

ESTUDIO DE MOLUSCOS LYMNAEIDAE, VECTORES DE FASCIOLOSIS, EN COMUNIDADES DE ALTURA EN LA PROVINCIA DE CATAMARCA

Tomassi, C. A.^{1,3,4}, Carnevale, S.^{2,4}, Cuezco, M. G.^{3,4}

¹ Cátedra Diversidad Animal I, Departamento De Biología, Facultad De Ciencias Exactas Y Naturales, Universidad Nacional De Catamarca (UNCa).

² Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI), Administración Nacional De Laboratorios e Institutos De Salud (ANLIS) "Dr. Carlos G. Malbrán".

³ Instituto De Biodiversidad Neotropical (IBN), Consejo Nacional De Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

⁴ Consejo Nacional De Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

INTRODUCCIÓN

Fasciola hepatica (Linnaeus 1758) es el tremátodo causante de fasciolosis. Esta parasitosis existe en casi todo el país, afectando a distintos ganados que pastan en áreas contaminadas y el hombre, al consumir alimentos contaminados con metacercarias (Carnevale et al., 2015). Los gasterópodos dulceacuícolas Lymnaeidae, del género *Galba* (Schrank, 1803) tienen una marcada especificidad en la transmisión de fasciolosis. Estas especies tienen características ecológicas y etológicas diferentes entre sí, por lo que identificar el tipo de hábitat preferido, la dinámica de la población, umbrales de temperatura o la susceptibilidad a la infección del trematodo es crucial para el conocimiento de la dinámica de fasciolosis. Los lymneidos tienen un rol importante en la diferenciación de los diversos escenarios epidemiológicos y el diseño de estrategias de control (Mas Coma et al., 2009).

Las especies de *Galba* presentan variabilidad intraespecífica marcada en conchillas, lo que dificulta su identificación taxonómica. Además existen especies cuyos sistemas genitales, usualmente útiles en la identificación, son similares ó idénticos. Otras especies, pueden ser identificadas correctamente sobre la base de estudios morfológicos al presentar caracteres únicos de cada una (Pointier et al., 2009). En fasciolosis, la utilización de los marcadores del ADN ribosomal ITS1 e ITS2 permite determinar cuáles son las cepas de Lymnaeidae transmisores a niveles específicos (Bargues et al., 2007). La heterogeneidad de ecorregiones presentes en Catamarca pueden ser determinantes para la presencia de distintas especies de *Galba*, posibles vectores de fasciolosis. Se han registrado previamente en la provincia dos especies naturalmente susceptibles a ser infectadas con *Fasciola hepatica*, *G. neotropica* (d'Orbigny, 1835) y *G. viator* (d'Orbigny, 1835) (Bargues et al., 2016) en la ecorregión de Monte. El objetivo de este trabajo es realizar un relevamiento de gasterópodos dulceacuícolas, potenciales vectores de fasciolosis en la Puna, donde se carece de datos. Los cuerpos de agua en esta ecorregión son humedales que ocurren por encima de los 3000 m. Allí se registran una variedad de ambientes, pantanos, vegas o ciénagas, con aguas poco profundas, permanentes o temporales, con agua estancada o que fluye, fresca, salobre o salina (Chatterjee et al. 2010).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras y morfología

Se revisaron 17 cuerpos de agua en la Puna (departamentos Antofagasta de la Sierra, Belén y Tinogasta) durante Noviembre 2017 a Marzo de 2018. Las colectas se efectuaron en forma manual y mediante uso de coladores. Para estudios anatómicos se relajaron los cuerpos de los gasterópodos en agua a 60-70°C, posteriormente fijados en alcohol 96%. Otros especímenes fueron fijados sin relajación, por inmersión en alcohol 96% (4°C) para estudios moleculares (Cuezco 2009). En cada sitio se tomaron las coordenadas geográficas y altura del cuerpo de agua. Se fotografiaron y midieron las conchillas usando el software Image J 1.49. Se disecaron como mínimo 6 especímenes de cada población, bajo un microscopio estereoscópico Leica MZ6, con cámara clara, para graficar el sistema reproductor.

