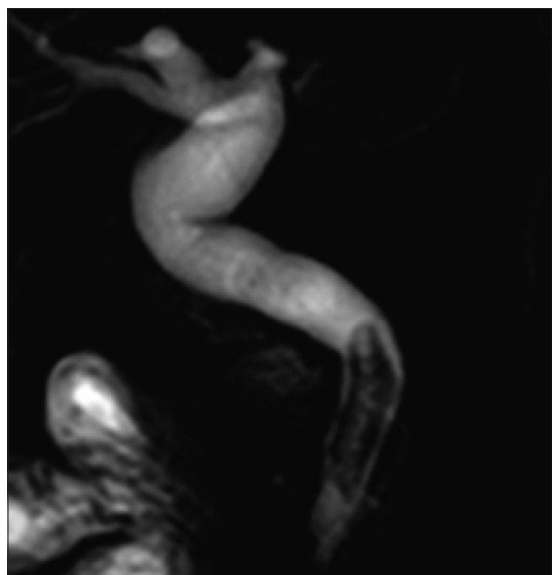


Figura 3. Detección de *Fasciola hepatica* en el interior del colédoco con técnica de colangiorensonancia potenciada en T2. Se puede observar el parásito con su cutícula de baja intensidad y órganos internos de alta intensidad de señal.

dispersas que aparecen hiperdensas en TC e hipointensas en todas las secuencias en RM (Figura 4). También se ha intentado caracterizar los cisticercos mediante espectro RM (Chang *et al.*, 1998; Jayacu-

mar *et al.*, 2004). La hidatidosis por *Echinococcus granulosus* ha sido perfectamente descrita tanto para ecotomografía, TC y RM, existiendo clasificaciones diversas para US y TC (Figura 5). Desgraciadamente éstas no coinciden. Por ejemplo la clasificación de Garbhi (1981) para US clasifica los quistes hidatídicos hepáticos desde el I al V, siendo el I el quiste unilocular y el V el quiste calcificado, mientras que en la clasificación de Polat (2003) para TC el quiste de tipo I es también el unilocular, pero el tipo III es el calcificado y el IV es el complicado. Por otra parte, la OMS (WHO 2003) propuso una clasificación evolutiva para US, donde los clasifica en I: fértil; II: transicional y III: inactivo o calcificado, asemejándose a la clasificación de Polat. Parece ser necesario una clasificación de consenso útil para todas las técnicas: I: fértil (uni o multilocular); II: en transición; III: calcificado y IV: complicado (Tabla 2). La enfermedad de Chagas también tiene una imagenología característica, pero no tan específica. En este caso el rol de la imagenología se encuentra fundamentalmente en el apoyo diagnóstico determinando la presencia o no de miocarditis, por ejemplo a través de la elevación de intensidad de señal en el miocardio en RM con medio de contraste (Gadolinio) en las secuencias T1, o la detección y etapificación de los mega-digestivos (Figura 6), fundamentalmente megaesófago y megacolon (Ma-

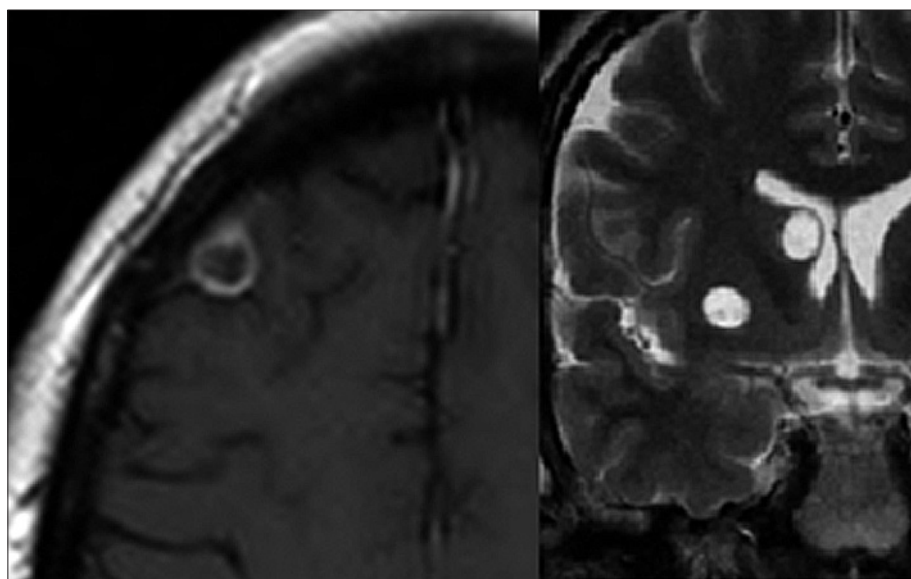


Figura 4. Estados coloidal y vesicular en neurocisticercos en resonancia magnética T1-Gadolinio a la izquierda y T2 a la derecha. Gentileza del Dr. Aarón Vidal.

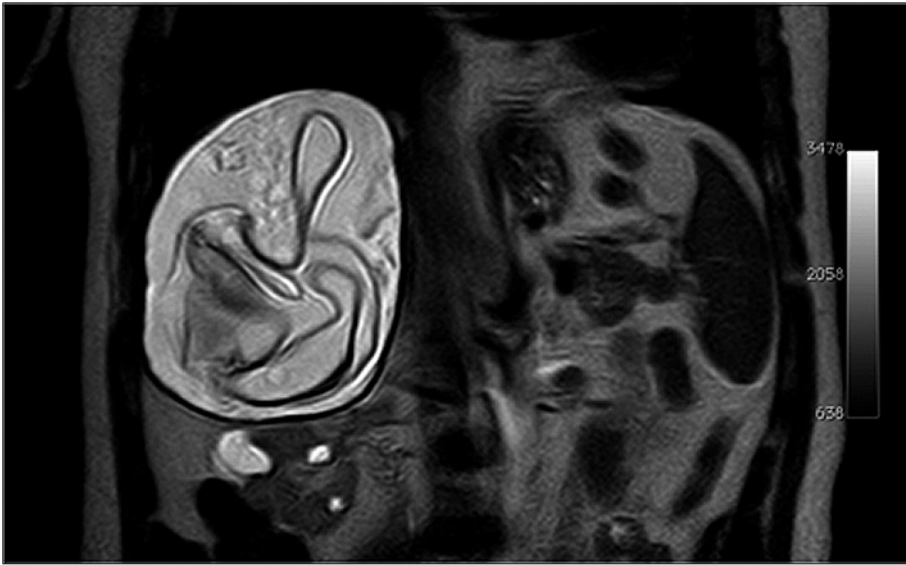


Figura 5. Quiste hidatídico hepático con membrana desprendida y vesículas hijas en una resonancia magnética potenciada en T2.



Figura 6. Radiografía frontal de tórax y lateral con contraste en paciente con enfermedad de Chagas (megaesófago).

tosso y Reeder, 1998; Palmer y Reeder 2001).

Dentro del grupo de las parasitosis en que las imágenes tienen un rol relevante, también se encuentran un grupo de patologías donde la imagen no es lo suficientemente específica pero que juega un rol fundamental en el apoyo diagnóstico, evaluación de extensión y en la evaluación de complicaciones como sucede por ejemplo, en las amebiasis, sean éstas amebas de vida libre (*Acanthamoeba astronyxis*, *Balamuthia mandrillaris*, *Neigleria fowleri*) donde se detectan en TC y RM abscesos

cerebrales, o Abscesos hepáticos amebianos o colitis amebiana por *Entamoeba histolytica*, donde el rol de la imagenología es algo más específico. En el caso de los abscesos amebianos la conjunción de la epidemiología de la zona geográfica, la clínica y la imagenología orientan al diagnóstico, aunque no lo confirman. Del mismo modo las colitis amebianas producen un engrosamiento de la mucosa del colon y úlceras que aunque sugieren el diagnóstico por la pura imagen no permiten un claro diagnóstico diferencial por ejemplo con colitis pseudomembranosa,

Tabla 2. Clasificaciones imagenológicas del quiste hidatídico hepático

	Garbhi 1981	OMS 2003	Polat	Consenso (este artículo)
I	Unilocular	CL:Unilocular CE1:Unilocular con pared y contenido CE2:Multivesicular o multiseptada	Unilocular	= OMS
II	Colección líquida con membranas separadas de la pared	Transicional (CE3): Quiste con membranas desprendidas de la pared	Ila: multilocular Ilb:Imagen en roseta Ilc: Quiste denso con algunas calcificaciones	Quiste con membranas desprendidas o signos de degeneración (cambios en densidad, ecogenidad o intensidad de señal)
III	Quiste multilocular	CE4: Lesión heterogénea, sin vesículas CE5: Calcificado	Quistes muertos (calcificados)	Quistes muertos (calcificados)
IV	Contenido hiperecogénico	-	Complicado	Complicado
V	Calcificado	-	-	-

tiflitis o colitis inflamatorias (Horton *et al.*, 2000). También en la Esquistosomiasis la imagenología tiene un rol de apoyo y detección de complicaciones determinando la presencia de infartos pulmonares, hipertensión pulmonar, daño hepático e hipertensión portal en el caso de *Schistosoma mansoni* y *S. japonicum* y detectando las calcificaciones, compromiso de la vía urinaria y posibilidad de neoplasia en *S. haematobium* (Palmer y Reeder 2001).

Hay un grupo que aunque la imagenología no juega un rol directo, si tiene un rol en la determinación de complicaciones y pronóstico (grupo I), como podría ocurrir por ejemplo en una perforación intestinal por microsporidium (Haddad *et al.*, 2008). Hay, sin embargo, un grupo de patología en que la imagenología no juega un rol relevante como en el caso de las enfermedades producidas por artrópodos como el aracnoidismo, la tungiasis, o la escabiosis. Tampoco en muchas enteroproteoosis tiene mucho que decir, o en acantocéfalo y entrobiosis. En éstos casos es la clínica y el laboratorio quienes tienen rol diagnóstico.

El rol de la imagenología es cambiante. Así en 1995, un análisis similar sugería que sólo en 1/3 de las parasitosis la imagenología tenía un rol relevante y que de éstas en 1/3 jugaba un rol de mayor

especificidad (Canals, 1995), lo que contrasta con la situación actual. Esto se debe fundamentalmente a dos factores correlacionados: 1) el avance tecnológico en la obtención, calidad, registro y análisis de imágenes, y 2) al mayor conocimiento de la anatomía patológica del daño parasitario, especialmente en las parasitosis de baja frecuencia o de zonas geográficas aisladas. En este sentido, es posible que en algún tiempo, alguna parasitosis poco conocida o descrita pueda ser mejor caracterizada en la medida que se describan y publiquen los hallazgos de imagen.

REFERENCIAS

1. ACHA PM, SZYFRES B. 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. Volumen III. Parasitosis. 3ª Ed. Publicación científica y técnica 580: OPS.
2. ATÍAS A. 2006. Parasitología Médica. Santiago, Mediterráneo.
3. CANALS M. 1995. Imágenes y parasitología. Resumen Congreso FLAP.
4. CANTISANI V, CANTISANI C, MORTELE K, PAGLIARA E, D'ONOFRIO M, FERNANDEZ M, D'AMBROSIO U, LOMBARDI V, MARIGLIANO C, RICCI P. 2010. Diagnostic imaging in the study of human hepatobiliary fasciolosis. Radiol Med 115: 83-

- 92.
5. CHANG KH, SONG IC, KIM SH, HAN MH, KIM HD, SEONG SO, JUNG HW, HAN MC. 1998. In vivo single voxel proton MR spectroscopy in intracranial cystic masses. *Am J Neuroradiol* 19: 401-405.
6. CHANG PJ. 2001. Challenges and opportunities for radiology in the next millennium: Re-engineering the radiology practice in an electronic world. *Radiographics* 21: 1013-1014.
7. CRISCI JV, LÓPEZ MF. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Monografía 28. Serie Biología. OEA.
8. DEL BRUTTO OH. 2005. Neurocisticercosis: actualización en diagnóstico y tratamiento. *Neurología* 20(8): 412-418.
9. ESCOBAR A. 1983. The pathology of neurocysticercosis. En Palacios E, Rodríguez-Carbajal J, Taveras JM Eds. *Cysticercosis of the central nervous system*. Springfield: 27-54.
10. GHARBI HA, HASSINE W, BRAUMER MW. 1981. Ultrasound examination of the hydatid liver. *Radiology* 139: 459-463.
11. GUNDERMAN RB. 2005. The medical community's changing vision of the patient: the importance of radiology. *Radiology* 234: 339-342.
12. HADDAD MC, ABD EL BAGI ME, TAMRAZ JC. 2008. *Imaging of parasitic diseases*. Heidelberg, Springer-Verlag.
13. HORTON KM, CORL FM, FISHMAN EK. 2000. CT evaluation of the colon: inflammatory disease. *Radiographics* 20: 399-418.
14. JAYAKUMAR PN, CHANDRASHEKAR HS, SRIKANTH SG, GURUPRASAD AS, INDIRA B, SHANKAR SK. 2004. MRI in vivo proton MR spectroscopy in a racemose cysticercal cyst of the brain. *Neuroradiology* 46: 72-74.
15. MANLEY BFJ. 2004. *Multivariate statistical methods: A primer*. 3ª Ed. Chapman & Hall/CRC.
16. MARTÍNEZ S, RESTREPO S, CARRILLO JA, BETANCOURT SL, FRANQUET T, VARON C, OJEDA P, GIMENEZ A. 2005. Thoracic manifestation of tropical parasitic infections: a pictorial review. *Radiographics* 25: 135-155.
17. MATTOSO LF, REEDER MM. 1998. Radiological diagnosis of Chagas disease. *Semin Roentgenol* 33(1): 26-46.
18. PALMER PES, REEDER MM. 2001. *The imaging of tropical diseases*. Heidelberg. Springer Verlag.
19. POLAT P, KANTAR M, ALPER F, et al. 2003. Hydatid Disease from Head to Toe. *Radiographics* 23: 475-494.
20. WHO Informal Working Group. 2003. International classification of ultrasound images in cystic echinococcosis for application in clinical and field epidemiological settings. *Acta Trop* 85: 253-261.

Agradecimientos: Este estudio surgió gracias a la invitación de parte de la Dra Marisa Torres y el Dr Werner Apt, a participar al Simposio de enfermedades del viajero y emergentes en el Congreso Mundial de Medicina, Santiago 2012, realizado por la Sociedad de Parasitología de Chile.

Modificación de la célula nodriza de *Trichinella spiralis* en ratas Long Evans inmunizadas con antígeno soluble total de *Trichinella spiralis* y sacrificadas en diferentes tiempos

LAREDO S. V. T.¹, MARTÍNEZ M. P. L.¹, REVELES R. G.², MUÑOZ J. J. E.² y MORENO M. A.²

¹ Unidad Académica de Ciencias Químicas.

² Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas. México.
Cuerpo Académico de Biología Celular y Microbiología.

ABSTRACT

MODIFICATION OF NURSE CELL FROM *TRICHINELLA SPIRALIS* IN LONG EVANS RATS IMMUNIZED WITH SOLUBLE TOTAL ANTIGEN OF *TRICHINELLA SPIRALIS* AND SACRIFICED AT DIFFERENT TIMES

The purpose of this study was to evaluate the changes in the *T. spiralis*' nurse cell in Long Evans rats immunized with Total Soluble Antigen *T. spiralis* sacrificed at different times. We worked with 25 male rats of two and a half months old, immunizing 20 of them. Then, the 25 rats were challenged with meat infected with *T. spiralis*, making the sacrifice of five rats each month, plus a rat control during 4 months to slaughter it; the techniques are carried out directly: on-board compression, artificial digestion and Hematoxylin-Eosin; indirect techniques of MIDD and Western Blot were applied for the serums. The result: a reduction in worm load. The maximum effects of protection were observed in the ultimate sacrifice after spending four months. The most obvious change to the nurse cell was a modification of the cyst and parasite's spiral loss. Changes in the nurse cell of *T. spiralis* in Long Evans rats' tissues immunized with AST and sacrificed at different times were evident with direct techniques of C/P, D/A and staining of H/E, we observed that the encystment was lost and the spiral was no longer viable, being statistically significant ($P \leq$ than 0.01).

Key words: *Trichinella spiralis*, nurse cell, changes, TSA, different times.

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue evaluar las modificaciones de la célula nodriza de *T. spiralis* en ratas Long Evans inmunizadas con Antígeno Soluble Total de *T. spiralis* y sacrificadas en diferentes tiempos. Se trabajó con 25 ratas macho de 2 meses y medio de edad, inmunizando 20. Posteriormente las 25 ratas

Recibido: 10 de Abril de 2012. Aceptado 10 de Diciembre de 2012.

