

REVISTA

PARASITOLOGÍA

LATINOAMERICANA

Vol. 65 / Nº 2 - SEPTIEMBRE 2016

Versión: On-Line: 0719-6326

Artículos originales

- *Blastocystis*: Biología, Subtipos Genéticos, Patología y Tratamiento
- Aplicación de herramientas bioinformáticas para la clasificación taxonómica de *Taenia solium* y *Taenia saginata*, para el diagnóstico clínico de la neurocisticercosis.
- Pentastomiasis canina ocasionada por *Linguatula serrata* (Porocephalida: Linguatulidae) en Concepción, Chile. Reporte de caso.
- Evaluación por medio de intradermoreacción de la aplicación del inmunógeno de 45kDa de *Trichinella spiralis* para el diagnóstico de Trichinellosis.
- *Amblyomma tigrinum* (Acari: Ixodidae) em *Cerdocyon thous* (Carnivora: Canidae) em Santa Catarina, Brasil.
- Detección de Giardia a partir de ADN genómico en heces formoladas
- Presente y futuro en el tratamiento de la enfermedad de Chagas
- Twenty years of monitoring of mortality and fecundity of *Triatoma infestans* in the laboratory



REVISTA

PARASITOLOGÍA LATINOAMERICANA

Volumen 65 N° 2-2016

ISSN: 0719-6326



REVISTA

PARASITOLOGÍA LATINOAMERICANA

Editor

Mauricio Canals (Chile)

Editores Asociados

Héctor Alcaino (Chile)
Werner Apt (Chile)
Pedro E. Cattán (Chile)
Fernando Fredes (Chile)
Catalina Muñoz (Chile)
Marisa Torres (Chile)
Inés Zulantay (Chile)
Mario George-Nascimento (Chile)

Editores Adjuntos

Guillermo Denegri (Argentina)	Arturo Ferreira (Chile)
Benjamín Cimerman (Brasil)	Ana Fliser (México)
David Botero (Colombia)	Luis Gil (Chile)
Rodrigo Zeledón (Costa Rica)	David Gorla (Argentina)
Jorge Sapunar (Chile)	Alejandro Llanos-Cueto (Perú)
Ramón Lazo (Ecuador)	Santiago Mas-Coma (España)
Raúl Romero (México)	Patricia Muñoz (Chile)
César Náquira (Perú)	Isabel Noemí (Chile)
Oswaldo Ceruzzi (Uruguay)	Chris Schofield (Inglaterra)
George Hillyer (Puerto Rico)	Aldo Solari (Chile)
Alejandro Schijman (Argentina)	Patricio Torres (Chile)
Anne Petavy (Francia)	Daniel González (Chile)
Michel Tivarenck (Francia)	Thomas Weitzel (Alemania)
Naftale Kats (Brasil)	Michael Miles (Alemania)
Ives Carlier (Bélgica)	Claudio Lazzari (Argentina)
Paulo Coelho (Brasil)	Felipe Guhl (Colombia)
Telmo Fernández (Ecuador)	Liliana Semenas (Argentina)

Secretarias

Rosa Ávila
Lucía Canals

Editorial

Francisco Rothhammer Engel, premio Nacional de Ciencias Naturales de Chile 2016.



Francisco Rothhammer ha sido galardonado recientemente con el premio Nacional de Ciencias naturales. El Dr. Francisco Rothhamer se formó como cirujano dentista y como Doctor en Ciencias en las Facultades de Odontología y en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y realizó un post-título en genética humana en la Universidad de Michigan, Estados Unidos.

Académico y profesor titular de la Universidad de Chile durante muchos años, profesor visitante de la Universidad de Texas y actualmente investigador titular del Instituto de Alta investigación de la Universidad de Tarapacá.

La contribución a la ciencia del Dr Rothhamer es notable, en sus más de docientas publicaciones, contribuyendo al conocimiento de la microevolución de las poblaciones originarias de América y a la comprensión de las rutas de poblamiento de América. Rothhamer, entre otros aspectos biomédicos de las poblaciones en las civilizaciones pre-colombinas contribuyó con los primeros reportes de lesiones compatibles con la forma crónica de la enfermedad de Chagas en 35 cuerpos momificados datados 470AC-600 DC en el desierto de Atacama, dando origen a una fecunda línea de investigación en paleo-parasitología en Chile como lo atestiguan algunas de las publicaciones mencionadas más abajo.

Revista Parasitología Latinoamericana, la Federación Latinoamericana de Parasitólogos (FLAP) y la Sociedad Chilena de Parasitología le agradecen por su contribución a la Ciencia y lo felicitan sinceramente por tan merecido reconocimiento.

Rothhammer F, Standen V, Nuñez L, Allison MJ, Arriaza B. Origen y desarrollo de la tripanosomiasis en el área Centro-Sur Andina. *Chungará*. 1984; 12: 155-160.

Rothhammer F, Allison MJ, Nuñez L, Standen V, Arriaza B. Chagas disease in pre Columbian Southamerica. *Am. J. Phys. Anthropol.* 1985; 68: 495-498.

Rothhammer F. Chagas disease in Chilean mummies. *Parasitology Today*. 1985; 1: 3.

Rothhammer F, Llop E, Acuña M, Apt W. Is Chagasic cardiopathy associated with HLA haplotype. *Parasitology Today*. 1986; 2: 76.

Llop E, Rothhammer F, Acuña M, Apt W. HLA antigens in cardiomyopathic Chilean chagasics. *Am J Hum Genet*. 1988; 43:770-773.

Llop E, Rothhammer F, Acuña M, Apt W. Antígenos HLA en cardiomiópatas chagásicos. Evidencia en favor de una protección genética contra esta afección. *Rev. Med. Chile*. 1988; 116: 211-214.

Llop E, Rothhammer F, Acuña M, Apt W. HLA B40 Cw3 in chagasic and noncardiopath. *Rev Mex. Parasit.* 1990; 3: 523.

Llop E, Rothhammer F, Acuña M, Apt W, Arribada A. Antígenos HLA en cardiopatas chagásicos: nueva evidencia basada en un análisis de casos y controles. *Rev. Med. Chile*. 1991; 119: 633-636.

Acuña M, Rothhammer F, Moreno R, Barton S, Arribada A, Apt W, Llop E. Evidencias genéticas corroboran la hipótesis de Neghme sobre la mayor benignidad de la tripanosomiasis americana en Chile. *Rev. Med. Chile*. 1992; 120: 233-238.

Les saluda cordialmente,

Mauricio Canals Lambarri

(M.D., Ph.D.)

Editor

Parasitología Latinoamericana.

Blastocystis: Biología, Subtipos Genéticos, Patología y Tratamiento

GARCÍA FLORES L*, SANTILLÁN-BENÍTEZ JL*, HERNÁNDEZ NAVARRO MD*

* Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex).

Correspondencia:

Dr. Jonnathan G. Santillán Benítez, Facultad de Química • Paseo Colón Esq. Paseo Toluca, CP 50120 • Toluca Estado de México Tel.+ 52 722 217-41 20 ext 134. jonnathangsb@yahoo.com.mx

Summary

Blastocystis is a chromista, unicellular, anaerobic eukaryote living in the intestinal tract of different hosts including humans. There are different morphologies of the organism, each with variations in morphology and size, featuring several subtypes (STs) of which at molecular and epidemiological studies that have revealed a significant difference in the distribution of subtypes by guests and geographic regions have been identified. In the treatment of *Blastocystis* infection, have been used a variety of drugs, however, it has been reported in the inefficacy of these parasite. Furthermore, it has been a change in the biological behavior *Blastocystis* when treated to a drug, which is suggested to be due to, the possible resistance of the parasite to the drugs, which makes *Blastocystis* an organism even more pathogenic as well as the secretion of cysteine proteases, which play an important role in its pathogenesis.

In this work recent advances in biology, pathogenesis, genetic variants and treatment and biological behavior to a drug and its association to various diseases is shown.

Introducción

Biología: Taxonomía

Varias observaciones fueron realizadas anteriormente en el estatus taxonómico de *Blastocystis*. Las primeras descripciones fueron realizadas por Brittan y Swayne quienes escribieron sobre la epidemia del “cólera” o “células anulares” considerándolo causante de la epidemia en Londres en 1849 (Swayne 1849, Brittan, 1849). Fue entonces que a principios de 190’s que el organismo fue específicamente observado por Alexeieff (1911) y Emile Brumpt (1912) quien propuso que se trataban de levaduras saprofitas inofensivas del tracto intestinal. El nombre del genero de “*Blastocystis*” fue acuñado por Alexeieff mientras que Brumpt proporciono el nombre de la especie “*hominis*”. Varias décadas después en 1967, Reclasificaron el organismo como un protista, basándose en la morfología y proporción fenotípica tal como, la presencia de uno o más núcleos, mitocondria, aparato de Golgi y retículo endoplásmico (Zierdt 1991).

Con los avances de análisis moleculares de la pequeña subunidad rRNA (SSU-rRNA) y la elongación del factor 1 α se colocó al organismo dentro del filum eucariota, en los heterokontophyta en 1996. Dentro de este grupo también llamado stramenofilos que comprende a algas, diatomeas, oomicetos y mohos del fango y con base a estos análisis moleculares *Blastocystis* forma el nuevo miembro de este grupo. Aunque esta clasificación a nivel molecular parece satisfactoria, hay una

discrepancia en la morfología entre *Blastocystis* y otros stramenofilos. En general los stramenofilos tienen flagelos, que es una característica ausente en *Blastocystis*, debido a esto, conlleva a una propuesta de reclasificación de este parásito y colocar a este organismo en un sexto reino llamado “Chromista” (Subhash & Jeremiah 2013). Por lo que, se coloca a *Blastocystis* en una clase de blastocistos recién creado en el Reino Chromista, Subreino Chromobiota, Infrareino Heterokonta o Stramenopiles, Subphylum Opalinata, Clase Blastocystea y Género *Blastocystis*. Esta clasificación hace de *Blastocystis* el primer chromista conocido como parásito de los humanos (Tan 2004, 2008).

Morfología

Blastocystis es caracterizado por las formas vacuolar, granular, quística y amebode. Así también se le ha visto en las formas multivacuolar y avacuolar, (Tan, et al. 2002) (Tabla1). El contenido de las formas de *Blastocystis* se encuentran resumidos en la Tabla 2.

A continuación, se describen las diferentes morfologías de *Blastocystis*

La forma vacuolar también conocida como cuerpo central, es la forma más predominante en las heces y en cultivo, considerada como la forma típica de *Blastocystis*. Comprende una gran vacuola central que ocupa más de la mitad de la célula. Esta forma muestra amplias variaciones en tamaño que varía de 3-25 μ m de diámetro, presenta una vacuola central que ocupa el 90% del volumen de la célula, alrededor de esta se encuentra el resto del citoplasma, que


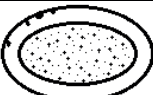




Morfología					
Vacuolar	Granular	Ameboide	Quiste	Multivacuolar	Avacuolar
					

Tabla 1. Se muestran las diferentes morfologías de *Blastocystis*

Estado del trofozoíto	Vacuola central	Pared celular	Número de núcleos	Tamaño (µm)
Vacuolar	Presente	Ausente	1-4 o más	3-25
Granular	Presente	Ausente	1-4	3-80
Ameboide	Ausente/presente	Ausente	1-2	2.6-7.8
Quiste	Ausente	Presente	1-2	5-40
Multivacuolar	Ausente	Ausente	1-2	5-8
Avacuolar	Ausente	Ausente	1-2	5

Tabla 2. Muestra número y organelos que contienen cada una de las formas de *Blastocystis*

contiene el núcleo del parásito con sus organelos, Fig. 1 (Romero 2010). Por otra parte, se ha visto en el subtipo 6 del parásito que, utiliza la forma vacuolar para almacenar lípidos (Chandrasekaran et al. 2014).

La forma granular, su diámetro oscila entre 3-80µm, parece que deriva de la forma vacuolar, se caracteriza por la presencia de gránulos dentro de la vacuola central, que pudieran ser mielinas, pequeñas vesículas, gránulos cristalinos o gotas lipídicas. Fig.2 (Stenzel & Boreham 1996).



Figura 1. Forma Vacuolar de *Blastocystis* tomada a 40X

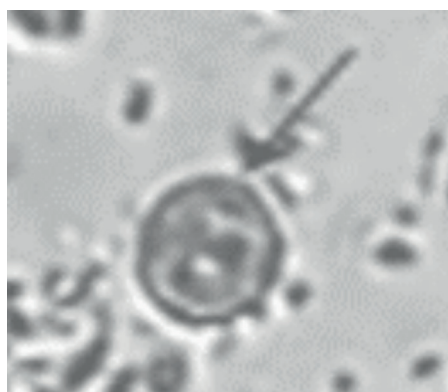


Figura 2. Forma Mitocondrial o granular de *Blastocystis* tomada a 40X

Forma amebode: son observadas en muestras fecales relacionadas con diarreas agudas, por lo tanto, vista sólo únicamente en muestras sintomáticas. Se describe a esta forma como oval o tipo ameba, con uno o dos pseudópodos grandes y carentes de membrana celular y vacuola central. Su diámetro oscila entre 2.6 y 7.8 μm , Fig.3, se menciona que se trata de un intermediario entre la forma vacuolar y la forma quística. Su reproducción se sugiere que es por esporulación y plasmotomía (Stenzel & Boreham 1996). Además, es la forma responsable de las manifestaciones clínicas, se ha descrito una alta actividad de proteasas en esta forma, jugando un rol importante en los síntomas de las personas infectadas por *Blastocystis* (Rajamanikam & Kumar 2013).

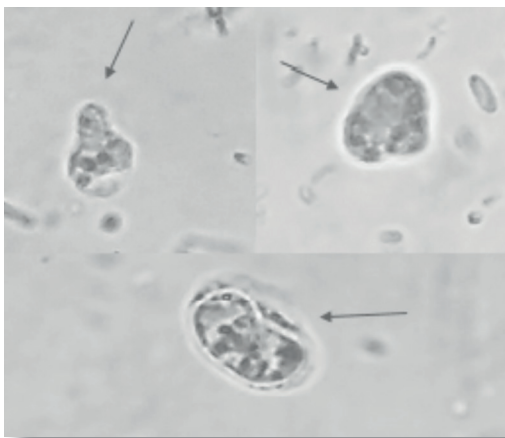


Figura 3. Formas ameboides de *Blastocystis*

Hay dos tipos de formas amebode, una con una gran vacuola central que contiene pequeñas partículas diminutas de densidad electrónica, mientras que la otra contiene múltiples vacuolas pequeñas en el citoplasma (Tan & Suresh 2006).

La forma quística, posee forma redondeada, luminosa, presenta una pared celular gruesa, citoplasma condensado con muchas vacuolas pequeñas, puede presentar de uno a cuatro núcleos., mide de 5-40 μm de diámetro, posee una gran vacuola central llena de líquido. La membrana externa es lisa rodeada de una capa de material capsular, Fig.4 (Stenzel & Boreham 1996).

Otras formas; la forma avacuolar mide 5 μm , carece de vacuola central. La forma multivacuolar mide de 5-8 μm , contiene múltiples vacuolas pequeñas, poseen pléos gruesos en su superficie.

Estas formas han sido sugeridas que representan el estado *in vivo* del parásito, mientras que la forma vacuolar y granular son formas predominantes en cultivo *in vitro* (Tan et al. 2002).

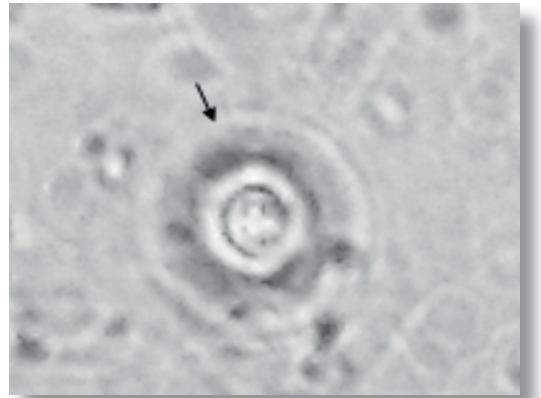


Figura 4. Forma quística de *Blastocystis*

Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Blastocystis* es aún un enigma, se ha reportado que las formas de replicación pueden ser por medio de fisión binaria, plasmotomía y esquizogonía, La persona infectada con *Blastocystis*, con presencia de estos en el intestino, excreta en sus heces al medio a la forma infectante de este protozoo, que es la fase de quiste, siendo este la única forma infectante, que a su vez contamina agua y alimentos, etc., siendo transmitido por la ruta fecal-oral (Lepczynska et al. 2015). Esto posibilita que lleguen por vía oral a otras personas de manera directa o indirectamente. Al ser ingerido el quiste, desciende al intestino delgado en donde hay una ruptura de este inducida por el pH, desencadenando una mitosis en la cual se desarrolla la forma vacuolar o la forma multivacuolar. Posteriormente, algunas de estas estructuras se pueden transformar a la fase granular o amebode, esta última juega un papel muy importante en el desarrollo de las manifestaciones clínicas. Su reproducción es asexual por fisión binaria y por esquizogonía. Posteriormente pasa nuevamente a la fase quística, que es eliminada al medio en las heces fecales. (Fig. 5) (Hotez 2000).

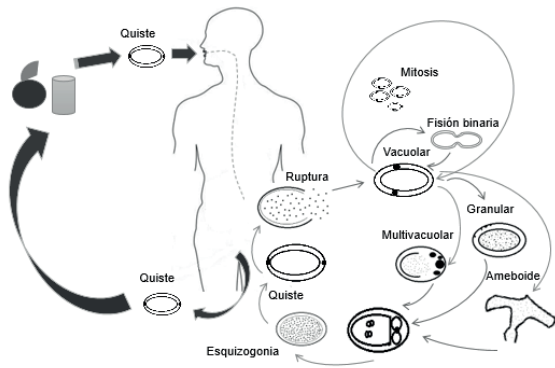


Figura 5. Ciclo de vida de *Blastocystis*

Subtipos genéticos

Los subtipos (ST) han sido determinados basados en la pequeña subunidad ribosomal del gen (SSU-rRNA) por medio de amplicones de PCR y por medio de una asignación directa utilizando un subtipo de diagnóstico de secuencia marcada *in situ* (STS) usando cebadores específicos, (Stensvold 2013).

Mientras que un número de subtipos en animales continúa expandiéndose, se ha reportado hasta el ST-17, en los humanos parece ser que continua estable, en quienes se han encontrado únicamente los subtipos ST-1 al ST-9, de los cuales de el St1 al St4 son los más comunes (Stensvold 2013). Así también, el ST- 2 es el más asociado a síntomas de diarrea, el ST-1 a pacientes asintomáticos, mientras que el ST- 3 está más asociado a IBS. Por otro lado, el ST-6 es encontrado en aves, ST-2 en perros y ST-8 en marsupiales, lo que da una correlación entre subtipos de animales domésticos que son encontrados al mismo tiempo en humanos con respecto a los encontrados en animales silvestres, que raramente se ven en humanos (Ramírez et al. 2013).

En Francia los subtipos encontrados fueron ST-1, ST-2, ST-3, ST4 y ST7, siendo el ST-3 más predominante en pacientes sintomáticos (Soupart et al. 2009) Mientras que en Brasil en un grupo étnico de Tapirape el subtipo más predominante es el ST1, encontrándose además los subtipos ST2 y ST3 (Malheiros et al. 2011). En China el subtipo más predominante en la población es el ST-3, siguiéndole ST-2, ST-4 (Meloni et al. 2012) y ST-1, en Grecia el ST-3, ST-1 y ST-2, en Egipto en pacientes sintomáticos ST-3, ST-1 y ST-6, mientras que en pacientes asintomáticos son; ST-3, ST-6 y ST-7 (Boorom et al. 2008).

Un estudio realizado por Scanlan y colaboradores en el 2014 determinaron la frecuencia de *Blastocystis* en la población humana, obteniendo que, el subtipo más frecuente es el ST-3 (42%) posteriormente el ST-2 (25%), ST-4(19%), ST-1(12%) y ST-8(2%) concluyendo que los subtipos más predominantes en las poblaciones humanas son del ST-1 al ST-4 (Fig.6).

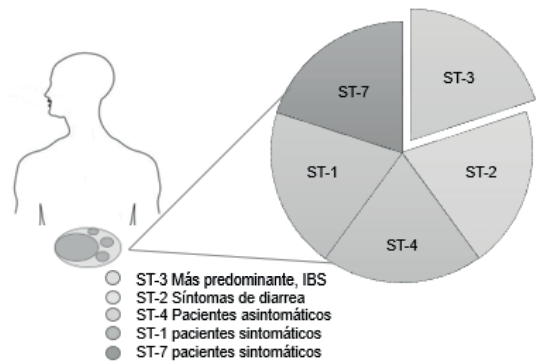


Figura 6. Prevalencia de los subtipos genéticos de *Blastocystis*

Prevalencia

Blastocystis es un parásito cosmopolita, que infecta a una gran variedad de vertebrados. Debido a la gran diversidad genética de *Blastocystis* que se han encontrado en humanos y que a su vez estos se han identificado en animales, esto conlleva a una contaminación cruzada entre animales y humanos por lo tanto se sugiere una baja especificidad en el hospedero de este microorganismo (Noel et al. 2003). Siendo transmisible de animal a humano, así también se sugiere que puede generarse una contaminación de humano a humano, de acuerdo a que el ST-3 es el más prevalente en la infección por *Blastocystis*, (Yoshikawa et al. 2000). Su prevalencia esta reportada que se presenta en un 60% en países en desarrollo, mientras que en países desarrollados se da en 5%-20% (Khoshnood et al. 2015). Es el parásito protozoario más común en humanos, anteriormente era considerado como un parasito no patógeno. Su alta prevalencia en países en desarrollo es relacionada a la falta de higiene, al consumo de comida y agua contaminada (Beyhan et al. 2015).

Un estudio realizado por Pestehchian y colaboradores en el 2015 en una tribu de Irán, analizaron a 655 pacientes, de los cuales se obtuvo 361 (55.1%) personas infectadas, determinando que, el parásito más frecuente fue *G. intestinalis*

(28.2%), siguiéndole *B. hominis* (27.5%). Así también obtuvieron los grupos más infectados, siendo estos mujeres y niños de 0-9 años.

Los individuos más infectados se dan en la edad promedio de 30-50 años y en niños de 4-5 años, en hombres se da en 59.8% y en mujeres 44.9%. Con una alta prevalencia durante verano de hasta 85.1% (Mostafa et al. 2015). La incidencia de este parásito, puede deberse a que este microorganismo ha desarrollado resistencia a tratamientos antiparasitarios para protozoarios (Foaud et al. 2011). Hoy en día se sabe que es un parásito importante en individuos inmunodeficientes e inmunosuprimidos incluyendo VIH y pacientes con cáncer, cuya prevalencia es de 30%-40% (Meloni et al. 2012).

Sintomatología

Estudios epidemiológicos han demostrado la asociación de *Blastocystis* con una variedad de desórdenes gastrointestinales, incluyendo diarrea, espasmo abdominal, fatiga, constipación, flatulencias o bien la infección puede presentarse de manera asintomática (Stark et al. 2007, Ramírez et al. 2010, Shawky et al. 2011).

Se ha demostrado que *Blastocystis* puede causar alergias cutáneas por la activación de células inmunológicas específicas Th2 produciendo interleucinas IL-3, IL-4, IL-5 y IL-13, que median la respuesta alérgica IgE (Rajic et al. 2015).

Durante los últimos años, se ha reportado una asociación entre *Blastocystis sp.* y el padecimiento de síndrome de colon irritable (IBS) (Irritable Bowel Síndrome) definido como un desorden común que produce dolor abdominal, defecación irregular con periodos de estreñimiento y diarrea (Sinagra et al. 2016, Occhipinti & Smith 2012). Se le atribuye esta asociación debido a que se ha encontrado quistes y trofozoítos de *Blastocystis sp.* en las muestras de heces en pacientes con IBS que en un grupo control, (Das et al. 2016) Algunos subtipos que se han detectado en pacientes con IBS han sido los subtipos ST-1, ST-3 y ST-4. En pacientes asintomáticos han sido ST-2, ST-3 y ST-4 (Foaud et al. 2011). La prevalencia de IBS se encuentra entre 5%-24% en países desarrollados y de un 35%-43% en países en desarrollo (Lepczynska et al. 2015).

Tratamiento

Algunos fármacos que se han usado para la infección de protozoarios han sido compuestos

5-nitroimidazoles incluyendo al metronidazol, tinidazol, ornidazol y secnidazol. Así también como nitazoxanida y albendazol (Speich et al. 2013).

En *Blastocystis* se han usado los fármacos como, metronidazol, nitazoxanida, trimetoprim-sulfametoxazol, paramomicina, iodoquinol, ketoconazol, secnidazol, emetina, tinidazol y el probiótico *Saccharomyces boulardii* (Sekar & Shanthi 2013). Durante los últimos años se ha visto que este probiótico tiene una eficacia en infecciones bacterianas y parasitarias, como en giardiasis y en *Blastocystis* (Kelesidis & Pothoulakis 2012) (Tabla 3).