Estudios moleculares

Se trabajó con 14 muestras a los que se extrajo el ADN con el kit "Genomic DNA Extration kit AccuPrep" de Bioneer bajo a las

indicaciones del fabricante para la amplificación de los marcadores del ADN ITS1 e ITS2. Se emplearon los cebadores Lim1657 (F) 5'-CTGCCCTTTGTACACACCG e ITS1-RIXO (R) 5'-TGGCTGCGTTCTTCATCG, para ITS-1; y NEWS2 (F) 5'-TGTGTGCGATGAAGAACGCAG y ITS2-RIXO (R) 5'-TTCTATGCTTAAATTCAGGGG, para ITS-2. En una mezcla de reacción con primer 10 pmolar, dNTP's 200 µM, enzima Taq polimerasa (Invitrogen) 1U, cloruro de magnesio (MgCl₂) 2,5 mM, buffer de reacción 10x (KCl), BSA, agua bidestilada estéril y 2µl de ADN. Con ciclado de: 94°C 2' 1 ciclo, 94°C 30", 50°C 30" y 72°C 30", 30 ciclos, y 72°C 7' (Correa et al. 2011). La amplificación se verificó en gel de agarosa al 1,5%. Los productos obtenidos fueron purificados mediante kit AccuPrep de Bioneer según las especificaciones del fabricante y se corrieron en gel de agarosa al 1%, usando un marcador de masa (Invitrogen). Para la secuenciación se utilizó reactivo Big Dye, los primers empleados en la PCR de amplificación y Buffer 5X en un volumen final de 7 ul. El ciclado fue: 96°C 1'; 30 ciclos de 96°C 10", 50°C 5' y 60°C 4'. Seguido se realizó la precipitación de los productos con etanol (100%). Se secuenciaron en el Servicio de Neurovirosis (INEI - ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán). Las comparaciones de secuencias se realizaron con datos de secuencias disponibles en la base de datos GenBank utilizando el programa BLASTN del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Las secuencias se alinearon utilizando CLUSTALW2, los análisis filogenéticos se realizaron con el método de Maximum Likelihood (ML) y en el de distancia bases (Neighbour Joining) (NJ). También se seleccionó el modelo de parámetros Kimura 2, en MEGA 6.0.6.

RESULTADOS

Ambiente

Ambas localidades donde se registraron especímenes de *Galba* fueron ambientes lénticos, de poca a nula corriente, de tipo vegas, en las que los caracoles se encontraban sobre las piedras, adheridos a la vegetación acuática o flotando sobre los cursos de agua. El agua disponible aquí era poco profunda y de fuente subterránea que emerge en la superficie. Los especímenes se colectaron en aguas entre los 13°C y 23°C, esto muestra una preferencia por temperaturas templadas y con pH de valores ligeramente ácidos cercano a la neutralidad (4.94 a 6.97) (Figs. 1 y 2)

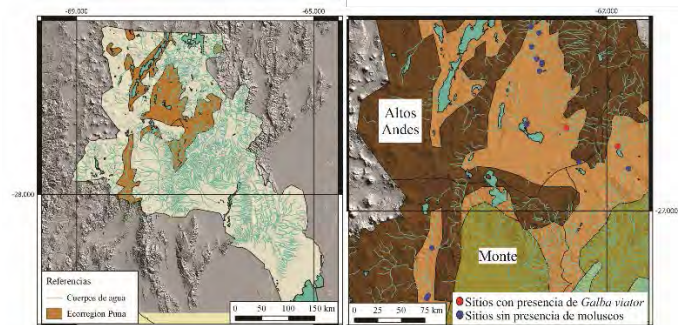


Figura 1. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo construido a partir de QGIS2.14.