Correspondencia: amoreno_29@hotmail.com

fany_fresnillo@hotmail.com; pilly911@hotmail.com

fueron retadas con carne infectada de *T. spiralis*, realizando el sacrificio de 5 ratas cada mes, más una rata control por 4 meses, al sacrificarlas se les realizó técnicas directas de compresión en placa, digestión artificial y la técnica de Hematoxilina-Eosina; a los sueros se les realizó técnicas indirectas de MIDD y Western Blot. Se obtuvo una disminución en la carga parasitaria. El efecto máximo de protección se observó en el último sacrificio después de haber transcurrido 4 meses. La modificación más evidente a la célula nodriza fue la modificación del quiste y pérdida del espiral del parásito. Las modificaciones en la célula nodriza de *T. spiralis* en tejidos de rata Long Evans inmunizadas con AST y sacrificadas en diferentes tiempos fue evidente con las técnicas directas de C/P, D/A y la tinción de H/E, se observa cómo se pierde el enquistamiento y la espiral ya no es viable, siendo estadísticamente significativo con un valor de $P < 0,01$.

Palabras clave: *T. spiralis*, célula nodriza, modificación, AST, diferentes tiempos.

INTRODUCCIÓN

La trichinellosis constituye una enfermedad zoonótica cosmopolita producida por el nematodo *Trichinella spiralis* el cual involucra en su ciclo de vida principalmente al cerdo, la rata y al hombre. Sin embargo, puede afectar a todos los animales carnívoros ya que su transmisión se produce a través de la ingesta de carne cruda o semi cruda de animales portadores de larvas (L1) del parásito en sus musculaturas.

En nuestro medio, los mecanismos más importantes para mantener la trichinellosis son, sin duda, los ciclos rata-cerdo y cerdo-cerdo, dada la crianza doméstica improvisada de cerdos, sin ninguna guía de zootecnia o sanitaria, con alimentación de desechos de comida, además de lo que en su libre deambular encuentre.

Su ciclo biológico contempla dos fases: una **entérica** en donde las LI son liberadas en el estómago de los carnívoros debido a la acción de los jugos gástricos y luego migran al epitelio columnar e intestino delgado en donde rápidamente se diferencian sexualmente y realizan la cópula, los machos mueren y las hembras penetran en la mucosa intestinal y liberando larvas recién nacidas (LRN) las que por vía linfática inician y cumplen la fase **parenteral**. En esta fase las LRN llegan a los músculos principalmente diafragma lengua, laringe, intercostales, bíceps y pectorales. La LRN aumenta su tamaño, empieza a enrollarse e induce la formación de un quiste, puede permanecer estable durante toda la vida del hospedero o

calcificarse. El ciclo se inicia nuevamente cuando estas larvas musculares son ingeridas (LI) por un nuevo huésped carnívoro, incluyendo el hombre. (Cabral *et al.*, 1990).

La prevalencia de la trichinellosis es mayor en las naciones en vías de desarrollo, donde las condiciones socio económicas y de insalubridad ambiental favorecen su transmisión, como sucede en el área de América Latina (Cabral *et al.*, 1990; Despommier, 1997). En México se han presentado numerosos brotes epidémicos de esta zoonosis, tanto en la capital de la República Mexicana como en diferentes estados y porque no se diagnostica con frecuencia en los humanos (Cabral *et al.*, 1990; Lanzas *et al.*, 1995).

Todos los parásitos, incluyendo la *T. spiralis*, escapan a la inmunidad protectora mediante la reducción de su inmunogenicidad o la inhibición de las respuestas inmunitarias de los huéspedes. Los parásitos cambian sus antígenos de superficie durante sus ciclos vitales de dos formas. La primera es el cambio de la expresión antigénica según su estadio (adultos o larvas). El segundo ejemplo es la continua variación de los principales antígenos de superficie de los *Trypanosomas* africanos. Una consecuencia de la variación antigénica en los parásitos es que resulta difícil vacunar a individuos de forma eficaz contra estas infecciones (Abbas, 2002; Lanzas *et al.*, 1995).

El objetivo de este trabajo será detectar los cambios de la célula nodriza de *T. spiralis* en ratas Long Evans inmunizadas con Antígeno Soluble Total del parásito y sacrificadas en diferentes tiempos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material y métodos

Modelo experimental 25 ratas Long Evans machos de 2 meses y medio de edad, formando 5 grupos (A,B,C,D,E) con 5 ratas cada uno:

- Grupo A. 5 ratas las cuales fueron inmunizadas cada semana por 4 ocasiones, a la quinta semana se infectaron con 500 LI de *T. spiralis* vía oral. Dejando un mes la infección para continuar con el sacrificio al término del tiempo establecido.
- Grupo B. 5 ratas las cuales fueron inmunizadas cada semana por 4 ocasiones, a la quinta semana se infectaron con 500 LI de *T. spiralis* vía oral, se dejó por dos meses la infección y luego se efectuó el sacrificio al término del tiempo establecido.
- Grupo C. 5 ratas las cuales se inmunizaron cada semana por 4 ocasiones, a la quinta semana se infectaron con 500 LI de *T. spiralis* vía oral, se dejó por tres meses la infección y posteriormente se sacrificaron.
- Grupo D. 5 ratas mismas que fueron inmunizadas cada semana por 4 ocasiones, a la quinta semana se infectaron con 500 LI de *T. spiralis* vía oral. Dejando cuatro meses la infección para continuar con el sacrificio al término del tiempo establecido.
- El grupo E. (Control) formado por 5 ratas sin inmunizar, a la quinta semana del experimento se infectaron con 500 LI de *T. spiralis* vía oral. Sacrificando una rata por cada grupo experimental cada mes.
- Los animales fueron sangrados vía ocular en la pre-inmunización y post-inmunización para obtener suero, luego se realizó técnicas indirectas (MIDD, IET).
- Se sacrificaron cada grupo de trabajo con una sobredosis de anestésico volátil (Halotano). Por disección se obtuvo músculo esquelético (macetero, lengua, pierna, diafragma) para realizar técnicas directas (C/P, D/A, cortes histológicos, conteo de carga parasitaria).

Las vías de inmunización en las ratas se presentan en la Tabla 1. En cada inmunización se aplicaron 10 µl de AST de *T. spiralis*.

Tabla 1. Vías de inmunización

Etapa de inmunización	Vía de inmunización
1 era.	Intradérmica
2 da.	Subcutánea
3 era.	Intramuscular
4 ta.	Intraperitoneal

METODOLOGÍA

A) Técnicas directas

Compresión en placa: Presionando entre dos laminillas de vidrio, verificando la presencia de *T. spiralis*, en objetivo de (10X) (Del Río *et al.*, 1986). Al sacrificar a los animales se obtiene tejido muscular 0,5 gr (pierna, lengua, diafragma, macetero) por triplicado. Observándolo al microscopio.

Digestión artificial: El proceso se llevó a cabo a 37° C por 24 horas según el método descrito por Del Río *et al.*, en 1986, donde se colocan aproximadamente 30 g de tejido infectado triturado, en un tamiz de tul, en forma de saco; suspendido en una solución de 3,5 ml de HCl, 1,75 gramos de pepsina y 500 ml de agua destilada en un embudo de separación; transcurridas las 24 horas se procedió a separar las LI que se depositaron en el fondo del embudo de separación y se recolectaron en un tubo cónico (Del Río *et al.*, 1986).

Técnica de cortes histológicos: Los tejidos musculares se conservaron en formol al 10% hasta el momento de ser sometidas al proceso de inclusión en parafina. La metodología de la técnica se llevó a cabo de acuerdo a lo propuesto por las Fuerzas Armadas de USA. (*Manual of Histologic 1957 a,b*).

Elaboración del Antígeno Soluble Total de *T. spiralis*: Las LI de *T. spiralis* se colocaron en un mortero con un inhibidor de proteasas (PMSF) 20 µl/ml; y continuando con la extracción por nitrógeno líquido para romper la estructura del parásito, y permitir extraer su contenido antigénico. Se centrifugó por 1 hora a 4° C a 10.000 rpm. Continuando con la separación de la parte soluble la que nos interesa, a la cual se le realizó la determinación de proteínas para saber la concentración del antígeno soluble total de *T. spiralis*. (Bradford, 1976).

B) Técnicas indirectas

Microinmunodifusión doble (MIDD): Prueba conocida como de Ouchterlony, (Ouchterlony O. 1958), se disolvió agar al 1% (0,9 mg de agar) en 100 ml de solución de fosfatos (PBS) y azida de sodio al 1% (como conservador) dejándose hidratar por 5 min continuando con un calentamiento hasta su ebullición.

Se dejó enfriar entre 55 - 65° C, luego el agar se depositó en portaobjetos con una cantidad de aproximadamente de 4,5 ml dejándolo gelificar por 30 min a temperatura ambiente. Se guardaron los portaobjetos a 4° C en cámara húmeda durante 18 hrs.

Se hicieron pozos en forma de flor, con 6 pozos periféricos y uno central, se colocaron 10 µl de la muestra antigénica en el pozo central y en los periféricos el suero de cada rata del estudio, así como controles positivos y negativos (Ouchterlony 1958).

Dejando difundir por 24 hrs a temperatura ambiente en una cámara húmeda, para observar los resultados de la interacción antígeno-anticuerpo que presenten los sueros de cada rata.

Inmunoelectrotransferencia (IET): Los geles que contienen la separación del antígeno soluble total de *T. spiralis* por PAGE, no teñidos se transfirieron a un papel de nitrocelulosa de acuerdo al método descrito por Towbin, se utilizó una cámara de Transblot-cell (Bio-Rad®) a 29 volts, durante toda la noche a 4° C. Se detectaron las bandas específicas de la interacción antígeno-anticuerpo por medio del relevado con 3,3 diamino-benzidina (DAB), 50 mg en 100 ml de PBS, agregándole 20 µl de peróxido de hidrogeno al 30% a 4°C (Laemmil *et al.*, 1990; Towbin *et al.*, 1979).

RESULTADOS

Los resultados se presentan en las Figuras 1- 6.

Se obtuvo una disminución en la carga parasitaria. El efecto máximo de protección se observó en el último sacrificio después de haber transcurrido 4 meses. La modificación más evidente a la célula nodriza fue la modificación del quiste y pérdida del espiral del parásito.

Las modificaciones en la célula nodriza de *T. spiralis* en tejidos de rata Long Evans inmunizadas

con AST y sacrificadas en diferentes tiempos fue evidente con las técnicas directas de C/P, D/A y la tinción de H/E, se observa cómo se pierde el enquistamiento y la espiral ya no es viable, siendo estadísticamente significativo con un valor de $P < 0,01$.

LI de *T. spiralis* obtenidas por la técnica de D/A

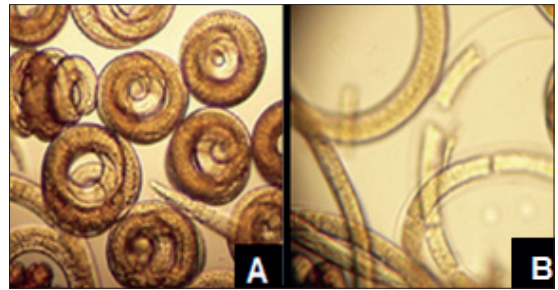


Figura 1. A) Se observa al microscopio óptico de luz con 40X LI de *T. spiralis* después de digestión con pepsina ejemplares del grupo control del modelo experimental con un promedio de 15 LI por campo en espiral. **B)** LI del cuarto sacrificio, no se observa el espiral y están fraccionadas por lo que ya no son viables.

Técnica directa cortes histológicos compresión en placa

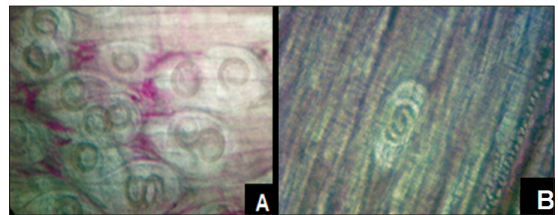


Figura 2. Se observa LI dentro de la célula nodriza al microscopio óptico de luz 10X **A)** Tejido de pierna del grupo control en el cual se observa un promedio de 15 LI de *T. spiralis* por campo, **B)** Tejido de diafragma del cuarto sacrificio se observa cutícula externa casi pérdida, CN paralela a las fibras musculares, pérdida definitiva de los polos o par de lóbulos, presencia de masas de células adiposas, una CN por campo, en los polos hay precipitados finos granulares por toda la cápsula.

Técnica directa cortes histológicos Hematoxilina-Eosina modificación de célula nodriza

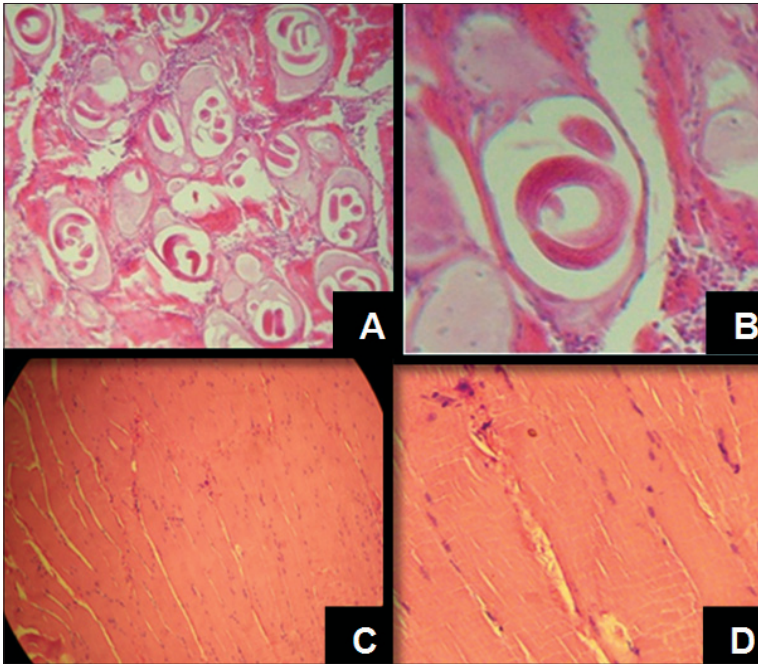


Figura 3. Se observa al microscopio óptico de luz cortes histológicos con técnica H/E, **A)** 10X y **B)** 40x tejido de macetero, grupo control infectado con *T. spiralis* y sin ningún tratamiento se observa presencia de células polimorfonucleares, presencia la LI de *T. spiralis* enquistada y enroscada con cutícula externa en forma alargada, con su polos extremos oscuros, **C)** 10X y **D)** 40X tejido de pierna del cuarto sacrificio, no se observan CN enquistado en tejido muscular.

Técnica indirecta MIDD

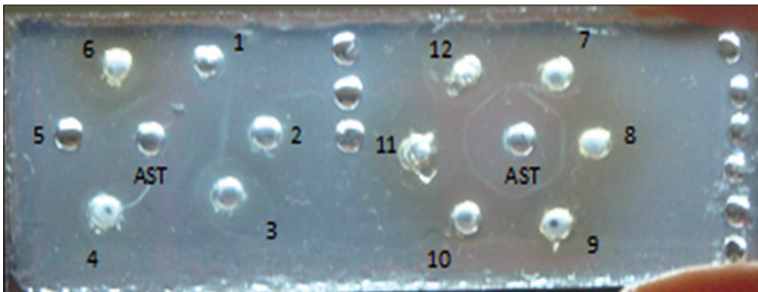


Figura 4 Se observa la interacción Ag-Ac contra *T. spiralis*. Pozo del No. 1 al 4 y 7 al 10 suero de animales inmunizados e infectados, pozo No. 5 y 11 negativos, pozo No. 6 y 12 positivos.

Técnica indirecta WB



Figura 5. Se aprecia el complejo inmune Ag-Ac de *T. spiralis*. Carril (1 a 6) suero de animales pre-inmunizados, en el carril 1 al 6 no se detecta bandeado, carril (7 a 8) suero de animales inmunizados e infectados, se detecta el complejo inmune Ag-Ac, carril 9 suero positivo, carril 10 suero negativo, carril (11 a 18) suero de animales inmunizados e infectados y se aprecia el complejo inmune Ag-Ac, se observa el predominio de una banda de 45 kDa.

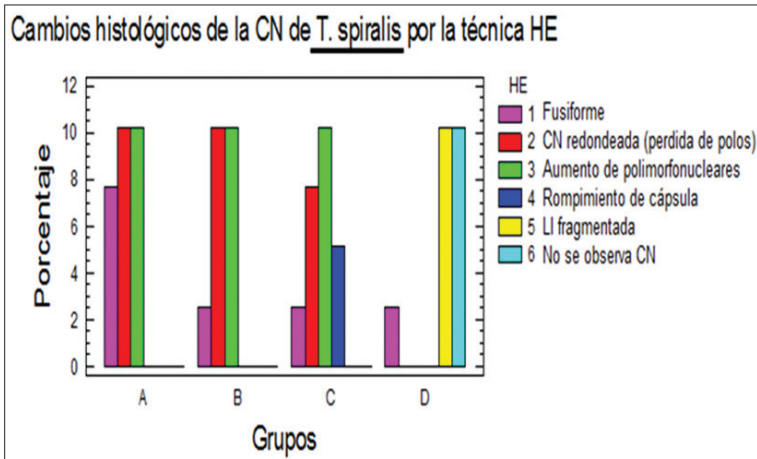


Figura 6. Representación en porcentaje de los cambios morfológicos observados mediante la técnica de H/E y la frecuencia en la que estos aparecen. Los porcentajes sobresalientes en los grupos A, B y C son del 10% indican presencia de polimorfonucleares y en el grupo D el 10% indica fragmentación de la LI y desapareciendo la CN.