Fármaco
Metronidazol
Clioquinol
Paramomicina
Albendazol
Nitazoxanida
Secnidazol
Iodoquinol
Ketoconazol
Emetina
Tinidazol

Tabla 3. Lista de fármacos que se han utilizado contra la infección de *Blastocystis*

A pesar de que metronidazol es considerado la primera línea terapéutica para la infección por *Blastocystis sp.* ha resultado fallida para algunos pacientes. Estudios realizados mencionan que esta variación de respuesta ante metronidazol está

relacionado con la presencia de subtipos de este parásito resistentes a este fármaco. Los subtipos 4 y 7 se han sugerido que son los representantes patógenos de los subtipos. Se ha visto que el ST-7 es resistente a metronidazol mientras que el subtipo 4 es sensible a este fármaco (Mirza et al. 2011). Es posible que esta resistencia o sensibilidad ante un fármaco, esté relacionada con la alta o baja actividad de proteasas en los subtipos, recientemente se ha reportado que el ST-7 de pacientes sintomáticos muestra una alta actividad de proteasas de cisteína y de arginasas, comparado con el ST-4 (Mirza et al. 2011).

Por otro lado, un estudio realizado por Van Hellemond et al (2013) mencionan que, el tratamiento con paramomicina es significativamente más eficaz que metronidazol y otros tratamientos como clioquinol, obteniendo una erradicación del parásito en un 77% mientras que con metronidazol y clioquinol en un 38%.

Comportamiento biológico de *Blastocystis* ante un fármaco

Se ha visto un cambio en el comportamiento biológico de *Blastocystis* cuando es tratado ante un fármaco, los parásitos tratados pueden revertirse a la forma granular como un mecanismo de sobrevivencia para liberar gránulos reproductivos y con esto incrementar el número de parásitos en cultivos (Haresh et al. 1999).

Mecanismo de acción de metronidazol en *Blastocystis*

Metronidazol es un nitroimidazol, usado para tratar infecciones de organismos anaerobios intestinales en humanos. Metronidazol entra a las células y a la mitocondria por difusión simple, en la mitocondria, metronidazol compete con un aceptor de electrones. Los organismos susceptibles a 5-nitroimidazoles transfieren electrones generados por su sistema de transporte de electrones al grupo nitro de los fármacos y no a sus aceptores de electrones naturales. La reducción del grupo nitro de metronidazol resulta de la síntesis de radicales citotóxicos (R-NO-2). Por lo tanto, el efecto antimicrobiano depende de su reducción metabólica dentro de la célula diana que resulta de la liberación de radicales citotóxicos (Nasirudeen et al. 2004, Balakrishnan & Kumar 2014).

Un estudio realizado por Nasirudeen y colaboradores en el 2004 observaron que; cuando

Blastocystis fue tratado con metronidazol, la mayoría de las formas de este parásito sufrió muerte celular programada, después de haber sido expuesto a $5 \times 10^{-7} M$ metronidazol, con una ID₅₀ $3.34 \times 10^{-7} M$. Las células tratadas con este fármaco mostraron contracción celular y oscurecimiento del citoplasma. La contracción de la célula se debió a la compactación de los orgánulos en el citoplasma, hecho que representa una evidencia morfológica importante de la apoptosis. Además, se mostró una condensación nuclear, encogimiento celular, la deposición de cuerpos apoptóticos unidos a la membrana, mantenimiento de la estructura citosólica y el tamaño del orgánulo (a diferencia de la necrosis en los orgánulos se hinchan y aparecen desorientados).

Bioquímica

La glucólisis es la ruta metabólica en células procariotas y eucariotas. En eucariotas, este proceso ocurre en el citosol. Sin embargo, la fusión de dos enzimas glucolíticas, trifosfato isomerasa (TPI) y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), estas se encuentran en los miembros de los stramenofilos (diatomeas y oomicetos). La fusión de los genes de las proteínas mitocondriales TPI-GAPDH es bien conocida en la diversidad de los stramenofilos, incluyendo los no anaerobios como *Blastocystis* (Nakayama et al. 2012).

Se han determinado enzimas en un tipo de mitocondria de *Blastocystis* tales como; piruvato ferredoxin oxido-reductasa (PFOR), hierro-hidrogenasa, NADH: ubiquinona subunit7 (NAD7) y β -succinil-CoA sintasa (β -SCS), (Wawrzyniak et al. 2008).

Patogenia

Se sabe bien que las proteasas juegan un papel muy importante en las interacciones patógeno-hospedero, debido a la secreción de proteasas específicas que estimulan la secreción intestinal o inflamación e inhiben la inmunidad del huésped, promoviendo así la enfermedad en el hospedero (Wawrzyniak et al. 2012). El incremento de la permeabilidad del intestino está asociada a síndrome de colon irritable y enfermedad celíaca (Camilleri et al. 2012). La modulación de la función de la barrera intestinal es uno de los mecanismos empleado por patógenos que inducen la patología del hospedero (Wu et al. 2014).

Las proteasas de cisteína de *Blastocystis* juegan un papel muy importante en su patogénesis, debido a que se ha reportado que pueden degradar la secreción de las IgAs del intestino humano (Puthia et al. 2005) he inducen las citocinas preinflamatorias, para de esta manera sobrevivir y colonizar el intestino del humano (Abdel & Mohamed 2011). La patogénesis resulta de la interacción entre los productos del parásito (por ejemplo, proteasas de cisteína localizadas en la vacuola central de *Blastocystis* y las monocapas del enterocito) que influyen una respuesta inflamatoria e inmunológica del hospedero. Algunos investigadores sugieren que los inhibidores de proteasas de cisteína son un potencial terapéutico para infecciones parasitarias (Mirza et al. 2011).

Blastocystis puede inducir apoptosis en las células, reorganizar la distribución de F-actina, disminuir la resistencia eléctrica trasepitelial (TER) y aumentar la permeabilidad epitelial (Puthia et al. 2006). Se ha reportado que, el ST-7 incrementa significativamente la apoptosis en los enterocitos en comparación con ST-4 que no induce patología en los enterocitos, así también, induce cambios en la resistencia epitelial, permeabilidad y en la localización de la unión estrecha (ZO-1) (Wu et al. 2014). Se ha visto que el ST-7 en muestras de pacientes sintomáticos además de mostrar una alta actividad de proteasas como se ha descrito anteriormente, también tiene una alta actividad de arginasas, lo que los hace factores de virulencia potenciales de este parásito (Mirza et al. 2011).

Los antígenos de *Blastocystis* inducen una expresión abundante de citosinas proinflamatorias, incluyendo interleucina 1 β (IL-1 β), IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) Las diferentes habilidades de ST-7 Y ST-4 (WR-1) para desencadenar la activación de MAPK y la expresión de citosinas proinflamatorias, pudiera deberse a la diferencia de expresión de proteasas de serina o a las diferentes actividades de las proteasas de serina (Xing et al. 2014). Debido a que, a niveles altos de proteasas de serina, neurológicamente comienzan activar la generación de dolor abdominal y contracciones musculares (Fouad et al. 2011).

La cisteína proteinasa regula el incremento de la expresión del gen interleucina (IL)-8 a través de la activación del factor nuclear Kb, pero el tratamiento con metronidazol evita la producción de IL-8 (Stensvold et al. 2008).

Durante el curso de la infección, la activación de NF-kB y MAPK en las células intestinales resulta la secreción de citosinas pro-inflamatorias y la inflamación intestinal (Zanello et al. 2009). MAPK se sabe que juegan un papel muy importante en la regulación de la expresión de citocinas en la respuesta inmune (Zhang & Chen 2005). La expresión del gen IL-8 está regulado por una serie de vías y su región promotora ha secuencias de unión por una serie de factores de transcripción, incluyendo NF-kB, NF-IL-6 y AP-1. En la mayoría de los tipos de células, la activación de NF-B es el paso más importante para la transcripción del gen IL-8. En las células no estimuladas, NF-kB existe en forma inactiva en el citoplasma, unido a las proteínas inhibidoras denominadas IkbBs. La estimulación por diversos inductores puede activar una cascada de señalización que culmina con la fosforilación de IkbBs, resultando en la degradación de las proteínas Ikb (Puthia et al. 2008).

En el secretoma de *Blastocystis*, se encontraron 307 proteínas, de las cuales 170 pueden estar implicadas en la relación de parásito hospedero, finalmente, 75 proteínas secretadas han sido clasificadas de acuerdo a sus funciones de las cuales pueden tener una conexión directa con la patogenicidad, tales como proteasas, enzimas hexosas de digestión, lectinas, glicosiltransferasas e inhibidores de proteasas. El parásito usa un tipo de hidrolasas para atacar los tejidos del hospedero, la fucosidasa, hexosaminidasa y poligalacturonasa han sido identificadas en el secretoma de *Blastocystis* que podrían participar en este proceso para la degradación de las glucoproteínas del hospedero (Denoeud et al. 2011).

En la Fig. 7, se muestra como *Blastocystis* ante la presencia de un fármaco se reinvierte a la forma mitocondrial, pero el fármaco como metronidazol ejerce apoptosis en esta forma del parásito. Así también este parásito secreta proteasas de cisteína, serina y arginasas que degradan las glucoproteínas (IgA) del intestino, induciendo apoptosis en los enterocitos. A su vez, las proteasas de serina neurológicamente activan la generación de dolor abdominal y contracciones musculares en el humano, debido a la activación de MAPK que regulan la expresión de citocinas de la respuesta inmune y del factor NF-kB que a su vez activa el gen de IL-8 que amplifica la respuesta inflamatoria local.

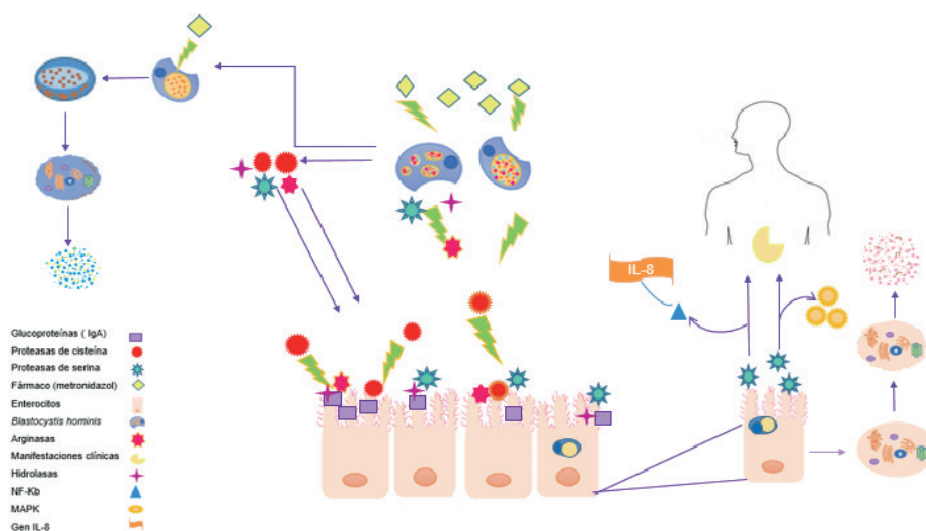


Figura 7. Mecanismo de acción de *Blastocystis* ante un fármaco y modo de acción en los enterocitos del epitelio intestinal.

Conclusiones

Blastocystis es un parásito controversial, ya que aún no se sabe mucho acerca de su biología como es el caso de su ciclo de vida y su patogenia en el hospedero. La gran diversidad genética (ST's) de este parásito hace que sea más complicado entender y determinar el rol patológico que ejerce en el huésped, su comportamiento ante un fármaco, así como su resistencia ante ellos, hace de este parásito un organismo difícil de tratar y erradicar en las diferentes enfermedades gastrointestinales y dermales en las que ha sido asociado. Así también su actuación ante la población de personas inmunodeficientes e inmunosuprimidos, en los pacientes asintomáticos y sintomáticos.

Referencias

- Abdel DM, Mohamed O. Protease activity of *Blastocystis hominis* subtype3 in symptomatic and asymptomatic patients. *Parasitol Res.* 2011;109: 321-327.
- Alexief A. Sur la nature des formations dites 'Kistes de *Trichomonas intestinalis*. *Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologie.* 1911; 71: 296-298.
- Balakrishnan D, Kumar S. Higher Caspase-like activity in symptomatic isolates of *Blastocystis* spp. *Parasit vectors.* 2014; 7: 21
- Beyhan Y, Yilmaz H, Cengiz Z, Ekici A. Clinical significance and prevalence of *Blastocystis hominis* in man, Turkey. *Saudi Med J.* 2015; 9(36):1118-1121.
- Boorom K, Smith H, Nimri L, Viscogliosi E, Spanakos G, Parkar U, Hua L, Nong X, Ok U, Leelayoova S, Jones M. Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasit Vectors.* 2008; 1: 40.
- Brittan F. Report of a series of microscopical investigations on the pathology of cholera. *London Medical Gazette* 1849; 9: 530-542.
- Brumpt E. (1912). «*Blastocystis hominis* N. sp et formes voisines.». *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 1912; 5: 725-730.

- Camilleri M, Madsen K, Spiller R, Van Meerveld B, Verne G. Intestinal Barrier function in health and gastrointestinal disease. *J Neurogastroenterol Motil.* 2012; 24: 503-512.
- Chandrasekaran H, Kumar S, Panchadcharam C, Bathmanaban P, Raman K, Theragarajan G. High lipid storage in vacuolar forms of subtype 6 *Blastocystis* sp. In ostrich. *Parasit Vectors.* 2014; 7: 469.
- Das R, Khalil S, Mirdha B, Makharia G, Dattagupta S, Chaudhry R. Molecular Characterization and Subtyping of *Blastocystis* Species in Irritable Bowel Syndrome Patients from North India. *PLoS ONE.* 2016; 11(1): e0147055.
- Denoeud F, Roussel M., Noel B., Wawrzyniak I., Da C., Diogon M., Viscogliosi E., Brochier-Armanet C., Couloux A., Poulain J., Segurens B., Anthouard V., Texie C., Blot N., Poirier P., Choo G., Kevin SW., Artiguenave F., Jaillon O., Aury J., Delbac F., Wincker P., Vivares C., El Alaoui H. Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biol.* 2011;12(3): R29.
- Haresh K, Suresh K, Anuar K, Saminathan S. Isolate resistance of *Blastocystis hominis* to metronidazole. *Tropical Medicine and International Health.* 1999; 4(4):274-277.
- Foad A, Basyoni M, Fahmy R, Kobaisi H. The pathogenic role of different *Blastocystis hominis* genotypes isolate from patients with irritable bowel syndrome. *Arab J Gastroenterol.* 2011; 12: 194-200.
- Hotez P. The other intestinal protozoa: Enteric infections Caused by *Blastocystis hominis*, *Entamoeba coli*, and *Diantamoeba fragilis*. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2000; 3(11): 178-18.
- Kelesidis T, Pothoulakis C. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therap Adv Gastroenterol.* 2012; 5(2): 111-125.
- Khoshnood S, Rafiei A, Saki J, Alizadeh K. Prevalence and Genotype Characterization of *Blastocystis hominis* Among the Baghmalek people in Southwestern Iran in 2013-2014. *Microbiol.* 2015; 8(10): e23930.
- Lepczynska M, Dzika E, Kubiak K. The role of *Blastocystis* sp. As an etiology of irritable bowel syndrome. *Pol Ann Med.* 2015; [Http://dx.doi.org/10.1016/j.poamed.2015.04.001](http://dx.doi.org/10.1016/j.poamed.2015.04.001)
- Malheiros A, Stensvold R, Graham C, Braga G, Shaw J. Short Report: Molecular Characterization of *Blastocystis* Obtained from Members of the Indigenous Tapirapé Ethnic Group from the Brazilian Amazon Region, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011; 85(6): 1050-1053.
- Meloni D, Poirier P, Mantini C, Noel C, Gantois N, Wawrzyniak I, Delbac F, Chabé M, Delhaes L, Dei-Gas E, Luigi P, EL Alaoui H, Viscogliosi E. Mixed human intra- and inter-subtype infections with the parasite *Blastocystis* sp. *Parasitol Int.* 2012; 61: 719-722.
- Mirza H, Teo D, Upcroft J, Tan S. A rapid, Hig-Throughput Viability Assay for *Blastocystis* spp. Reveals Metronidazole Resistance and Extensive Subtype-Dependent Variations in Drug Susceptibilities. *Am Soc Microbiol.* 2011; 2(55): 637-648.
- Mirza H, Wu Z, Kidwai F, Tan S. A Metronidazole-Resistant Isolate of *Blastocystis* spp. Is Susceptible to Nitric Oxide and Downregulates Intestinal Epithelial Inducible Nitric Oxide Synthase by a Novel Parasite Survival Mechanism. *Infect Immu.* 2011; 12(79): 5019-5026.
- Mostafa S, Abd K, Salah Z, Mostafa S. Prevalence and diagnostic approach for a nebleted protozoo *Blastocystis hominis*. *Asian Pac J Trop Dis.* 2015; 5(1): 51-59.
- Nakayama T, Ichiro I. y Archibald J. Broad Distribution of TPI-GAPDH Fusion Proteins among Eukariotes: Evidence for Glycolytic Reactions in the Mitochondrion? *PLoS ONE.* 2012; 12(7): e52340.
- Nasirudeen A, Eu Y, Singh M, Tan K. Metronidazole induces programmed cell death in the protozoan parasite *Blastocystis hominis*. *Microbiology.* 2004; 150: 33-43.
- Noel C, Peyronnet C, Gerbod D, Edgcomb V, Delgado P, Sogin M, Capron M, Viscogliosi E, Zenner L. Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from different hosts based on the comparison of small-subunit rRNA gene sequences. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; 126: 119-123.
- Occhipinti K, Smith J. Irritable Bowel Syndrome: A Review and Update. *Clin Colon Rectal.* 2012; 25: 46-52.
- Pestehchian N, Nazari M, Haghghi A, Salehi M, Yosefi H, Khosravi N. Prevalence of Intestinal Parasitic Infection Among Inhabitants and Tribes of Chelgerd, Iran 2008-2009. *J Clin Diag Res.* 2015; 9(5): LC01-LC04.
- Puthia MK, Vaithilingam A, Lu J, Tan KS. Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitol Res.* 2005; 97(5): 386-9.
- Puthia M, Sio S, Lu J, Tan K. *Blastocystis ratti* Induces Contact-Independent Apoptosis, F-Actin Rearrangement, and Barrier Function Disruption in IEC-6 Cells. *Infect Immun.* 2006; 7(74): 4114-4123.
- Puthia M, Lu J, Tan SW. *Blastocystis ratti* Contains Cysteine Proteases That Mediate Interleukin-8 Response from

- Human Intestinal Epithelial Cells in an NF-Kb- Dependent manner. *Eukariot Cell*. 2008; (7): 435-443.
- Rajamanikam A, Kumar S. Amoebic forms of *Blastocystis* spp.-evidence for a pathogenic role. *Parasit Vectors*. 2013; 6: 295.
- Rajic B, Arapovic J, Raguz K, Boskovic M, Babic S, Maslac S. Eradication of *Blastocystis hominis* prevents the development of simtomatic Hashimoto's thyroiditid: a case report. *J Infect Dev Ctries*. 2015; 9(7): 788-791.
- Ramirez M, Hernandez R, Lopez E, Moncada D, Rodriguez A, Pagaza C, Gonzales A, Flisser A, Kawa A, Maravilla P. Parasites in Mexican patients with irritable bowel síndrome: a case-control study. *Parasit Vectors*. 2010; 96 (3): 1-3.
- Ramirez J, Viviana L, Carolina D, Felipe A, Carolina A, Stensvold C. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infect Genet Evol*. 2013; 22: 223-228.
- Romero R. *Microbiología y parasitología humana*. 2th ed. México: Panamericana; 2010.
- Scanlan P, Stensvold C, Rajilic M, Heilig H, De Vos W, O'Toole P, Cotter P. The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiol Ecol*. 2014; 90: 326-330.
- Shawky A, Maha M, Reham A, Mohamed H. The pathogenic role of different *Blastocystis hominis* genotypes isolated from patients with irritable bowel syndrome. *Arab J Gastroenterol*. 2011;12: 194-200.
- Sinagra E, Pompei G, Tomasello G, Cappello F, Morreale G, Amvrosiadis G, Rossi F, Lo monte A, Rizzo A, Raimondo D. Inflammation in irritable bowel syndrome: Myth or new treatment target? *World J Gastroenterol*. 2016; 7: 2242-2255.
- Sekar U, Shanthi M. *Blastocystis*: Consensus of treatment and controversies. *Trop parasitol*. 2013; 3(1): 35-39.
- Souppart L, Sancier G, Cian A, Wawrzyniak. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitol Res*. 2009; 105: 413-421.
- Speich B, Marti H, Ame S, Ali S, Bogoch I, Utzinger J, Albonico M, Keiser J. Prevalence of intestinal protozoa infection among school-aged children on Pemba Island, Tanzania, and effect of single-dose albendazole, nitazoxanide y albendazole-nitazoxanide. *Parasit Vectors*. 2013; 6: 3.
- Stark D, Van Hal S, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Irritable bowel syndrome: A review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. *Int J Parasitol*. 2007; 37: 11-20.
- Stensvold C, Nielsen V, Molbak K, Smith V. Pursing the clinical significance of *Blastocystis*- diagnostic limitations. *Trends parasitol*. 2008; 1(5): 23-29.
- Stensvold R. Comparison of secuencing (Barcode Region) and Sequence-Tagged-Site PCR for *Blastocystis* Subtyping. *J Clin Microbiol*. 2013; 1(51): 190-194.
- Stensvold C. *Blastocystis*: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. *Trop Parasitol*. 2013; 3(1):26-34.
- Stenzel D, Boreham P. *Blastocystis hominis* Revisited. *Clin Microbiol Rev*. 1996; 4(9): 563-584.
- Subhash CH, Jeremiah SS. *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Trop parasitol*. 2013; 3(1): 17-25.
- Swayne JG. An account f certain organic cells peculiar to the evacuation of cholera. *The Lancet* 1849; 2: 368-371.
- Tan KS, Singh M, Yap H. Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spots in terra incognita. *Int J Parasitol*. 2002; 32: 789-804.
- Tan KS. *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Vet Parasitol*. 2004; 126: 121-144.
- Tan T, Suresh K. Amoeboid form of *Blastocystis hominis*-a detailed ultrastructural insight. *Parasitol Res*. 2006; 99: 737-742.
- Tan K. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis spp*. *Clin Microbiol Rev*. 2008; 4(21): 639-665.
- Van Hellemond J, Molhoek N, Koelewijn R, Wisman P, Van Genderen P. Is paramomicyn the drug of choice for eradication of *Blastocystis* in adults? *J Infect Chemother*. 2013; 19: 545-548.
- Wawrzyniak I, Roussel M., Diogon M., Couloux A., Texier C., Tan K., Vivares C., Delback F, Wincker P, El Alaoui H. Complete circular DNA in the mitochondria-like organelles of *Blastocystis hominis*. *Int J Parasitol*. 2008; 38: 1377-1382.
- Wawrzyniak I, Texier C, Poirier P, Viscogliosi E, Tan K. Characterization of two cysteine proteases secreted by *Blastocystis* ST7, a human intestinal parasite. *Parasitol Int*. 2012; 61: 437-442.
- Wu Z, Mirza H, Joshua D, Kevin S. Strain-Dependent induction of Human Enterocyte Apoptosis by *Blastocystis* Disrupts Epithelial Barrier and ZO-1 organization in caspase 3- and 9 Dependent Manner. *BioMed Res Int*. 2014; ID 209163.11

Xing M, Wen C, Bing C, Ding J, Jiao H, Lehming N, Shyong K, Zhang Y. Differential Regulation of Proinflammatory Cytokine expression by Mitogen- Activated Protein Kinases in Macrophages in Response to Intestinal Parasite Infection. *Infect Immun*. 2014; 11(82): 4789-4801.

Yoshikawa H, Abe N, Iwasawa M, Kitano S, Nagano I, Wu Z, Takahashi Y. Genomic Analysis of *Blastocystis hominis* Strains Isolated from Two Long-Term Health Care Facilities. *J Clin Microbiol*. 2000; 4(38): 1324-1330.

Zanello G, Meurens F, Salmon H. *Saccharomyces boulardii* effects on gastrointestinal diseases. *Curr Issues Mol Biol*. 2009; 11: 47-58.

Zhang Y, Chen D. MAP Kinases in Immune Responses. *Infect Immun*. 2005; 11(82): 4789-4801.

Zierdt H. *Blastocystis hominis*-past and future. *Clin Microbiol Rev*. 1991; 4: 61-79.

Aplicación de herramientas bioinformáticas para la clasificación taxonómica de *Taenia solium* y *Taenia saginata*, para el diagnóstico clínico de la neurocisticercosis.

CUENCA-LEÓN K. ¹, CUENCA-LEÓN J. ², CRUZ-ERAZO J. ³

^{1 2 3} Universidad Católica de Cuenca. Avenida de las Américas. Ciudad Cuenca-Ecuador.