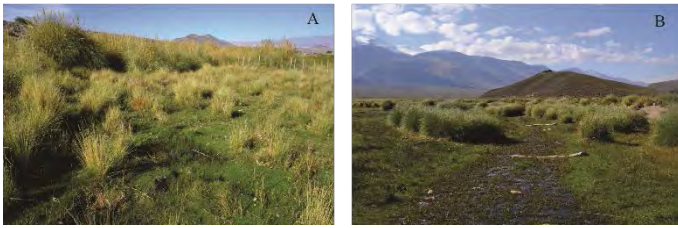


Figura 2. A. Vega, El Peñon, Antofagasta de la Sierra. B. Vega, Laguna Blanca, Belén

Conchilla

Forma helicoidal, ovalada, paredes delgadas, translúcidas castaño claro, dextrógira. Cuatro a 4 y 1/2 vueltas separadas por suturas profundas. Espira cónica con ápice obtuso, contorno de vueltas convexo. Protoconcha lisa. Superficie de teleoconcha con cóstulas axiales marcadas. Vuelta corporal con contorno variable, de muy a poco convexo. Peristoma cortante. Borde palatal expandido algo reflejado. Ombligo sellado.

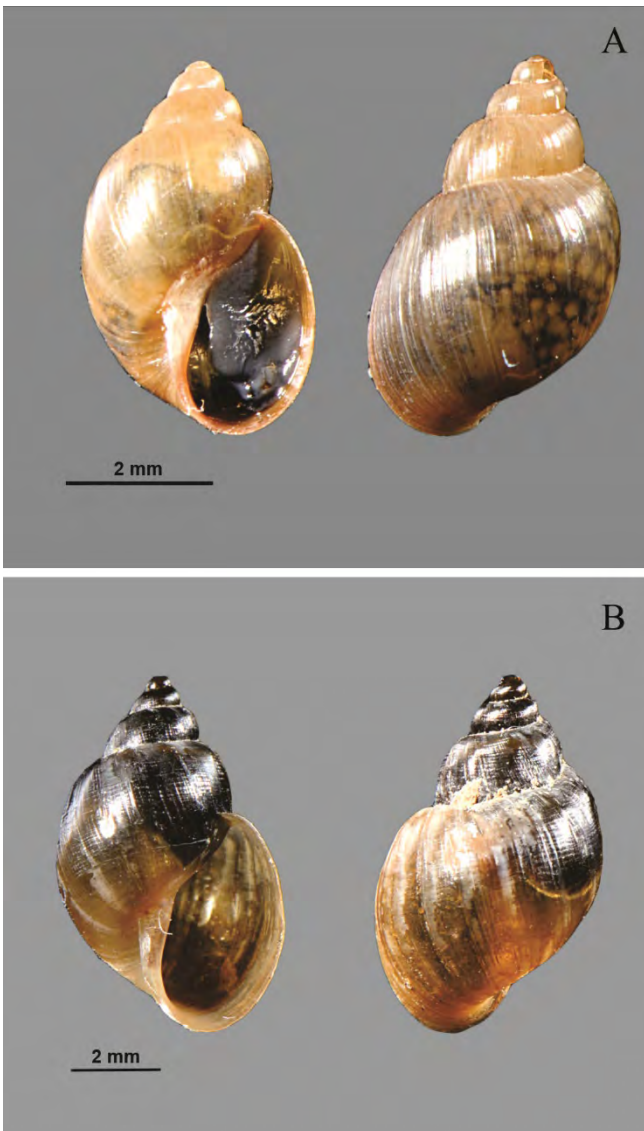


Figura 3. Ejemplares de *Galba viator* en vista ventral y dorsal. A. Ejemplar de El Peñon; B. Ejemplar de Laguna Blanca.

La morfología de conchillas resultó ser similar para ambas localidades. Se encontraron diferencias en los tamaños de las mismas siendo los gasterópodos de la localidad de El Peñon de menor tamaño de conchilla en comparación con los de Laguna Blanca. Se interpreta que dichas diferencias son intraespecíficas. Asimismo, los especímenes de la localidad Laguna Blanca se distinguieron por

presentar líneas espirales no profundas sobre todo en la vuelta corporal (Fig. 3).