DISCUSIÓN

La trichinellosis constituye en la época actual uno de los problemas graves que afectan la salud humana y de las 32 especies de nematodos que parasitan al hombre se ha señalado a *T. spiralis* como la más peligrosa (Cabral *et al.*, 1990), con mayor complejidad antigénica por consecuencia en la especie humana la infección por trichinellosis presenta manifestaciones clínicas y la diversidad de signos y síntomas hacen difícil el diagnóstico clínico (Cabral *et al.*, 1990) que puede pasar como asintomáticas y la patología de *T. spiralis* depende de varios factores, pero está estrechamente relacionada con la carga parasitaria; edad y la inmunidad adquirida los casos graves siempre se deben a infecciones intensas, pues por un lado son consecuencia de la agresión directa del parásito durante su migración y por otro, de la reacción inflamatoria desencadenada; esta última puede causar complicaciones cardíacas (miocarditis, insuficiencia cardíaca o arritmias), neurológicas, (encefalitis, meningitis, convulsiones, alteraciones visuales o auditivas) o pulmonares (neumonitis, pleuresía). Los casos mortales suelen ser consecuencia de miocarditis (Chomel *et al.*, 1993; Pozio y La Rosa, 1990).

Nuestros resultados demostraron que se tuvo un efecto de protección total con el AST y posterior a la infección con *T. spiralis* hubo una disminución de LI, esto fue evidente en el transcurso del experimento utilizando métodos de diagnóstico directos e indirectos.

El estímulo antigénico que es determinado por

las fases del parásito, se produce una inmunidad general (Cabral *et al.*, 1990), formando anticuerpos contra los antígenos esto hace que inhiba el desarrollo normal del parásito.

Las modificaciones en la célula nodriza de *T. spiralis* en tejidos de rata Long Evans inmunizadas con AST y sacrificadas en diferentes tiempos fue evidente con las técnicas directas de C/P, D/A y la tinción de H/E, se observa cómo la *T. spiralis* pierde su enquistamiento, su espiral y se encuentra fragmentada por lo que ya no es viable, obteniendo resultados que son estadísticamente significativos con un valor de $P < 0,01$.

En el presente estudio se demostró en la trichinellosis experimental como en la infección natural existe un estado de inmunidad y resistencia adquirida. La inmunidad total y el estado de resistencia de un hospedero se deben en parte a los estímulos antigénicos.

REFERENCIAS

1. ABBAS AK. 2002. Inmunología Celular y Molecular 4ta. Edición, Editorial McGraw - Hill Interamericana, pág. 367-370.
2. BRADFORD HA. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of proteindyebinding. Annual. Biochem. 72: 248-254.
3. CABRAL J, VILLICAÑA H, FRAGOZO R, CONTRERAS A. 1990. Perfil epidemiológico de la triquinosis en el estado de Zacatecas. Salud Pública Méx; No. 32, pág. 575-582.

4. CHÁVEZ GE, SALDIVAR ES, MUÑOZ EJ, MORENO G A. 2006. Trichinellosis una zoonosis vigente. REDVET, Vol. VII, No. 05, pág. 1-12.
5. CHOMEL BB, KASTEN R, ADAMS C, LAMBLLOTTE D, THEIS J, GOLSMITH R, KOSS J, CHIOINO C, WIDJANA DP, SITISNA P. 1993. Serosurvey of some major zoonotic infections in children and teenagers in Bali, Indonesia. Southeast Asian J Trop Med Public Health No. 24 pág. 321-326.
6. DEL RÍO A, HERRERA DRM, HERRERA R. 1986. Triquinosis experimental I: extracción del antígeno y procedimiento para detectar anticuerpos. Arch. Invest. Med. 17: 359-367.
7. DESPOMMIER DD. 1977. Immunity to *Trichinella spiralis*. Am J Trop Med Hyg No 26: 68.
8. FLISSER A, PÉREZ TR. 2006. Aprendizaje de la parasitología basado en problemas, Triquinellosis Capítulo 50, Editorial ETM, pág. 560-570.
9. LAEMMIL UK, CHERG SH, ADOLPH K, PAULSON JR, BROWN J, BAUMBACH WR. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of heard of bacteriophage T4. 227: 680-685.
10. LANZAS GT, GALARZA MI, SÁNCHEZ J, QUILEZ Y, MARTÍNEZ AVS. 1995. Report: an outbreak of trichinosis in Navarra, Spain. Am J Trop Med Hyg 53: 241-242.
11. MANUAL OF HISTOLOGIC AND SPECIAL STAINING TECHNIC. 1957a. Armed Forces, Institute of Pathology. Washington, D.C. Chapter 2, pp. 7-16.
12. MANUAL OF HISTOLOGIC AND SPECIAL STAINING TECHNIC. 1957b. Armed Forces, Institute of Pathology. Washington, D.C. Chapter 4, pp. 29-38.
13. OUCHTERLONY O. 1958. Diffusion in gel methods for immunological analysis. In: progress allergy. Vol. V Editor: Kallos, P., Basel and New P., Basel.
14. POZIO EG, LA ROSA KD, MURRELL AND LICHTENFELS. 1992. Taxonomic Revision of the genus *Trichinella*. J. Parasitol. 78 (4): 654-659.
15. TOWBIN HT, STANLIN T, GORDON. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets, procedure and some application. Proct Natl Acad Sci USA 76: 4350.

Frecuencia de esquistosomiasis y otras enfermedades parasitarias en Zuata, Edo Aragua, Venezuela 2008-2009

GONZÁLEZ A.¹, MONTENEGRO I.¹, NAVARRO M.¹, DE NOYA B.² y LÓPEZ M.¹

¹ Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Bioanálisis.

² Universidad Central de Venezuela, Instituto de Medicina Tropical.

ABSTRACT

SCHISTOSOMIASIS AND OTHERS PARASITIC DISEASES IN ZUATA, EDO ARAGUA, VENEZUELA 2008-2009

Schistosomiasis is a parasitic disease caused by helminth digenetic trematodes of the genus *Schistosoma*, of which three species affect humans: *Schistosoma japonicum* present in Asia, Africa and *Schistosoma haematobium* *Schistosoma mansoni* latter is the cause of the disease in America. Venezuela is considered a tropical country that meets all weather conditions, socioeconomic and cultural development and establishment of this parasite. The endemic area covers an area of bilharzigena 15.000Km², ie, 1.6% of the country with a high risk population of 200 000 inhabitants. To this end, 101 samples were evaluated for immune testing by ELISA for schistosomiasis and 102 samples for parasitological analysis by the methods: saline 0.85% iodine solution, Faust, Baermann and Kato, collected from three community colleges of Zuata, Aragua State. Any resulting frequency of schistosomiasis by the Kato method and immune coproparasitology ELISA. Stool testing in high prevalence throw protozoa (34.31%) for helminths with a percentage of 13.72%, representing a serious public health problem for children and youth in the community. In addition there was an 51.96% of samples without parasites. Children aged 9 to 11 years were the most affected with these parasites and the incidence of parasites by sex, females accounted for a higher prevalence with 26.47%, although the differences in men is greater.

Key words: Esquistosomiasis, Diagnóstico, Frecuencia, helmintos, protozoarios.

RESUMEN

La esquistosomiasis es una parasitosis causada por helmintos tremátodos digénéticos del Género *Schistosoma*, del cual tres especies afectan al hombre: *Schistosoma japonicum* presente en Asia,

Recibido: 21 de Junio de 2012. Aceptado: 18 de Noviembre de 2012.

Correspondencia: Amelia González.

Universidad de Carabobo, Departamento de Parasitología.

Tel. Directo: 58. 0245-5653929 - Celular: 58. 0414-4251948

E-mail: yarubithgonzalez@hotmail.com, yarubithgonzalez@gmail.com

Schistosoma haematobium en África y el *Schistosoma mansoni* este último es el causante de la enfermedad en América. Venezuela es considerada un país tropical que cumple con todas las condiciones climáticas, socioeconómicas y culturales para el desarrollo y establecimiento de esta parasitosis. El área endémica bilharzigena tiene una superficie de 15.000 Km², es decir, el 1,6% del territorio nacional con una población de riesgo de 200 mil habitantes. Para tal fin se evaluaron 101 muestras para pruebas inmunitarias por el método de ELISA para esquistosomiasis y 102 muestras para análisis coproparasitológicos mediante los métodos: solución salina al 0,85%, solución de lugol, Faust, Baermann y Kato; recolectadas en tres colegios de la comunidad de Zuata, Estado Aragua. Resultando ninguna frecuencia de esquistosomiasis por el método coproparasitológico Kato e inmunitario ELISA. En el análisis coproparasitológico arrojo una alta prevalencia para los protozoarios (34,31%) con respecto a helmintos con un porcentaje del 13,72%, lo que representa un serio problema de salud pública para los niños y jóvenes de la comunidad. Además se presentó un 51,96% de muestras sin parásitos. Los niños con edades comprendidas entre 9 a 11 años fueron los más afectados con dichas parasitosis y en la frecuencia de parasitosis por sexo, las hembras representaron una mayor prevalencia con un 26,47%, aunque las diferencias en cuanto a los varones no es mayor.

Palabras clave: Esquistosomiasis, Diagnóstico, Frecuencia, helmintos, protozoarios.

INTRODUCCIÓN

Las parasitosis intestinales constituyen un serio problema de salud pública, debido a que se encuentran entre las enfermedades más prevalentes dentro de las infecciones tropicales. Estas parasitosis han sido definidas como: toda relación ecológica desarrollada entre individuos de especies diferentes donde se verifica a parte de una asociación íntima y duradera, una dependencia metabólica de grado variable. El parasitismo intestinal se presenta cuando una especie vive dentro del hospedador en el tracto gastrointestinal y el parásito compite por el consumo de sustancias alimentarias (Inceni *et al.*, 1996).

En el mundo los parásitos intestinales afectan a más del 10% de la población en países en desarrollo y, según sea la gravedad de la infección, pueden causar desnutrición, anemia o retraso en el crecimiento. Los niños y las niñas son especialmente vulnerables a los parásitos y, por lo general, tienen mayor cantidad de helmintos en sus intestinos, donde 400 millones de afectados son de edad escolar (UNICEF, 2003).

En términos generales se considera que existe hoy día una población mundial de 1.110 millones de personas infectadas por cestodes, 240 millones por tremátodes y 3.200 millones por nemátodes. De igual manera se acepta que del 20-50% de la población mundial se encuentran afectada por protozoarios (generalmente *Giardia* y Amebas)

incluidos los países desarrollados, por tal razón se debe comprender con exactitud la magnitud del problema (OMS, 2004).

Actualmente los países de América latina y el Caribe reflejan problemas asociados, con bajo nivel de ingreso económico, un crecimiento volátil, gran concentración de riquezas y pobreza extrema; lo que ha traído como consecuencia unas condiciones precarias de salud poblacional. Por lo tanto, representa un aumento de las enfermedades parasitarias (OMS, 2004).

Venezuela por estar ubicada en una zona tropical presenta todas las características climáticas, socioeconómicas y culturales para el desarrollo de las parasitosis, no existiendo ninguna porción del territorio donde no se observe la prevalencia de parásitos en la población humana. Siendo principalmente las zonas costeras cuyo clima favorece las condiciones ecológicas para el desarrollo de los agentes etiológicos productores principalmente de esquistosomiasis (Inceni, 1987).

Dentro de la familia de este tipo de parásito se encuentran cinco especies de *Schistosoma* que afectan al hombre, siendo las mas frecuentes: *S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. mekongi*. Resultando el *Schistosoma mansoni* la única especie que afecta al continente americano y por consiguiente a Venezuela, ocasionando el cuadro clínico denominado Esquistosomiasis (Inceni, 1987).

La Esquistosomiasis o Bilharziasis es una enfermedad producida por tremátodos dioicos pertenecientes a la familia schistosomatidae y al género *Schistosoma*, la especie *S. mansoni* se distribuye principalmente en África, América del sur y las regiones de las cuencas del Caribe (Venezuela, Santo Domingo, Puerto Rico, Guadalupe, Martinica, Santa Lucía y otras Antillas), y de las costas Atlánticas (Brasil y Surinam) (OMS, 1997).

La esquistosomiasis afecta a más de 200 millones de personas con un riesgo de infección de 600 millones de habitantes en 74 países tropicales y subtropicales del mundo en desarrollo; afecta probablemente a más de 10 millones en nuestro continente (Alarcón *et al.*, 1997; Mirkin *et al.*, 2000).

Esta enfermedad es una afección fundamentalmente crónica, que debilita severamente a quienes la padecen, reduce su capacidad productiva y limita su perspectivas de progreso económico y social (Mirkin *et al.*, 2000).

En Venezuela, según estudios anteriores, las áreas endémicas se distribuyen en aquellas zonas donde se encuentran los embalses, ríos y otras cuencas de aguas dulces, es donde se encuentra el hospedador intermediario del *S. mansoni*, *Biomphalaria glabrata*, un caracol planorbideo el cual es necesario para cumplir parte del ciclo de vida del parásito para alcanzar el estadio infectante para los humanos. Este hospedador no es el único pero sí el más importante que se encuentra en el territorio nacional (Balzán, 1992).

A menudo se subestima la importancia de la esquistosomiasis para la salud pública por dos razones primero: como ocurre con la gran mayoría de las enfermedades helmínticas, en toda comunidad la distribución del parásito es generalizada y a su vez desequilibrada es decir un número pequeño de persona tienen infecciones y enfermedades graves, mientras que otro grupo presenta infecciones mas leves y menos sintomáticos. Otras personas tienen muy pocos parásitos y son asintomáticos. Segundo: las enfermedades graves generalmente aparecen al cabo de varios años de infección silenciosa o levemente sintomática lo cual constituye un serio problema de salud publica de enormes proporciones (OMS, 1993).

Esta investigación se enfoco primordialmente en el estudio de la frecuencia de la esquistosomiasis y otras parasitosis intestinales en la población de Zuata en el estado Aragua, durante el año 2007.

Dicha región tiene una superficie de 63,14 Km², una densidad habitacional de 387 por Km² y con una población de 29.473, según el último censo realizado en el año 2002 por Alarcón *et al.*, Se considera endémica ya que según los últimos estudios realizados señala que las comunidades de Curia y de Zuata cumplen con todas las condiciones necesarias para que se desarrolle el hospedador intermediario y esto porque se encuentran irrigadas por tributarios del río Aragua y afluentes del embalse de Zuata. Comportándose el mismo como hábitat de dicho hospedador intermediario (Alarcón de Noya *et al.*, 2003).

El estudio comprendió la parte de análisis coprológico, como análisis serológico debido a que esta enfermedad en el país se caracteriza por tener baja intensidad de transmisión parasitaria, menos de 100 huevos/gramos de heces por lo que un diagnóstico basado en coprología desestimaría la prevalencia certera de la infección (Alarcón de Noya, 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis Coproparasitológico: En cuanto a las muestras de heces se les determinó las características macroscópicas (consistencia, aspecto, color, olor presencia de restos de alimentos y moco). Se midió el pH (con la cinta reactiva), luego se registro en una hoja de reporte.

Inmediatamente se procedió al montaje de los diferentes métodos de diagnóstico coproparasitológico en busca de la presencia de parásitos. Para ello se aplicaron a cada una de las muestras los métodos que a continuación se describe:

Examen Directo

Con Solución Salina Fisiológica (SSF) al 0,85%: La solución salina fisiológica constituye el medio más adecuado para todos los estadios de los parásitos intestinales. Los trofozoítos y quistes de los protozoarios se presentan refringentes; en los trofozoítos, cuando están vivos, se aprecian muy bien las características de sus movimientos además de algunas estructuras como los cuerpos cromatoidales, glóbulos rojos son más fácilmente reconocibles en este tipo de examen (Botero y Restrepo 2003; Atías, 1997).

Con Solución Lugol: La solución de Lugol

se uso, en principio, para teñir los quistes, con la finalidad de determinar el número y la estructura de sus núcleos. Así mismo, también tiñe las masas de glucógeno en los quistes. Los núcleos de la forma, tanto vegetativa como quística, son invisibles en las preparaciones con solución salina. No obstante, esta solución no es satisfactoria para colorear trofozoítos, porque distorsiona la morfología total del organismo (Botero y Restrepo, 2003). Se llevo a cabo de la misma forma que para el examen directo solución fisiológica, pero se sustituye por el uso de la solución Lugol (solución de Dobell y O'Connor) (Botero y Restrepo, 2003).

Método de FAUST (flotación por sulfato de zinc): Esta técnica se uso para el diagnóstico de los protozoarios intestinales que emiten quistes con las heces. Esta técnica permite concentrar huevos livianos de *Anquilostomideos spp* y de *Hymenolepis nana* así como también permite concentrar huevos fértiles de *Ascaris lumbricoides* y de *Trichuris trichiura*.