Correspondencia:
Email: kcuenca@ucacue.edu.ec; kangeles22@hotmail.com

Summary

The present work investigative has by object classify taxonomically it had solium and it had saginata since them two forms parasitic have the same morphology, both in the form resistant as in the adult, but the effects of each one are different, is by this the importance of the study, since it species solium produces neurocysticercosis disease in where the system nervous Central is committed and if is detects full-time is can calcifying and avoid that this advance. The methodology applied to this classification was in order: download of sequences from the Genbank, alignment, evaluation statistics of results of alignment and phylogeny molecular. As result we obtained that the best alignment was given by Clustal Omega with - 13402.651769, being the value more negative and the phylogeny by the program Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) with the method of inference Maximum Likelihood which threw data that allowed find similarity between them two phylogenies of *T. Solium* and *T. Saginata*.

Introducción

En el 2003 se publico el primer borrador del Genoma Humano lo cual despertó el interés mundial a nivel científico, ya que este nos permitiría conocer de cierta manera a los millones de pares de bases que codifican a la especie humana, y esto conllevaría a avances a pasos agigantados en el tratamiento de muchas enfermedades. (Sarti 1997)

Basándonos en la amplia variabilidad genética que nos caracteriza, una de las principales preguntas ha sido qué cambios en el ADN producen enfermedades. Empíricamente se han identificado muchas mutaciones responsables de múltiples patologías humanas. Pero en los últimos años se han desarrollado numerosas herramientas de predicción entre estas la Bioinformática, esta herramienta es fundamental fuera del laboratorio, es así que dentro de las áreas que más apoyo y demanda tienen son: bases de datos, software para visualización de estructuras moleculares, sistemas de manejo integrado de laboratorios a nivel de industria farmacéutica, Software para estudios de redes genéticas (Genetic Networks), y desarrollo de nuevos algoritmos para estudios de estructura proteica. (León 2002) (Jawetz 2010)

Como se lo menciono antes la Bioinformática es una herramienta importante para el tamizaje de ciertas enfermedades desde el punto de vista comparativo entre especies, ya que en algunos casos es vital conocer el origen del microorganismo para un diagnóstico y tratamiento adecuado. (Jawetz 2010) Una de las enfermedades que requiere interés es la neurocisticercosis, ya que para su diagnóstico

debemos conocer el origen de la misma, como ya es conocido el género *Tenia* tiene dos especies *solium* y *saginata* de las cuales su huevo y parásito adulto son idénticos macroscópica y microscópicamente siendo esto objeto de estudio en los análisis clínicos, teniendo solamente como punto de apoyo la alimentación del individuo ya que la *T. solium* es proveniente de la carne de cerdo y la *T. saginata* de carne de vacuno. (OMS Teniasis/Cisticercosis 2015)

La neurocisticercosis se produce por el consumo de carne de cerdo infectada o por malas costumbres higiénicas, la *saginata* solamente llega a producir una parasitosis que si no es controlada a tiempo migraría a otros órganos como el hígado sin llegar a comprometer el Sistema Nervioso Central como la *Tenia solium*. (Meza 2012) (Saavedra 2010)

La diferenciación de estas especies es vital y la bioinformática y las técnicas moleculares son las que nos ayudaran a definir a que especie pertenece la forma parasitaria que encontremos en el análisis clínico. (Saavedra 2010) (Álvarez 2011)

Los inconvenientes en la aplicación de estas técnicas de diferenciación a nivel de la bioinformática y molecular, es que no son habituales y son costosas, debido a esto en el campo clínico se reporta el genero y la supuesta especie, ya que en la realidad no se sabe con certeza la especie del parásito hallado. Estudios hay muchos sin embargo, como se lo menciono el factor económico no permite aplicar estas metodologías que sin lugar a duda ayudarían a mejorar el diagnóstico y tratamiento, incluso la prevención de muchas enfermedades; y porque no a erradicar esta parasitosis; como países desarrollados ya lo han hecho (Walteros 2009, Nieves 2011).

Métodos

Los siguientes pasos servirán para llegar al resultado final del proyecto:

1. Descarga de secuencias de la Base de Datos

Se descargó 20 secuencias en total entre *Taenia solium* y *Taenia saginata* del GenBank. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

Nº	IDENTIFICACIÓN	NOMBRE
1	GT284693	Taenia
2	GT889685	Taenia
3	GT889684	Taenia
4	GT889679	Taenia
5	GT284686	Taenia
6	GT889678	Taenia
7	GT284690	Taenia
8	GT284687	Taenia
9	GT889683	Taenia
10	GT284836	Taenia
11	GT889681	Taenia
12	GT284689	Taenia
13	GT284694	Taenia
14	GT889680	Taenia
15	GT889682	Taenia
16	GT284691	Taenia
17	GT889687	Taenia
18	GT284692	Taenia
19	GT284688	Taenia
20	GT889686	Taenia

Tabla 2. Identificación y números de secuencias tomadas del GenBank

2. Alineamiento

Para esto se utilizó dos programas: Clustal Omega – versión web (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y Mafft – versión web (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>)

3. Evaluación estadística de resultados del alineamiento

Dicha evaluación estadística se la realizó con una herramienta web llamada CIPRES Science Gateway (<https://www.phylo.org/>)

4. Filogenia Molecular

En base al mejor resultado obtenido, que en este caso fue el del programa “Clustal Omega” (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), mientras que la filogenia se generó con los programas: Mega – versión web (Tamura Koichiro, Stecher Glen, Peterson Daniel, Filipinski Alan y Kumar Sudhir) y adicional el análisis de bayes con MCMC, modelo evolutivo GTR con el programa Mr. Bayes – versión web 3.2.6 (Autores: Huelsenbeck John, Larget Bret, Paul van der Mark)

Resultados

1. Alineamiento

PROGRAMAS	%
Clustal	-13402.651769
Mafft	-13239.440965

Tabla 2. Resultado del alineamiento en los programas Clustal y Mafft.

2. Filogenia

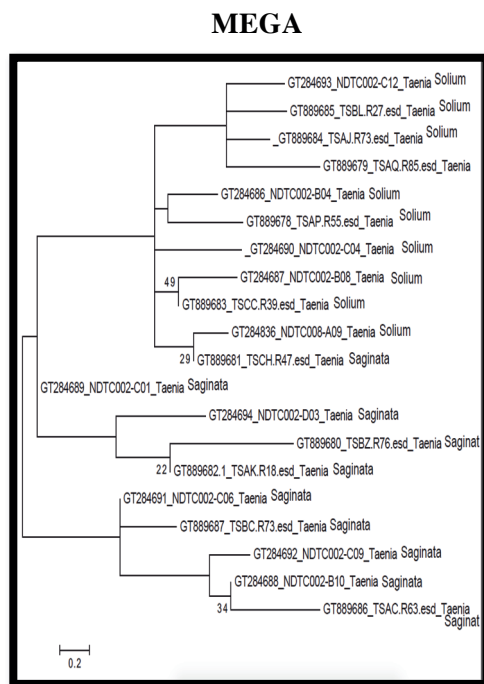


Figura 1. Árbol según el programa Mr. Bayes

MR. BAYES

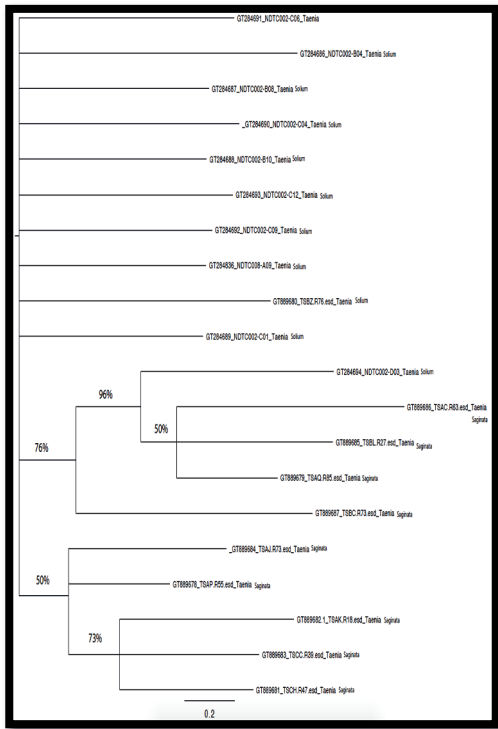


Figura 2. Árbol según el programa Mr. Bayes

Discusión

Una de las dificultades encontradas en este estudio fue la poca información existente sobre el tema, como el de Elsa Sarti en el año de 1997 que realiza un estudio cuya finalidad fue desarrollar pruebas rápidas, sensibles y específicas que permitan detectar a los portadores de *Taenia spp*, estandarizado un ELISA de captura de antígenos de tenia en heces de personas infectadas y de animales infectados experimentalmente, pero esta técnica no permite distinguir entre *T. solium* y *T. saginata*. Lo cual lleva a implementar nuevos protocolos como uso de anticuerpos monoclonales dirigidos a atacar antígenos específicos que puedan diferenciar entre *T. solium* y *T. saginata*. Se han obtenido secuencias repetidas específicas de ADN para emplearlas en el diagnóstico por hibridación y se ha iniciado el estudio de anticuerpos locales y sistémicos en la teniasis; las pruebas diagnósticas mencionadas se relacionan con nuestro estudio ya que hasta la actualidad no se aplican técnicas de diferenciación entre estas especies lo cual puede llevar a un incorrecto diagnóstico y

tratamiento; la bioinformática y la biología molecular proponen nuevos métodos pero en muchos de los casos aún están en etapa experimental y no se encuentran disponibles en el mercado.

Meza en el 2002 realizó un trabajo en donde usó técnicas de hibridación con sondas de ADN especie-específicas como técnicas de biología molecular para evaluar muestras de heces son opciones futuras para el diagnóstico de la teniasis; también se ha utilizado experimentalmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otras para la diferenciación de huevos de *Taenia spp*. Existe un reporte serológico para el diagnóstico de la teniasis; utilizando como fuente de antígeno productos de excreción-secreción, se usó un Western blot para este propósito y los resultados mostraron 95% de sensibilidad y 100% de especificidad, ya que no reaccionó con sueros de individuos con cisticercosis, sino sólo con los de individuos confirmados de estar infectados con la forma adulta de *Taenia solium*, al igual que el estudio anterior se concluye con la falta de estudios de tipo molecular.

Caris M, en el 2005 realiza estudios de PCR secuenciando un fragmento de ADN de cada especie logrando identificar a cada una; Kecher en el 2007 continúa con proyectos similares amplificando la región SCAR entre estas dos especies obteniendo mayor especificidad, en lo que concluyen todos estos estudios y el mío también es en la complejidad y el alto costo necesario para su ejecución, pero sin lugar a duda ayudaran primero a la identificación y luego a la prevención de los efectos que causan cada una de estas especies .

Conclusiones:

El proyecto que realizamos ha contribuido de manera muy importante para identificar y resaltar que tanto la *Taenia Solium* como la *Taenia Saginata* son muy parecidas morfológicamente en su forma resistente y adulta, pero diferentes en las secuencias de nucleótidos, por ende estos parásitos contribuyen con enfermedades muy diferentes la una de la otra. El reconocimiento de estas especies es de vital importancia para prevención, diagnóstico y tratamiento adecuado de enfermedades complejas como la Neurocisticercosis.

Para esta diferenciación se aplicaron herramientas bioinformáticas las cuales permitieron obtener los mejores resultados en alineamiento con el Programa

Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) ya que fue el valor con mayor negatividad (-13402.651769) y la mejor filogenia con el programa Mega – versión web 6.0.6 (Autores: Tamura Koichiro, Stecher Glen, Peterson Daniel, Filipiski Alan y Kumar Sudhir).

Referencias

Álvarez-Rodríguez E, Torres-Gárate R, Gutiérrez Larráinzar A, Cabello J, Espinós D. Neurocisticercosis: recomendaciones de tratamiento a propósito de tres casos. 2011 An Med Interna 2011; 21(8): 382-386.

Cáris M, Kerche K. *Taenia saginata*: differential diagnosis of human taeniasis by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. Parasitol Aug. 2005; 110(4):412-5.

Jawetz G. Microbiología Medica Ed 25º Brooks .2010.

Kerche Dias K, Moraes Aoki S, Garcia J, Cáris Maroni Nunes. *Taenia solium* and *Taenia saginata*: identification of sequence characterized amplified region (SCAR) markers. Exp Parasitol. 2007; 16;117(1):9-12.

León N, Padilla C, Pajuelo M. Cisteinoproteasas catépsinas I de *Taenia solium*: rol biológico en la infección y potencial uso para el inmunodiagnóstico de la neurocisticercosis . Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v30n3/a13v30n3.pdf>

Meza A, Aguilar F. Teniasis humana por *Taenia solium*. 2012. Revista Mexicana de Patología Clínica 2012. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2002/pt022d.pdf>

Nieves Orta M, Guna JL, Pérez S, Gimeno C. Diagnóstico de las Teniasis intestinales. 2011. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/Cestintes.pdf>

OMS Teniasis/Cisticercosis. Nota descriptiva N°376 Mayo de 2015 . Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs376/es/>

Rodriguez-Hidalgo R, Geysen D, Benítez-Ortiz W, Geerts S, Brandt J. Comparison of conventional techniques to differentiate between *Taenia solium* and *Taenia saginata* and an improved polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay using a mitochondrial 12S rDNA fragment. J Parasitol. 2002; 88(5):1007-11.

Saavedra H, Gonzales I, et al. Diagnóstico y manejo de la neurocisticercosis en el Perú. 2010. 586 Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2010; 27(4): 586-91.

Sarti E. La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. 1997. Salud pública Méx vol.39 n.3 Cuernavaca May. Disponible en: http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36341997000300009

Walteros D. Cisticercosis: situacion de la parasitosis. Informe Final de Evento Cisticercosis; 2009. Avances en el conocimiento de la enfermedad. V 1.013.09

Programas utilizados:

GenBank Author: Goad Walter, 1979 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

Clustal Omega - web version Authors: Bateman Alex, Beltrao Pedro, Birney Ewan, Brazma Alvis, Enright Anton, Flicek Paul, 1994 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> and Mafft - web version Authors: Bateman Alex, Beltrao Pedro, Birney Ewan, Brazma Alvis, Enright Anton, Flicek Paul, 1994. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>

Mega - web version Authors: Tamura Koichiro, Stecher Glen, Peterson Daniel, Filipiski Alan y Kumar Sudhir, 2008. <http://www.megasoftware.net/mega4/>

Mr.Bayes - web version 3.2.6 Authors: Huelsenbeck John, Larget Bret, Paul van der Mark, 2001

Parasitología médica y/o veterinaria: reporte de caso

Pentastomiasis canina ocasionada por *Linguatula serrata* (Porocephalida: Linguatulidae) en Concepción, Chile. Reporte de caso.

FERNÁNDEZ F I.¹, ROJAS F J.², HERRERA L F.³

- ¹ Laboratorio de Parasitología. Departamento Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. itfernan@udec.cl
- ² Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción.
- ³ Hospital Veterinario "Concepción", Bernardino Corral 117, Collao, Concepción.

Summary

Pentastomids are a group of parasites of birds, reptiles and mammals, whose presence in Chile has been reported in rare occasions. *Linguatula serrata* is a pentastomid that could be affects domestic and wild carnivores. This parasite could be cause rhinitis and respiratory distress. This paper presents a case of canine Pentastomiasis, in female patient, whose characterized mild respiratory symptoms and eventual hunting of wildlife. Pathogenesis, epidemiology, treatment and control aspects were reviewed. There are no previously reported of canine pentastomiasis in the Concepcion city. This report takes relevance due of zoonotic nature of *Linguatula serrata*, so measures prevention of human and animal pentastomiasis, are reviewed.

Keywords: : *Linguatula serrata*, pentastomids, *Canis lupus familiaris*, Chile.

Introducción

Los pentastómidos constituyen un conjunto homogéneo y especializado que incluye a más de un centenar de especies que se comportan como parásitos de cavidades y vías respiratorias en aves, reptiles y mamíferos, infección denominada como pentastomiasis (Apt 2013).

Hasta la fecha, la posición taxonómica de estos parásitos ha sido muy discutida, siendo incluidos por algunos autores dentro de los artrópodos, anélidos, crustáceos y como un grupo separado, el *Phylum* Pentastomida (Riley 1986, Christoffersen & De Assis 2013). Sin embargo, estudios moleculares establecen mayor cercanía filogenética con los crustáceos branquiuros (Møller et al. 2008, Gunn & Pitt 2012), lo que actualmente es ampliamente reconocido. El grupo está compuesto de dos Ordenes: Cephalobaenida y Porocephalida siendo, comúnmente, especies de este último Orden las que causan los parasitismos más frecuentes sobre mamíferos.

Linguatula serrata (Fröhlich 1789) es un pentastómido parásito obligado cosmopolita que afecta tanto a mamíferos domésticos como salvajes y, de forma accidental, al ser humano. La forma adulta, que se encuentra en las vías nasales, senos frontales y cavidad timpánica de perros y gatos, efectúa postura de huevos los que son expulsados al medio ambiente mediante el estornudo, secreciones salivales y, eventualmente, junto con las deposiciones del mismo hospedero cuando éste los ha ingerido previamente. Los hospederos intermediarios, habitualmente mamíferos herbívoros como ovinos, caprinos y lagomorfos, se infectan al ingerir los

huevos desde pasto o agua contaminados y, en su intestino, eclosionan liberando una larva de primer estado que penetra la pared intestinal y, mediante la circulación sanguínea, alcanza los ganglios linfáticos, hígado, bazo, pulmones y otros órganos, donde se enquistada y forma pequeños nódulos. En su interior, la larva muda continuamente hasta formar el estado de ninfa infectante que, rompe su envoltura quística y migra por la cavidad peritoneal, penetrando distintos tejidos. El hospedero definitivo se infecta al ingerir los tejidos u órganos infectados por la ninfa, que migra desde el estómago hacia su nasofaringe, donde después de varias mudas alcanza el estado adulto (Soulsby 1987, Mehlhorn 2008).

La información respecto de este parasitismo en animales de Chile es escasa y dispersa. La presencia de formas adultas ha sido señalada en *Canis familiaris* (Sievers 1926), *Lycalopex culpaeus* (Álvarez 1960) y *Pseudalopex griseus* (Alarcón 2005) mientras que los estados ninfales han sido encontrados en los rumiantes *Bos taurus* (Poo 1971, Garcinuño & González 1977, Valenzuela et al. 1995, Urrutia 2001) *Ovis aries* y *Capra hircus* (Tagle 1953), en los roedores *Cavia porcellus* (Gast-Galvis 1960), *Octodon degus* y *Abracoma benetti* (Álvarez 1960, Babero & Cattán 1975), en los lagomorfos *Oryctolagus cuniculus* y *Lepus europaeus* (Gajardo-Tobar 1943) y en el cérvido *Pudu pudu* (Fernández & Villalba 1986).

Con el objetivo de contribuir a complementar el conocimiento de este parasitismo en Chile, se informa de un caso de pentastomiasis canina ocurrido en la ciudad de Concepción y se revisan aspectos relativos a su patogenia, epidemiología, diagnóstico y control.

Materiales y métodos

Caso Clínico

En octubre de 2014, concurrió hasta nuestra clínica “Almendra”, paciente canino hembra, raza labrador de seis años de edad, 34.7 kilos, esterilizada, proveniente del área Valle Nonguén (36°50'44.7”S; 73°00'30.2”W), límite urbano noreste de la ciudad de Concepción, Región del Bío Bío, Chile. El paciente vive acompañado de tres perros más, todos con su programa de vacunación y desparasitación al día, alimentándose exclusivamente de alimentos para mascotas. Sin embargo, en forma esporádica salen de la propiedad y llegan con aves o roedores que han cazado. El dueño acude a consulta debido a que el animal presenta dolor lumbar que al estudio radiográfico se asoció a disco-espondilosis leve de vértebras lumbares e inestabilidad lumbosacra. En esta oportunidad, así como en ocasiones anteriores, el propietario comenta que el animal presenta estornudos esporádicos pero permanentes en el tiempo. Por tal motivo, se realiza un estudio radiográfico torácico y de cráneo en busca de antecedentes que justifiquen el cuadro clínico, el cual no arrojó signos radiográficos compatibles. Se administró antibióticos (Cefadroxilo) y corticoides (Prednisona) por una semana como tratamiento empírico buscando la resolución del cuadro respiratorio superior. Un mes después el dueño llegó a nuestra consulta con un parásito que, de acuerdo a su relato, el animal eliminó luego de un evento de tos paroxística. Al examen clínico “Almendra” mostró descarga de apariencia mucosa con trazas de sangre. Los síntomas bajaron en intensidad luego de la eliminación del parásito y en un plazo de una semana, habían remitido completamente.

Resultados

La identificación taxonómica del parásito encontrado se efectuó en el Laboratorio de Parasitología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. Estos fueron montados en una lupa estereoscópica para observar y establecer sus características morfológicas principales. El ejemplar mostró ser aplanado en sentido dorso ventral con numerosas segmentaciones de apariencia anular y cubierto de espinas. Su cuerpo presentó el extremo anterior de aspecto lanceolado

o foliáceo provisto de dos pares de ganchos y un angostamiento progresivo hacia su extremo posterior. El gusano midió 6.5 cm de largo y 0.8 cm en su parte más ancha (Fig. 1). De acuerdo a las características morfológicas mencionadas anteriormente y a la revisión de literatura especializada de referencia (Borchert 1975, Mehlhorn 2008) se determinó que el ejemplar correspondía a una hembra adulta de *Linguatula serrata*. En el examen de la secreción nasal se ratificó el diagnóstico al observar la presencia de huevos ovalados, de color amarillento, con una membrana externa gruesa y tamaño de 90 por 70 µm (Fig. 2).



Figura 1. Vista macroscópica de ejemplar adulto de *Linguatula serrata* expulsado desde nasofaringe canina (Octubre de 2014).

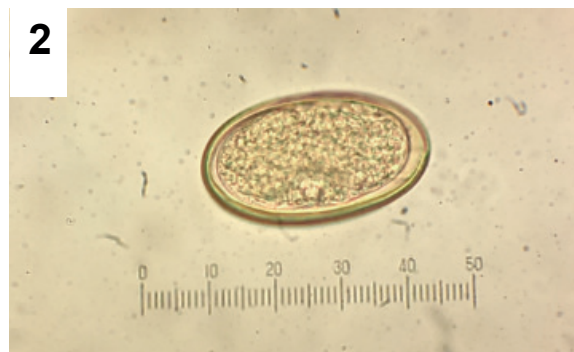


Figura 2. Huevo de *Linguatula serrata* en fluido nasal canino (Microscopio óptico, aumento de 40x).

Discusión

La patogénesis de *L. serrata* aún no está aclarada completamente. La forma adulta se fija a la mucosa mediante ganchos quitinosos succionando linfa y secreciones mediante su aparato bucal lo que provocaría lesiones, irritación e inflamación, aunque no se descarta la acción de enzimas proteolíticas que, se ha demostrado, el parásito excreta (Alcalá-Canto et al. 2007). La ocurrencia de altas cargas parasitarias incrementaría la intensidad del daño sobre la mucosa nasofaríngea, incluyendo la presencia de edema, necrosis y hemorragia en la superficie del tracto nasofaríngeo (Oryan et al. 2008). Perros con baja carga parasitaria pueden comportarse como asintomáticos mientras que aquellos con infecciones más intensas pueden presentar rinitis, disnea y estornudos intermitentes, flujo nasal mucoso, con eventual epistaxis y resoplido nasal (Chandler et al. 1986, Bowman 2000). El animal, además, puede mostrar signos de dolor cuando se presiona la cavidad nasal. Los perros se muestran inquietos y pueden frotar sus narices contra superficies que los rodean presentando el riesgo de abrasiones o cortes. Las lesiones son susceptibles de presentar infección secundaria de carácter bacteriano, que se caracteriza por flujo nasal mucopurulento (Mehlhorn et al. 2008).

El diagnóstico es habitualmente clínico y consiste en la visualización de los parásitos y/o lesiones sugerentes, además de la consideración de antecedentes epidemiológicos. La rinotomía exploratoria puede ser un procedimiento útil para visualizar lesiones en la mucosa aunque en infecciones poco intensas éstas pueden no estar presentes (Chandler et al. 1986). Por lo tanto, es valioso efectuar el examen directo de flujo nasal para buscar los huevos del parásito ya que ratifica el diagnóstico ante la ausencia de lesiones evidentes, tal como sucedió en nuestro caso. Por otra parte, se ha comunicado que técnicas coproparasitarias de sedimentación-flotación son útiles para aislar huevos de *L. serrata* (Cordero del Campillo & Rojo 1999, Alarcón 2005) a partir de heces de animales sospechosos.

El tratamiento usualmente consiste en la inducción del estornudo del animal para favorecer la eliminación del parásito o su remoción quirúrgica. Si bien, se ha comunicado el uso de avermectinas contra pentastómidos relacionados en perros (Haugerud

1993, Bowman 2000) hasta la fecha, no se dispone de tratamiento antiparasitario eficaz.