Morfología del Sistema Reproductor

Complejo reproductor blanquecino. Ovotestis alargada, globosa. Conducto hermafrodita, cuya parte central forma la vesícula seminal, de pigmentación anaranjada. Glándula de albumen oval. Espermiducto tubular inmerso en la glándula nidamentaria y oviducto, en su extremo distal puede estar cubierto por pliegues del oviducto. Próstata sobre la porción terminal de la glándula nidamentaria, globosa, 1/3 del tamaño de la vaina peniana. Vaso deferente de similar grosor al espermiducto. Penis cubierto con la vaina peniana ligeramente curvada 1/3 la longitud del prepucio. Vagina, corta y muscular, se abre al exterior en el poro genital, en la parte inferior derecha hacia atrás. Bursa cupulatrix, globosa, de 2/3 la longitud del prepucio inserta en la unión con el oviducto, ubicada al nivel de la próstata (Fig. 4).

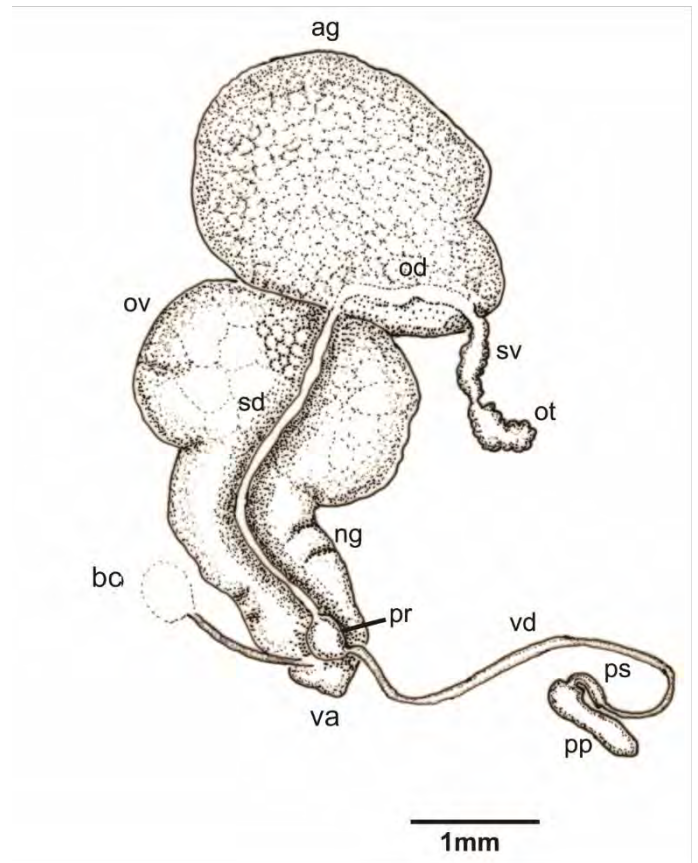


Figura 4. Sistema reproductor de *Galba viator*. ag: glándula del albumen; ng: glándula nidamentaria; od: oviespermiducto; ot: ovotestis; ov: oviducto; pr: próstata; pp: prepucio; ps: vaina penial; sd: espermiducto; bc: bursa cupulatrix; sv: vesícula seminal; va: vagina; vd: vaso deferente.

Identificación molecular

La identificación de las muestras mediante el análisis de las secuencias a través del algoritmo BLASTN confirmó su identidad específica como *Galba viator*, para ITS1 e ITS2. A su vez concuerdan con la información provista en el árbol filogenético (Fig. 5), estos marcadores empleados presentaron 100% de identidad con secuencias de *G. viator*, código de acceso KT215349.1.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos con los estudios morfológicos comparativos y moleculares son congruentes para confirmar a *Galba viator* como la única especie presente en la ecorregión de la Puna en Catamarca, y potencial huésped intermediario de la fasciolosis.

Esta especie representa un marcador importante en ambientes como la Puna de condiciones climáticas y paisajísticas extremas,

similares a otros sitios de altitud elevada en Sudamérica con patrones de endemia para esta parasitosis. La identificación de esta especie en la puna en Catamarca es una información importante en la elaboración futura de políticas sanitarias apropiadas. Sobre esta base es necesario analizar las características epidemiológicas de fasciolosis para esta especie y su relación distribucional con sitios habitados por el hombre.