Método de BAERMANN: Este método es el más indicado para realizar el diagnóstico de strongyloidiasis, para concentrar larvas a partir de materias fecales, cultivos o tierra. Se fundamenta en la atracción que tiene las larvas por la temperatura cálida.

Método de KATO: Esta técnica es útil para detectar la presencia de huevos de helmintos que son ovipuestos por la hembra grávida en la luz intestinal y que son arrastrados con las heces al exterior.

ANÁLISIS PARA PRUEBAS INMUNITARIAS

A.- ELISA-ASH-MPS (Antígeno Soluble de Huevos- Meta Periodato de sodio)

El ELISA se basa en la detección de antígeno-anticuerpo, a través de dos reacciones; la primera con la anti-inmunoglobulina humana marcada con una enzima y una posterior que consiste en la revelación de las reacciones previas, con el sustrato correspondiente del enzima. Esta última reacción se traduce en color, pudiéndose entonces cuantificar en un espectrofotómetro siendo el punto de corte 0,160. Valores mayores a este punto de corte seria positiva la prueba (Alarcón de Noya et al., 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estudió la frecuencia de esquistosomiasis y otras parasitosis intestinales en una población de 101 niños escolares y jóvenes en edades comprendidas entre 6 y 15 años, provenientes de tres colegios de la comunidad de Zuata, obteniéndose los siguientes resultados:

En el análisis de frecuencia de protozoarios de la muestra en estudio, resultó que el 51,96% de la población estudiada, no se observaron formas parasitarias (NSOFP) en las muestras analizadas, mientras que el 12,70%, de niños y jóvenes se encontraban parasitados con *Endolimax nana* representando esta la mayor prevalencia de parásitos. El parásito con menos frecuencia fue *Iodamoeba büschlii* con un 0,98% (Figura 1).

Entre los helmintos con mayor prevalencia se encontraron: huevos de *A. lumbricoides* infértiles con (5,88%) y el de menor fue huevos de *T. trichiura* con un 3,90% (Figura 2).

La frecuencia de parasitismo por los tres colegios estuvo representado en aquellos niños y niñas estudiantes de la U.E.E Primitivo de Jesús con un 54,71%, seguido de la U.E.E Negra Matea (33,96), siendo los jóvenes del Liceo Bolivariano "Zuata" los menos parasitados (11,32%) como se puede observar en la (Figura 3).

En el estudio inmunitario mediante la técnica de ELISA, para la determinación de prevalencia de la esquistosomiasis, resultó que el 100% de la muestra en estudio fueron negativos. Por lo que, no hay presencia de anticuerpos específicos contra antígenos de huevos o vermes de *S. mansoni*, por lo tanto,

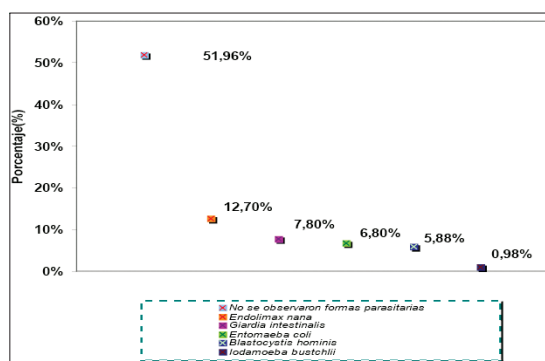


Figura 1. Frecuencia de protozoarios en niños estudiantes con edades comprendidas entre 6 y 15 años de tres colegios de la comunidad de Zuata, Edo-Aragua.

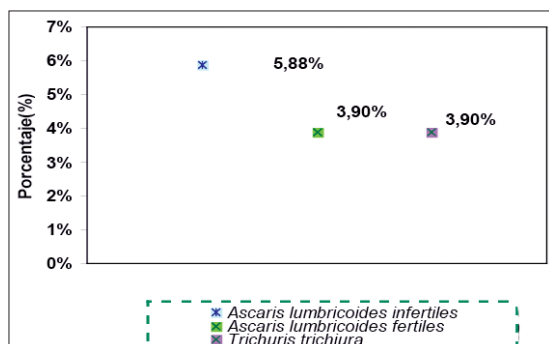


Figura 2. Frecuencia de Helmintos en niños estudiantes con edades comprendidas entre 6 y 15 años de tres colegios de la comunidad de Zuata, Edo Aragua.

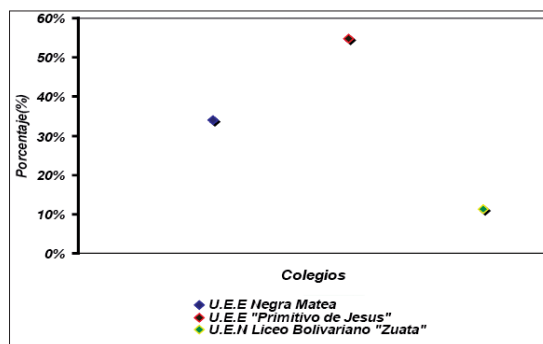


Figura 3. Frecuencia de parasitismo en los tres colegios bajo estudio de la comunidad de Zuata, Edo Aragua con edades comprendidas entre 6 y 15 años.

ningún individuo estudiado en esta investigación presentó la infección. (Datos no mostrados).

REFERENCIAS

1. AMBROSINO F. (2004). Prevalencia de esquistosomiasis mansoni en la población escolar menor de 15 años en el Municipio Revenga año 2004. Trabajo de Grado, Universidad de Carabobo, Maracay.
2. ALARCÓN B, Cesari I, Losada S, Colmenares C, Hoebeke J, Noya O. (1997). Evaluation of alkaline phosphatase immunoassay and comparison with other diagnostic methods in areas of low transmission of schistosomiasis. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 66: 69-78.
3. ALARCÓN B, BALZÁN C, ARTEAGA C, CESARI IY, NOYA O. (1999a). The last fifteen years of schistosomiasis in Venezuela: feactures and evolution. Memorias Instituto Oswaldo Cruz. 94: 139-146.
4. ALARCÓN DE NOYA B, NOYA O, LOSADA S, COLMENARES C, GUZMÁN C, LORENZO M, BERMÚDEZ H. (2002). Laboratory diagnosis of schistosomiasis in areas of low trasmisión. A review of a line of research. Memória do Instituto Oswaldo Cruz. 97 (supl 1): 167-169.
5. ALARCÓN B, NOYA O, RUIZ R, COLMENARES C, LOSADA S, CONTRERAS R, BRUCES C, CERTAD G, HERNAN A, SIERRA C, TORO J, CHACÓN N, CESARI I. (2003). Prevalencia de las parasitosis intestinales y esquistosomiasis en comunidades del área centro norte de Venezuela. Boletín de Malariología y Salud Ambiental. 43: 21-29.
6. ATÍAS A. (1997). Parasitología Médica. Santiago de Chile: Mediterráneo.
7. BALZÁN C. (1992). Un nuevo enfoque en la lucha contra la esquistosomiasis. XXXIX Asamblea Anual Ordinaria y Jornadas Científicas Maracay, Aragua.
8. BOTERO D, RESTREPO M. (2003). Parasitosis humanas (4ª edición) Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas. pág 332-335.
9. EBRAHIM A, MORSHEDY H, OMER E, EL DALY S, BARAKAT, R. (1997). Evaluation of the Kato. Katz Smear and formol ether sedimentation thecnique of quantitative diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection. Amer. J. Tropical Medicine. Hyg. 57: 706-708.
10. INCANI R. (1987). The Venezuelan experiencie in the control of schistosomiasis mansoni. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 82 (supl4): 89-93.
11. INCANI R, AGUILAR CRUZ, DAVILA IY PACHECO M. (1996). Parasitología. Valencia: Tatum 80-102.
12. MIRKIN G, SPATZ L, GONZÁLEZ S. (2000). La esquistosomiasis: una de las enfermedades parasitarias más difundidas en el mundo. En revista ciencia hoy en línea 10: 30-41. <http://www.cienciahoy.org.ar/ln/hoy56/esquistosomiasis.htm>
13. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). (1997). Control de la esquistosomiasis. Viii, 93: Ginebra.
14. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). (2004). *Schistosomiasis* et géohelminthiases: prévention et lutte. Rapport d'un comité d'experts de OMS, En Série de Rapports techniques 912 vol. 12, (pp. 46-54): Geneve.
15. RABELLO A, PONTES L, DIAS-NETO E. (2002). Recent advances in the diagnosis of *Schistosoma* infection: the detection of parasite DNA. Memorias Instituto Oswaldo Cruz. Supl 97 1: 171-172.
16. RIVERO Z, DÍAZ I, ACURERO E, CAMACHO M, MEDINA M, RÍOS L. (2001). Prevalencia de parásitos intestinales en escolares de 5 a 10 años de un instituto del municipio Maracaibo. Revista Hoy en línea. 29: (2) 153-170.
17. UNICEF, UNESCO, OMS. (2003). Série de Rapports techniques, No 912 (www.unicef.org/lifefskills/Fresh-Document.pdf).

Prevalencia del ácaro *Ornithonyssus bursa* Berlese, 1888 (Mesostigmata: Macronyssidae) en un ensamble de aves (Passeriformes) de bosques del centro de la Provincia de Santa Fe, Argentina

ARRABAL J. P.¹, MANZOLI D. E.¹, ANTONIAZZI L. R.¹, LARESCHI M.^{2,3} y BELDOMENICO P. M.^{1,3}

¹ Laboratorio de Ecología de Enfermedades, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. RP Kreder 2805, 3080 Esperanza, Santa Fe.

² Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE, UNLP-CCT La Plata), Calle 2 N° 584, 1900 La Plata, Argentina.

³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, Argentina).

ABSTRACT

PREVALENCE OF *ORNITHONYSSUS BURSA* IN BIRDS PASSERIN AT TWO SITES OF SANTA FE PROVINCE, ARGENTINA

The mite *Ornithonyssus bursa* parasitizes several species of birds of tropical and subtropical regions. In the Neotropics it is responsible for causing significant economic losses as it affects commercial poultry. It also is a vector for diseases, affecting both birds and humans. In this study, we thoroughly examined a reproductive ensemble of birds of the Order Passeriformes, at two sites in the region of the Espinal of Santa Fe province, Argentina, with the aim of describing the parasite-host associations to detect differences in prevalence in natural hosts. Of 55 species examined, 28 were parasitized, of which the most affected species were the rufous hornero (Furnariidae) *Furnarius rufus* (49.4%), the Shiny Cowbird (Icteridae) *Molothrus bonariensis* (40%) and the finch (Emberizidae) *Sicalis flaveola* (48.4%). *M. bonariensis* is a parasitic species and in the study area mainly parasitize *F. rufus*, while *S. flaveola* use abandoned nests of *F. rufus*, so we might conclude that *O. bursa* is highly associated with hornero nests.

Key words: *Ornithonyssus bursa*, mites, nests, *Furnarius rufus*, *Molothrus bonariensis*, *Sicalis flaveola*.

RESUMEN

El ácaro *Ornithonyssus bursa* parasita a diversas especies de aves de regiones tropicales y subtropicales. En el Neotrópico es responsable de causar importantes pérdidas económicas por afectar a aves comerciales.

Recibido: 14 de Diciembre de 2012, Aprobado: 19 de Enero de 2013.

Correspondencia: Pablo Martín Beldomenico. RP Kreder 2805 Esperanza, Santa Fe (3080) Argentina.

Teléfono: (54) 03496-420639 interno: 111-353 Fax: (54) 03496-426304.

E-mail: pbeldomenico@wcs.org - pbeldome@hotmail.com

También es vector de enfermedades que afectan tanto a las aves como al hombre. En el presente estudio, se examinó exhaustivamente un ensamble reproductivo de aves del orden Passeriformes en dos sitios de la región del Espinal de la provincia de Santa Fe, Argentina, con el objetivo de describir las asociaciones parásito-hospedador para detectar diferencias de prevalencias en sus hospedadores naturales. De 55 especies examinadas, 28 estuvieron parasitadas, de las cuales las especies más afectadas fueron el hornero (Furnariidae) *Furnarius rufus* (49,4%), el tordo renegrido (Icteridae) *Molothrus bonariensis* (40%) y el jilguero (Emberizidae) *Sicalis flaveola* (48,4%). *M. bonariensis* es una especie parásita y en el área de estudio parasita principalmente a *F. rufus*, mientras que *S. flaveola* utiliza nidos abandonados de *F. rufus*, por lo que se podría concluir que *O. bursa* está altamente asociado a nidos de hornero.

Palabras clave: *Ornithonyssus bursa*, ácaros, nidos, *Furnarius rufus*, *Molothrus bonariensis*, *Sicalis flaveola*.

INTRODUCCIÓN

Ornithonyssus bursa Berlese, 1888 (Acari: Parasitiformes: Macronyssidae) es un ácaro que parasita a diversas especies de aves en todo el mundo, preferentemente en zonas tropicales y subtropicales (Walter y Proctor, 1999). El ciclo de vida de *O. bursa* está comprendido por cinco etapas, huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto (Sikes y Chamberlain, 1954). Todas se desarrollan entre el material del nido de sus hospedadores y se alimentan principalmente de la sangre de los pichones (Burt Jr. *et al.*, 1991). Después de alimentarse, la hembra pone sus huevos, los cuales maduran en el hospedero o en el material del nido. Dependiendo de las condiciones reinantes, estos huevos pueden eclosionar tan solo un día después de la oviposición. En 7 a 15 días, después de tres mudas, se completa el ciclo (Sikes y Chamberlain, 1954).

En la región Neotropical, *O. bursa* es el ácaro que se encuentra con mayor frecuencia en las aves comerciales (Fletchmann, 1985) y causa importantes pérdidas económicas (Devaney, 1978). En las granjas avícolas, los ácaros del género *Ornithonyssus* pueden transmitir numerosas enfermedades como la viruela aviar, la enfermedad de Newcastle o infecciones debidas a *Pasteurella* spp. (Gállego Berenguer J., 2007; Watson C. Human, 2003). También tienen el potencial de parasitar a los seres humanos, determinando un picor intenso y una dermatitis dolorosa (Baker *et al.*, 1956; Jofré *et al.*, 2009; Angaut Semenas y Rocha, 1998). A su vez, pueden ser vectores de patógenos zoonóticos como el virus de la encefalitis equina del oeste y *Coxiella burnetti* (Valiente Moro *et al.*, 2005).

Se han demostrado los efectos perjudiciales en sus hospedadores naturales, tales como deterioro en el crecimiento y en el desarrollo de los pichones, aumento en la mortalidad de los mismos, aumento de los intervalos entre nidadas, incremento en el costo de la reproducción, disminución en el tamaño de la nidada y abandono de nidos (Moss y Carmin, 1970; Moller, 1987; Barclay, 1988; Clark y Mason, 1988; Moller, 1990; Moller *et al.*, 1990; Chapman y George, 1991; Fauth *et al.*, 1991; De Lope *et al.*, 1993; Moller, 1993; Clayton y Tompkins, 1995; Stoehr *et al.*, 2000; Berggren, 2005). Por otra parte, altos niveles de parasitismo por ácaros han reflejado afección del cuadro hematológico con disminución del hematocrito y anemia (Merino y Potti, 1995; Potti *et al.*, 1999; Stoehr *et al.*, 2000; Szabo K. *et al.*, 2002).

Por todo lo anterior, aumentar el conocimiento sobre la ecología de este parásito es de suma importancia para la industria avícola, la salud pública y la conservación de las aves.

En el presente estudio se examinó exhaustivamente un ensamble reproductivo de aves en dos sitios de estudio, con el objetivo de describir las asociaciones parásito-hospedador para detectar diferencias de prevalencias en sus hospedadores naturales en la región del Espinal de la provincia de Santa Fe, Argentina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los datos fueron recolectados en dos zonas representativas de la región del Espinal, distrito del Algarrobal (Cabrera, 1994): la Reserva de la

Escuela de Agricultura, Ganadería y Granja de la Universidad Nacional del Litoral (S 31° 23' W 60° 55') y un campo privado de la localidad de Recreo (S 31° 30' W 60° 46'). Ambas áreas están separadas por 20 Km de distancia en línea recta.

El clima en la región es templado pampeano, con una temperatura media anual de 21°C y precipitaciones de un rango entre los 800 y los 1.100 mm anuales, que se producen en su mayor parte durante los meses de verano.

Las áreas se ubican sobre la faja de bosques relictales que acompañan el recorrido del río Salado del Norte en la región centro-este, próximo a su desembocadura en el complejo sistema de islas del Paraná.

Los bosques presentan el estrato arbóreo constituido por especies como chañar (*Geoffroea adecorticans*), algarrobo (*Prosopis* sp.), quebrachos blancos (*Aspidosperma quebracho-blanco*), aromos (*Acacia caven*), curupíes (*Sapium haematospermum*), talas (*Celtis tala*), cinacina (*Parkinsonia aculeata*) y ombú (*Phytolaca dioica*). También se encuentran especies invasoras como la acacia negra (*Gleditsia triacanthos*) y mora (*Morus alba*). El estrato arbustivo, esta conformado por especies como la chilca (*Tessariadodo neaeifolia*), la carne gorda (*Maitenivitis aidea*), molles (*Schinus longifolia*) y talas.