La frecuencia de infección en cánidos por *L. serrata* es variable y depende de la ubicación geográfica encontrándose variaciones incluso en distintas zonas de un país. Por ejemplo, se encontró tasas de 43,3 % en perros de vida libre en Líbano, 38 % en India, 20 % en Turquía, 27.8 % en Irán y 38.57 % en Nigeria (Acha & Szyfres 2003, Meshgi & Asgarian 2003, Oryan et al. 2008, Rezaei et al. 2011, Oluwasina et al. 2014). En Chile, mediante necropsia a 19 zorros grises de la zona Austral, un 15.7 % de resultó positivo a huevos de *L. serrata* (Alarcón 2005). Las tasas de infección larval en los hospederos intermediarios, donde también pueden encontrarse animales como bovinos, cérvidos, equinos y cerdos, también es variable y, debido a que la sintomatología generalmente es poco clara o asintomática (Mehlhorn 2008), la información a menudo es referida a partir de datos de necropsia o inspección medico veterinaria de carnes en mataderos. En Chile, se ha encontrado porcentajes de infección oscilan entre 5.9 % y 36.2 % en bovinos faenados en mataderos de la zona centro sur (Garcinuño & González 1977, Valenzuela et al. 1995, Urrutia 2001).

Si bien, la infección canina se asocia con la alimentación de los perros con vísceras crudas, habitualmente de ovinos o caprinos, también puede deberse cuando estos acceden a hospederos intermediarios silvestres infectados mediante la cadena depredador-presa. De hecho, en este caso, una vez que se tuvo el diagnóstico concreto sostuvimos una nueva conversación con el dueño, en la que se pudo constatar que el animal habitaba en un sector colindante con un área rural, la reserva ecológica de Nonguén y que, cada cierto tiempo, se escapaba por horas a cazar. A partir de estos nuevos antecedentes podemos plantear la posibilidad de que este animal pudo haberse infectado al ingerir lagomorfos que abundan en esta reserva.

El hallazgo de *L. serrata*, además, implica el riesgo de infección humana, dado su carácter zoonótico. El ser humano podría infectarse mediante la ingesta accidental de los huevos del parásito cuando éste tiene contacto con secreciones oronasales y heces de hospederos definitivos infectados, así como agua y/o alimentos contaminados (Tappe & Buttner 2009). En este caso, se comportaría como hospedero intermediario al albergar las larvas encapsuladas en diferentes tejidos como mesenterio, pared intestinal

y, principalmente, en el hígado. Si bien, se han informado de casos de prostatitis, infección ocular y abdomen agudo (Lazo et al. 1999; Acha & Szyfres 2003; Koehsler et al. 2011), la presencia de ninfas en los tejidos del ser humano no produciría sintomatología en forma habitual y, a menudo, su hallazgo ocurre en cirugías, exámenes imagenológicos y autopsias, hecho que ya fue reportado en cuatro individuos en la ciudad de Concepción (Behn 1937).

Además, el ser humano también se puede contagiar al consumir vísceras crudas o insuficientemente cocidas que contengan las ninfas del parásito, comportándose, en este caso, como hospedero definitivo. El cuadro clínico, conocido como síndrome de Halzoun o Marrara, se caracteriza por irritación, dolor de garganta, lagrimeo y descarga nasal que ocurre entre unos pocos minutos y media hora después de ingerir la comida infectante. Además, se presenta disnea, disfagia, vómito, cefalea y edema intenso que puede extenderse hacia la laringe, trompa de Eustaquio, conjuntiva, nariz y labios. El curso de la infección es benigno y rápido pues cerca de la mitad de los pacientes se recupera en menos de un día hasta una o dos semanas. Casos humanos han sido comunicados principalmente en países del norte de África, Europa y el Medio Oriente (Mehlborn 2008, Yilmaz et al. 2011, Hamid et al. 2012).

La prevención de la infección visceral consiste en evitar la contaminación del agua o los alimentos crudos con secreciones o deposiciones de carnívoros y en el lavado cuidadoso de las manos antes de comer, cuando se ha tenido contacto con ellos. La prevención del Halzoun o Marrara consiste en evitar la ingestión de vísceras crudas o insuficientemente cocidas.

La ocurrencia de pentastomiasis canina en la ciudad de Concepción, hecho no reportado anteriormente, además de implicar riesgo de infección humana, pone manifiesto la necesidad de adoptar medidas de prevención por parte de la población respecto de no dar carne o vísceras crudas a los perros y/o gatos además de evitar, en lo posible, la caza de eventuales hospederos intermediarios infectados por parte de estos carnívoros. Además, ratifica la presencia de este parásito en animales domésticos y mascotas de nuestra ciudad, hecho que debería ser tomado en cuenta por el profesional médico veterinario dentro de sus pre-diagnósticos en cuadros respiratorios compatibles. Por último,

estos antecedentes dan pie a realizar estudios epidemiológicos en búsqueda de este parasitismo en fauna sinantrópica y silvestre de la zona.

Referencias

Acha P, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Volumen III. Estados Unidos: Organización Panamericana de la Salud; 2003.

Alarcón, U. Estudio taxonómico de la fauna parasitaria del tracto gastrointestinal de zorro gris (*Pseudalopex griseus*, Gray 1837), en la XII Región de Magallanes y Antártica Chilena. Memoria de título, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile; 2005.

Alcalá-Canto Y, Alberti-Navarro A, Ibarra-Velarde F. Serine protease activity demonstrated in the larval stage of the pentastomid *Linguatula serrata*. Parasitol. Res. 2007; 100 (5): 1011-1014.

Álvarez V. Presencia de *Linguatula serrata* Froelich, 1789, en *Dusycion culpaeus* y de formas ninfales en *Octodon d. degus* y *Abrocoma b. benetti*. Bol. Chile. Parasitol. 1960; 15: 22.

Apt W. Parasitología Humana. México: Mc Graw Hill Interamericana Editores S.A.; 2013.

Babero BB, Cattán PE. Helmintofauna de Chile: III. Parásitos del rededor degú, *Octodon degus* Molina 1782, con la descripción de tres nuevas especies. Bol. Chile. Parasitol. 1975; 30(3-4): 68-76.

Behn F. Sobre la existencia de larvas de *Linguatula* (nódulos de *Pentastomum denticulatum*) en el material de autopsias del Instituto de Anatomía Patológica de la Universidad de Concepción. Bol. Soc. Biol. Concepción. 1938; 12: 39-43.

Blagburn CM, Hendrix WL. Current. Canine linguatulosis. Canine Practice. 1983; 10: 54-55.

Borchert A. Parasitología Veterinaria. España: Editorial Acribia; 1975.

Bowman DD. Respiratory System Parasites of the Dog and Cat (Part I): Nasal Mucosa and Sinuses, and Respiratory Parenchyma. In: DD Bowman, Companion and Exotic Animal Parasitology, International Veterinary Information Service, New York. [cited 2000 April 20]. Available from: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.576.5766&rep=rep1&type=pdf>

- Chandler, E.A., J.B. Sutton & D.J. Thompson. Medicina y Terapéutica Canina. España: Editorial Acribia S.A.; 1986.
- Christoffersen M.L. De Assis JS. A systematic monograph of the Recent Pentastomida, with a compilation of their hosts. Zool Mededelingen. 2013; 87: 1-206.
- Cordero del Campillo M, Rojo FA. Parasitología Veterinaria. España: McGraw-Hill; 1999.
- Fernández J, Villalba C. Presencia de *Linguatula serrata* Fröhlich, 1789, en el ciervo chileno *Pudu pudu* (Molina, 1782). Parasitol. al Día. 1986; 10: 31-32.
- Gajardo-Tobar R. Observaciones acerca de *Linguatula serrata*. Med. Moderna. 1943; 16: 295-298.
- Garcinuño L. González H. Linguatulosis hepática en bovinos de Valdivia. Arch. Med. Vet. 1977; 9: 62-65.
- Gast-Galvis A. *Linguatula serrata* en un hígado humano. Bol. Chile. Parasit. 1960; 15: 15-16.
- Gunn, A. & S.J. Pitt. Parasitology: An Integrated Approach. UK: Wiley-Blackwell; 2012.
- Hamid T., Hossein YD, Mehran BB, Masood FS, Hamid E. A case report of *Linguatula serrata* infestation from rural area of Isfahan city, Iran. Adv. Biomed. Res. 2012; 1: 42.
- Haugerud RE, Nilssen AC, Rognmo A. On the efficacy of ivermectin against the reindeer sinus worm *Linguatula arctica* (Pentastomida), with a review on ivermectin treatment in reindeer. Rangifer. 1993; 13: 157-162.
- Koehsler M, Walochnik J, Georgopoulos M, Prunte C, Boeckeler W, Auer H, Barisani-Asenbauer T. *Linguatula serrata* Tongue Worm in Human Eye, Austria. Emerg. Infect. Dis. 2011; 17: 870-872.
- Lazo R, Hidalgo E, Lazo, J, Bermeo A, Liaguno M, Murillo J, Teixeira V. Ocular Linguatuliasis in Ecuador: Case report and morphometric study of the larva of *Linguatula serrata*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1999; 60(3):405-409.
- Mehlhorn H. Encyclopedia of Parasitology. Germany: Springer Publishing Co; 2008.
- Meshgi B, Asgarian O. Prevalence of *Linguatula serrata* infestation in stray dogs of Shahrekord, Iran. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. 2003; 50 (9): 466-467.
- Møller OS, Olesen J, Avenant-Oldewage A, Thomsen PF, Glenner H. First maxillae suction discs in branchiura (Crustacea): development and evolution in light of the first molecular phylogeny of branchiura, pentastomida, and other "maxillopoda." Arthropod Struct. Dev. 2008; 37:333-346.
- Oluwasina OS, ThankGod OE, Augustine O, Gimba FI. *Linguatula serrata* (Porocephalida: Linguatulidae) Infection among Client-Owned Dogs in Jalingo, North Eastern Nigeria: Prevalence and Public Health Implications. J. Parasitol. Res. 2014; 14: 1-5.
- Oryan A, Sadjjadi SM, Mehrabani D, Rezaei M. The status of *Linguatula serrata* infection of stray dogs in Shiraz, Iran. Comp. Clin. Path. 2008; 17: 55-60.
- Poo L. Estudio anato-patológico de los hígados de bovino en el matadero de Socoagro de Valdivia. Chile: Memoria de Título. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile; 1971.
- Rezaei F, Tavassoli M, Mahmoudian A. Prevalence of *Linguatula serrata* infection among dogs (definitive host) and domestic ruminants (intermediate host) in the North West of Iran. Vet. Med. Czech. 2011; 56 (11): 561-567.
- Riley J. The Biology of pentastomids. Advances in Parasitology. 1986; 25: 45-128.
- Sievers H. La *Linguatula serrata* (Fröhlich) y su existencia en Chile. Rev. Chilena Hist. Nat. 1926; 30: 306.
- Soulsby, EJ. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. México: Nueva Editorial Interamericana; 1987.
- Tagle I. Parásitos de los animales domésticos determinados en el Instituto de Investigaciones Veterinarias. Agr. Téc. Chile. 1953; 13: 93-108.
- Tappe D, Buttner DW. Diagnosis of human visceral pentastomiasis. PLoS Negl. Trop. Dis. 2009; 3 (2): 320.
- Urrutia A. Estudio de Linguatulosis en hígados de bovinos beneficiados en la Planta Faenadora "Carne de Chile", VII región, Maule. Chile: Memoria de Título, Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de Concepción; 2001.
- Valenzuela G, Bascuñán M, Bayer L. Infecciones por *Linguatula serrata* (Fröhlich 1789) en hígados de bovinos. Arch. Med. Vet. 1995; 28: 29-34.
- Yilmaz H., Cengiz ZT, Cicek M, Dulger AC. A nasopharyngeal human infestation caused by *Linguatula serrata* nymphs in Van Province: a case report. Turkiye Parazitol. Derg. 2011; 35: 47-49

Evaluación por medio de intradermorreacción de la aplicación del inmunógeno de 45kDa de *Trichinella spiralis* para el diagnóstico de Trichinellosis.

CHÁVEZ RUVALCABA F. ¹, CHÁVEZ RUVALCABA MI. ²; HERNÁNDEZ LUNA CE. ¹
MUÑOZ ESCOBEDO JJ. ³, MORENO GARCÍA MA. ²

- ¹ Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, México
² Unidad Académica de Ciencias Biológicas, UAZ, México
³ Unidad Académica de Odontología, UAZ, México

Summary

Diagnostic methods for different zoonotic diseases in the food industry have helped to control, treat and eradicate several food-transmitted diseases such as Trichinellosis, a parasitic disease mainly transmitted through consumption of poorly cooked meat, that is not commonly detected in any type of meat processing facility. The main objective of this work is to evaluate the delayed hypersensitivity immunological mechanism by administration of the 45 kDa *Trichinella spiralis* immunogen in order to develop an easy access and cost-effective diagnostic method for the detection of the disease both in humans and animals. In this study, Long Evans murines were distributed in six different groups: healthy and infected control groups, murine-treated sublingually and conventionally with the 45 kDa immunogene after infection with *T. spiralis*, and murines challenged with 500 infective larvae after sublingual and conventional immunization. The intradermal reaction was performed using the 45 kDa immunogen in order to evaluate the delayed hypersensitivity by the triple response of Lewis after 2, 6, 24 and 48 h. The statistical analysis performed, consisting in a multifactorial analysis of variance, allowed us to detect significant differences between the groups considered ($p < 0.05$, CI: 95%), which led us to conclude that the 45 kDa antigen is a protein potentially usable for the diagnosis of Trichinellosis.

Key words: Diagnosis, intradermal reaction, *Trichinella spiralis*.

Introducción

La trichinellosis es una enfermedad parasitaria zoonótica que afecta a mamíferos silvestres y domésticos, se transmite de modo accidental al hombre por ingestión de carne o productos cárnicos insuficientemente cocidos, procedentes de animales infectados (Ilic et al. 2012, Gu et al. 2013, Bruschi & Dupouy-Camet 2014, Chu et al. 2014, Cui et al. 2014, Wang et al. 2014, Wei et al. 2015), *Trichinella* puede infectar a más de 150 tipos de animales, incluyendo seres humanos, cerdos, roedores y caninos (Yang et al., 2014), no sólo afecta la salud pública al afectar a pacientes humanos, si no también representa un problema económico en la producción animal porcina y la seguridad alimentaria (Cui et al., 2014; Gao et al., 2014; Lia et al., 2014; Wang et al., 2014), la OMS la clasifica como una de las principales parasitosis transmitidas por alimentos con mayor impacto a nivel mundial (OMS, 2014; Wei et al., 2011).

La población mexicana consume anualmente 22 millones de cerdos, la carne que se produce en México atraviesa por varios procesos de Tipo Inspección Federal (TIF) que aseguran una mayor

calidad (Díaz et al., 2007) pero en ninguno de estos procesos son para el diagnóstico de *T. spiralis*, el consumo de cerdo por persona en México es de 14kg, ocupando el tercer lugar del consumo de carne después de la de pollo y bovino (Díaz et al., 2007) y debido a que la pobreza en México se estima que un 53% de la población se mantiene en un nivel de consumo por debajo de las necesidades mínimas de alimentos básicos, existen programas de apoyo que pretenden la utilización de cerdos de traspatio como estrategia para aliviar la pobreza (Rivera et al., 2007).

Debido a la importancia zoonótica, los principales esfuerzos en muchos países se ha centrado en el control y eliminación del parásito en la cadena alimentaria (Gajadhar et al., 2009; Molina et al., 2012). Es importante mencionar la dificultad y baja incidencia de detección de la enfermedad, el ineficiente control sanitario en el canal del cerdo contaminado y la práctica frecuente de matanza clandestina en animales de traspatio.

Los principales fármacos utilizados para tratar la parasitosis son los benzimidazoles, y actualmente se están buscando alternativas como los inmunógenos, principalmente el de 45kDa de *T. spiralis* para inducir una respuesta inmune protectora, así como para el

diagnóstico precoz de Trichinellosis, al igual que el antígeno soluble total (AST) ya que es difícil porque sus manifestaciones clínicas son comunes con otras enfermedades en su mayoría gastroentericas.

La prueba intradérmica (IDR) que mide la reacción de hipersensibilidad cutánea de tipo retardada (RHC) es una prueba útil para muchos microorganismos, por lo cual se pretende estandarizar para el diagnóstico de Trichinellosis.

El objetivo del estudio fue evaluar la respuesta de hipersensibilidad retardada del inmunógeno de 45kDa de *Trichinella spiralis* para el diagnóstico de Trichinellosis por medio de intradermorreacción evaluando la Triple Respuesta de Lewis.

Material y metodos

Se utilizaron 42 murinos (ratas) hembras de la cepa Long Evans de aproximadamente 2 meses y medio de edad, para formar los grupos: 1) control sano, 2) control infectado, 3) inmunizado vía parenteral e infectado, 4) infectado e inmunizado vía parenteral, 5)inmunizado vía sublingua e infectado y 6) infectado e inmunizado vía sublingual. A los grupos experimentales con inmunizaciones se les aplicaron 4 dosis: al día 1, 7, 14 y 21 y al día 28, para la vía parenteral (intramuscular, subcutánea, intramuscular y peritoneal), se infectó con carne con 500 LI de *T. spiralis*, Para la evaluación de hipersensibilidad retardada se practicó la prueba de intradermorreacción la cual se llevó a cabo en el dorso del animal, previamente eliminado el pelo, la aplicación fue con jeringa de insulina del 100 unidades, 10 µg de proteína y se analizó la zona de observación a las 2, 6, 24 y 48 horas y se evaluó la triple respuesta de Lewis (eritema, calor e induración) la induración fue medida con micrómetro manual de la marca Vervier y la temperatura con la ayuda de termómetro digital infrarrojo de la marca Médica home care. (Moreno 1996).

El antígeno de 45kDa fue obtenido por medio de elución de bandas de geles de poliacrilamida reduciendo en condiciones del 10%, por medio de electroforesis (SDS-PAGE), por medio de la separación proteica del Antígeno Soluble Total (AST) de *T. spiralis*, el AST se obtuvo por medio de la extracción con nitrógeno líquido, a las LI obtenidas por digestión artificial, se lavaron tres veces con PBS con un pH de 7.3, se le añadió el nitrógeno

líquido en cantidad suficiente para cubrir las LI y por estallamiento permitió la salida de los componentes antígenicos, el homogenizado se verificó y se ecentrifugo a 3500 rpm por 1.5h y se utilizó inhibidor de proteasas AEBDF Sigma (4-(2-Aminoethyl) benzenosulfonyl fluoride hydrochloride) (Chávez et al. 2012, Muñoz 2013).

Para la determinación proteínas se obtuvo una curva estándar utilizando albúmina sérica bovina, según la metodología de Bradford, ajustando a la concentración de proteínas obtenidas a una densidad óptica de 610 nm mediante azul de Coomassie al 0.06% preparado en HCl al 2.2% (Bradford & Lancetti 1976), se procedió a la separación cromatográfica con el sistema nanoUPLC marca Waters modelo nanoAccquity con una columna de fase reversa C18 300micras x 150 mm, 2 micras y elución con un gradiente agua+0.1% Ac fórmico/ Acetonitrilo durante 125 minutos, la detección se realizó con un sistema de espectrometría de masas híbrido Cuadrupolo-tiempo de vuelo con resolución experimental aprox 10,000 y con interface electro Spray y con inyección de Glucofibrinopeptido como calibrador continuo a 100fmol/ml, del cual se tomó la masa 785.8426 como referencia para el ajuste de exactitud de masas, cabe señalar que el control y adquisición de datos crudos se hizo con el software MassLynx vers 4.1, se procedió entonces al procesamiento de datos. El cromatograma obtenido fue exportado al servidor para ser procesado con el software PLGS vers 2.4. Se obtuvo secuenciación de la proteína por medio del software ProteinLinx Global Server (PLGS), para después hacerlo con un método de proceso donde se usó la base de datos específica de *T. spiralis*, está fue obtenida de la Universal Uniprot-SwissProt donde se afirmó que los péptidos identificados tienen más del 95% de confiabilidad y masas exactas menores a 10ppm, se realizó el procesamiento de datos del cromatograma obtenido este fue exportado al servidor para ser procesado con el software PLGS vers 2.4 obteniéndose dos proteínas: una de 45940 Daltons (Multicystatinlikedomainprotein OS T.S GN mcd PE 2 SV 1) y 46607 Daltons (excretory secretory antigen OS *Trichinella spiralis* GN Gp 53 PE 2 SV) (Chávez 2013).

La carne con LI de *T. spiralis* fue obtenida de ratas de conserva del bioterio de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas, las cuales son una cepa mestiza del primer

brote de Trichinellosis en humanos en Zacatecas y encontrados en cerdos, perros y ratas de libre muestreo (Fragoso et al. 1983, Franco et al. 2012).

El trabajo experimental en animales se llevó a cabo bajo la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 de las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorios, donde se siguieron las especificaciones de cuidado, administración de sustancias, obtención de muestras sanguíneas así como el sacrificio humanitario.

Resultados

En el laboratorio de Biología Celular y Microbiología de la Universidad Autónoma de Zacatecas como parte de una tesis de Doctorado se obtuvo la secuencia proteica por medio del software ProteinLinx Global Server (PLGS), posteriormente se hizo con un nuevo método de proceso usando la base de datos específica de *Trichinella spiralis*, esta a su vez fue obtenida de la Universal Uniprot-SwissProt. A través de este análisis afirmaron que los péptidos identificados, tienen más del 95% de confiabilidad y masas exactas menores a 10ppm. Se realizó el procesamiento de datos del cromatograma obtenido este fue exportado al servidor para ser procesado con el software PLGS vers 2.4 (Chávez 2013). Para la administración vía sublingual se le agrego un adyuvante de uso comercial de laboratorios EMIR de uso humano, en cada inmunización se administraron 10µg de la proteína.

Este proceso de hipersensibilidad tardía mediada por linfocitos T y sus productos solubles, que ocurre de las 24 a las 72hrs posteriores a la aplicación del antígeno, la inflamación generada se caracteriza por una gran infiltración de células mononucleares, en la evaluación por medio de la triple respuesta de Lewis que consiste en el análisis de: rubor, calor y edema, ninguno de los grupos experimentales presento rubor en la zona de aplicación del inmunógeno, mientras que en el edema la reacción más fuerte se dio a las 24 horas.

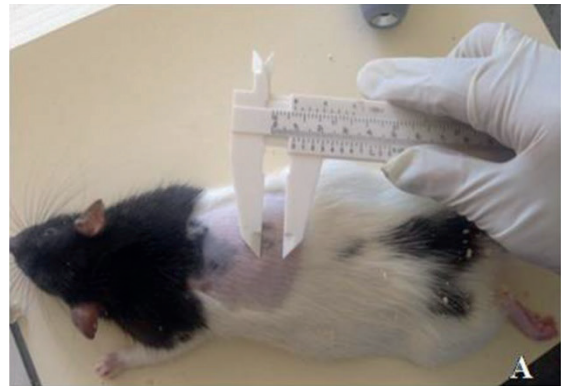


Figura 1. Evaluación de la triple respuesta le Lewis
A) medición de la induración,
B) medición de la temperatura

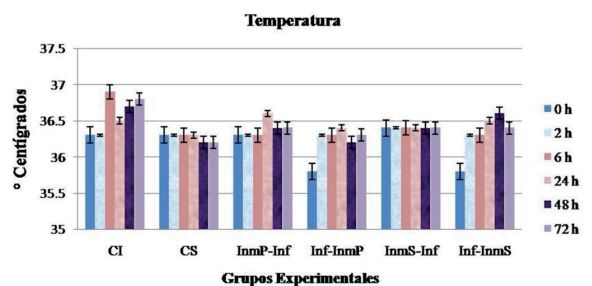


Figura 2. Gráfica de la temperatura presentada por intradermorreacción a diferentes tiempos

(CI-control infectado, CS-control sano, InmP-Inf- Inmunización parenteral y reto, InmS-Inf- Inmunización sublingual y reto, Inf-InmP- Infección e inmunización parenteral, Inf-InmS- Infección e inmunización sublingual)

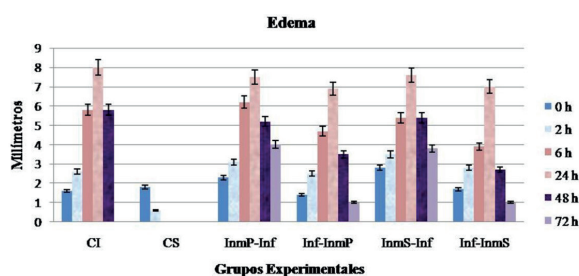


Figura 3. Gráfica del edema presentado en cada uno de los murinos

(CI-control infectado, CS-control sano, InmP-Inf-Immunización parenteral y reto, InmS-Inf-Immunización sublingual y reto, Inf-InmP-Infeción e inmunización parental, Inf-InmS-Infeción e inmunización sublingual)

Además se realizó un análisis multifactorial de varianza para la respuesta de hipersensibilidad retardada, por medio de intradermorreacción, donde se construyeron varias pruebas y gráficos para determinar qué factores tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el edema, donde presentó un $P < 0.05$ mostrando que es estadísticamente significativo, con un nivel de confianza del 95%.