REFERENCIAS

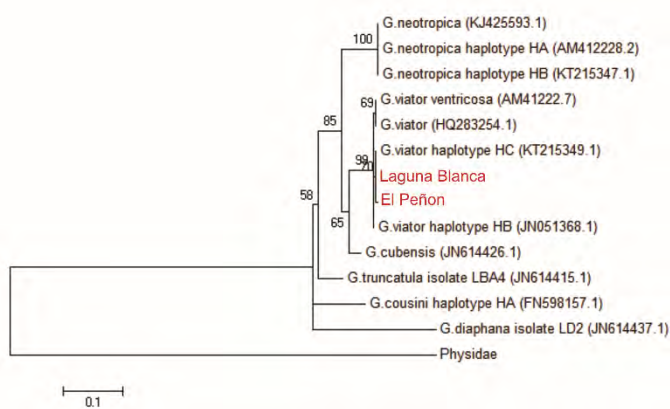


Figura 5. Árbol filogenético de las especies de Galba estudiadas.

AGRADECIMIENTOS

A la Asociación Argentina de Malacología (ASAM) por concederme el Premio Parodiz 2017, que cubrió parte de los gastos implicados en el desarrollo de esta investigación. Agradezco a las Dras. Gabriela Cuezco, Silvana Carnevale y Patricia Córdoba por su orientación en los análisis implicados. A los compañeros de laboratorio en la Universidad Nacional de Catamarca y la Dra. Liliana Salas por brindarme un espacio de trabajo y compañerismo. Al personal del Instituto de Biodiversidad Neotropical por su valiosa ayuda en las campañas de colecta.

BARGUES, M. D., ARTIGAS, P., MERA Y SIERRA, R. L., POINTIER, J. P. y MAS-COMA, S. 2007. Characterisation of *Lymnaea cubensis*, *L. viatrix* and *L. neotropica* n. sp., the main vectors of *Fasciola hepatica* in Latin America, by analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. **101** (7), 621-641.

BARGUES, M. D., MALANDRINI, J. B., ARTIGAS, P., SORIA, C. C., VELÁSQUEZ, J.N., CARNEVALE, S., MASTER, L. M., KHOUBBANE, M. y MAS-COMA, S. 2016. Human fascioliasis endemic areas in Argentina: Multigenic, phenotypic and environmental characterisation of the snail vectors *Lymnaea neotropica* and *L. viator*. *Parasites & Vectors* **9**, 306-326.

CARNEVALE, S., PANTANO, M. L., KAMENETZKY, L., MALANDRINI, J. B., SORIA, C. C. y VELÁSQUEZ, J. N. 2015. Molecular diagnosis of natural fasciolosis by DNA detection in sheep faeces. *Acta Parasitologica* **60** (2), 211-215.

CORREA, A. C., ESCOBAR, J. S., NOYA, O., VELÁSQUEZ, L. E., GONZALEZ RAMIREZ, C., HURTREZ-BOUSSÈS, S. y POINTIER, J. P. 2011. Morphological and molecular characterization of Neotropic Lymnaeidae (Gastropoda: Lymnaeidae). *Infection, Genetics and Evolution* **11**, 1978-1988.

CUEZZO, M. G. 2009. Mollusca Gastropoda. En Domínguez, E., Fernández, H. R. (Eds.) *Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos*. Tucumán Argentina: Fundación Miguel Lillo. pp: 595-630.

MAS COMA, S., ARTIGAS, P. y BARGUES, M. D. 2009. Filogenia de los Lymnaeidae vectores de *Fasciola hepatica*. En Corredor Pereira, C., Guhl Nannetti, F., Duque Beltrán, C. (Eds.). *Tendencias y futuro de la investigación en parasitología y en productos naturales*. Bogotá. pp:141-173.

POINTIER, J. P., NOYA, O., ALARCÓN DE NOYA, B. y THÉRON, A. 2009. Distribution of Lymnaeidae (Mollusca: Pulmonata), intermediate snail hosts of *Fasciola hepatica* Venezuela. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **104** (5), 790-796