En cada sitio, un área de 40 ha fue examinada cada semana durante dos temporadas reproductivas (2008-2009 y 2009-2010) en búsqueda de nidos activos. Al detectar un nido en actividad, se accedió

a éste para constatar la presencia de huevos o pichones, siempre con el máximo cuidado y con el menor disturbio posible sobre la estructura del nido. Pichones de 55 especies fueron examinados cada semana en búsqueda de ectoparásitos (Tabla 1). Los ácaros fueron colectados con pinzas del cuerpo de las aves y fijados en alcohol 96%. Algunos ejemplares de cada muestra se aclararon en lactofenol y luego se montaron utilizando el medio de Hoyer entre porta y cubreobjeto para su identificación taxonómica al microscopio óptico.

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra las prevalencias detectadas para cada especie hospedadora. De 55 especies de aves examinadas, *O. bursa* se detectó en 28 (50,9%). En general, un 14,1% de los pichones estuvieron parasitados, pero las especies más afectadas fueron *Furnarius rufus* (49,43%), *Molothrus bonariensis* (40%), *Sicalis flaveola* (42,66%), *Agelaius badius* (17,24%), *Troglodytes aedon* (15,79%) y *Pitangus sulphuratus* (12,5%) (Figura 1). Se examinaron 55 pichones de *M. bonariensis* de los cuales el 58,18% (32) se encontró parasitando nidadas de *F. rufus* y el 41,81% (23) en nidos de otras especies. Se examinaron 349 pichones de *S. flaveola* de los cuales el 90% (314) estaban utilizando nidos de *F. rufus* y el 10% (35) utilizando nidos de otras especies.

Tabla 1. Prevalencia de ácaros en el ensamble de aves estudiado en la región del Espiral de la Provincia de Santa Fe, Argentina

Especies parasitadas por ácaros	n	Prevalencia %	I.C.95%
<i>Drymornis bridgesii</i>	2	100,00	—
<i>Myiarchus swainsoni</i>	3	100,00	—
<i>Pseudoseiurus lophotes</i>	12	66,67	66,55 - 66,77
<i>Guiraca guiraca</i>	16	56,25	56,12 - 56,37
<i>Empidonotus aurantioatrocristatus</i>	6	50,00	49,86 - 50,13
<i>Tachycineta leucorrhoa</i>	10	50,00	49,86 - 50,13
<i>Vireo olivaceus</i>	8	50,00	49,86 - 50,13
<i>Furnarius rufus</i>	176	49,43	49,29 - 49,57
<i>Sicalis flaveola</i>	349	48,42	48,42 - 48,56
<i>Molothrus bonariensis</i>	55	40,00	39,84 - 40,15
<i>Saltator coerulescens</i>	13	30,77	30,60 - 30,93
<i>Colaptes melanocloros</i>	24	29,17	29,00 - 29,33
<i>Schoeniophylax phryganophilus</i>	14	28,57	28,40 - 28,73

<i>Elaenia parvirostris</i>	45	20,00	19,82 - 20,17
<i>Agelaioides badius</i>	174	17,24	17,06 - 17,41
<i>Saltator aurantirostris</i>	12	16,67	16,48 - 16,84
<i>Troglodytes aedon</i>	152	15,79	15,60 - 15,96
<i>Coryphistera alaudina</i>	65	13,85	13,66 - 14,02
<i>Pitangus sulphuratus</i>	192	12,50	12,31 - 12,68
<i>Phacellodomus ruber</i>	100	9,00	8,81 - 9,18
<i>Turdus amaurochalinus</i>	45	8,89	8,70 - 9,07
<i>Elaenia spectabilis</i>	31	8,00	7,81 - 8,18
<i>Phacellodomus sibilatrix</i>	223	6,73	6,53 - 6,91
<i>Synallaxis frontalis</i>	21	4,76	4,57 - 4,95
<i>Taraba major</i>	25	4,00	3,80 - 4,19
<i>Columbina picui</i>	422	2,84	2,65 - 3,03
<i>Paroaria coronata</i>	212	2,36	2,16 - 2,55
<i>Zenaida auriculata</i>	582	0,34	0,14 - 0,54
<i>Astenes baeri</i>	9	0,00	-
<i>Coccyzus melacoryphus</i>	29	0,00	-
<i>Coryphospingus cucullatus</i>	4	0,00	-
<i>Cranioleuca pyrrhophia</i>	11	0,00	-
<i>Crotophaga ani</i>	5	0,00	-
<i>Geothlypis aequinoctialis</i>	4	0,00	-
<i>Leptasthenura platensis</i>	3	0,00	-
<i>Leptotila verreauxi</i>	35	0,00	-
<i>Machetornis rixosa</i>	3	0,00	-
<i>Mimus saturninus</i>	1	0,00	-
<i>Myiopsitta monachus</i>	2	0,00	-
<i>Molothrus rufoaxillaris</i>	9	0,00	-
<i>Myiophobus fasciatus</i>	2	0,00	-
<i>Pachyramphus polychopterus</i>	2	0,00	-
<i>Patagioenas picasuro</i>	4	0,00	-
<i>Phytotoma rutila</i>	5	0,00	-
<i>Polioptila dumicola</i>	51	0,00	-
<i>Poospiza melanoleuca</i>	4	0,00	-
<i>Saltatricula multicolor</i>	9	0,00	-
<i>Serpophaga subcristata</i>	5	0,00	-
<i>Sporophila caerulea</i>	9	0,00	-
<i>Sublegatus modestus</i>	2	0,00	-
<i>Suiriri suiriri</i>	1	0,00	-
<i>Synallaxis albescens</i>	8	0,00	-
<i>Tapera naevia</i>	10	0,00	-
<i>Xenopsaris albinucha</i>	2	0,00	-
<i>Zonotrichia capensis</i>	27	0,00	-

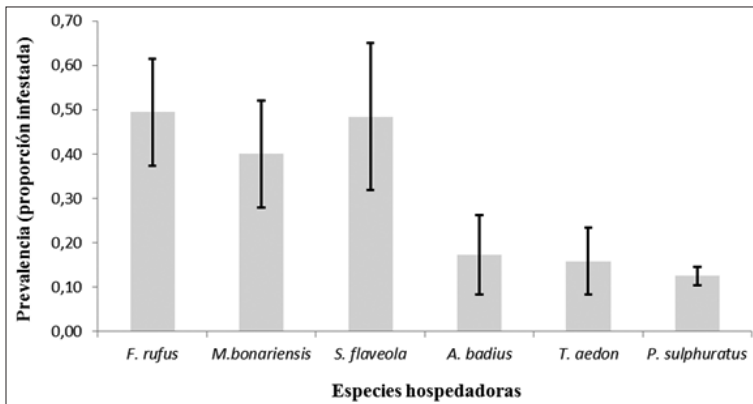


Figura 1. Prevalencia de *O. bursa* para las seis especies hospedadoras más abundantes y/o más parasitadas de las comunidades estudiadas. Las barras de error representan intervalos de confianza del 95%.

DISCUSIÓN

Estudios descriptivos en Argentina reportaron a *O. bursa* en especies de aves silvestres, como por ejemplo Aramburú *et al.*, (2000, 2002, 2003, 2009) en nidos de cotorras (*Myiopsitta monachus*) de la provincia de Buenos Aires; Berkunsky *et al.*, (2005) en nidos de loro hablador (*Amazona aestiva*) en la provincia de Chaco; Liébana *et al.*, en el halconcito colorado (*Falco parverius*) en la provincia de La Pampa. Este es el primer trabajo que describe las prevalencias de *O. bursa* en aves silvestres de la provincia de Santa Fe, Argentina.

Ciertas características de las especies hospedadoras pueden orientar en la interpretación de una mayor prevalencia de *O. bursa* en *F. rufus*, *M. bonariensis* y *S. flaveola*. Aunque estas tres especies pertenecen a distintas familias (Furnariidae, Icteridae y Emberizidae, respectivamente), tienen una relación directa por el tipo de nido que utilizan para garantizar el éxito de su descendencia. *Furnarius rufus* construye su propio nido, dándole una forma abovedada similar a la de un horno de barro. Para su construcción utiliza barro, mezclado con paja, pelo y estiércol (Fraga, 1980). En su interior presenta un tabique que separa la cámara de cría del exterior, resguardando el clima interno del nido de las inclemencias del tiempo, sobre todo de tormentas y vientos (Souza y Santos, 2007). Las gruesas paredes de barro estabilizan la temperatura de la cámara de cría por su baja conductividad térmica (Vaz-Ferreira y Palerm, 1973). Estas características propiciarían un ambiente adecuado para las poblaciones de ácaros, ya que estos son sensibles a los cambios de temperatura y humedad, y por lo

general prosperan bajo condiciones de temperatura y humedad elevadas (Krantz, 1978). También hay que resaltar el corto ciclo de vida de los ácaros hematófagos (Richner y Heeb, 1995), lo que permite que se acumulen en los nidos, alcanzando hasta dos o tres generaciones de ácaros por cada nidada (Szabó, 2002). Por lo general cada pareja reproductora de *F. rufus* construye un nido por año (Fraga, 1980), y a veces vuelven a utilizar el nido de la misma temporada reproductiva para engendrar otra nidada (Harper, 1934; Gavio, 1942), pudiendo generar así una continuidad en la proliferación de ácaros. Otra particularidad de *F. rufus* es el prolongado período de permanencia de los pichones en el nido, el cual comprende entre 20 y 23 días, aunque a los 16 días de haber nacido ya poseen el plumaje completo del adulto (De la Peña, 2010). Este tiempo de permanencia podría permitir que las poblaciones de ácaros proliferen más que en otras especies de aves, aumentando así la carga parasitaria en *F. rufus*. El transcurso del tiempo desde la eclosión de los huevos permite la proliferación de los ácaros a expensas de sus hospedadores (Pacejka *et al.*, 1998), aumentando la cantidad de ácaros en la nidada a medida que crecen los pichones. El incremento de la carga parasitaria favorecería el intercambio de parásitos entre los pichones de un mismo nido facilitando la infección de nuevos pichones y por ende aumentaría la prevalencia.

Molothrus bonariensis es una especie parásita, es decir, utiliza nidos activos de otras especies para depositar sus huevos, los cuales serán incubados por el ave que construyó el nido. La prevalencia de ácaros en pichones de *M. bonariensis* criados en nidos de *F. rufus* fue de 62,5%, mientras que en

otras nidadas sólo fue del 30,43% (com. pers.), por lo cual la elevada prevalencia de *O. bursa* en *M. bonariensis* podría atribuirse a que la mayor parte del parasitismo por *M. bonariensis* se da en nidadas de *F. rufus* en los sitios de estudio.

Sicalis flaveola no es una especie parásita sino que utiliza nidos abandonados (por lo general nidos cerrados) para criar a sus pichones. Un 90% de las nidadas examinadas se encontraron en nidos de *F. rufus*. Por lo tanto, se podría suponer que la elevada carga parasitaria en esta especie se debió a las cargas de ácaros preexistentes en los nidos que utilizaron para criar su progenie, lo que facilitaría el desarrollo de la infección en pichones de *S. flaveola* con el consiguiente aumento de la prevalencia. Las poblaciones de ácaros aumentan con la edad del nido, tanto en densidad como en diversidad (Estévez-González, 1997) y con ello el riesgo de producir infección.

Nuestros resultados permiten concluir que en la región centro de Santa Fe, *O. bursa* es una especie asociada a *F. rufus* y a especies de aves que utilizan sus nidos. Son necesarios estudios complementarios que evalúen los efectos de estos ácaros sobre las poblaciones de aves silvestres, teniendo en cuenta los factores ambientales y otros factores que influyen en su abundancia.

REFERENCIAS

1. ARAMBURU R, CALVO S, CARPINTERO D, CICCHINO A. 2009. Artrópodos presentes en nidos de cotorra *Myiopsitta monachus monachus* (Aves: Psittacidae). Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales 11:
2. ARAMBURÚ RM, CALVO S, ALZUGARAY ME, CICCHINO A. 2003. Ectoparasitic load of Monk Parakeet (*Myiopsittamonachus*, Psittacidae) nestlings. Ornithología Neotropical 14: 415-418.
3. ARAMBURÚ RM, CICCHINO A, BUCHER E. 2002. Material vegetal fresco en cámaras de cría de la cotorra argentina *Myiopsitta monachus* (Psittacidae). Ornithología Neotropical 13: 433-436.
4. ARAMBURÚ RM, CICCHINO A, CORBALÁN V. 2000. Ectoparásitos hematófagos en buches de pichones de *Myiopsitta monachus monachus* (Aves: Psittacidae). Neotrópica 46: 74.
5. BERKUNSKY I, FORMOSO A, ARAMBURÚ RM. 2005. Ectoparasitic load of Blue-fronted Parrot (*Amazona aestiva*, Psittacidae). Ornithología Neotropical 16: 573-578.
6. BAKER E, EVANS T, GOULD D, HULL W, KEEGAN H. 1956. A manual of parasitic mites of medical or economic importance. National Pest Control Association, New York.
7. BARCLAY RMR. 1988. Variation in the costs, benefits, and frequency of nest reuse by Barn Swallows (*Hirundo rustica*). - Auk 105: 53-60.
8. BERGGREN A. 2005. Effect of the blood-sucking mite *Ornithonyssus bursa* on chick growth and fledging age in the North Island robin. New Zealand Journal of Ecology 29: 2430-2432.
9. BURTT Jr. E, CHOW W, BABBITT G. 1991. Occurrence and demography of mites of tree swallow, house wren, and eastern bluebird nests. In: LOYE J., ZUK M. (Eds.), Bird-parasite interactions. Oxford University Press, Oxford.
10. CABRERA AL. 1994. Regiones Fitogeográficas Argentinas. En: Kugler, W. (ed), Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería, 2º ed., T II, F 1, 85 pp.
11. CHAPMAN BR, GEORGE JE. 1991. The effects of ectoparasites on Cliff Swallow growth and survival. En: Loye JE, Zuk M (eds.). Bird-parasite interactions: ecology, evolution, and behaviour. Univerty Pres Oxford, Oxford, pp. 69-92.
12. CLARK L, MASON JR. 1988. Effect of biologically active plants used as nest material and the derived benefit to starling nestlings. Oecologia 67: 169-176.
13. CLAYTON DH, TOMPKINS DM. 1995. Comparative effects of mites and lice on the reproductive success of Rock Doves (*Columba livia*). Parasitology 110: 195-206.
14. DE LA PEÑA MR. 2005. Familia FURNARIIDAE - 14. HORNERO *Furnarius rufus*, pp 378-385, en: DE LA PEÑA M.R. Reproducción de las Aves Argentinas (con descripción de pichones). L.O.L.A. Monografía 20: 845.
15. DE LOPE F, GONZÁLEZ G, PEREZ J J, MOLLER AP. 1993. Increased detrimental effects of ectoparasites on their bird hosts during adverse environmental conditions. Oecologia 95: 234-240.
16. DE VANEY J. 1978. A survey of poultry ectoparasite problems and their research in the United States. Poult. Sci. 57: 1217-1220.
17. ESTÉVEZ-GONZÁLEZ ML. 1997. Acarofauna en nidos de aves silvestres en México. Acta Zool. Mex. Nueva Serie 71: 1-15.
18. FAUTH PT, KREMENTZ DG, HINES JE. 1991. Ectoparasitism and the role of green nesting material in the European starling. Oecologia 88: 22-29.
19. FLETCHMANN C. 1985. Ácaros de importância Médico Veterinária. Livraria Nobel S.A., São Paulo.
20. FRAGA R. 1980. The breeding of rufous Horneros (*Furnarius rufus*). Condor 82: 58-68.
21. GAVIO HS. 1942. Algo más sobre el hornero. El Hornero 8(2): 268.
22. HARPER EC. 1934. Observaciones sobre el hornero y la tijereta. El Hornero 5(3): 414-415.
23. JOFRÉ L, NOEMÍ I, NEIRA P, SAAVEDRA T, DÍAZ C. 2009. Acarosis y zoonosis asociadas. Revista Chilena de Infectología 26: 248-257.
24. KRANTZ GW. 1978. A manual of acarology. Second edition. Oregon State University Book Stores, Corvallis, Oregon, USA.
25. SZABO K, SZALMAS A, LIKER A, BARTA Z. 2002. Effects of haematophagous mites on nestling house sparrows (*Passer domesticus*). Acta Parasitológica 47

- (4): 318-322.
26. MERINO S, POTTI J. 1995. Mites and bowflies decrease growth and survival in nestling pied flycatchers. *Oikos* 73: 95-103.
27. MOLLER AP. 1993. Ectoparasites increase the cost of reproduction in their host. *Ecology* 62: 309-322.
28. MOLLER AP. 1990. Effects of parasitism by a hematophagous mite on reproduction in the barn swallow. *Ecology* 71: 2345-2357.
29. MOLLER AP. 1987. Advantages and disadvantages of coloniality in the swallow *Hirundo rustica*. *Animal Behaviour* 39: 819-832.
30. MOSS W, CARMIN J. 1970. Nest parasitism, productivity, and clutch size in purple martins. *Science* 168: 1000-1003.
31. PACEJKA AJ, GRATTON CM, THOMPSON CF. 1998. Do potentially virulent mites affect House Wren (*Troglodytes aedon*) reproductive success? *Ecology* 79: 1797-1806.
32. POTTI J, MORENO J, MERINO S, FRIAS O, RODRÍGUEZ R. 1999. Environmental and genetic variation in the haematocrit of fledging pie flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Oecologia* 120: 18.
33. RICHNER H, HEEB P. 1995. Are clutch and brood size patterns in birds shaped by ectoparasites? *Oikos* 73: 435-441.
34. SEMENAS L, ANGAUT ROCHA J. 1998. Un motivo poco común de crisis de llanto en un recién nacido. *Arch. Argent. Pediatr.* 96: 131-133.
35. SIKES R, CHAMBERLAIN R. 1954. Laboratory observations on three species of bird mites. *Parasitology* 40: 691-697.
36. SOUZA FL, SANTOS CA. 2007. Climate and nest opening orientation in *Furnarius rufus* (Furnariidae). *Iheringia, Sér. Zool., Porto Alegre*, 97(3): 293-295.
37. STOEHR AM, NOLAN PM, HILL GE, MCGRAW KJ. 2000. Nest mites (*Pellonyssus reedi*) and the reproductive biology of the house finch (*Carpodacus mexicanus*). *Canadian Journal of Zoology*, 78: 2126-2133.
38. VALIENTE MORO C, CHAUVE C, ZANNER L. 2005. Vectorial role of some Dermanyssoid mites (Acari, Mesostigmata, Dermanyssoid). *Parasite* 12: 99-109.
39. VAZ-FERREIRA R, PALERM E. 1973. Sucesion y moldes de actividad en la construcción del nido de *Furnarius rufus rufus* (Gmelin), ("Hornero"). *Revista de Biología del Uruguay* 1: 103-120.
40. WALTER D, PROCTOR H. 1999. Mites: ecology, evolution and behaviour. University of New South Wales Ltd., Sydney.