Discusión

La Trichinellosis como enfermedad parasitaria zoonótica, no solo afecta la salud pública, si no también representa un problema económico en la producción porcina y la seguridad alimentaria (Cui et al. 2014, Gao et al. 2014, Lia et al. 2014, Wang et al. 2014) se encuentra clasificada por la OMS como una de las enfermedades parasitarias transmitidas por alimentos con mayor impacto mundial (OMS 2014), la población mexicana consume anualmente 22 millones de cerdos, la carne que se produce en México atraviesa por varios procesos de Tipo Inspección Federal (TIF) que aseguran una mayor calidad (Díaz et al. 2007) pero ninguno de estos procesos son para el diagnóstico de *T. spiralis* y debido a que la pobreza en México se estima que un 53% de la población mantiene en un nivel de consumo por debajo de las necesidades mínimas de alimentos básicos, existen programas de apoyo que pretenden la utilización de cerdos de traspatio como estrategia para aliviar la

pobreza (Rivera et al. 2007), por lo cual su control se basa principalmente en la inspección de los animales en matadero, así como en la cocción adecuada de la carne antes del consumo (Bruschi-Dupouy-Camet 2014).

La elección de hembras para el estudio experimental se debe a que estudios realizados por Flisser et al. (2002) encontró una mayor cantidad de anticuerpos en hembras (3.8%) que en machos (1.2%), con lo que se puede considerar que el sexo confiere cierto grado de protección. Son más susceptibles los machos porque las hembras presentan una mejor respuesta inmunológica.

La hipersensibilidad retardada que se evaluó con intradermorreacción por medio de la Triple Respuesta de Lewis (induración, calor y eritema) a las 2, 6, 24 y 48h posteriores a la inoculación de los diferentes antígenos mostraron tanto en el grupo control infectado como en los diferentes tratamientos un pico máximo de induración a las 24hrs difiriendo de la mayoría de los autores que mencionan que la manifestación más notoria se da a las 48h con diferentes tipos de antígenos, se realizó esta técnica con el fin de que, además de ser un inmunógeno potencial para la protección contra la enfermedad causada por *T. spiralis*, pueda ser utilizada en la técnica de intradermorreacción o reacción cutánea intradérmica buscando una respuesta inmunitaria positiva o negativa, con fines de diagnóstico, tratamiento, pronóstico o los tres (Rodríguez et al. 2008) como en otras afecciones.

La intradermorreacción utilizada en otras enfermedades como la leishmaniasis a reportado una sensibilidad alta para el diagnóstico en una concentración de $10\mu\text{g/ml}$ al igual que el utilizado con el antígeno de 45 kDa. En Trichinellosis todavía no se utiliza como método de diagnóstico, por lo cual en estudios anteriores utilizando el AST mostró una respuesta aumentada por el gran número de proteínas presentes (Chávez 2013), por lo cual creemos que este puede dar un mayor número de resultados falso-positivos, mientras que el antígeno de 45 kDa en los diferentes tratamientos con fármacos se ve un mejor respuesta, presumiblemente por ser una proteína característica de la enfermedad. En el caso de falsos positivos Rodríguez et al. (2008) menciona que en la mayoría de los casos se da una respuesta de hipersensibilidad inmediata de los 30 min hasta las 18 horas, desapareciendo completamente, por lo cual en el caso del grupo control sano que hubo

una reacción al momento de inoculación y en las siguientes 2h debido al traumatismo de la aplicación, pero desapareció en las próximas horas, la respuesta negativa se traduce a una ausencia de exposición al inoculo estudiado o que se carece de una respuesta celular adecuada. También se difiere de una de las técnicas realizadas para el diagnóstico por medio de la hipersensibilidad retardada con mayor impacto en diagnóstico es la prueba de tuberculina que consiste en producir una pequeña pápula a las 48 o 72hrs de haber inyectado subcutáneamente una cierta cantidad de derivado purificado de proteína de tuberculina (Cabarcos et al. 2001). Este tipo de hipersensibilidad se inicia por el reconocimiento del antígeno por linfocitos T, los cuales se activan y destruyen la célula blanco por dos mecanismos diferentes: uno en el que se secretan citocinas (TNF – factor de necrosis tumoral e interferón gamma) y por linfocitos (Madero & Madero, 2002). Cabarcos et al. (2002), utilizó una prueba de hipersensibilidad retardada con múltiples antígenos para evaluar y tener una aproximación del estado de inmunidad celular, el *Multitest IMC*[®], es un aplicador de resina acrílica, precargado con 7 antígenos (tetanos, difteria, estreptococo, tuberculina, testigo glicerina, *Candida albicans*, trichophyton, proteus) y un testigo, para la punción múltiple, con la parte destinada a la parte proximal de la punción acabada en «T», cada cabeza contiene 0,03 ml de antígeno en solución glicerinada al 70% donde se considera positiva cuando la semisuma de los diámetros es mayor o igual a 2 mm, desechando las inferiores. La suma de todos los diámetros medios obtenidos se conoce con el nombre de score, comparando con este dato, lo obtenido en nuestros resultados podemos argumentar que los grupos control infectado, inmunizado vía parenteral e infectado, infectado e inmunizado vía parenteral, inmunizado vía sublingual e infectado, infectado e inmunizado vía sublingual a partir de las 24h muestran su mayor reacción.

Por medio del *score* en trabajos anteriores se clasifico el resultado en humanos como normoérgico, hipoérgico y anérgico: a) un resultado corresponde de un paciente normoérgico cuando el *score* es mayor o igual a 10 mm en varones, 5 mm en mujeres; b) un resultado es anérgico cuando el *score* es 0 mm, y c) un *score* es hipoérgico cuando se sitúa entre 0 y 10 mm en varones y 0 y 5 mm en mujeres (Cabarcos et al. 2002). En comparación con algunos antígenos utilizados por medio de intradermorreacción (Tabla

1), pudimos clasificar nuestros resultados como positivos a las 24h y los mayores a 6mm.

Antígeno o reacción	Lectura	Tipo de respuesta	Valor
Tuberculina	48-72h	Induración 10mm	Contacto previo, orienta el diagnóstico
		Induración 5-9mm	Dudosa
		Induración < 4mm	Negativa
Lepromina	21 días	Nódulo > 5mm	Contacto previo, clasificación y pronóstico
Esporotricina	24-48h	Induración de 5mm	Diagnóstico
Coccidioidina	24-48h	Induración de 5mm	Contacto previo/pronóstico
Leishmanina	24-48h	Induración de 7mm	Diagnóstico/clasificación
Kveim	4 semanas	Induración > 5mm	Orienta el diagnóstico
Candidina	24-48h	Induración de 5mm	Contacto/inmunidad celular
Tricofitina	24-48h	Induración de 5mm	Contacto/inmunidad celular
Histoplasmina	24-48h	Induración de 5mm	Contacto/epidemiología
Paracoccidioidina	24-48h	Induración de 5mm	Contacto/epidemiología
Blastomicina	24-48h	Induración de 5mm	Pronóstico
Nocardina	24-48h	Induración de 15mm	Diagnóstico de micetoma
Casoni	24h	Induración de 5mm	Diagnóstico de equinocociasis
Tulargina	24-48h	Induración de 5mm	Diagnóstico de tularemia
Antraxina	24-48h	Induración de 5mm	Diagnóstico de ántrax agudo
Frei-Reilly	48-72h	Induración de 5mm	Diagnóstico de linfogranuloma venéreo
Foshay	24-48h	Induración de 5mm	Diagnóstico de bartonellosis
Ito-Reenstierna	48h	Induración de 7mm	Infección por <i>H. ducreyi</i>
Frenkel	48h	Induración de 5mm	Toxoplasmosis

Tabla 1. Interpretación de Intradermorreacciones

Conclusion

La técnica de intradermorreacción para evaluar la respuesta de hipersensibilidad retardada es factible para utilizarla en el diagnóstico de la infección por *T. spiralis* y su mayor respuesta se presenta a las 24h PI.

Agradecimientos

Allaboratorio de Biología Celular y Microbiología de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

Referencias

Bradford H, Lancetti A. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle dye binding. *Anal. Biochemistry*. 1976; 72:248-254.

Bruschi, F. Y Dupouy-Camet, J. Helminth Infections and their impact on global public health. Springer. 2014.

Cabarcos A, Lado F, Pestoni C, Lorenzo V. Utilidad de los tests cutáneos (mantoux y prueba de hipersensibilidad retardada) en la infección por VIH. *An Med Int*. 2001. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992001001200008

Cabarcos A, Lado F, Gómez A, Regueiro M. Pruebas cutáneas y tuberculosis: aplicación e indicaciones en la profilaxis, con especial incidencia en la coinfección con el VIH. *Medicina Integral*. Elsevier. 2002. <http://www.elsevier.es/ese-13029947>

Chávez EG. Caracterización de la respuesta inmune generada por la inmunización e inmunoterapia de la proteína de 45 kDa y del antígeno soluble total (AST) de *Trichinella spiralis*. Tesis de Doctorado en Ciencias con Acentuación en Microbiología. UANL. 65. 2013.

Chávez F. Caracterización de la respuesta inmune e histológica en ratas long Evans infectadas con *Trichinella spiralis* y tratadas con albendazol e ivermectina. Universidad Autónoma de Nuevo León. Tesis de maestría. 2012.

Chávez F, Chávez I, Muñoz J, Reveles R, Morales M, Moreno A. Caracterización de la respuesta inmune e histológica de ratas Long Evans infectadas con *Trichinella spiralis* y tratadas con albendazol e ivermectina. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol*. 2013; 1: 75-81.

Chu KB, Kim S, Lee SH, Joo KH, Lee K, Lee Y, Zheng S, Quan F. Enhanced protection against *Clonorchis sinensis* induced by co-infection with *Trichinella spiralis* in rats. *Parasit Immunol*. 2014; 36: 522-530.

Cui J, Wang L, Sun G, Liu LN, Zhang SB, Liu RD, Zhang X, Jiand P, Wang ZQ. Characterization of *Trichinella spiralis* 31 kDa protein and its potential application for the serodiagnosis of Trichinellosis. *Acta Tropica*. 2014; 142: 52-63.

Díaz C, Mejía P, Moral L. El mercado de la carne de cerdo en canal en México. *Análisis Económico*. 2007; 51: 273-287. Flisser A, Velasco A, Martínez C, González F, Briseno B, García R, Caballero A, Hernández I, García H, Gutiérrez L. Infectious diseases in México. A survey from 1995-2000. *Arch Med Res*. 2002; 33: 334-350.

Fragoso R, Tavizón P, Villacaña H. Un brote de triquinosis (triquinelosis) en laguna de carretero, Zacatecas. *Salud Pública*. 1983; 23: 24-41.

Franco SL, Caballero GM, Reveles HG, Moreno GM, Jiménez C. Molecular similarities and differences between *Trichinella spp.*, isolated from canine skeletal muscle in Zacatecas, México. *Exp Parasitol*. 2012; 131: 148-152.

Gajardhar AA, Pozio E, Gamble HR. *Trichinella diagnostics* and control: mandatory and best practices for ensuring food safety. *Vet Parasitol*. 2009; 23:197-205.

Gao F, Wang R, Liu M. *Trichinella spiralis*, potential model nematode for epigenetics and its implication in metazoan parasitism. *Front Physiol*. 2014; 4:1-5.

Gu Y, Wei J, Yang J, Huang J, Yang X, Zhu X. Protective Immunity against *Trichinella spiralis* infection induced by a Multi-epitope Vaccine in a Murine Model. *PLOS ONE*. 2013; www.plosone.org.

Ilic N, Gruden-Movsesijan A, Sofronic-Milosavljevic L. *Trichinella spiralis*: shaping the immune response. *Immunology in Serbia*. 2012; 82:111-119.

Lia C, Liu M, Bai X, Liu P, Wang X, Li T. Characterisation of a plancitoxi-1-like DNase II gene in *Trichinella spiralis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014; 8:8.

Madero M, Madero J. El sistema immune cutáneo. *Dermatología Práctica*. http://www.medicosecuador.com/librodermatologia/capitulos/capitulo_3.htm. 2002.

Molina V, Albarracín S, Krivokapich S, Chiosso C, Mancini S, Bigatti R, Arbusti P, Avila A, Larrieu E. Seroepidemiología y control de Trichinellosis en credos en Sierra Grande, Argentina. *In Vet*. 2012; 14(1): 33-40.

Moreno A, Ávalos E, Muñoz J, Herrera R. Detención de Antígenos Inmunodominantes de *Trichinella spiralis* en conejo como modelo experimental. *Inv Cient.* 1996; 9: 5-8.

Muñoz J. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de la resiniferatoxina en fase intestinal en la infección por *Trichinella spiralis* en modelo murino. Universidad Autónoma de Zacatecas. Tesis de maestría. 2013.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial Mexicano.

Rivera J, Losada H, Cortés J, Grande D, Vieyra J, Castillo A, González R. Cerdos de traspatio como estrategia para aliviar pobreza en dos municipios conurbados al oriente de la Ciudad de México. *Liv Res Rur Dev.* 2007; 9:7.

Rodríguez M, Lizarraga C, Jurado F. Intradermorreacciones en dermatología. *Dermatol Rev Mex.* 2008; 166-174.

Wang L, Cui J, Hu D, Lui R, Wang Z. Identificación of early diagnostic antigens from major excretory-secretory proteins of *Trichinella spiralis* muscle larvae using immunoproteomics. 2014. *Parasites & Vectors.* <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/40> 20/08/2014

Wei J, Gu Y, Yang J, Yang Y, Wang S, Cui S, Zhu X. Identification and characterization of protective epitope of *Trichinella spiralis* paramyosin. *Vaccine.* 2011; 29: 3162-3168.

Wei Y, Ling GL, Ruo DL, Ge GS, Chun YL, Shuai BZ. Molecular identification and characterization of *Trichinella spiralis* proteasome subunit beta type-7. *Parasites & Vectors.* 2015; 8:18.

Yang Y, Qin W, Qiu H, Liu Y. Characterization of TsDAF-21/HSP90 protein from the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Parasitol Res.* 2014; 113:2209-2217.

***Amblyomma tigrinum* (Acari: Ixodidae) em *Cerdocyon thous* (Carnivora: Canidae) em Santa Catarina, Brasil.**

DE QUADROS RM ¹, SANGALETTI LAVINA M ², TIETZ MARQUES SM ^{3*}, LOTARIO COSTA J ⁴.
CARNEIRO JÚNIOR JA ¹

- ¹ Laboratório de Parasitologia da Universidade do Planalto Catarinense - UNIPLAC, Lages, Santa Catarina. rosileia18@hotmail.com
- ² Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC, Lages, Santa Catarina. marciavetcav@yahoo.com.br
- ³ Laboratório de Helminthoses, Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande Do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.
- * Autor para correspondência: smtmuni@hotmail.com
- ¹ Laboratório de Parasitologia da Universidade do Planalto Catarinense - UNIPLAC, Lages, Santa Catarina. jarybio@gmail.com
- ⁴ Biólogo - Eletrosul Centrais Elétricas SA, Florianópolis, Santa Catarina. jocelimcosta@hotmail.com

Summary

Most species of ticks associated with wild animals are scarcely documented in Brazil. This study reports and describes the morphological characteristics of *Amblyomma tigrinum* parasiting *Cerdocyon thous* in mountainous plateau and amplifies the list of documented instances in the state of Santa Catarina, Brazil.

Key words: tick, Ixodidae, *Amblyomma tigrinum*, crab-eating fox.

Introdução

Cachorro-do-mato ou graxaim-do-mato (*Cerdocyon thous*) foi a primeira das 11 espécies de canídeos descrita no continente americano. Seu habitat varia entre biomas de deserto aos campos, com registro em quase todos os países da América do Sul; no Brasil está presente à exceção da bacia amazônica (Ruas et al. 2008). Esta espécie apresenta maior atividade no período noturno e crepuscular, com dieta variada entre animais e vegetais e por isso pode ser observado nas proximidades de acampamentos e habitações, em bordas de matas e áreas alteradas e habitadas pelo homem, que lhe permite certa tolerância a espaços antropizados e interação com outras espécies de carnívoros (Reis et al. 2006). Não está ameaçada de extinção, entretanto é possível que sofra os impactos decorrentes de atropelamento nas rodovias brasileiras causado pela elevada influência antrópica (Gomes 2007).

São descritas no mundo aproximadamente 879 espécies de carrapatos, 102 são endêmicas para o novo mundo e 61 foram registradas no Brasil, sendo o gênero *Amblyomma* o mais prevalente com 30 espécies estabelecidas no Brasil (Dantas-Torres et al. 2009). Os carrapatos gastam mais de 90% de sua vida útil fora dos hospedeiros, cujas condições ambientais são cruciais para determinar a sobrevivência e o desenvolvimento, bem como a disponibilidade de hospedeiros primários (Labruna et al. 2005). A maioria das espécies de carrapatos está associada aos animais silvestres, com poucos registros no Brasil, principalmente em relação aos hospedeiros, distribuição geográfica e efeitos do parasitismo (Guimarães et al. 2001, Labruna et al., 2002).

Os ambientes fragmentados promovem

o deslocamento de animais silvestres na busca por outros ambientes para sua sobrevivência o que leva a aproximação de áreas urbanas e ao contato mais direto com espécies domésticas entre elas cães e o ser humano, formando um ciclo de importância dentro das transmissões de patógenos zoonóticos (Góes et al. 2006). Este relato objetiva descrever a presença da espécie *A. tigrinum* em *C. thous* resgatado em ambiente doméstico e ampliar a lista de ocorrência para o estado de Santa Catarina.

Uma fêmea de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) com idade aproximada de dois anos foi recolhida viva em setembro de 2012 dentro das dependências de uma Pequena Central Hidrelétrica (PCH), localizada no município de Campo Belo do Sul (coordenadas geográficas 27°42'54.47"S e 50°40'05.7134"O), no Planalto Catarinense, estado de Santa Catarina, região sul do Brasil. O canídeo foi encaminhado a uma clínica para atendimento, evoluindo ao óbito dois dias após o internamento. No exame clínico foi constatada a presença de carrapatos. Os três carrapatos retirados do animal foram colocados em frasco contendo álcool 70°GL e identificados como *Amblyomma tigrinum* (duas fêmeas e um macho), conforme descrição de Barros-Battesti et al. (2006) e Martins et al. (2014).

A Figura 1 e a Figura 2 mostram, respectivamente, as características da região dorsal do macho e fêmea de *A. tigrinum* e a identificação da região ventral do macho e fêmea. Pelo fenótipo, o macho de *A. tigrinum* apresenta no escudo uma banda escura longitudinal central interrompida pela mancha clara (a). Na espécime fêmea observa-se no escudo que a mancha clara posterior não é interrompida pela banda central (b) e na região ventral do macho há um longo espinho na coxa IV

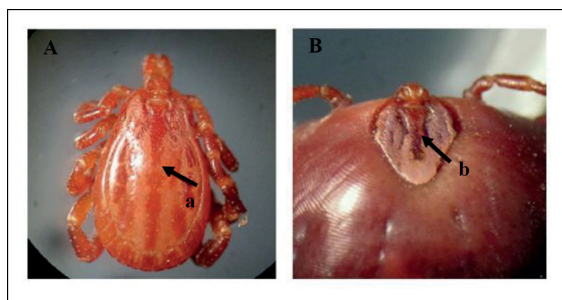


Figura 1. Características fenotípicas da região dorsal de macho (A) e fêmea (B) de *Amblyomma tigrinum*.

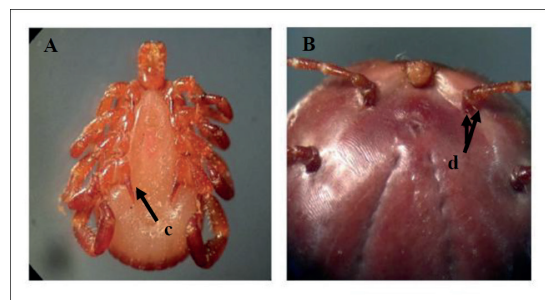


Figura 2. Características fenotípicas da região ventral de macho (A) e fêmea (B) de *Amblyomma tigrinum*.

(c) e ambos sexos apresentam um curto espinho interno e um longo espinho externo na coxa I (d).

Amblyomma tigrinum é um carrapato com relatos na Venezuela, Guiana Francesa, Peru, Paraguai, Bolívia, Argentina e Chile (Abel et al. 2006) e é provável que sua distribuição abranja todo o Uruguai (Martins et al. 2014). No Brasil, foram registrados nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Goiás, São Paulo (Guimarães et al. 2001, Toledo et al. 2008, Quadros et al. 2013, Rabelo 2014) e Minas Gerais (Rodrigues & Daemon 2004, Martins et al. 2015). É um carrapato com ciclo trioxeno, tendo como hospedeiros os animais domésticos e silvestres, porém com maior especificidade pelos carnívoros, como em cachorro-do-mato no Rio Grande do Sul e em lobo-guará (*Chrysocyon* sp.) em Goiás. Foi identificado em cachorro doméstico nos Estados do Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Pará (Sinkoc et al. 1997), Santa Catarina (Cardoso et al. 2008) e Tocantins (Martins et al. 2009). Os estádios adultos são observados o ano todo, com picos populacionais no verão (Cardoso et al. 2008). As larvas e ninfas podem parasitar aves domésticas e silvestres (Evans et al. 2000, Guglielmono et al. 2000, González-Acuña et al. 2004) como codornas (*Callipepla californica*), perdiz (*Nothoprocta perdicaria*) e pombos (*Zenaida auriculata*) (González-Acuña et al. 2006). Há registro da ocorrência deste carrapato em humanos (Guglielmono et al. 2000).

Os animais silvestres representam uma importante fonte de informações e que regionalmente são pouco conhecidas. Muitas espécies de carnívoros são bioindicadoras da qualidade ambiental. O encontro de espécies fora do seu habitat e nicho ecológico podem ser mensuradas através de doenças,

bem como o grau de parasitismo a qual estas podem estar expostas e revelar o desequilíbrio ambiental, a vulnerabilidade e relação infracomunitária entre espécies que compartilham este habitat.

A. tigrinum tem envolvimento na transmissão de microrganismos patogênicos como *Rangelia vitalii*, *Babesia canis* e *Ehrlichia canis* (Loretti & Barros 2004). O estudo da ixodofauna em áreas rurais deve ser mais explorado, sobretudo por veterinários, tendo em vista sua grande importância epidemiológica na transmissão de protozooses. As doenças atualmente ocupam, junto com a fragmentação, caça e outros fatores, lugar de destaque entre as ameaças para a conservação de canídeos silvestres. Este estudo amplia a lista de ocorrência de *A. tigrinum* parasitando *Cerdocyon thous* para o estado de Santa Catarina.

Referências

- Abel I, Pedrozo MGC, Bueno C. *Amblyomma tigrinum* Koch 1844 (Acari: Ixodidae) em cães domésticos procedentes da Reserva Florestal do Boqueirão, Município de Ingaí, Sul de Minas Gerais. Arq. Inst. Biol. 2006; 73 (1):111-112. I.
- Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo/Vox/ICTTD-3/Butantan. 2006; 223p.
- Cardoso CP, Stalliviere FM, Stalliviere CA et al. *Amblyomma tigrinum* no Município de Lages, SC e observações da biologia em condições de laboratório. Rev. Bras. Parasit. Vet. 2008; 17 (1):56-58.