Agradecimientos: El presente estudio fue financiado por Wildlife Conservation Society (Wildlife Health Fund), Morris Animal Foundation (Grant No.D08ZO-304) y CONICET (Subsidio N°. PIP11220100100261). Darío E. Manzoli es becario doctoral de CONICET. Agradecemos la asistencia en el trabajo de campo de María José Saravia, Leonardo Silvestri, David Rohrmann, Emilce Barengo, Nicolás Acosta y Sebastián Alvarado, y a Daniela Lamattina por las correcciones.

Prevalencia de parásitos gastrointestinales en equinos Pura Sangre de Carrera durante el período de cuarentena 2012 en el hipódromo “La Rinconada” Caracas, Venezuela

MORALES A. A.^{1,2}, BELLO H.¹, y VILLORIA D.¹

¹ División de Sanidad Animal Instituto Nacional de Hipódromos Hipódromo “La Rinconada” Caracas, Venezuela.

² Departamento de Patología Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Estado Aragua-Venezuela.

ABSTRACT

PREVALENCE OF GASTROINTESTINAL PARASITES IN THOROUGHBRED HORSES DURING THE QUARANTINE PERIOD OF 2012 AT THE RACETRACK "LA RINCONADA", CARACAS, VENEZUELA

Were evaluated clinically to 798 horses (*Equus caballus*), race Thoroughbreds, all under 2 years old. During the quarantine period months of January to June 2012 at the Hippodrome “La Rinconada” Caracas, Venezuela. Stool samples were collected from the rectum and stool practical study by McMaster flotation technique (Willis-Molloy) from breeding centers in the central region of Venezuela. The stool culture revealed the presence of parasitic eggs by 82%. The highest percentage of parasites observed was 83% strongyles, 9% *P. equorum* and 7% of *O. equi*. The presence of equine *Strongyles* infested remained within the range of 700-1800 HPG, while 400-800 *P. equorum* was HPG and *O. equi* maintained a range of 500 HPG. No other parasites were observed. The rest of the specimens 17% were negative for the presence of parasite eggs in feces evaluated. In conclusion, we report a high prevalence of gastrointestinal parasites in Thoroughbred horses during the quarantine period at the Hippodrome “La Rinconada” Caracas, Venezuela.

Key word: Estróngilos, *Parascaris*, equinos, *Equus caballus*.

RESUMEN

Fueron evaluados clínicamente a 798 equinos (*Equus caballus*), raza Pura Sangre de Carrera, todos de 2 años de edad. Durante el periodo de cuarentena meses de Enero-Junio del año 2012 en el Hipódromo “La Rinconada” Caracas, Venezuela. Se colectaron muestras de heces del recto y se practico un estudio coprológico por la técnica de flotación Mc Master (Willis-Molloy) procedentes de centros de reproducción y cría de

Recibido: 9 de Julio de 2012. Aceptado: 25 de Noviembre de 2012.

Correspondencia: Morales A.

E-mail: aamorales13@gmail.com

la región central de Venezuela. El estudio coprológico reveló la presencia de huevos parásitos en un 82%. El mayor porcentaje de parásitos observado fue de 83% estróngilos, 9% *P. equorum* y un 7% de *O. equi*. La presencia de estróngilos se mantuvo por equino infestado entre un rango de 700-1.800 HPG, mientras que *P. equorum* fue de 400-800 HPG y *O. equi* mantuvo un rango de 500 HPG. No fueron observadas otras formas parasitarias. El resto de los ejemplares 17% fueron negativos a la presencia de huevos de parásitos en las heces evaluadas. En conclusión se reportó una alta prevalencia de parásitos gastrointestinales en equinos Pura Sangre de Carreras, durante el período de cuarentena en el Hipódromo “La Rinconada” Caracas, Venezuela.

Palabras clave: Estróngilos, *Parascaris*, equinos, *Equus caballus*.

INTRODUCCIÓN

Los parásitos intestinales de los équidos representan una amenaza potencial para la salud y el bienestar. Se ha establecido la asociación entre ciertos parásitos con la casuística de cólicos, la diarrea y pérdida de peso en el equino (Proudman, 2009). La piedra angular del control de parásitos ha sido tradicionalmente el uso extensivo de medicamentos antihelmínticos, pero ahora se reconoce que esta situación no es sostenible. El surgimiento generalizado de la resistencia a los antihelmínticos, y las preocupaciones ambientales han obligado a la reconsideración de las “mejores prácticas” (Proudman, 2009). Cuando las cargas son altas, estos parásitos pueden comprometer seriamente la salud y el bienestar (Matthews, 2011). Las infestaciones subclínicas por estróngilos afectan el desempeño atlético en caballos (Fog *et al.*, 2011). Los grandes estróngilos son parásitos frecuentes del intestino grueso, desde donde las larvas migran de manera compleja a todo el organismo y son responsables de problemas variados y a menudo graves (Morales *et al.*, 2010 a, b). Los potros son particularmente sensibles a este parásito (Jubb *et al.*, 1984). Entre las 3 especies principales de grandes estróngilos del equino (*Strongylus vulgaris*, *S. edentatus*, *S. equinus*), el *S. vulgaris* es el más patógeno y frecuente (Power, 1990). La prevalencia de los grandes estróngilos, ha sido reportada: *S. vulgaris* 80,5%, *S. equinus* 9,8%, *S. edentatus* 4,9%, *Triodontophorus serrato* 19,5% y *T. brevicauda* 7,3% (Kornas *et al.*, 2009). El objetivo de la presente investigación es describir la prevalencia de parásitos gastrointestinales en equinos Pura Sangre de Carreras durante el período de cuarentena 2012 en el Hipódromo “La Rinconada”, en Caracas, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Enmarcado en las actividades básicas de cuarentena, se realizó un examen clínico a cada uno de los ejemplares, vacunación contra los virus de Rinoneumonitis e Influenza Equina, Rabia, Encefalitis Equina Venezolana, del Este y del Oeste. Así como el descarte del virus de Anemia Infecciosa Equina. Fueron tomadas del recto muestras de heces para un estudio coprológico por la técnica de flotación Mc Master (Willis-Molloy) (Whitlock, 1948; Fog *et al.*, 2011) a un total de 798 equinos (*Equus caballus*), raza Pura Sangre de Carrera, 350 de sexo macho y 448 hembras, todos de 2 años de edad, procedentes de centros de reproducción y cría de la región central de Venezuela (estados: Aragua, Bolívar, Carabobo, Guárico, Miranda, Lara y Yaracuy). Durante el período de cuarentena meses de enero-junio del año 2012 en el Hipódromo “La Rinconada” Caracas, Venezuela.

RESULTADOS

El estudio coprológico (Tabla 1), reveló la presencia de huevos parásitos en un 83% (657/798). Específicamente de estróngilos en 550/657, huevos de *Parascaris equorum* 62/657 y *Oxyurus equi* 45/657. El resto de los ejemplares 141/798 (17%) fueron negativos a la presencia de huevos de parásitos en las heces evaluadas. El mayor porcentaje de parásitos observado fue de 84% estróngilos, 9% *P. equorum* y un 7% de *O. equi*. La presencia de estróngilos se mantuvo por equino infestado entre un rango de 700-1.800 HPG, mientras que *P. equorum* fue de 400-800 HPG y *O. equi* mantuvo un rango

Tabla 1. Resultados del estudio coprológico en equinos Pura Sangre de Carreras Hipódromo “La Rinconada” Caracas Venezuela

Resultados	Negativos	Estróngilos HPG	Parascaris HPG	Oxyurus	Total
Equinos	141	550	62	45	798

de 500 HPG. No fueron observadas otras formas parasitarias.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos evidencian una alta prevalencia de parásitos intestinales en los equinos estudiados 82%. Estos resultados se incrementaron con respecto al año 2010, que fue de huevos de estróngilos en 477 equinos (73%), huevos de *P. equorum* en 23 equinos (4%) y 150 negativos (23%) (Morales *et al.*, 2010 b). Así como para el año 2011 cuya presencia de huevos parásitos fue de 70% (630/894). La infestación por estróngilos es preponderante con respecto a los otros parásitos, seguido de *P. equorum* y en menor medida *Oxyurus* sp. No se evidencian infestaciones por otros parásitos en relación con otras regiones como Europa con respecto a otras regiones donde los équidos son comúnmente infectados por anquilostomas, ascárides y tenias, (Romaniuk *et al.*, 2004). En Sudamérica la presencia de parásitos oscila desde 155 hasta 1.249 larvas (Pereira y Vianna, 2006). Así como *Cyathostominae*, *Triodontophorus* sp, 50% de *Gyaloccephalus*, *Oesophagodontus*, *Acuticaudatum craterostomum*, *Habronema* y *Trichostrongylus axei* (Pereira y Vianna, 2006) En Victoria Australia, las 3 especies más prevalentes fueron *Cylicostephanus longiburstatus*, *Catinatum cyathostomem* y *Cylicocylus nassatus*, así como en mayor proporción los estróngilos (Beugnet, 2008). El uso de antihelmínticos en caballos a base de ivermectina y fenbendazol es relativamente frecuente (Reinemeyer *et al.*, 1984; Power 1990; Kaplan, 2002), sin embargo, en muchos casos las infestaciones por estróngilos no suelen responder de manera eficaz. Es posible una resistencia parasitaria a los desparasitantes de uso convencional (Morales *et al.*, 2010 a, b y 2012). La necesidad de mejorar las estrategias de control de los parásitos para conservar la eficacia antihelmíntica y para evitar problemas relacionados con me-

dicamentos son necesarios (Herd, 1993). Estudios recientes han revelado una tendencia a la dependencia exclusiva de la ivermectina por los propietarios de ganado en los EE.UU., con poco respeto por las estrategias basadas en datos epidemiológicos, o la rotación anual de antihelmínticos (Reinemeyer *et al.*, 1984); al igual que en Venezuela (Morales *et al.*, 2010 b). Los cambios climáticos asociados al calentamiento global complican de alguna manera el control de las infestaciones por parásitos en el ambiente y por ende en el equino En conclusión se reporto una alta prevalencia de parásitos gastrointestinales en equinos Pura Sangre de Carreras, durante el período de cuarentena en el Hipódromo “La Rinconada” Caracas, Venezuela.

REFERENCIAS

1. BEUGNET F. 2008. Digestive parasitism of horses - from epidemiology to control. Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association, 2008 - Moscow, Russia.
2. FOG P, VIGRE H, NIELSEN M. 2011. Strongyle egg counts in standardbred trotters: are they associated with race performance? Equine Vet J. 43, (issue supplement 39): 89-92.
3. HERD RP. 1993. Control strategies for ruminant and equineparasites to counter resistance, encystment, and ecotoxicity in the USA. Vet Parasitol. 48: 327-336.
4. JUBB K, KENNEDY P, PALMER N. 1984. Patología de los Animales Domésticos Animales. 3^{ra} Ed. Edit. Hemisferio Sur, S.R.L. Uruguay. 2: 59-90.
5. KAPLAN RM. 2002. Anthelmintic resistance in nematodes of horses. Vet Res, 33: 491-507.
6. KORNAS S, SKALSKA M, NOWOSAD B, GAWOR J, KHARCHENKO V, CABARET J. 2009. Occurrence of strongyles (*Strongylidae*) in horses from small farms on the basis of necropsy. Pol J Vet Sci. Polish Journal of Veterinary Sciences, vol. 12, pp. 225-230.
7. MATTHEWS JB. (2011). Facing the threat of equine parasitic disease. Equine Vet J, 43: 126-132.
8. MORALES A, GARCÍA F, CORONADO R, LA-TOUCHE O, RIVERO L, ROSSINI M, BELLO H, LEAL L, LÓPEZ P, RODRÍGUEZ C. 2010. Síndrome de enteritis secretora crónica parasitaria por *Strongylus vulgaris* con resistencia a ivermectina en un equino pura sangre de carrera. Neotropical Helminthology, 4

- (1); 71-74.
9. MORALES A, BELLO H, GÓMEZ M. 2010. Prevalencia de parásitos gastrointestinales en caballos pura sangre de carrera (*Equus caballus*) durante el período de cuarentena 2010 en el Hipódromo “La Rinconada” Caracas, Venezuela. *Neotropical Helminthology*, 5, (1); 85-88.
 10. MORALES A, BELLO H, VALLEJO M, VILLORIA D. 2012. Prevalencia de parásitos gastrointestinales en caballos pura sangre de carrera (*Equus caballus*) durante el período de cuarentena 2011 en el Hipódromo “La Rinconada”, Caracas, Venezuela. *Neotropical Helminthology*. 6, (1): 115-119.
 11. PEREIRA JR, VIANNA SS. 2006.- Gastrointestinal parasitic worms in equines in the Paraíba Valley, State of São Paulo, Brazil. *Vet Parasitol*. 140(3-4): 289-295.
 12. PROUDMAN C. 2009. Current perspectives on parasite management in equidae. WEVA, Sao Paulo, Brazil 2009.
 13. POWER L. 1990. Parasitismo por nemátodos en animales domésticos en Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. pp. 132-135.
 14. REINEMEYER CR, SMITH SA, GABEL AA, HERD RP. 1984. The prevalence and intensity of internal parasites of horses in the U.S.A. *Vet Parasitol* 1984: 75-83.
 15. ROMANIUK K, RESZKA K, LASOTA E. 2004. Influence of animal breeding manner on the occurrence of internal parasites. *Wiad Parazytol*. 50(3): 647-651.
 16. WHITLOCK HV. 1948. Some modifications of the McMaster helminth egg counting technique and apparatus. *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research*, 21: 177.

Efecto de un inmunomodulador comercial en combinación con oxitetraciclina, imidocarb y diminazeno en el tratamiento de piroplasmosis en equinos Pura Sangre de Carrera

MORALES A.^{1,2}, VILLORIA D.², ROMERO N.³, MORALES G.³, KASSAR M.³, ARRIETA D.¹ y REQUIZ F.³

¹ Departamento de Patología Veterinaria, Cátedra de Farmacología y Toxicología, Cátedra de Fisiología Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Central de Venezuela.

² División de Sanidad Animal Instituto Nacional de Hipódromos "La Rinconada" Caracas, Venezuela.

³ Facultad de Farmacia Universidad Santa María.

ABSTRACT

EFFECT OF IMMUNOMODULATOR IN COMBINATION WITH OXYTETRACYCLINE, IMIDOCARB AND DIMINAZENE IN THE TREATMENT OF EQUINE PIROPLASMOSIS

The aim of this study was to describe the effect of immunomodulators in combination with oxytetracycline, imidocarb and diminazene in the treatment of equine piroplasmosis in Thoroughbreds. We studied a total of 80 horses. Evaluated by clinical examination, complete blood count and blood smear for disposal of taxon. Horses positive for the presence of haematozoa were dosed with a single dose intramuscular (IM) in the following manner diminazene, Oxytetracycline, and Imidocard, and maintained at 20 copies based treatment only with immunomodulator. At 24 and 72 hours post-treatment is applied at a dose of a commercial product immunomodulator. At 07 days blood samples were taken for hematology and blood smears. A study was conducted Competitive ELISA for detecting antibodies to *B. caballi* and *T. equi*. Clinical findings showed jaundice, fever, anorexia, depression, rough hair in all cases studied. The results showed pretreatment hematological average: RBC: 8.16 mm³, hemoglobin: 9.2 g/dL, platelets: 200 mm³ leukocytes on average 5.05 mm³, 2.1 mm³ neutrophils, lymphocytes 1.9 mm³ 9.0 mm eosinophils, monocytes 0.3 mm³. Blood smears showed *B. caballi* 30/60 and *T. equi* 30/60. The results showed post-treatment hematologic on average: RBC: 8.16 mm³, hemoglobin: 9.2 g/dL, platelets: 190 mm³. The average leukocyte 7.05 mm³ 4.1 mm neutrophils, lymphocytes 3.9 mm³ 4.0 mm eosinophils, monocytes 0.7 mm³. In the evaluation of blood smear was not observed the presence forms of *B. caballi* and *T. equi*. The competitive ELISA allowed the detection of antibodies against *B. caballi* and *T. equi* in horses medicated with diminazene average 50%, oxytetracycline and 61% average rate of 65% post-treatment imidocarb. In horses treated only with the immunomodulator, remained the presence of forms of *B. caballi* and *T. equi*

Recibido: 9 de Julio de 2012. Aceptado: 30 de Noviembre de 2012.

Correspondencia: Abelardo Morales

Email: aamoraes13@gmail.com

studied in blood smears. All drugs were above 40%. The mean concentration of IgG was 1620.44 mg/dl and the mean concentration of IgM was 80.56 mg/dl. The treatments were effective against taxon detected in horses, except in the group that we only apply the immunomodulator.

Key words: Diminazene, oxytetracycline, imidocarb, hemoparasites, equine.

RESUMEN

Se plantea describir efecto de inmunomoduladores en combinación con oxitetraciclina, imidocarb y diminazeno en el tratamiento de piroplasmosis en equinos Pura Sangre de Carrera. Se estudiaron un total de 80 equinos. Evaluados mediante un examen clínico, estudio hematológico y frotis sanguíneo para el descarte de hematozoarios. Los equinos positivos a la presencia de hematozoarios fueron medicados con dosis única intramuscular (IM) de la siguiente manera Diminaceno; Oxitetraciclina, e Imidocard, y se mantuvo a 20 ejemplares sólo con tratamiento basado en inmunomodulador. A las 24 y 72 horas pos-tratamiento se le aplico una dosis de un producto comercial inmunomodulador. A los 07 días fueron tomadas muestras de sangre para hematología y frotis sanguíneo. Se realizo un estudio de ELISA Competitivo para la detección de anticuerpos contra *B. caballi* y *T. equi*. Los hallazgos clínicos evidenciaron ictericia, fiebre, anorexia, depresión, pelo hirsuto en todos los casos estudiados. Los resultados hematológicos pre-tratamiento evidenciaron en promedio: hematíes: 8,16 mm³, hemoglobina: 9,2 g/dL, plaquetas: 200 mm³, leucocitos en promedio 5,05 mm³, neutrofilos 2,1 mm³, linfocitos 1,9 mm³, eosinofilos 9,0 mm³, monocitos 0,3 mm³. Los frotis sanguíneos evidenciaron *B. caballi* 30/60 y *T. equi* 30/60. Los resultados hematológicos pos-tratamiento evidenciaron en promedio: hematíes: 8,16 mm³, hemoglobina: 9,2 g/dL, plaquetas: 190 mm³. Los leucocitos en promedio 7,05 mm³, neutrofilos 4,1 mm³, linfocitos 3,9 mm³, eosinofilos 4,0 mm³, monocitos 0,7 mm³. En la evaluación de los frotis sanguíneos no se observo la presencia formas de *B. caballi* y *T. equi*. El ELISA competitivo permitió la detección de anticuerpos contra *B. caballi* y *T. equi* en los equinos medicados con diminaceno promedio 50%, oxitetraciclina promedio 61% y promedio 65% imidocarb post-tratamiento. En los equinos tratados sólo con el inmunomodulador, se mantuvo la presencia de formas de *B. caballi* y *T. equi* en los frotis sanguíneos estudiados. Todos los medicamentos fueron superiores al 40%. La concentración media de inmunoglobulinas IgG fue de 1620,44 mg/dl y la concentración media de IgM fue de 80,56 mg/dl. Los tratamientos fueron efectivos contra los hematozoarios detectados en los equinos, excepto en el grupo que solo se le aplico el inmunomodulador.

Palabras clave: Diminaceno, imidocarb, oxitetraciclina, hemoparasitos, equinos.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades asociadas hematozoarios afectan drásticamente a la industria equina a nivel mundial pero especialmente en países tropicales en los cuales existen mayor numero de vectores de parásitos lo cual limita su control. Los hematozoarios que se asocian a enfermedad en los equinos son *Ehrlichia risticii*, *Ehrlichia equi*, *Theileria equi*, *Babesia caballi*, *Tripanosoma evansi*, *Tripanosoma equi*. La piroplasmosis o babesiosis es una enfermedad producida por protozoos *T. equi* y *B. caballi*, que afecta a los équidos ya que parasita a los glóbulos rojos en el tejidos sanguíneo y es transmitido

por garrapatas del genero *Ixodes* y otros vectores (Bruning, 1996; Butler *et al.*, 2008; Abutarbush *et al.*, 2011; Adaszek *et al.*, 2011;). La distribución es mundial. La presentación clínica varía desde un cuadro hiperagudo, agudo y crónico (Jubb *et al.*, 1984; Donald 1996; De Vera *et al.*, 2006). La sig-nología está caracterizada por fiebre, anorexia, congestión/hemorragia petequeal e ictericia, hematuria, pelo hirsuto, emaciación, trombocitopenia, anemia, leucopenia, hemolisis e intolerancia al ejercicio (Jubb *et al.*, 1984; Hailat *et al.*, 1997; De Vera *et al.*, 2006). Un número de agentes quimioterapéuticos se han probado para eliminar el riesgo de transmisión de los caballos infectados. Gran parte

de la investigación se ha centrado en relación con el tratamiento de parasitemia aguda y la enfermedad clínica. Existe cierta polémica sobre la eficacia de identificación en su capacidad para eliminar por completo (claro) riesgo de infección y transmisión de los équidos, parte de la controversia es probablemente debido a la anterior el uso de la LFT para definir aclaramiento de la infección. Debido a la falta de sensibilidad de la negativa LFT, resultados de la prueba después del tratamiento de identificación, en algunos casos, puede haber sido causado por la falta de esta prueba para detectar infección persistente. En segundo lugar, se ha sugerido que diferentes dosis y regímenes de tratamiento con ID puede haber llevado a ID cepas de *T. equi* tanto y *B. caballi*. La evaluación de la resistencia ID entre los agentes patógenos del PE es un objetivo importante de la actual la investigación de quimioterapia. La terapéutica para el tratamiento de las hemoparasitosis se basa en el uso de oxitetraciclina, diminaceno y sulfato de imidocard. La Oxitetraciclina es una tetraciclinas capaz de inhibir la síntesis de proteínas de las bacterias al ligarse al ribosoma bacteriano 30S e impedir la llegada del ARNt aminoacíclico receptor (A) en el complejo ARNm - ribosoma (Botama *et al.*, 2002). El Diminaceno una amina aromática, actúa sobre las membranas citoplasmáticas y nucleares del hemoparásito (Botama *et al.*, 2002). El Imidocarb directamente sobre el parásito causando una alteración en el número y el tamaño del núcleo y en la morfología del citoplasma (vacuolización, degeneración del espacio en el protoplasma de la célula, al cual se le atribuyen funciones digestivas y excretorias) (Botama *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2005). La inmunomodulación se refiere a la acción que ejerce la medicación sobre los procesos de autorregulación que dirigen el sistema de defensa inmunitario. Muchos medicamentos antihomotóxicos intervienen y son sumamente útiles por su acción terapéutica demostrada. Durante el funcionamiento de la defensa celular o humoral se activan diferentes inmunocitos. En ambas vías la actividad de la célula final de la cadena influye sobre la entrada de la vía. Los macrófagos estimulan la actividad TH1 mediante la liberación de IL-12, aunque ellos mismos se activan por la liberación de IFN- γ y TNF- β , que son liberados por el linfocito TH1. En virtud de esta importante área se plantea describir el efecto de inmunomoduladores en combinación con oxitetraciclina, imidocarb y diminaceno

en el tratamiento de piroplasmosis en equinos Pura Sangre de Carrera.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron un total de 80 equinos (*Equus caballus*), de raza Pura Sangre de Carrera, todos de 2 años de edad, durante el período de cuarentena enero-mayo 2012. Todos los ejemplares fueron evaluados mediante un examen clínico exhaustivo. Se tomaron muestras de sangre para un estudio hematológico y frotis sanguíneo para el descarte de hematozoarios (Banks 1996; Aluja y Constantino 2002). Los equinos positivos a la presencia de hematozoarios fueron medicados con dosis única intramuscular (IM) de la siguiente manera Diminaceno 20/80 (3,5 mg/kg) (Pyroject 100 ml); Oxitetraciclina 20/80 (10 mg/kg) (Oxitetraciclina Calox 50 mg/ml) e Imidocard 20/80 (2,4 mg/kg) (Imizol), y se mantuvo a 20 ejemplares sólo con tratamiento basado en inmunomodulador. A las 24 horas post-tratamiento se le aplicó una dosis intramuscular de 5 ml y se repitió a las 72 horas, de un producto comercial INFERVAC (Composición: Células inactivadas de *P. granulosum* 25 mg Lipopolisacaridos de células de *E. coli*. 2 mg. Excipiente c.s.p. Laboratorios CALIER de Argentina, S.A. A los 07 días fueron tomadas muestras de sangre para hematología completa y frotis sanguíneo para determinar la presencia de hematozoarios (Banks 1996; Aluja y Constantino 2002). Se realizó un estudio de ELISA Competitivo para la detección de anticuerpos contra *B. caballi* y *T. equi* (Katz *et al.*, 2000). Se considero Positivo (+) en los casos en los cuales los niveles de anticuerpos fueron superiores > 40%. Se realizó una medición de Inmunoglobulinas en plasma mediante inmunodifusión radial. Se realizó un análisis estadístico mediante la prueba de McNemar de los equinos medicados con diminaceno, oxitetraciclina, imidocarb e infervac.

RESULTADOS

Clínica: Los hallazgos clínicos evidenciaron ictericia, fiebre, anorexia, depresión, pelo hirsuto en todos los casos estudiados. Sólo en 36/80 (45%), de casos se observaron ectoparásitos (vectores), del género *Ixodes*.

Laboratorio: Los resultados hematológicos previo al tratamiento evidenciaron en promedio: hematíes: 8,16 mm³, hemoglobina: 9,2 g/dL, plaquetas: 200 mm³. Los leucocitos en promedio 5,05 mm³, neutrofilos 2,1 mm³, linfocitos 1,9 mm³, eosinofilos 9,0 mm³, monocitos 0,3 mm³. Los frotis sanguíneos permitieron la detección de *B. caballi* 30/60 y *T. equi* 30/60. Los resultados hematológicos pos-tratamiento evidenciaron en promedio: hematíes: 8,16 mm³, hemoglobina: 9,2 g/dL, plaquetas: 190 mm³. Los leucocitos en promedio 7,05 mm³, neutrofilos 4,1 mm³, linfocitos 3,9 mm³, eosinofilos 4,0 mm³, monocitos 0,7 mm³. En la evaluación de los frotis sanguíneos no se observó la presencia de formas de *B. caballi* y *T. equi* excepto en el grupo medicado sólo con el inmunomodulador.

Serología: Los resultados serológicos por ELISA competitivo permitieron la detección de anticuerpos contra *B. caballi* y *T. equi* en los equinos medicados con diminazeno promedio 50%, oxitetraciclina promedio 61% y promedio 65% imidocarb post-tratamiento. En los equinos tratados sólo con el inmunomodulador, se mantuvo la presencia de formas de *B. caballi* y *T. equi* en los frotis sanguíneos estudiados. Todos los medicamentos fueron superiores al 40%. La concentración media de inmunoglobulinas IgG fue de 1620,44 mg/dl en los caballos, mientras que la concentración media de IgM fue de 80,56 mg/dl.

Estadística: Los tratamientos fueron efectivos contra los hematozoarios detectados en los equinos $p < 0,001$ altamente significativo, excepto en el grupo que sólo se le aplicó el inmunomodulador.

DISCUSIÓN

Los resultados clínicos, hematológicos, frotis sanguíneo y de ELISA, confirmaron la presencia de hematozoarios específicamente: *B. caballi* y *T. equi* en los equinos estudiados. La terapéutica basada en oxitetraciclina, sulfato de imidocard y diminazeno fue efectiva en todos los casos, posiblemente asociado al efecto del inmunomodulador empleado. Los resultados serológicos parecen indicar que en las infecciones asociadas a piroplasmosis disminuyen los niveles de IgG, sin embargo, la respuesta terapéutica basada en la aplicación de inmunomoduladores se incrementa notablemente los niveles de IgG. Con respecto a la IgM también presenta un

incremento post tratamiento. Es posible el empleo de inmunomoduladores de manera combinada en el tratamiento de piroplasmosis en el caballo. Los medicamentos antihelmínticos inmunomoduladores intervienen en la reacción de defensa del cuerpo y, por lo tanto, son muy útiles en el tratamiento de las reacciones inadecuadas del sistema inmunitario. Algunos medicamentos tienen efecto inhibitor (inmunoinhibidores), y otros estimulan la reacción de defensa (inmunoestimuladores). Algunos tienen dos efectos reguladores opuestos en función de la fase de la onda de autorregulación en la que se encuentre el paciente. Este último grupo de medicamentos son realmente inmunomoduladores, porque pueden corregir de ambas maneras. La persistencia del patógeno es la habilidad de un organismo infeccioso de permanecer por largo tiempo en el hospedero, incluso de por vida, en la ausencia de signos clínicos pero bajo condiciones de estrés e inmunosupresión se exagera y produce sintomatología clínica. Actualmente las normas aprobadas para las autoridades federales y estatales de los Estados Unidos, para equinos diagnosticados como reactores positivos a la PE en el territorio de la Unión Americana son la cuarentena perpetua o el sacrificio mediante eutanasia (Seroprevalence of equine piroplasmosis, 2009), ante esta situación es posible el empleo de quimioterapias en combinación con el uso de inmunomoduladores.

En conclusión se describió el efecto de inmunomoduladores en combinación con oxitetraciclina, imidocarb y diminazeno en el tratamiento de piroplasmosis en equinos Pura Sangre de Carrera, en todos los casos fue efectivo y puede ser un tratamiento de elección para el control de la piroplasmosis en el tropico.

REFERENCIAS

1. ABUTARBUSH SM, ALQAWASMEH DM, MUKBEL RM, AL-MAJALI AM. 2011. Equine Babesiosis: Seroprevalence, Risk Factors and Comparison of Different Diagnostic Methods in Jordan. Transbound Emerg Dis.
2. ADASZEK L, GÓRNA M, KRZYSIAK M, ADASZEK M, GARBAL M, WINIARCZYK S. 2011. Identification of the piroplasmas isolated from horses with clinical piroplasmosis in Poland. Wiad Parazytol. 57(1): 21-26.
3. ALUJA A, CONSTANTINO C. 2002. Technical of Necropsy in domestic animals. 2nd ed., pp 103. Manual

- Moderno. México.
4. BANKS W. 1996. Veterinary Applied Histology. 2nd ed., 487-492. Manual Moderno México.
5. BOTANA L, LANDONI F, MARTÍN T. 2002. Veterinary Pharmacology and therapeutical. 1 ed., pp 3-690. Madrid España.
6. BRÜNING A. 1996. Equine piroplasmosis an update on diagnosis, treatment and prevention. *Br Vet J*. Mar; 152(2): 139-151.
7. BUTLER CM, NIJHOF AM, VAN DER KOLK JH, DE HASETH OB, TAOUFIK A, JONGEJAN F, HOUWERS DJ. 2008. Repeated high dose imidocarb dipropionate treatment did not eliminate *Babesia caballi* from naturally infected horses as determined by PCR-reverse line blot hybridization. *Vet Parasitol*. Feb 14; 151(2-4): 320-322.
8. DE VERAM, GUILLÉNA, GARCÍA F, CONTRERAS R, SIERRALTA A, LEÓN E. 2006. Seroprevalencia de la babesiosis equina en caballos purasangre de carrera alojados en los Hipódromos La Rinconada y Nacional de Valencia, Venezuela. *Veterinaria Trop*. 31(1-2): 43-52.
9. DONALD M. 1996. Special Veterinary Pathology. 3rd ed., 24-29. Mosby. USA.
10. FRIEDHOFF KT, TENTER AM, MÜLLER I. Haemo-parasites of equines: impact on international trade of horses. *Rev Sci Tech*. 1990 Dec; 9(4): 1187-1194.
11. HAILAT NQ, LAFI SQ, AL-DARRAJI AM, AL-ANI FK. 1997. Equine babesiosis associated with strenuous exercise: clinical and pathological studies in Jordan. *Vet Parasitol*. Apr; 69(1-2): 1-8.
12. JUBB K, KENNEDY P, Y PALMER N. 1984. Domestic animal pathology. 3 ed., vol. 2., 59-90. Hemisferio Sur, S.R.L. Uruguay.
13. KATZ J, DEWALD R, NICHOLSON J. 2000. Procedurally similar competitive immunoassay systems for the serodiagnosis of *Babesia equi*, *Babesia caballi*, and *Trypanosoma equiperdum*, and *Burkholderia mallei* infection in horses. *J Vet. Diagn. Invest* 12: 46-50.
14. SEROPREVALENCE OF EQUINE PIROPLASMOSIS Disease Agents in the United States. 2009. APHIS. Info Sheet. Veterinary Services. Centers for Epidemiology and Animal Health. USDA.
15. MEYER C, GUTHRIE AJ, STEVENS KB. 2005. Clinical and clinicopathological changes in 6 healthy ponies following intramuscular administration of multiple doses of imidocarb dipropionate. *J S Afr Vet Assoc*. Mar; 76(1): 26-32.