- Dantas-Torres F, Onofrio VC, Barros-Battesti DM. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. Syst. Appl. Acarol. 2009; 14:30-46. Acessado em 21 de mar. 2016. Online. Disponível em: <http://www.acarology.org/saas/saa/saa14/pdf2009/2009-14-030-046.pdf>.
- Evans DE, Martins JR, Guglielmone AA. A review of ticks (Acari: Ixodidae) of Brazil, their hosts and geographical distribution – 1. The state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2000; 95(4):453-470.
- Góes EM et al. Investigação acarológica realizada em Ribeirão Pires frente a infestação de carrapatos do gênero *Amblyomma*. Bol. Epidem. Paulista (BEPA). 2006; 3(35):13-18.
- Gomes MS. Carnívora-Canidae (Lobo-guará, cachorro-domato, raposa do mato). In: Cubas ZS, Silva JCR & Catão-Dias JL. Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária. São Paulo: Editora Roca. 2007; 492-504.
- González-Acuña D, Venzal J, Skewes-Ramm O et al. First record of immature stages of *Amblyomma tigrinum* (Acari: Ixodidae) on wild birds in Chile. Exp. Appl. Acarol. 2004; 33(1): 153-156.
- González-Acuña D, Venezuela G, Moreno L et al. Nuevos hospedadores para las garrapatas *Amblyomma tigrinum* y *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) en Chile. Arch. Med. Vet. 2006; 38(3): 273-275.
- Guglielmone AA, Mangold AJ, Luciani CE & Viñabal AE. *Amblyomma tigrinum* (Acari: Ixodidae) in relation to phytogeography of central-northern Argentina with notes on hosts and seasonal distribution. Exp. Appl. Acarol. 2000; 24:983-989.
- Guimarães JH, Tucci EC & Barros-Battesti DM. Ectoparasitos de Importância Veterinária, Plêiade/FAPESP, São Paulo. 2001. 218 p.
- Labruna MB et al. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild animals from the Porto-Primavera Hydroelectric Power Station area, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2002; 97(8):1133-1136.
- Labruna MB, Jorge RSP, Sana AA et al. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. Exp. Appl. Acarol. 2005; 36: 149-163.
- Loretti AP, Barros SS. Parasitismo por *Rangeliavitali*em cães (“Nambuivu”, “Peste de Sangue”) - Uma revisão crítica sobre o assunto. Arq. Inst. Biol. 2004; 71(1): 101-131.
- Martins TF, Spolidorio MG, Batista TCA et al. Ocorrência de carrapatos (Acari: Ixodidae) no município de Goiatins, Tocantins. Rev. Bras. Parasit. Vet. 2009; 18(2):50-52.
- Martins TF, Lado P, Labruna MB, Venzal JM. El género *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) en Uruguay: especies, distribución, hospedadores, importancia sanitaria y claves para la determinación de adultos y ninfas. Vet. 2014; 51(193): 26-41.
- Martins TF et al. Carrapatos (Acari: Ixodidae) em mamíferos silvestres do Parque Nacional da Serra da Canastra e arredores, Minas Gerais, Brasil. Ciênc. Rural. 2015; 45(2): 288-291.
- Quadros RM, Boaventura BL, Veronezi W, Marques SMT. Fauna de ixodídeos em carnívoros silvestres atropelados em rodovias de Santa Catarina: relato de caso. Vet. em Foco. 2013; 10(2): 222-228.
- Rabelo FA. Doenças transmitidas por vetores em canídeos na região da Serra do Amolar, Pantanal, Brasil. 2014. 56 p. Dissertação (Mestrado). Curso de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
- Reis RN et al. Mamíferos do Brasil. Londrina. 2006; 244-245.
- Rodrigues AFSF, Daemon E. Ixodídeos e Sifonápteros em *Cerdocyon thous* L. (Carnívora, Canidae) procedentes da Zona da Mata Mineira, Brasil. Arq. Inst. Biol. 2004; 71(3): 371-372.
- Ruas J et al. Helmintos do cachorro do campo, *Pseudalopex gymnocercus* (Fischer, 1814) e do cachorro do mato, *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) no Sul do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Rev. Bras. Parasit. Vet. 2008; 17(2): 87-92.
- Sinkoc AL, Brum JGW, Muller G et al. Ocorrência de Ixodidae parasitos de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1766) na Estação Ecológica do Taim, Rio Grande-RS, Brasil. Ciênc. Rural. 1997; 27(1): 119-122.
- Toledo RS, Tamekuni K, Haydu VB et al. Dinâmica sazonal de carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) em um parque urbano da cidade de Londrina, PR. Rev. Bras. Parasit. Vet. 2008; 17(supl.1): 50-54.

Detección de *Giardia* a partir de ADN genómico en heces formoladas

GUNTURIZ ML.¹, DUQUE S.², ARÉVALO A.²

- ¹ Equipo Banco de Proyectos, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá D.C., Colombia.
- ² Grupo de Parasitología, Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá D.C., Colombia

Correspondencia:
María Luz Gunturiz

Summary

Giardiasis affects 200 million people worldwide, mainly children between 2 and 5 years and the World Health Organization has set as a public health problem. His parasitological identification is conventionally performed by light microscopy which requires experienced staff but still given the intermittent fecal excretion of *Giardia* can be obtained false negatives. To demonstrate the presence of the parasite in stool is important to develop molecular methods for detecting genomic DNA of *Giardia* after obtaining a good quantity and quality of it. The aim of this study was to optimize and evaluate purification techniques, isolation and rupture of *Giardia* spp from feces with 5% formalin for DNA extraction and detection by Chain Reaction (PCR) a fragment of β -giardina gene. Lysis of parasite cysts present was performed in 5% formalin feces by freeze, thaw by vortex, sonication and enzymatic reaction. DNA concentration was determined in nanodrop. PCR was standardized by amplification of a 264 bp fragment of β -giardina gene whose identity was confirmed by sequencing of nucleic acids. The results obtained in this work allow having a methodology of easy application to obtain DNA from *Giardia* cysts from formulated feces 5%, which could be used in the steps prior to the PCR for genotyping of this parasite.

Keywords: : *Giardia* cysts, genomic DNA, formaldehyde, PCR, β -giardina

Introducción

La giardiasis es una parasitosis infecciosa que afecta a 200 millones de personas en el mundo, en especial a niños entre 2 y 5 años de edad generando en ellos problemas de crecimiento, malnutrición (Duedo et al. 2015) y en la función cognitiva. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima en Asia, África y Latinoamérica alrededor de 200 millones de casos, con más de 500.000 casos nuevos cada año (WHO 1996). Por el impacto que la giardiasis tiene sobre el desarrollo socio-económico, ésta fue incluida por la OMS en la Iniciativa de Enfermedades Desatendidas (Geurden et. al. 2010, OPS 2009). En los países desarrollados esta parasitosis ha estado presente y es reconocida como una enfermedad emergente y ha estado asociada a varios brotes de enfermedad diarreica en guarderías infantiles y también a brotes por transmisión hídrica o por alimentos. Dado lo anterior se ha motivado la realización de investigaciones relacionadas con este agente parasitario después de años de relativa desatención (Almirall et al. 2010).

La OMS ha establecido la giardiasis como un problema de salud pública debido a que sus tasas de prevalencia oscilan entre el 8% al 30% en diferentes países del mundo, sobre todo en aquellos en vía de desarrollo. De acuerdo con los resultados de la primera investigación nacional de morbilidad,

de 1965 a 1966 en la población colombiana, La prevalencia de *Giardia* fue del 11,9% (Galán et al. 1969) y en la segunda de parasitismo intestinal en los años 1977 a 1980 la prevalencia fue del 13,7 % (Corredor et. al. 2000). Dentro de las principales causas de transmisión del parásito se encuentran las deficientes condiciones de sanidad, el hacinamiento, la falta de acueducto y alcantarillado, entre otras, asociadas a situaciones de pobreza (Jethwa et al. 2015).

Su identificación parasitológica se realiza convencionalmente por microscopía de luz que requiere de personal con experiencia, sin embargo, dada la excreción intermitente de *Giardia* en heces se obtienen falsos negativos. Para demostrar la presencia del parásito en materia fecal es importante desarrollar metodologías moleculares para la detección de ADN del parásito (Abbas et. al. 2016), no sólo para brindar un tratamiento eficaz de la enfermedad sino para realizar estudios de epidemiología molecular de la giardiasis que permitan conocer los genotipos circulantes en el país y aquellos que realmente sean específicos de humano (Amar et. al. 2002). Como ya se mencionó, los métodos usuales en la detección de *Giardia* están basados en el reconocimiento visual por microscopía óptica de trofozoítos o quistes, teñidos o no. Las muestras fecales seriadas deben recolectarse en días alternados debido a la excreción intermitente de quistes (Arévalo et. al. 2005), sin

embargo, el diagnóstico de giardiasis por microscopía óptica prolonga el tiempo de búsqueda, requiere de personal capacitado, su sensibilidad es moderada y no permite detectar variables de genotipos (Amar et al. 2002).

En las últimas décadas se han venido utilizando métodos moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como alternativa de diagnóstico, pero tiene ciertas limitantes cuando se utiliza materia fecal, debido a que existen inhibidores intrínsecos como sales biliares, hemoglobina, bilirrubina, polisacáridos y extrínsecos como los ácidos húmicos, el dicromato de potasio, el formaldehído, los complejos y compuestos fenólicos presentes en preservantes utilizados para la conservación de las heces. El formaldehído podría co-extraerse con ADN durante el aislamiento y proceso de la purificación lo que podría interferir con la amplificación de ADN del parásito por PCR (Nantavisai et al. 2007).

Mediante PCR se realiza la identificación y amplificación de componentes genéticos y secuencias específicas de *Giardia*, dentro de las que se encuentran el gen β -giardina, gen trifosfatoisomerasa, glutamato deshidrogenasa, factor de elongación alfa y el Ácido Ribonucleico ribosomal (ARNr), entre otros (McGLade et al. 2003). La PCR ha sido la técnica utilizada junto con sus variantes como PCR anidada (Monis et al. 1999), PCR múltiple (Miller et al. 2007) PCR con análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR RFLP) (Amar et al. 2002). Aunque los procedimientos de biología molecular no se han establecido como forma diagnóstica son muy utilizados en la determinación de los genotipos y sub-genotipos de *Giardia* y en estudios de epidemiología molecular.

En Latinoamérica, países como Argentina, Brasil y México han utilizado técnicas de extracción de ADN de *Giardia* para determinar la transmisión zoonótica de la enfermedad. En Colombia, aún no existen estudios registrados sobre la implementación de técnicas de extracción de ADN para este parásito a partir de muestras de materia fecal preservadas en formol. Es de mencionar que en el país, la mayoría de las muestras de heces son preservadas en formol para la confirmación del diagnóstico, la docencia y la investigación. Este preservante presenta entre sus ventajas su fácil preparación y conservación de estructuras de quistes, huevos y larvas por largos periodos y, desventajas como la interacción que realiza con los ácidos nucleicos, lo que hace que la

extracción de ADN de buena calidad se dificulte.

Por otra parte, diversas soluciones de sacarosa y de sulfato de zinc han sido tradicionalmente usadas para concentrar quistes de *Giardia* (Molina et al. 2007), sin embargo, ninguna de estas técnicas separan completamente los quistes de la materia fecal y detritos bacterianos, pero ayudan a concentrar el número de los mismos (Barr et al. 1995). Para la obtención del ADN se han realizado cultivos de trofozoítos del parásito en medio axénico (Upton 1997), otros lo han extraído a partir de la degradación química, enzimática o mecánica de la pared de los quistes (Barr et al. 1995).

El objetivo de este trabajo fue optimizar y evaluar las técnicas de purificación, aislamiento y ruptura de quistes de *Giardia* a partir de heces formoladas al 5% para la obtención de ADN y detección por PCR de un fragmento del gen β -giardina.

Material y métodos

Se utilizó materia fecal humana preservada en formol (Sigma-Aldrich) al 5%, previa observación de la presencia de *Giardia* por microscopía de luz y con presencia de 5 a 7 quistes por campo microscópico de 40X (Figura 1). Para este estudio se emplearon 100 muestras de materia fecal obtenidas de niños entre 5 y 14 años de edad provenientes de Bogotá y Antioquia (50 muestras/región). Además de *Giardia*, a todas las muestras se les verificó la presencia o no del Complejo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, *Entamoeba hartmanii*, *Endolimax nana*, *Entamoeba coli*, *Iodamoeba butschlii*, *Chilomastix mesnili*, *Balantidium coli*, y de Helminthos como *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Uncinarias*, *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta* y *Taenia sp.* (Datos no mostrados).

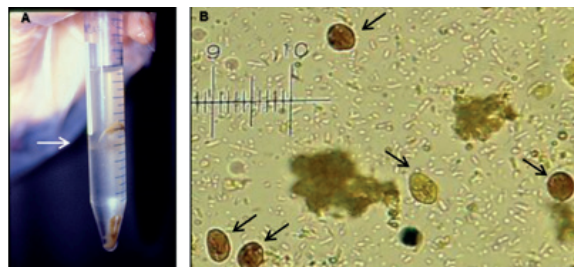


Figura 1. Aislamiento de quistes de *Giardia* intestinalis. A. Colchón de sacarosa al 1,2 M. Con la flecha superior

se señala la fase acuosa y con la inferior la fase de sacarosa. B. Quistes aislados, preservados en formol, teñidos con lugol. Las flechas señalan los diferentes quistes aislados a partir de materia fecal. Objetivo de 40X. Obsérvese que los quistes presentan su pared integra.

Aislamiento, purificación y ruptura de quistes

1 mL de heces fecales previamente filtrado y centrifugado con presencia de quistes de *Giardia* se sometió a cuatro procedimientos diferentes, para el aislamiento, purificación y ruptura de quistes:

En el primer procedimiento (shock térmico y efecto mecánico), se purificaron los quistes de *Giardia* mediante gradiente de sacarosa (Sigma-Aldrich) 1M. Los quistes purificados se sometieron a enfriamiento (-80°C/30 min) seguido de calentamiento a (80°C/30 min) por tres veces consecutivas. Luego se rompieron mecánicamente con perlas de vidrio con un homogenizador y se incubaron en solución reguladora de lisis y proteinasa K (ICN) durante 18 horas a 60°C.

En el segundo y tercer procedimiento no se realizó purificación de quistes sino ruptura de los mismos mediante tres ciclos de enfriamiento a -80°C y calentamiento a 80°C/30 min. La diferencia entre estos dos procedimientos radicó en la elución final del ADN genómico con solución reguladora Tris-HCl y EDTA (AE) de QIAamp DNA stoolminikit, (Qiagen®) y con agua libre de nucleasas, respectivamente.

En el cuarto procedimiento se cambió la temperatura de congelación realizando una cadena de frío con las siguientes temperaturas -192°C, -80°C y -40°C, descongelación por vortex y 3 ciclos de sonicación por 20 segundos cada uno.

Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y se realizó la evaluación de la ruptura de los quistes mediante microscopía en aumento de 40X. Los procedimientos se resumen en la tabla 1.

Procedimiento	Gradiente sacarosa 1M	Enfriamiento /calentamiento	Proteinasa K 18 horas/60°C. Lisis mecánica a 700 rpm	Elución gADN	Evaluación quistes por microscopía
Primero (Shock térmico y efecto mecánico)	Si	-80°C/30 min/80°C/30 min). 3 veces consecutivas	Si	Solución reguladora AE (Qiagen®)	Si
Segundo	No	-80°C/30 min/80°C/30 min). 3 veces consecutivas	Si	Solución reguladora AE (Qiagen®)	Si
Tercero	No	-80°C/30 min/80°C/30 min). 3 veces consecutivas	Si	Agua libre de nucleasas	Si
Cuarto	No	-192°C, -80°C y -40°C, descongelación por vortex y 3 ciclos de sonicación por 20 segundos cada uno	Si	Agua libre de nucleasas	Si

Tabla 1. Procedimientos empleados para la obtención de ADN genómico a partir de quistes de *Giardia*

Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se realizó mediante el estuche comercial QIAamp DNA stoolminikit, Qiagen®, siguiendo las recomendaciones del fabricante. En breve, se mezclaron, independientemente, 400µL de muestras de heces resultantes de cada uno de los procedimientos utilizados para el aislamiento, purificación y ruptura de quistes, con 1.2 mL de solución reguladora de lisis para materia fecal (ASL, Qiagen®). Para la elución del ADN se adicionaron 30 µL de agua libre de nucleasas, cada una de las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos, y el ADN se obtuvo por centrifugación a 13000 rpm durante 4 minutos. El ADN genómico se almacenó a -20°C para posteriormente comprobar su calidad e integridad, mediante fraccionamiento en gel de agarosa al 1% teñido con gel Red (Biotium) y como templado en las reacciones de PCR.

PCR para amplificación de un fragmento del gen β-giardina

Se emplearon primers (iniciadores) específicos para la amplificación del fragmento del gen de la β-giardina, para lo cual se obtuvieron las secuencias disponibles en Genbank y Refseq. Se realizaron alineamientos, se seleccionaron regiones conservadas y se seleccionaron los respectivos primers teniendo en cuenta Tm, contenido de GC, formación de horquillas y dímeros, entre otras (Gunturiz ML, datos no mostrados). La secuencia de los primers empleados fueron primer directo 5` -CATCCgCgAggAggTCAgAA -` 3

5´-gTTAGCTGGTCGTACATCTTCTT-´3 para el primer reverso. Las condiciones de PCR estandarizadas fueron: 95°C/5 minutos; 40 ciclos: 95°C/1 minuto, 57°C/1 minuto, 72°C/1 minuto, extensión final de 72°C/7 minutos y 16°C/∞. Las PCR se realizaron en un termociclador C1000 Touch (BioRad). Con los primers diseñados se obtiene la amplificación de un fragmento de 264 pb. Para la verificación de la amplificación de los productos esperados, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 voltios durante 75 minutos en solución reguladora Tris/Borate/EDTA (TBE) 1X (Lonza, Rockland, ME USA). Se tiñó el gel con 0,02 µL/mL de gel red. Se observaron las bandas de ADN en el transiluminador y las imágenes fueron capturadas con el Software ImageLab (BioRad®). Se determinó la concentración y pureza del ADN obtenido utilizando la relación 260/280 nm en un espectrofotómetro (Nanodrop2000, Thermo Scientific).

Una vez obtenidos los productos de PCR se realizó la purificación a partir de gel, utilizando el estuche Ilustra GFX PCR ADN and Gel Band Purification (GE Healthcare, Buckinghamshire UK), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para verificar la identidad de los fragmentos obtenidos se realizó la secuenciación directa por el método de Sanger, empleando el estuche Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) y el Analizador genético ABI Prism 310. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las reportadas en las bases de datos a nivel mundial.

Resultados

A partir de los cuatro procedimientos se logró la ruptura total o parcial de quistes y la obtención de ADN genómico con diferentes grados de concentración e integridad (datos no mostrados), que fue verificada mediante fraccionamiento en geles de agarosa, en donde, efectivamente se visualizaron barridos de diferente intensidad, siendo el de mayor calidad y cantidad el obtenido a partir del cuarto procedimiento, por lo tanto, los siguientes ensayos de extracción de ADN se realizaron con el último procedimiento descrito.

Las heces preservadas se observaron al microscopio de luz en objetivo de 40X observándose de 4 a 8 quistes por campo microscópico. Luego de congelar a -192°C, -80°C, -40°C, y descongelar por agitación en vortex se encontraron quistes

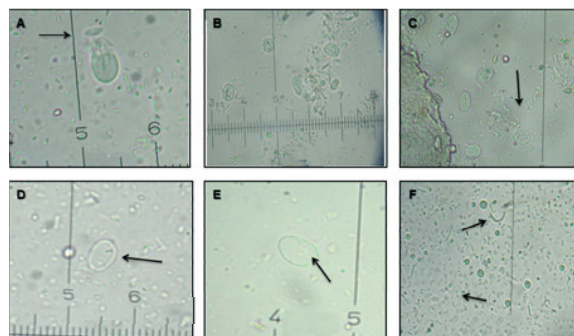


Figura 2A a 2F. Métodos empleados para ruptura de quistes de *Giardia intestinalis*. A. Quistes preservados en formol. B. Quistes degradados, luego de congelar-descongelar. C. Quistes sin alteración morfológica y quiste degradado internamente. D. Membrana del quiste luego de sonicar. E. Membrana degradada por sonicación. F. Restos de membrana de quistes por incubación con buffer de lisis y proteinasa.

Las concentraciones del ADN en las muestras preservadas en formol tratadas con técnicas de ruptura de quistes son constantes con el paso del tiempo, sin encontrarse cambios significativos en los valores de la concentración de ADN. La relación de las absorbancias medidas a 260/280 nm entre 1,8 y 2 indicó que el grado de pureza del ADN obtenido estaba dentro de los parámetros recomendados.

Para demostrar que el ADN obtenido con el método de ruptura de quistes provenientes de heces preservadas en formol, correspondía a ADN genómico de *Giardia* y no a ADN humano, se estandarizó la PCR para la amplificación de un fragmento de 264 pb del gen β-giardina (Figura 3A). Para verificar la identidad del producto amplificado se realizó la secuenciación, análisis y comparación de las secuencias obtenidas (Figura 3B) con las reportadas a nivel mundial, observándose una identidad del 100% con el gen de la β-giardina de *Giardia* (Figura 3C).

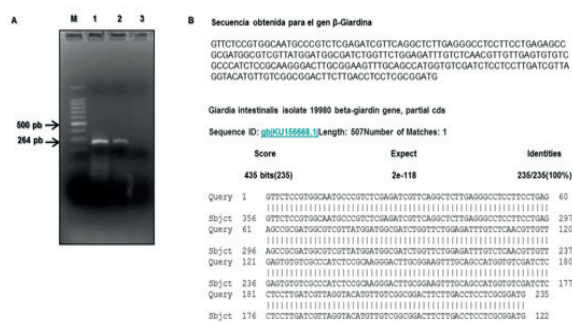


Figura A y B. Amplificación de un fragmento del gen β -giardina de *Giardia*. A. Electroforesis en gel de agarosa al 1,8% mostrando en 1 el producto de amplificación para el fragmento del gen B1 obtenido a partir de quistes frescos, en 2 producto de amplificación para el fragmento del gen B1 obtenido a partir de quistes formolados y en 3 el control negativo de PCR. M corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). B. Arriba: Secuencia obtenida para el fragmento del β -giardina de *Giardia*. Abajo: Comparación de la secuencia obtenida con las secuencias del NCBI. Nótese que se encuentra homología del 100% para el producto obtenido.

Discusión

La investigación de los genotipos de *Giardia* junto a sus características clínicas, epidemiológicas, patrones de transmisión y especificidad del hospedero adquieren importancia debido a sus prevalencias en áreas tropicales y subtropicales, donde afecta al 30% de la población (Van Keulen 1991). Para dichos estudios se requiere una caracterización genética directa de los quistes o trofozoitos obtenidos del huésped afectado. Sin embargo, las técnicas de genotipificación para *Giardia*.

no han avanzado de la misma manera en comparación para con la de otros patógenos protozoarios (Minvielle 2008, Pelayo et. al. 2008). No obstante, y a pesar de que existen muchos métodos disponibles para el diagnóstico de *Giardia*, el desarrollo de técnicas moleculares permitirán diagnósticos más sensibles, la diferenciación de los genotipos de este parásito y entender la dinámica de infección que se presenta en nuestro país.

En este sentido, un procedimiento de aislamiento de ADN eficaz es importante para mejorar la sensibilidad de las pruebas diagnósticas utilizadas para la detección de microorganismos. La extracción

del material genético a partir de muestras fecales se ve obstaculizada por los compuestos inhibitorios presentes en las heces, y compuestos fenólicos que hacen parte de algunos preservantes como el fenol-cloruro de sodio-alcohol-formol (PAF), compuestos aldehídicos como el

sodio-ácido acético-formol (SAF) y el formol, que pueden interferir en el aislamiento del ADN y en las reacciones de amplificación. En el caso de *Giardia*, se ha encontrado que la pared quística es altamente insoluble debido a las fuertes interacciones entre las cadenas de carbohidratos así como entre los azúcares y proteínas de la pared del quiste (Caccio et al. 2008). La forma quística le confiere al parásito gran estabilidad, permitiéndole soportar las condiciones del ambiente. Dicha pared está compuesta por N-acetilgalactosamina y tres proteínas diferentes CWP1, CWP2 y CWP3, una capa membranosa interna y dos membranas externas. Se considera que esta organización estructural es la que le confiere gran resistencia a este parásito (Ankarklev 2010), por lo que es muy difícil obtener ADN de quistes de *Giardia*, debido a que su ruptura es dispendiosa y en materia fecal se encuentran gran cantidad de inhibidores tales como proteasas, DNAsas, polisacáridos de moco o bacterias y sales biliares, que degradan el ADN e inhiben algunas reacciones enzimáticas (Chavez-Munguia 2004, Abbaszadegan et. al. 2007).

En este estudio, para la extracción de ADN de *Giardia* en heces preservadas en formol al 5%, se tuvieron en cuenta las variables reportadas por Kuk y colaboradores en 2012, que incluyeron entre otras, tiempo y condiciones de almacenamiento de heces, ciclos de congelación-ebullición en quistes de *Giardia* como pre-tratamiento para la extracción de ADN (Babaei et. al. 2011), ruptura de quistes con ciclos de congelación ebullición y acción enzimática (Minvielle et. al. 2008), sonicación para el tratamiento de quistes, una variante muy poco común, la cual fue utilizada por Adamska y colaboradores en 2010, quienes utilizaron métodos similares a los incluidos en el estudio, como la concentración de quistes en gradiente de sacarosa, ciclos de congelación-ebullición y extracción de ADN con el Kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit con modificaciones. Las mejores condiciones de trabajo para la ruptura de los quistes y obtención de ADN genómico en el estudio se obtuvieron utilizando temperaturas -192°C , -80°C y -40°C , descongelación por vortex

y 3 ciclos de sonicación por 20 segundos; con estas condiciones se obtuvo ADN genómico de calidad y cantidad suficientes para su uso en la estandarización de las PCR.

Para mejorar la calidad del aislamiento y purificación de quistes, Basso y colaboradores en 1998, recomiendan el uso de las muestras sin formol a las formoladas y en el caso de los exámenes seriados que se incluya por lo menos una muestra en fresco. Esta situación en algunas regiones de Colombia es infrecuente, pues la mayoría de las muestras de materia fecal para análisis coproparasitario son remitidas en formol al 5 o al 10%.

En este estudio el ADN obtenido a partir de las heces formoladas al 5% y ruptura de quistes permitieron la amplificación del gen β -giardina de manera específica y reproducible. Adamska y colaboradores en 2010, demostraron que la extracción de ADN de quistes de *Giardia*, sin acciones precedentes que destruyan la pared del quiste no es efectiva. En estudios previos, se ha utilizado la amplificación del gen β -giardina para evaluar la efectividad de los métodos utilizados para la purificación de quistes y extracción de ADN, debido a que este gen es considerado único en *Giardia*, eliminando efectivamente las oportunidades de amplificaciones cruzadas del huésped u otro blanco no determinado.

Por otra parte, la aplicación alterna de la ebullición y la congelación en la temperatura de -70°C antes de la extracción no causó la destrucción de la pared celular de los quistes y la extracción de ADN no fue eficaz, mientras que el tratamiento con sonicación dio resultados satisfactorios, y al alternar la ebullición y la congelación en nitrógeno líquido los resultados mejoraron. Además, el tratamiento con proteinasa K fue importante para garantizar la extracción eficaz de ADN a partir de quistes de *Giardia*. Estos resultados concuerdan con lo reportado en otros estudios sugiriendo que todos los procedimientos previos a la extracción de ADN de *Giardia* son importantes y en su mayoría necesarios ya que influyen el resultado final de la extracción del ADN genómico.

En el presente trabajo se logró optimizar una técnica de purificación, aislamiento y ruptura de quistes de *Giardia* a partir de materia fecal formolada al 5%, que permitió obtener ADN genómico de buena calidad y la estandarización de la amplificación por PCR de un fragmento del gen

β -giardina. Para obtener ADN de quistes de *Giardia* a partir de muestras preservadas en formol al 5% es necesario realizar un tratamiento previo de ruptura a los quistes, alternando ciclos de congelación a -192°C , -80°C y -40°C , descongelando por agitación, aplicando ciclos de sonicación y acción enzimática.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten contar con una metodología de fácil aplicación y reproducibilidad para la obtención de ADN de quistes de *Giardia* a partir de heces formoladas al 5%, que podría ser usada en los pasos previos a la técnica de PCR para la genotipificación de este parásito.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado con recursos del Instituto Nacional de Salud.

Referencias

- Abbas BM, Al-Saqur IM, Majeed HA. Detection and genotyping of *Giardia lamblia* in clinical and environmental samples in some regions of Baghdad city. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2016;5:459-68.
- Abbaszadegan MR, Velayati A, Tavasoli A, Dadkhah E. Rapid DNA extraction protocol from stool, suitable for molecular genetic diagnosis of colon cancer. *Iran Biomed J*. 2007;11:203-8.
- Adamska M, Leonska-Duniec A, Maciejewska A, Sawczuk M, Skotarczak B. Comparison of efficiency of various DNA extraction methods from cysts of *Giardia Intestinalis* measured by PCR and Taqman Real Time PCR. *Parasite*. 2010;17:299-305.
- Almirall P, Escobedo AA. Enfrentando la giardiasis con una nueva mirada. *Rev Pan Infect*. 2010;3.
- Amar CFL, Dear PH, Pedraza-Díaz S, Looker N, Linnane E, McLauchlin J. Sensitive PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay for Detection and Genotyping of *Giardia duodenalis* in Human Feces. *J Clin Microbiol*. 2002;40:446-52.
- Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature Rev Microbiol*. 2010;8:413-22.

- Arévalo A, Duque S, Nicholls RS. Comportamiento de la infección experimental por aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis* en el modelo animal del gerbo (*Meriones unguiculatus*). *Biomedica*. 2005;25:305-14.
- Babaei Z, Oormazdi H, Rezaie S, Rezaeian M, Razmjou E. *Giardia intestinalis*: DNA extraction approaches to improve PCR results. *Exp Parasitol*. 2011;128:159-62.
- Barr CS, Bowman DD. Giardiasis. *Selecciones Vet*. 1995;3:43-8.
- Basso WU, Venturini L, Risso MA. Comparación de técnicas parasitológicas para el examen de heces de perro. *Parasitol Día*. 1998;22:52-6.
- Caccio SM, Ryan U. Molecular epidemiology of Giardiasis. *Mol Biochem Parasitol*. 2008;160:75-80.
- Chavez-Munguia B, Cedillo-Rivera R, Martínez-Palomo A. The Ultrastructure of the Cyst Wall of *Giardia lamblia*. *J Eukaryot Microbiol*. 2004;51:220-6.
- Corredor A, Arciniegas E, Hernández CA, Cáceres E, Castaño de Romero L, Estupiñán D, et. al. Parasitismo Intestinal. Santa Fe de Bogotá, D.C. Instituto Nacional de Salud; 2000.
- Duedu KO, Peparah E, Anim-Baidoo I, Ayeh-Kumi PF. Prevalence of Intestinal Parasites and Association with Malnutrition at a Ghanaian Orphanage. *Human Parasitic Dis*. 2015;7:5-9.
- Galán R, Agualimpia C, Corredor A, Cáceres E. Parasitismo intestinal – Investigación Nacional de Morbilidad. Bogotá, D.E. Instituto Nacional de Salud para Investigaciones Especiales, INPEA; 1969.
- Geurden T, Vercruyse J, E. Claerebout E. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals?. *Exp Parasitol*. 2010;124:98-106.
- Jethwa DK, Chaudhri U, Chauhan D. Prevalence of *Giardia* infection in paediatric age group. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2015;4:907-11.
- Kuk S, Yazar S, Cetinkaya U. Stool sample storage conditions for the preservation of *Giardia intestinalis* DNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107:965-8.
- McGlade TR, Robertson ID, Elliot AD, Thompson RCA. High Prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. *Vet Parasitol*. 2003;110:197-205.
- Miller KM, Sterling CR. Sensitivity of Nested PCR in the Detection of Low Numbers of *Giardia lamblia* Cysts. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:5949-50.
- Minvielle MC, Molina NB, Polverino D, Basualdo JA. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103:98-103.
- Molina N, Polverino D, Minivielle M, Basualdo J. PCR amplification of triosephosphate isomerase gene of *Giardia lamblia* in formalin-fixed feces. *Rev Latinoam Microbiol*. 2007;49:6-11.
- Monis PT, Andrews R.H., Mayrhofer G, Ey PL. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol*. 1999;16:1135-44.
- Nantavisa K, Mungthin M, Tan-Ariya P. Evaluation of the sensitivities of DNA extraction and PCR methods for detection of *Giardia duodenalis* in stools specimens. *J Clin Microbiol*. 2007;45:581-3.
- Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Eliminación de las enfermedades desatendidas y otras infecciones relacionadas con la pobreza. Resolución CD49.R19. 2009.
- Pelayo L, Núñez F, Rojas L, Furuseth HE, Gjerde B, Wilke H, et al. *Giardia infections* in Cuban children: the genotypes circulating in a rural population. *Ann Trop Med Parasitol*. 2008;102:585-95.
- Upton SJ. *In vitro* cultivation. En: Fayer R, ed. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press, Inc.; 1997. p. 181-207.
- Van Keulen H, Campbell SR, Erlandsen SL, Jarroll EL. Cloning and restriction enzyme mapping of ribosomal DNA of *Giardia duodenalis*, *Giardia ardeae* and *Giardia muris*. *Mol Biochem Parasitol*. 1991;46:275-84.
- World Health Organization. The World Health Report 1996. Fighting disease, fostering development. Geneva: World Health Organization; 1996.

Presente y futuro en el tratamiento de la enfermedad de Chagas

TORO B. ¹, VEGA B. ¹, ZULANTAY I. ², APT W. ²

- ¹ Ayudantes Alumnos Parasitología. Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Laboratorio de Parasitología Básico Clínico.
- ² Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Programa de Biología Celular, Instituto de Ciencias Biomédicas y Molecular, Laboratorio de Parasitología Básico Clínico.

Correspondencia: Werner Apt : wapt@med.uchile.cl
Laboratorio Parasitología Básico-Clinico. Programa Biología Celular y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Independencia 1027, Casilla 9183 Santiago1, Santiago, Chile.

Summary

Chagas disease treatment is recent. Since 1970 the drugs internationally accepted are nifurtimox and benznidazol. Both drugs are effective in acute cases, congenital, reactivated chronic cases and recent chronic cases.

Other drugs as ergosterol inhibitors, itraconazole (ITZ), ravuconazole and posaconazole have been shown to decrease the parasitemia, but do not cure the disease. ITZ has been studied in patients with chronic indeterminate Chagas disease and chronic Chagas cardiopathy which has been shown to prevent the development of heart disease in relation to controls without therapy and also improves the electrocardiographic alterations in chronic Chagas cardiopathy.

As future projection we will deal with combinations of BNZ and ITZ due to the synergism of both drugs. We propose a combination of drugs with shorter periods in between, since it has been shown that an associated therapy is more effective having a synergism between the drugs and at the same time would reduce potential adverse reactions.

Key words: Chagas disease, treatment, combination drugs

Introducción

Desde 1970, los fármacos aceptados internacionalmente para el tratamiento de la ECh son NF y BNZ (Pinto Dias 2004). Ambos fármacos son efectivos en los casos agudos, congénitos, en la reactivación de casos crónicos y en los casos crónicos recientes.

Haremos una revisión de algunos fármacos estudiados para el tratamiento de la ECh, con los cuales se ha obtenido disminución de la parasitemia, pero no una cura de la enfermedad.

Fármacos que inhiben la síntesis de Proteínas o Purinas

Alopurinol: ha sido estudiado en ratones infectados con *T. cruzi*, donde se ha obtenido una reducción importante en la parasitemia. En pacientes con ECh aguda, no se obtuvo disminución de la parasitemia. En pacientes con ECh crónica tratados por 60 días, no se obtuvo cura parasitológica. En algunos casos, se obtuvo mejora en las alteraciones electrocardiográficas de la CCC (Apt et al. 2005). Se han obtenido buenos resultados en pacientes chagásicos transplantados de corazón (Tomimori-Yamashita et al. 1997), y en tratamiento combinado con BNZ (Perez-Mazliah et al. 2013).

Inhibidores del Ergosterol

Miconazol, Econazol, Ketoconazol, ITZ, Fluconazol, Ravuconazol y Posaconazol: con estos fármacos se ha obtenido una cura parasitológica en ratones con ECh aguda. ITZ ha sido estudiado en pacientes con ECh crónica indeterminada y CCC, donde ha mostrado prevenir la cardiopatía en comparación a los controles sin terapia y mejora las alteraciones electrocardiográficas en CCC (Apt et al. 2005, Apt et al. 2013).

Inhibidores de la Cisteína proteasa

Hay estudios en modelos ratones con infección aguda y crónica, obteniendo cura parasitológica con mínima toxicidad, pero no es aplicable a la práctica clínica debido a la corta vida media del fármaco, que requiere dosis altas que aumenten progresivamente (Cazzulo et al. 2002, Choy et al. 2013).

Inhibidores del Metabolismo de Pirofosfato

Pamidronato, Aledronato y Risedronato: en estudios con ratones con infección aguda, Risedronato ha eliminado casi totalmente las parasitemias y las formas amastigotes intracelulares (Garzoni et al. 2004). No hay estudios en humanos actualmente.

Drogas naturales

La mayoría de las drogas naturales probadas contra *T. cruzi* tienen efecto en las formas epimastigotes y algunos amastigotes. Sólo hay estudios en ratones, no se han probado en humanos (Leite de Oliveira et al. 2006, Leite et al. 2001).

Otras drogas

Se han probado muchos fármacos contra *T. cruzi* en los últimos años que han tenido buenos resultados in vitro y/o en animales, como: Fexinidazol (Bahia et al. 2012), Vinylsulfone (Choy et al. 2013), Glycosyl Disulfider (Gutierrez et al. 2013), Pentamidina (Diaz et al. 2014), Squaramidas (Olmo et al. 2014), entre otros. Ninguno ha sido estudiado en humanos.

Tratamiento de la infección humana

El tratamiento con NF se inició en la década de 1970 y consiste en un tratamiento empírico (Prata 1997, Rassi et al. 1997). El NF actúa por la producción de radicales libres, aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y metabolitos electrófilos. Se ha demostrado que, además de la acción metabólica de la droga en *T. cruzi*, su incorporación y transporte por el parásito es de gran importancia. *T. cruzi* en presencia de NF aumenta el consumo de oxígeno, H₂O₂ y la producción de radicales superóxido. El fármaco BNZ, fue introducido para el uso clínico en humanos en 1978. Este inhibe la síntesis de proteínas, originando una degradación de la biosíntesis de macromoléculas. Metabolitos reducidos de BNZ en uniones covalentes con macromoléculas interactúan con el ADN del parásito (Maya et al. 2006). La producción de radicales libres es menor que con NF.

Farmacoterapia actual

La ECh siempre debe ser tratada en el periodo agudo, así como también, en los periodos crónicos inicial, medio e indeterminado. Las únicas excepciones al tratamiento etiológico son aquellos pacientes con infecciones crónicas con Cor Bovis e insuficiencia cardíaca terminal. La indicación de aplicar un tratamiento específico en los casos crónicos es la demostración de los parásitos por PCR cuando no son detectados por microscopía óptica (Viotti et al. 2014, Urbina 2015).

Casos agudos

Los pacientes con manifestaciones clínicas deben recibir tratamiento. Esto incluye los que tienen una infección de menos de 4 meses, así como los casos agudos, con fácil detección de parásitos en muestras frescas y frotis, y aquellos con serología convencional positiva: IHA, CF, IF, ELISA, e inmunoblotting con IgM positiva. La idea es tratar estos casos con NF 8 mg/kg/día durante 30-60 días en adultos y 10 mg/kg/día durante el mismo período en los niños. Esta cantidad diaria debe dividirse en tres dosis tomadas después de las comidas (cada 8h).

Infección congénita

El tratamiento debe iniciarse tan pronto como se realiza el diagnóstico, cuando la sospecha clínica se confirma por la observación del parásito en muestras frescas de frotis sanguíneo, microstraut, etc. A veces el diagnóstico se confirma cuando el niño está en el período crónico (8 o más meses) por serología positiva persistente después de este período. Resultados terapéuticos mejores se obtienen cuando el diagnóstico es más precoz.

Todos los casos congénitos deben ser tratados, ya que hasta el 100% de estos tratamientos puede producir serología negativa y parasitemia; si se inicia el tratamiento antes, mejor será la respuesta obtenida. NF debe ser administrado en dosis de 8-10 mg/kg/día durante 60 días, se toma cada 8 ó 12 h, o BNZ 5-10 mg/kg/día durante 60 días. En caso de reacciones dermatológicas secundarias, se sugiere añadir antihistamínicos. Las reacciones adversas en los recién nacidos son menores que en los adultos. Es importante realizar un diagnóstico precoz de los casos congénitos y tratarlos lo antes posible (Carlier et al. 2012). En las mujeres embarazadas, realizar una prueba serológica conjuntamente con otras pruebas como VDRL durante el primer trimestre del embarazo y realizar el seguimiento de los casos positivos hasta que el diagnóstico de la infección congénita se confirme o descarte. En el recién nacido, realizar un estudio serológico para la infección por *T. cruzi*, junto con VDRL y otras pruebas. En los casos positivos, el seguimiento debe realizarse hasta que se confirme o descarte el diagnóstico.

Enfermedad de Chagas accidental

Todos los casos accidentales deben ser tratados con los mismos fármacos que las infecciones agudas adquiridas a partir del vector, durante 15 días. Si hay resultados positivos, el tratamiento inmediato debe llevarse a cabo con BNZ 5 mg/kg/día (adultos) o 7-10 mg/kg/día (niños) durante 15 días, dependiendo del estado inmunológico de la persona.

Transplante de órganos

Un trasplante en el que el donante o el receptor tiene la ECh debe ser tratado siempre, cuando es posible antes del trasplante con NF 8 mg / kg / día en adultos y 10 mg / kg / día en niños de 60 días, o BNZ 5 mg / kg / día en adultos y 5-10 mg / kg / día en niños (Σ 7,5 mg / kg / día) durante 60 días. En los casos con un trasplante de un paciente chagásico sin saberlo. Ejemplo: un riñón de un cadáver, recibirá tratamiento sólo si hay una reactivación (20-30% de los casos) (Huprikar et al. 2013).

Proyecciones tratamiento de la enfermedad de Chagas

Actualmente el tratamiento de la ECh consiste en el uso de NF o BNZ, por 60 días. No existe un marcador biológico que prediga la gravedad de la ECh, se han realizado múltiples estudios, pero estos no han sido concluyentes. Por esta razón se trata a todos los enfermos (Apt 2013).

La cardiopatía chagásica (CC) es una patología grave, y no existe relación entre ésta y una determinada carga parasitaria o una cepa determinada de *T. cruzi*. No se sabe actualmente cual es el tratamiento adecuado. Para algunos pacientes con bloqueo AV el marcapasos es una opción y para otros el trasplante cardíaco. De estos últimos, se sabe que el 50% muere al año. Es importante buscar un tratamiento adecuado ya que la sobrevida es menor en pacientes con alteraciones en el electrocardiograma (ECG).

Cuando al ECG desaparecen las alteraciones podemos suponer que un determinado tratamiento hizo efecto, sin embargo, cabe mencionar que no existen imágenes patognomónicas (Apt 2013). Para demostrar una mejoría sintomática es necesario pesquisar el parásito en sangre mediante PCR; esto último en base a que a mayor carga parasitaria en el grupo de cardiopatas, mayor es la gravedad de

la cardiopatía. De esta manera una PCR negativa se explicaría por un tratamiento adecuado y no necesariamente ausencia de la enfermedad ya que *T. cruzi* puede permanecer en su ciclo intracelular por días o meses (Luquetti 2013).

Cabe señalar que para iniciar un determinado tratamiento se deben considerar ciertos criterios que favorecerán su utilización tales como: PCR en sangre positivo, tiempo desde que el/la paciente es chagásico/a (mientras menos tiempo de contacto, mayor el éxito del tratamiento), pacientes jóvenes, mujeres en edad fértil y edades entre 60 y 70 años donde se ha visto que disminuye la probabilidad de éxito al usar una terapia con pocos fármacos. Por otro lado, pacientes con enfermedades graves hepáticas, renales y cardíacas o pacientes alcohólicos debieran excluirse de cualquier terapia. En este último grupo se ha visto una muy baja adherencia al tratamiento.

Como proyección a futuro, proponemos una combinación de fármacos con períodos reducidos entre medio (acotar de 2 meses a 1 mes) porque se ha visto que una terapia asociada es más eficiente al haber un sinergismo entre los fármacos y a la vez se reducirían las posibles reacciones adversas a los medicamentos, que para NF y BNZ están presentes en el 30% de los casos. Planteamos tratar mes por mes con combinaciones de Benznidazol e Itraconazol, debido al sinergismo demostrado entre ambas drogas. Otra combinación podría ser BNZ y Alopurinol, ya que ambos fármacos han mostrado buenos resultados en estudios clínicos por separado (Apt 2013).

Referencias

- Apt W. Actualización sobre la búsqueda de marcadores biológicos y tratamientos de la enfermedad de Chagas. FLAP XXI 2013, Congreso Latinoamericano de Parasitología "Dr. Pedro Morera Villalobos".
- Apt W. Enfermedad de Chagas. Diagnóstico clínico. FLAP XXI 2013. Congreso latinoamericano de parasitología "Dr. Pedro Morera Villalobos".
- Apt W, Arribada A, Zulantay I, Rodríguez J, Saavedra M, Muñoz A. Treatment of Chagas' disease with itraconazole: electrocardiographic and parasitological conditions after 20 years of follow-up. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 2164-69.

- Apt W, Arribada A, Zulantay I, Solari A, Sánchez G, Mundaca K, et al. Itraconazole an Allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the results of clinical and parasitological examinations 11 years post treatment. *Ann Trop Med Parasitol* 2005; 99: 733-41.
- Bahia M, de Andrade I, Martins T, do Nascimento A, Diniz L, Caldas I, et al. Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6: e1870.
- Carlier Y, Truysens C, Deloron P, Peyron F. Congenital parasitic infections: a review. *Acta Trop* 2012; 121: 55-70.
- Cazzulo J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Curr Top Med Chem* 2002; 2: 1261-71.
- Choy J, Bryant C, Calvet C, Doyle P, Gunatilleke S, Leung S, et al. Chemical-biological characterization of a cruzain inhibitor reveals a second target and a mammalian off-target. *Beilstein J Org Chem* 2013; 9: 15-25.
- De Oliveira C, Santana L, Carmona A, Cezari M, Sampaio M, Sampaio C, et al. Structure of cruzipain/cruzain inhibitors isolated from *Bauhinia bauhinioides* seeds. *Biol Chem* 2001; 382: 847-52
- Díaz M, Miranda M, Campos-Estada C, Reigada C, Maya J, Pereira C, et al. Pentamidine exerts “*in vitro*” and “*in vivo*” anti *Trypanosoma cruzi* activity and inhibits the polyamine transport in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 2014; 134: 1-9.
- Garzoni L, Waghbi M, Baptista M, de Castro S, Meirelles M, Britto C, et al. Antiparasitic activity of risedronate in a murine model of acute Chagas disease. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23: 286-90.
- Gutiérrez B, Muñoz C, Osorio L, Fehér K, Illyés T, Papp Z, et al. Aromatic glycosyl disulfide derivatives: evaluation of their inhibitory activities against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem Lett* 2013; 23: 3576-79.
- Huprikar S, Bosseman E, Patel G, Moore A, Pinney S, Anyanwu A, et al. Donor-derived *Trypanosoma cruzi* infection in solid organ recipients in the United States, 2001-2011. *Am J Transplant* 2013; 13: 2418-25.
- Leite J, Oliveira A, Lombardi J, Filho J, Chiari E. Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 2307-09.
- Luquetti A. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas. Métodos convencionales y no convencionales. FLAP XXI 2013. Congreso Latinoamericano de Parasitología “Dr. Pedro Morera Villalobos”.
- Maya J, Cassels B, Iturriaga-Vasquez P, Ferreira J; Faundez M, Galanti N, et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol* 2006; 146: 601-20.
- Olmo F, Rotger C, Ramírez-Macías I, Martínez L, Marin C, Carreras L, et al. Synthesis and biological evaluation of N,N'-squaramides with high *in vivo* efficacy and low toxicity: toward a low-cost drug against Chagas disease. *J Med Chem* 2014; 57: 987-99.
- Perez-Mazliah D, Alvarez M, Cooley G, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, et al. Sequential combined treatment with allopurinol and benznidazole in the chronic phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a pilot study. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 424-37.
- Pinto Dias J. 2004. Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. En XII Reunión de la Comisión Intergubernamental del Cono Sur para la eliminación de *Triatoma infestans* y la interrupción de la transmisión transfusional de la Tripanosomiasis Americana (INCOST/Chagas). Washington DC. Pan American Health Organization; 2004. p. 129-134.
- Prata A. 1997. Abordagem general do paciente chagásico. En Pinto Dias J. Coura (eds). Clínica e terapeutica do doença de Chagas. Um manual pratico para o clínico general. Rio de Janeiro. Fiocruz; 1997. p. 115-126.
- Rassi A, Rassi Jr A, Rassi S. 1997. Cardiopatía crónica: arritmias. En: Pinto Dias J. Coura J (eds). Doença de Chagas. Um manual para o clínico general. Rio de Janeiro. Fiocruz; 1997. p. 201-222.
- Tomimori-Yamashita J, Deps P, Almeida D, Enokihara M, De Seixas M, Freymuller E. Cutaneous manifestation of Chagas disease after heart transplantation: successful treatment with allopurinol. *Br J Dermatol* 1997; 137: 626-30.
- Urbina J. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic Chagas disease: advances, challenges and perspectives. *J Eukaryot Microbiol* 2015; 62: 149-56.
- Viotti R, Alarcón de Noya B, Araujo-Jorge T, Grijalva M, Guhl F, López M, et al. Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 635-39.

Twenty years of monitoring of mortality and fecundity of *Triatoma infestans* in the laboratory

CANALS M.^{1,2}, ALVARADO S.¹, CACERES D.¹, CATTAN PE.³

- ¹ Programa de Salud Ambiental, Instituto de Salud Poblacional, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
² Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
³ Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Silvoagropecuarias, Universidad de Chile.

Correspondencia:

Mauricio Canals.

Programa de Salud Ambiental, Instituto de Salud Poblacional,
Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

E-mail: mcanals@uchile.cl.