INDICE DE AUTORES 2012 VOLUMEN 71

-A-		-G-	
Acosta-García G	143	Galán Puchades V T	5
Alarcón de Noya B	14	Galindo M V	42, 55
Alfonso S	125	Garaycochea O	143
Alvela- Suárez L	34	García A	117
Antonio-Rodríguez O	34	García-Bardeci D	34
Antoniazzi LR	172	Gómez F L E	62
Antunes Uchoa C M	90	González A	83
Apt W	07	González A	167
Arrabal JP	172	Guzmán R C T	42, 55
Arrieta D	78, 183		
-B-		-H-	
Bandeiras Vianaa M	90	Heringman K	143
Bandes A	42, 55	Hermández-Cabrera M	34
Beldomenico PM	172		
Bello H	179	-J-	
Binder N	23	Jeri S	143
Blanco M J	42, 55		
Bordez-Benítez A	34	-K-	
		Kassar M	78, 183
-C-		-L-	
Canals M	152	Larechi M	172
Carranza- Rodríguez C	34	Laredo SVT	160
Comerma S	78	Larenas J	23, 117
Corral G	97	Laurentino da Silva V 90	
Cortés A T	138	López M	167
Cruz M I	62		
-D-		-M-	
DaSilva Barbosa A	90	Mancillia A	97, 138
De Noya B	167	Manzoli DE	172
Díaz-Bello Z	14	Martín-Sánchez	34
Dorla A	42, 55	Martínez-Díaz R A	125
Dyer A	143	Martínez MPL	160
		Mateos R A	62
-E-		Medina C	83
Elcuaz-Romano L	34	Molina M	97
Esteban J J G	138	Moncada E	83
		Monteiro Fonseca A B	90
-F-		Montenegro I	167
Farías N A R	70	Morales A	78, , 179, 183
Finger I S	70	Morales G	78, 183
Fried B	138	Moreno MA	160
		Muñoz Calderón A	14

Muñoz JJE	160			
Muro A	34	Salazar L S	-S-	55
		Santaniello A		14
		Siancas G		143
-N-		Silva S S		70
Nascimento Duarte A	90	Sotillo J		138
Navarro M	167			
Nessi A	42, 55			
Nizoli L Q	70		-T-	
Nogueira C W	70	Toledo R		138
Novo Valeiro I	34	Torres A		97
		Torres AI J		70
		Trelis M		138
-O-		Trudgett A		138
Osuna A	5			
-P-			-U-	
Paláu M T	23, 117	Ulloa-Arvizu R		62
Pereira A	14			
Pereira Bastos D M	90		-V-	
Pérez G M V	42, 55	Valencia C N		97
Pérez-Arellano J L	34	Vigo-Ames N		143
Ponce-Gordo E	125	Villoria D		78, 179, 183
Ponzano P	117	Vergara U		23, 117
		Vethencourt M A		42, 55
-Q-				
Quiroz R H	62		-W-	
		Wagner C M		42, 55
-R-				
Ramos D	97		-Y-	
Requiz F	183	Yamuzzi J		14
Reveles RG	160			
Rojas G	83		-Z-	
Romero N	78, 183	Zúñiga C		23, 117
Romo G	117	Zulantay I		97
Rueda M	83			

NORMAS DE PUBLICACIÓN

1. Los trabajos serán remitidos a:

1.1 Secretaria de Edición, Prof. Dra. Susana Vilchez Tornero, Instituto de Biotecnología Universidad de Granada, Campus Universitario de Fuentenueva, 18071 Granada España. E-mail: svt@ugr.es

1.2 Editor Prof. Héctor Alcaíno, Casilla 9183, Santiago 1, Chile. E-mail: hectoralcaino@gmail.com

2. Los autores deberán remitir el manuscrito del trabajo, que será original y aceptado por todos los autores, mediante un soporte informático, a ser posible en formato RTF, Microsoft Word (DOC) u Openoffice (ODT).

3. La Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología no dispone limitación en el número de páginas de los trabajos, siempre que la información aportada lo justifique.

4. ESTILO:

- Los trabajos podrán ser escritos en español, portugués o inglés (la Comisión Editorial aconseja este último idioma), deben remitirse usando una fuente Times New Roman tamaño 12 y con márgenes derecho e izquierdo de 3 cm, normas que deben guardar también las cabeceras de tablas y pies de figuras. Todas las páginas deberán ser numeradas consecutivamente, tablas y figuras incluidas.

- Las letras en cursiva se utilizarán para los nombres científicos de géneros y especies, así como para palabras en idioma distinto al que se escribe.

- Cuando se cite una especie por primera vez en el texto, se hará con su nombre científico completo.

- Para nombrar las enfermedades se seguirán las normas publicadas por Kassai T., Cordero M., Euzeby J., Gaafar, S., Hiepe Th. and Himonas, C.A. 1988. Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD). Vet Parasitol 29: 299-326, las cuales están aceptadas por la SEP.

- Los números del uno al diez, se escribirán con letras (nueve), salvo si preceden a una unidad de medida (4 m) o se utilizan como marcadores (día 3). Los números mayores de diez se escribirán con letras únicamente cuando vayan al principio de un párrafo. Los números que sobrepasen las unidades de millar se anotarán, uniformemente en ambas lenguas, sin signos de puntuación, ejemplo "10000 y no 10.000 o 10,000". Por su parte los números decimales se anotarán siguiendo la forma "xx'xx (xx.xx)", según se trate de textos en español o inglés". Igualmente, deben evitarse números muy largos, como "(250000000)", escribiendo 250 millones o 2,5 x 10⁸".

- Las horas del día se nombrarán de "0 a 24 (18 h y no 6 p.m.)".

- Los años se expresarán de forma completa (por ejemplo "1999-2000 y no 1999-00").

- Las abreviaturas podrán usarse, siempre claras y carentes de ambigüedad. Las abreviaturas de uso muy frecuente, no necesitarán deletrearse previamente: "ADP, AMP, ATP, bp, kDa, cpm, D.F., ADN, Fig., g, h, i.m., i.p., mAb, min, NAD, NADH, no., pH, p.i., %, ARN, sec, sp., spp., s.c., s.d., s.e., OMS, etc."

- Los artículos constarán de los siguientes apartados, a menos que la naturaleza del trabajo requiera otra estructura:

A) Página de título: Constará de:

- Título.

- Título abreviado (A running title)

- Nombre(s) de autor(es) y su centro de trabajo, subrayando el autor para correspondencia:

REINA D., SERRANO F.J. y NAVARRETE I.
Parasitología. Facultad de Veterinaria. 10071 Cáceres. España.

- Autor para correspondencia: Nombre, dirección completa, teléfono, fax y dirección electrónica.

B) Resumen y Abstract (siempre en español e inglés), no excediendo de 200 palabras; **Palabras**

Clave y Key words (en número máximo de seis en cada idioma),

C) Introducción, Material y Métodos, Resultados

- **Discusión.**

D) Referencias:

Se relacionarán únicamente los artículos citados en el texto.

Las referencias de las publicaciones deberán ir numeradas y se hará de la manera siguiente:

1. ALLENDE A, SELMA MV, LÓPEZ-GÁLVEZ F, VILLAESCUSA R, GIL MI. 2008. Impact of wash water quality on sensory and microbial quality, including *Escherichia coli* cross-contamination, of fresh-cut escarole. J Food Prot 71: 2514-2518.

Cuando varios artículos del mismo o de los mismos autores hayan sido publicados el mismo año serán citados como "Brown (1980 a, b). Las referencias a observaciones no publicadas, resúmenes o publicaciones en preparación, deberán ser excepcionales, apareciendo sólo en el texto como "com. pers.". La relación bibliográfica deberá ser ordenada alfabéticamente por autores, incluyendo el título completo del trabajo y según los modelos siguientes:

Artículos en revistas:

SERRANO F., PÉREZ-MARTÍN J.E., REINA D., NAVARRETE I., KAPEL C.M.O. 2000. Influence

of infection intensity on predilection sites in swine trichinellosis. *J Helminthol* 73: 251-254.

Libros y publicaciones no periódicas:

NAVARRETE I., CALERO R., REINAD., SERRANO F. 1989. Programa de Acciones contra la Trichinellosis. Servicio de Publicaciones Universidad de Extremadura. Cáceres/Badajoz.

Artículos en libros:

ARROWOOD M.J. 1997. Diagnosis. In: *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis* (Ronald Fayer, Ed.). CRC Press. Boca Ratón. USA., 43-64.

Tesis Doctorales:

FRONTERA E. 2000. Repercusiones orgánicas de la infección experimental por *Ascaris suum* en el cerdo ibérico. Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura. España.

Trabajos no publicados: (Se citarán únicamente si han sido aceptados para su publicación).

SERRANO F.J., REINA D., FRONTERA E., NAVARRETE I., ROEPSTORFF A. Resistance against migrating *Ascaris suum* larvae in pigs immunized with adult worm antigens. *Parasitology* (en prensa).

Las abreviaturas de los nombres de las revistas estarán de acuerdo con las indicaciones de los Journal Citation Reports (JCR); en caso de no estar incluidas en esa relación, se citará con el nombre completo.

E) Tablas y Figuras:

Se presentarán en página aparte, perfectamente numeradas y con referencia, en el reverso, al primer autor y al título del trabajo. Deberán tener suficiente calidad para que cuando se reduzcan a los formatos de una o dos columnas (8 ó 16 cm, respectivamente) conserven suficiente nitidez. En el manuscrito deberá aparecer una llamada destacada (ejemplo: AQUÍ TABLA 2), para la colocación de cada tabla o figura en su lugar en el texto.

5. El autor, una vez aceptado para su publicación el trabajo, recibirá una prueba de imprenta para que sea corregida, y deberá devolverla antes de diez días. En caso de que el autor introduzca modificaciones sustanciales en el texto aceptado por el comité editorial, los gastos correrán a su cargo.

6. El autor podrá recibir separatas de su trabajo, previo pago de su importe. Así mismo, las reproducciones de figuras en color, serán por cuenta de los autores.

7. El Comité de Redacción se reserva el derecho de hacer algunas correcciones de forma cuando lo estime necesario

8. Los autores deberán pagar la suma de 10 US por cada página impresa que ocupe el trabajo en la revista. Esta cantidad se pagará cuando se comunique a los autores que el trabajo está aceptado para su publicación.

INSTRUCTION TO AUTHORS

1. Papers should be sent to:

1.1 Edition Secretary, Prof. Dra. Susana Vilchez Tornero, Instituto de Biotecnología Universidad de Granada, Campus Universitario de Fuentenueva, 18071 Granada España. E-mail: svt@ugr.es

1.2 Editor Prof. Héctor Alcaíno, Casilla 9183, Santiago 1, Chile. E-mail: hectoralcaino@gmail.com

2. Authors should be submitted the manuscript, which will be original and accepted by all the named authors, in an electronic copy. The format is MS Word (DOC), Openoffice (ODT) or Ritch Text Format (RTF).

3. Ibero-Latin American Journal of Parasitology haven't lower limit on manuscript size, provided that sufficient essential information is given. Unnecessarily long papers will be returned to the authors for revision.

4. STYLE:

- Manuscripts should be in Spanish, Portuguese or English, typewritten using Times New Roman 12, with 3 cm left and right margin, including figure and table headings. All pages should be numbered consecutively, figures and tables included.

- The italic typeface should be reserved for scientific names of genera and species, and also for words typewritten in a different to the mean paper language.

- Species names should be given in full on first appearance in the text.

- Parasitic disease will be named according to: Kas-sai T., Cordero M., Euzeby J., Gaafar S., Hiepe Th. and Himonas C.A. 1988. Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD). *Vet Parasitol* 29: 299-326.

- Numbers one to ten should be written as words unless they precede a measurement unit (e.g. 4 m) or serve as markers (e.g. day 3). Numbers larger than ten should only be written as words at the beginning of a sentence.

- Large numbers should be set out without commas, uniformly and in both languages (e.g. 10000 not 10,000 or 10.000). On the other hand, decimal number will appear following the type xx.xx. Equally, very large numbers should be avoided, e.g. 250 million or 2.5×10^8 and not 250 000 000.

- Times should be expressed according to a 24-h

clock (e.g. authors should write 18.00 rather than 6 p.m.).

- Years should not be abridged to the last two figures (e.g. 1999-2000 rather than 1999-00 should be used).
- Abbreviations should be used sparingly and unambiguously. The following abbreviations are commonly used and need not be spelled out: ADP, AMP, ATP, bp, kDa, cpm, D.F., DNA, Fig., g, h (hour), i.m., i.p., mAb, min, NAD, NADH, no., pH, p.i., %, RNA, sec, sp., spp., s.c., s.d., s.e., WHO.
- Articles will consist of the following sections, unless its structure makes any of them redundant:

A) Title-page:

- A concise but informative full title.
- A running title
- Name(s) of author(s) and working Centre. Corresponding author's name should be underlined.
REINA D., SERRANO F.J. and NAVARRETE I. Parasitología. Facultad de Veterinaria. 10071 Cáceres. España.
- Corresponding author: Name, complete address, phone, fax and e-mail address.

B) Abstract and Resumen.

Always in English and Spanish, no more than 200 words; **Key words** and **Palabras Clave** (a maximum of six key words for each language).

C) Introduction, Material and Methods, Results, Discussion.

D) References:

The list of references will be composed only by articles cited in the text.

References should be numbered and will be cited as follow:

1. ALLENDE A, SELMA MV, LÓPEZ-GÁLVEZ F, VILLAESCUSA R, GIL MI. 2008. Impact of wash water quality on sensory and microbial quality, including *Escherichia coli* cross-contamination, of fresh-cut escarole. J Food Prot 71: 2514-2518.

When several papers by the same author(s) have been published in the same year, they should be cited as "Brown (1980 a, b). References to unpublished observations, abstracts or papers in preparation should only be cited in exceptional circumstances, and should be cited only as "pers. com." (personal communication). References must be listed in alphabetical order of the author's name and the title of the paper should be given in full.

Articles should conform to the following formats:

Journal articles:

SERRANO F., PÉREZ-MARTÍN J.E., REINA D., NAVARRETE I., KAPEL C.M.O. 2000. Influence

of infection intensity on predilection sites in swine trichinellosis. J Helminthol 73: 251-254.

Books and other non-periodical publications:

NAVARRETE I., CALERO R., REINA D., SERRANO F. 1989. Programa de Acciones contra la Trichinellosis. Servicio de Publicaciones Universidad de Extremadura. Cáceres/ Badajoz.

Chapter in edited books:

ARROWOOD M.J. 1997. Diagnosis. In: *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis* (Ronald Fayer, Ed.). CRC Press. Boca Ratón. USA., 43-64.

Doctoral Theses:

FRONTERA E. 2000. Repercusiones orgánicas de la infección experimental por *Ascaris suum* en el cerdo ibérico. Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura.

Unpublished works: (This should only be cited if it has been accepted for publication and be styled as follows).

SERRANO F.J., REINA D., FRONTERA E., NAVARRETE I., ROEPSTORFF A. Resistance against migrating *Ascaris suum* larvae in pigs immunized with adult worm antigens. Parasitology (In press).

Abbreviations of Journal titles should conform to those of the Journal Citation Reports (JCR); if Journal is not indexed full name of Journal should be noted.

E) Figure and Table headings:

In a separate page, perfectly numbered and with a reference in the reverse to both the first author and the title of the paper. Their approximate intended location in the text should be marked clearly in the manuscript (eg. HERE FIG. 2). Figures and tables may be accepted provided that they are of a high quality such as to fit neatly into one column (80 mm) or two columns (166 mm) maintaining its quality.

5. The gallery proofs of each paper will be sent in due course to the author(s) for correction and should be returned within ten days of receipt. Expenses incurred as results of substantial modifications to the original text at this stage will be charged to the author(s).

6. Authors could be supplied with offprints of their paper, charging its full value.

7. The Redaction Committee reserves its right to make some form corrections when necessary.

8. Authors must pay the equivalent sum of 10 USD per each printed page in the Journal. This amount must be paid when the paper is accepted.