Summary

A colony of *Triatoma infestans* (Klug) has been maintained continuously in the laboratory “Colonia de Vinchucas” of the Faculty of Medicine of the University of Chile since 1949, under a constant regime of temperature and humidity, recording weekly since 1983 the oviposition and deaths of individuals. This constitutes an invaluable record of a single long-term colony maintained in the same place and under the same environmental conditions for a number of years. The aim of this report was to study mortality and fecundity rates in this population of *T. infestans* maintained under constant environmental conditions, which may serve as a standard of comparison for other species or the same species under other environmental conditions. Fecundity and mortality time series showed seasonal fluctuations confirmed with the ARIMA model. The mean fecundity of *T. infestans* varied from averages of 0.39 eggs/female/week in autumn to 1.63 eggs/female/week in spring, with maximum values of 7.59 eggs/female/week in spring and 5.83 eggs/female/week in summer. Maximum mean mortality rates were in spring and summer. Mortality rates of males and females were not different. Fluctuations of fecundity were of greater magnitude than mortality rates. The highest fecundity rates were also in spring and summer.

Keywords: Fecundity, Mortality, Triatomines

Introduction

Chagas' disease, caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects more than 8 million people in America (WHO 2013). Its main vector in South America is the kissing bug *Triatoma infestans* (Klug 1834) (Hemiptera, Reduviidae), because of its wide distribution range and its capacity to maintain high intra-domiciliary population densities (Lent & Wygodzinsky 1979, Zeledón & Rabinovich 1981, Canals et al. 1991a,b, 1993, 1994, 1997, 1999). This insect has a relatively low intrinsic rate of increase, great longevity and resistance to starvation, maintaining populations near the saturation level (Rabinovich 1972, Canals et al. 1998). In Chile *T. infestans* can live in domestic and peri-domestic habitats with a preference for warm micro-environments (24 °C) (Canals et al. 1997); it is able to survive, mate and rear in human dwelling environments (Canals et al. 1994), and blood of humans represents about 68% of its diets (Schenone et al. 1985, Gürtler et al. 2014). In Chile it inhabits the Mediterranean climate, experimenting large fluctuations of temperature and humidity; although the vector chain of transmission of Chagas' disease has been broken since 1999 (Lorca et al. 2001), recently sylvatic population foci have been reported in the central zone of Chile (Bacigalu-

po et al. 2006, 2010), in Bolivia (Cortez et al. 2006, 2007, 2010, Buitrago et al. 2013) and in Argentina (Gurevitz et al. 2011).

Fecundity and mortality rates are the two of the most fundamental factors of the demographic regime of a population, and are of great interest in populations of vectors such as *T. infestans* (Rabinovich et al. 2011, Medone et al. 2015). Stochastic, seasonal and secular variations in these variables may result in fluctuations if the population size or the proportions of individuals in each age class, extinctions or plagues (Canals et al. 1991 a,b). These fluctuations are mostly induced by climatic variations. For example, temperature and humidity variability affect population parameters such as the basic reproductive rate (R_0), the pre-imaginal period and the generation time (Canals et al. 1992, 1994), and also infection indexes of vectors (Canals et al. 1998).

A colony of *Triatoma infestans* (Klug) was maintained continuously in the laboratory “Colonia de Vinchucas” of the Faculty of Medicine of the University of Chile since 1949, under a constant regime of temperature and humidity, recording weekly since 1983 the oviposition and deaths of individuals; it was suspended in 2003 because the loss of interest as a result of the interruption of the vector transmission chain in Chile. This constitutes

an invaluable record of a single long-term colony maintained in the same place and under the same environmental conditions for several years. The aim of this report was to study mortality and fecundity rates in this population of *T. infestans* maintained under constant environmental conditions, which may serve as a standard of comparison with other species or the same species under other environmental conditions.

Material and methods

The weekly record of the fecundity (number of eggs) and adult deaths of *T. infestans* from 1983 to 2003 was analyzed. Adult insects were maintained in groups of 200 individuals (100 males and 100 females) in glass jars of 18 liters. There were three to eight jars in the analyzed period. They were fed weekly on adult hens. The insects were maintained in a climatic chamber of 2 x 2 x2 m (8m3) (Jordan Commercial Refrigerator, Model D.46.8, UK) at 24 ± 2.5 °C, with a maximal range between 18 and 28 °C and a relative humidity of 50 ± 8%. The climatic chamber remained with the door open 30 cm, allowing indirect light entrance provided by a window of the laboratory and an artificial light only during working hours. The density of individuals in each glass jar was maintained constant; dead individuals were replaced weekly by new ones from the breeding jars. The count of individuals and eggs was performed weekly. Fecundity (number of eggs /female week) and sex-specific mortality (dead individuals/ individual week) rates were calculated. Time series of 20 years (1040 weeks) of each variable were obtained. The seasonal behavior of the series was described graphically and with descriptive statistics. Periodogram, autocorrelation (ACF) and partial autocorrelation (PACF) functions of the time series were analyzed and a seasonal integrated autoregressive and moving average model, ARIMA, (P,D,Q)x(Ps,Ds,Qs) was adjusted to probe the seasonal component, where P, D and Q represent autoregressive, difference and moving average parameters, respectively, and “s” indicates the seasonal component-.

Results

Both time series showed seasonal fluctuations (Fig. 1). The ARIMA model confirmed the seasonal

component and a non-seasonal autoregressive parameter that accounted for the dependence of both variables with themselves in the immediately preceding week (Table 1). Mortality rates of males and females were not different (t = -0.168, p = 0.867). Fluctuations in fecundity (CV = 0.59) were of greater magnitude than those of mortality rates (CV = 0.34) (Bartlett test = 14.37, p = 0.0002). The highest values of fecundity and mortality rates were in spring and summer (Table 2).

	Mortality			Fecundity		
	Value	SE	t-test	Value	SE	t-test
PI	0.980	0.008	129.4*	0.961	0.010	95.88*
Q1	0.494	0.036	13.9*	0.523	0.031	16.86*
Ps1	0.895	0.089	10.0*	0.139	0.033	4.21*
Qs1	0.824	0.107	7.7*	-	-	-

Table 1. Parameter values of the seasonal ARIMA model of the mortality and fecundity time series for *Triatoma infestans* under constant laboratory conditions. P1, Q1, Ps1 and Qs1 are non-seasonal and seasonal (s) auto-regression and moving average parameters, respectively. Se indicates standars error of the parameters and* indicates a p-value <0.001 in a t test.

	Fecundity (eggs/female week)	Mortality (deaths/individual week)
Spring	1.63 ± 1.13 [0.00-7.59]	0.059 ± 0.035 [0.00-0.155]
Summer	1.37 ± 1.05 [0.00-5.83]	0.071 ± 0.039 [0.01-0.184]
Autumn	0.39 ± 0.36 [0.00-2.13]	0.044 ± 0.034 [0.00-0.205]
Winter	0.66 ± 0.48 [0.02-2.78]	0.031 ± 0.024 [0.00-0.103]

Table 2. Seasonal variation of mortality and fecundity in *Triatoma infestans* under constant laboratory conditions for twenty years. Range in brackets.

Discussion

The mean fecundity of *T. infestans* reported in this study varied from 0.39 eggs/female week (eggs/female/week) in autumn to 1.63 eggs/female/week in spring, with maximum values of 7.59 eggs/female/week in spring and 5.83 eggs/female/week in summer. Other reports of fecundity for this species are 1.9 eggs/female/week at 15-32 °C and 40 to 90% relative humidity (RH) (Canals et al. 1992), 1.0 eggs/female/week at 25 °C and 75% RH (Canals et al. 1991), 5.4 eggs/female/week at 26 °C and 60% RH (Rabinovich 1972), between 5.95eggs/female/week and 13.65 eggs/female/week at 28 °C and 60% RH (Espinoza et al. 2011), fecundities ranging from

1.16 and 4.07 eggs/female/day under controlled conditions (Nuñez & Segura 1987) and 3.68 ± 2.39 and 3.79 ± 2.94 eggs/female/week for individuals fed on humans and hens respectively, at 28 °C and 40% RH (Medone et al. 2015). The results of the last three authors were obtained in laboratory but for shorter periods than that reported in our study, which explains that these values are within the range of our reported maximum values. This species may have high fecundity for short periods (Fig. 1). Mortality rates were similar to previous reports: 0.0083 deaths/individual week at 25 °C and 75% RH (Canals et al. 1991) and 0.0070 deaths/individual week at 15-32 °C and 40-90% RH (Canals et al. 1992).

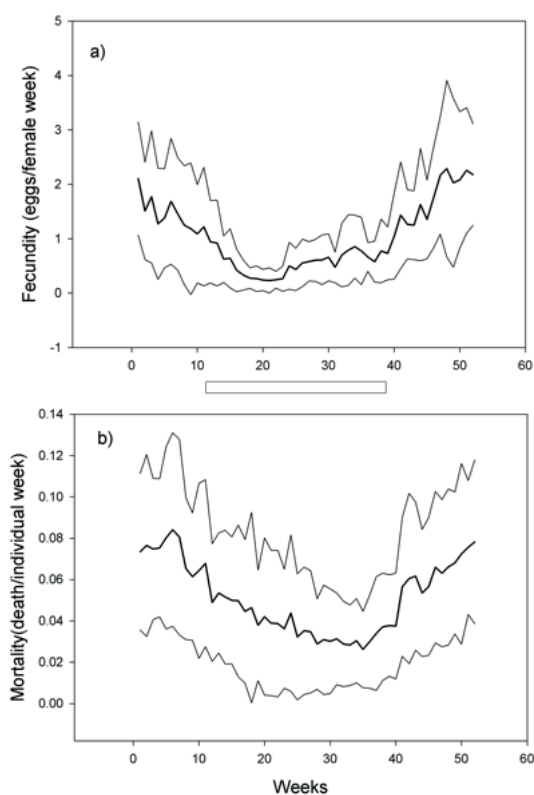


Figure 1. Annual variation of fecundity and mortality rates (b) in *Triatoma infestans* under constant laboratory conditions for twenty years. Thick lines represent the average for each week from the week one to week 52. Bold lines indicate ± 1 standard deviations. The white bar indicates the cold period of the yaers (Autumn and Winter).

Fluctuations in fecundity are an expected result in insect populations in natural conditions because they are strongly influenced by environmental conditions (Carey 2001, Peterson et al. 2009). Particularly it has been reported that *T. infestans* has high sensitivity to temperature, especially below 20 °C.

In constant temperature and humidity conditions there should not be a direct effect of these variables on fecundity. Probably seasonal variations of light trigger or module endogenous population cycles related to mating and oviposition; most insects adapt to seasonal changes by a direct response to photoperiod (Miyasaki et al. 2014, Meireles-Filho & Kiriakou 2013, Numata et al. 2015). For example in the two most epidemiologically relevant species, *Rhodnius prolixus* and *T. infestans*, locomotor activity and other behaviors such as foraging, breeding, oviposition, dispersion and thermopreference are controlled by the circadian clock (Ampleford & Steel 1982, Ampleford & Davey 1989, Lazzari 1992, Reisenman et al. 1998, 2002, Minoli & Lazzari 2003, Bodin et al. 2008, Valentinuzzi et al. 2014). *T. infestans* is a nocturnal species (Canals et al. 1997) with its locomotor activity driven by the circadian clock mainly synchronized by light as the predominant zeitgeber (Lazzari 1992, Lorenzo & Lazzari 1998, 1999). The light dependence *T. infestans* shows in the laboratory may be similar to what *T. infestans* experiments in natural conditions because this species has adapted to living in houses, where they feed on humans and domestic animals (Vazquez-Prokopec et al. 2002). The fact that the studied population was acclimated to the same conditions for a number of generations may make it particularly sensitive to small light changes into the laboratory.

Population cycles may have an endogenous cause generated in the population related to the density of individuals, or an exogenous environmental cause. For the seasonal cycle of mortality rates we cannot propose a population fluctuation modulated by the density of individuals because the density was maintained constant (200 individuals), although there may exist an effect of delayed density dependence as result of the high density of immature stages in the breeding jars, since these were maintained in fluctuating populations that reached 400 individuals per jar. In this case the mechanism would be a greater mortality rate in adults from high densities of offspring due to a nutritional deficit in the immature stages. However it is unlikely that

these induced cycles would have a one year period. Another possibility to explain an endogenous cycle may be a fluctuation induced by a generation time of one year. In the case of *T. infestans* the generation time has been estimated as 7.1 (Rabinovich 1972) and 14.7 months (Canals et al. 1992), so this is a real possibility.

A more reasonable possibility is that the cycle of mortality is environmentally induced. This can occur because the high mortality period coincides with the reproductive period. Mating and oviposition are behaviors with high energetic requirements; the probability of individual death increases, which is known as the cost of reproduction -a trade-off between reproduction and survival-, which has been shown to exist in virtually all insect studies (Bell & Koufopanou 1986, Roitberg 1989, Carey 2001). A final possibility to explain this cycle is a periodic increase in pathogens in spring and summer. Although the temperature was maintained constant inside the climate chamber, it was open, communicating with the laboratory which had variations in temperature and humidity. This may have provided a possible entry of pathogens to the chamber, where microorganisms would find an environment of stable and high temperature and humidity favoring their development. (Rabinovich 1972) reported that the high humidity in the jars is a potential danger for *T. infestans* because of possible colonization by fungi, which are a natural agent of mortality for insects (Varley et al. 1973). This agrees with reports that domestic, peridomestic and sylvatic habitats of triatomines have favorable conditions for entomopathogenic fungi during rainy periods in Latin America (Romaña 1992, Romaña & Fargues 1987, Luz et al. 1994) and that entomopathogenic fungi have been proposed as a cause of mortality in triatomines (Fargues & Luz 2000).

Acknowledgements

We thank anonymous reviewers and the editor for their useful comments on the manuscript. We also thank Mr Antonio Rojas by devotedly keeping track of insects for many years and Dr. Lafayette Eaton for useful comments and idiomatic corrections. This work was funded by Fund for Science and Technology of Chile: FONDECYT 1150514.

References

- Ampleford EJ, Davey KG. Egg laying in the insect *Rhodnius prolixus* is timed in a circadian fashion. *J Insect Physiol.* 1989; 35: 183-188.
- Ampleford EJ, Steel SGH. Circadian control of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J Comp Physiol.* 1982; 147: 281-286.
- Bacigalupo A, Segura JA, García A, Hidalgo J, Galuppo S, Cattán PE. Primer hallazgo de vectores de la enfermedad de Chagas asociados a matorrales silvestres en la Región Metropolitana, Chile. *Rev Med Chile* 2006; 134: 1230-1236.
- Bacigalupo A, Torres-Pérez F, Segovia V, García A, Correa JP, Moreno L, et al. Sylvatic foci of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in Chile: description of a new focus and challenges for control programs. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010; 105: 633-641.
- Bell G, Koufopanou V. The cost of reproduction. In *Oxford Surveys in Evolutionary Biology.* Dawkins R, M Ridley M, editors. Oxford, UK: Oxford Univ. Press; 1986.
- Bodin A, Barrozo RB, Couton L, Lazzari CR. Temporal modulation and adaptive control of the behavioural response to odours in *Rhodnius prolixus*. *J Insect Physiol.* 2008; 54: 1343-1348.
- Buitrago NLR, Bosseno MF, Waleckx E, Brémond P, Vidaurre P, Zoveda F, et al. Risk of transmission of *Trypanosoma cruzi* by wild *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Bolivia supported by the detection of human blood meals. *Infect. Genet. Evol.* 2013; 19: 141-144.
- Canals M, Cattán PE, Valderas J, Solís R. Biología de poblaciones de *Triatoma infestans*: Fluctuaciones de la mortalidad y fertilidad. *Rev. Med. Chile.* 1991; 119: 979-983.
- Canals M, Cattán PE, Valderas J, Solís R. Efectos poblacionales de fluctuaciones de mortalidad y fecundidad en *Triatoma infestans*: Simulación mediante matrices de Leslie. *Rev. Med. Chile.* 1991; 119: 1239-1242.
- Canals M, Cattán PE, Ehrenfeld M, Torres P. Poblaciones experimentales de *T. infestans*: efectos de condiciones ambientales variables. *Parasitol. al día.* 1992; 16: 72-77.
- Canals M, Cattán PE, Ehrenfeld M. Algunas estimaciones numéricas de la importancia epidemiológica de los vectores de la enfermedad de Chagas en Chile. *Parasitol. al Día.* 1993; 17: 79-86.

- Canals M, Cattán PE, Ehrenfeld M. Dinámica comparada de cohortes de *T. infestans* en ambiente habitacional. Rev. Med. Chile. 1994; 122: 993-997.
- Canals M, Solís R, Valderas J, Ehrenfeld M, Cattán PE. Preliminary studies on temperature selection and activity cycle of Chilean vectors of the Chagas disease. J. Med. Entomol. 1997; 34:11-17.
- Canals M, Ehrenfeld M, Solís R, Cruzat L, Pinochet A, Tapia C, et al. Biología comparada de *Mepraia Spinolai* en condiciones de laboratorio y terreno: cinco años de estudio. Parasitol. al Día. 1998; 22: 72-78.
- Canals M, Solís R, Tapia C, Ehrenfeld M, Cattán PE. Comparison of some behavioural and physiological parameters of the feeding of *Triatoma infestans* KLUG, 1834 and *Mepraia spinolai* PORTER 1934; vectors of the Chagas's disease in Chile. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1999; 94: 687-692.
- Carey JR. Insect biodemography. Annu. Rev. Entomol. 2001; 46: 79-110.
- Cortez MR, Emperaire L, Piccinali RV, Gürtler RE, Torrico F, Jansen AM, et al. Sylvatic *Triatoma infestans* (Reduviidae: Triatominae) in the Andean valleys of Bolivia. Acta Trop. 2007; 102: 47-54.
- Cortez MR, Monteiro FA, Noireau F. New insights on the spread of *Triatoma infestans* from Bolivia - implications for Chagas disease emergence in the southern cone. Infect. Genet. Evol. 2010; 10: 350-353.
- Cortez MR, Pinho AP, Cuervo P, Alfaro F, Solano M, Xavier SC, et al. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae): ecology of the transmission cycle in the wild environment of the Andean valley of Cochabamba, Bolivia. Exp. Parasitol. .2006; 114: 305-313.
- Espinoza J, Bustamante M, Garcia AL, Tenorio O, Noireau F, Rivera D, et al. Biología reproductiva de dos poblaciones de *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) en condiciones de laboratorio. Gac. Med. Bol. 2011; 34: 66-70.
- Fargues J, Luz C. Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on the infection potential of *Beauveria bassiana* for *Rhodnius prolixus*. J. Invert. Pathol. 2000;76: 202-211.
- Gurevitz J, Ceballos MLA, Gaspe MS, Alvarado- Otegui JA, Enríquez GF, Kitron U, et al. Factors affecting infestation by *Triatoma infestans* in a rural area of the humid Chaco in Argentina: a multi-model inference approach. PLoSNegl. Trop.Dis. 2011; 5: e1349.
- Gürtler RE, Cecere MC, Vázquez-Prokopec GM, Ceballos LA, Gurevitz JM, Fernández MDP, Kitron U, et al. Domestic animal hosts strongly influence human-feeding rates of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in Argentina. PLoSNegl. Trop.Dis.2014; 8: e2894.
- Lazzari CR. Circadian organization of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. J. Insect Physiol.1992; 38: 895-903.
- Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the triatominae (Hemiptera; Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. Bull. Am. Nat. Hist. 1979; 163: 123-520.
- Lorca M, García A, Bahamonde MI, Fritz A, Tassara R. Certificación serológica de la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en Chile. Rev. Med. Chile. 2001; 129: 266-71.
- Lorenzo, M.G, Lazzari. C.R. Activity pattern in relation to refuge exploitation and feeding in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Acta Trop. 1998; 70: 163-170.
- Lorenzo MG, Lazzari CR. Temperature and relative humidity affect the selection of shelters by *Triatoma infestans*, vector of Chagas disease. Acta Trop.1999; 72: 241-249.
- Luz C, Fargues J, Romaña CA, Moreno J, Goujet R, Rougier M, et al. Potential of entomopathogenic hyphomycetes for the control of the triatomine vectors of Chagas' disease. Proc. VIth. Int. Coll. Invertebr. Pathol. Microbiol. Control. 1994; 1: 272-276.
- Medone P, Balsalobre A, Rabinovich JE, Marti GE, Menu F. Life history traits and demographic parameters of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) fed on human blood. J. Med. Entomol. 2015; 1-9: DOI:10.1093/jme/tjv138
- Meireles-Filho ACA, Kyriacou CP. Circadian rhythms in insect disease vectors. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2013;108: 48-58.
- Minoli SA, Lazzari CR. Chronobiological basis of thermopreference in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. J. Insect Physiol.2003; 49: 927-932.
- Miyazaki Y, Nisimura T, Numata H. Circannual rhythms in insects. In Numata, H, Helm editors. Annual, Lunar and Tidal Clocks. Patterns and Mechanims of Nature's Enigmatic Rhythms. Tokio: Springer, Tokyo; 2014. P. 333-350.
- Numata H, Miyazaki Y, Ikeno T. Common features in diverse insect clocks. Zool. Letters. 2015; 1:10, DOI 10.186/s40851-014-0003-y

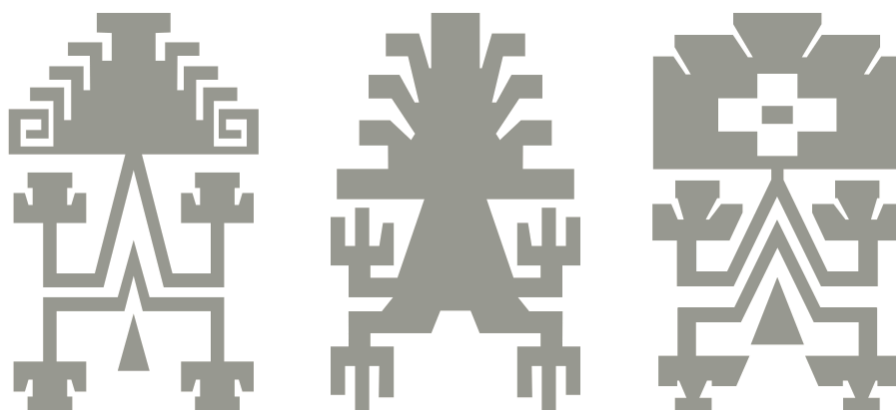
- Núñez JA, Segura EL. Rearing of Triatominae. Chagas' Disease Vectors, Vol. II. USA: CRC Press, Florida; 1987.
- Peterson RKD, Davis RS, Highley LG, Fernandes OA. Mortality risk in insects. Environ. Entomol.2009; 38: 2-10.
- Rabinovich JE.. Vitals statistics of triatominae under laboratory conditions. J. Med. Entomol. 1972; 9: 351-370.
- Rabinovich JE, Kitron UD, Obed Y, Yoshioka M, Gottdenker N, Chaves LF. Ecological patterns of blood-feeding by kissing-bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2011; 106: 479-494.
- Reisenman CE, Insausti TC, Lazzari CR . Light-induced and circadian changes in the compound eye of the haematophagous bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). J. Exp. Biol.2002; 205: 201-210.
- Reisenman CE, Lazzari CR, Giurfa M. Circadian control of photonegative sensitivity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. J. Comp. Physiol. 1998; 183: 533-541.
- Roitberg BD. The cost of reproduction in rosehip flies, *Rhagoletis basiola*: eggs are time. Evol. Ecol. 1989; 3:183-88.
- Romaña CA. "Recherches sur les Potentialités des Hyphomycètes Entomopathogènes (Fungi imperfecti) dans la Lutte Microbiologique contre les Triatominae (Heteroptera)." Thèse de l'Université de Montpellier I, Montpellier, France.1992.
- Romaña CA, Fargues J. Sensibilité des larves de l'hémiptère hématophage *Rhodnius prolixus* (Triatominae) aux hyphomycètes entomopathogènes. Entomophaga.1987; 32: 167-179.
- Schenone H, Christensen H, De Vasquez A, Gonzalez C, Mendez E, Rojas A, Villarroel F. Fuentes de alimentación de triatomíneos domésticos y su implicancia epidemiológica en relación a la enfermedad de Chagas en áreas rurales de siete regiones de Chile. Bol. Chile Parasitol. 1985; 40: 24-38.
- Valentinuzzi VS, Amelotti I, Gorla DE, Catalá SS, Ralph MR . Circadian entrainment by light and host in the Chagas disease vector, *Triatoma infestans*. Chronobiol Int. 2014; 31: 265-75.
- Varley GC, Gradwell GR, Hassell MP. Insect Population Ecology: An Analytical Approach. University of California Press, Berkeley and Los Angeles. 1973.
- Vazquez-Prokopec GM, Ceballos LA, Cecere MC, Gürtler RE . Seasonal variations of micro-climatic conditions in domestic and peridomestic habitats of *Triatoma infestans* in rural northwest Argentina. Acta Trop.2002; 84: 229-238.
- Zeledón R, Rabinovich JE. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. Annu. Rev. Entomol.1981; 26: 101-133.

Santiago de Chile

Facultad de Medicina
Universidad de Chile

10-14 de Diciembre 2017

XXIV Congreso
Latinoamericano de Parasitología



FLAP 2017

www.sociedadchilenaparasitologia.cl
www.parasitologia.cl

REVISTA

PARASITOLOGÍA

LATINOAMERICANA



Órgano Oficial de la Federación
Latinoamericana de Parasitólogos