

## *Gnathostoma binucleatum* (Spirurida: Gnathostomatidae) en peces dulceacuícolas de Tabasco, México

Teiji Kifune<sup>1</sup>, Rafael Lamothe-Argumedo<sup>2</sup>, Luis García-Prieto<sup>2</sup>, Alejandro Ocegüera-Figueroa<sup>2</sup> & Virginia León-Règagnon<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Parasitología, Escuela de Medicina, Universidad de Fukuoka, Fukuoka 814-0180, Japón.

<sup>2</sup> Laboratorio de Helmintología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-153, C.P. 04510, México, D.F., México. email: vleon@ibiologia.unam.mx; gprieto@ibiologia.unam.mx

Recibido 02-V-2002. Corregido 06-II-2004. Aceptado 12-II-2004.

**Abstract:** Human gnathostomiasis is a food-born parasitic disease of relative importance in many countries in Southeast Asia. It is caused by several species of nematodes of the genus *Gnathostoma*. In Mexico is an emerging public health problem since 1970, when first cases were reported. Until today, larval morphometric characters that have been proposed to differentiate between the three species of *Gnathostoma* present in this country, are not satisfactory. Recently, the presence of advanced third-stage larvae AdvL<sub>3</sub> (infective form for humans) in freshwater fishes from Pantanos de Centla, Tabasco, was recorded but their specific identity was not clarified. Examination of four species of freshwater fishes from the same locality revealed that three of them: *Petenia splendida* (n=58), *Cichlasoma managuense* (n=35) and *Gobiomorus dormitor* (n=9) were infected by 15 AdvL<sub>3</sub> of *Gnathostoma binucleatum*. Specific identity was obtained comparing the internal transcribed spacer 2 (ITS2) of the ribosomal DNA with sequences reported in Genbank. This is the first record of *G. binucleatum* in *P. splendida* and *G. dormitor* from Tabasco and the first specific determination of the parasite in the locality.

**Key Words:** *Gnathostoma binucleatum*, Gnathostomiasis, Tabasco, Mexico, freshwater fishes, ITS2, DNA.

La Gnatostomiasis es una enfermedad producida en el hombre y vertebrados silvestres por nemátodos del género *Gnathostoma* Owen, 1836, en cuyo ciclo de vida intervienen un copépodo como primer hospedero intermedio, un pez como segundo y un mamífero como definitivo; el hombre se infecta accidentalmente al ingerir carne cruda de peces de agua dulce. Su distribución abarca diversos países de Asia y América, en algunos de los cuales constituye un problema de salud pública importante (Lamothe-Argumedo 1997).

Los primeros casos humanos de esta enfermedad fuera de Asia, fueron registrados en México por Peláez y Pérez-Reyes (1970); desde entonces, su número se ha incrementado de manera gradual en el país, estimándose en 8000 en la actualidad (Lamothe-Argumedo *et al.* 2001).

La presencia de larvas de tercer estadio avanzado (L<sub>3</sub>A) del nematodo se ha señalado en vertebrados de 12 estados de la República Mexicana, infectando al hombre en diez de ellos (Lamothe-Argumedo 1997, Lamothe-Argumedo *et al.* 2001); particularmente en el estado de Tabasco, López-Jiménez y García-Magaña (2000) registraron tres especies de peces como hospederos del parásito; sin embargo, no establecieron su identidad específica, ya que en la actualidad, las L<sub>3</sub>A de las tres especies del género que se distribuyen en México (*Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991, *Gnathostoma turgidum* Stossich, 1902 y *Gnathostoma procyonis* Chandler, 1942), no pueden diferenciarse claramente con bases morfológicas. Por esta razón, el principal objetivo de nuestro estudio es realizar la identificación específica del

parásito, a través de la obtención de la secuencia del espaciador interno 2 (ITS2) del ADN ribosomal y de su comparación con las secuencias de otras especies publicadas en estudios previos (Almeyda-Artigas *et al.* 2000, León-Règnon *et al.* 2002).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Durante marzo de 2001, se recolectaron cuatro especies de peces: 58 ejemplares de *Petenia splendida*, Günther 1862, 35 de *Cichlasoma managuense* Günther 1867 (= *Heros managuensis*), cinco de *Cichlasoma urophthalmus* Günther 1862 y nueve de *Gobiomorus dormitor* Lacépède 1798, en la Laguna San Pedrito (92°33'9" W; 18°23'2" N), localizada en el Municipio de Centla, Tabasco, México. La musculatura de cada pez fue molida individualmente, comprimiéndola entre dos placas de vidrio para observarla a contraluz bajo un microscopio estereoscópico en búsqueda de larvas. Las larvas recolectadas fueron fijadas en alcohol al 70% caliente para su estudio morfométrico (n=6 larvas), aclarándolas con lactofenol de Amann y en etanol absoluto para su análisis molecular (n=2 larvas). La infección se caracterizó de acuerdo con los parámetros propuestos por Margolis *et al.* (1982); ejemplares de referencia fueron depositados en la Colección Nacional de Helminthos (CNHE), Instituto de Biología, UNAM, México, con los números de catálogo: 4426 y 4427.

La obtención del ADN se efectuó individualmente mediante el método estándar de extracción fenol / cloroformo (Hillis *et al.* 1996). Para amplificar el ITS2 se utilizó la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) con los iniciadores NEWS2 (delantero) 5'TGTGTC-GATGAAGAACGCAG e ITS2-RIXO (reversa) 5'TTCTATGCTTAAATTCAGGGG (Almeyda-Artigas *et al.* 2000). El programa de amplificación fue el siguiente: 1 min a 94°C; 35 ciclos de 30 s a 92°C, 30 s a 45°C y 1 min a 72°C; elongación final de 4 min a 72°C. Los productos de la PCR se purificaron utilizando

el kit de purificación QIAquick (QIAGEN), secuenciándose directamente con un secuenciador automático ABI Prism 310. Las secuencias obtenidas se alinearon con las de *G. binucleatum* (Genbank Z97072), *G. turgidum* (Genbank Z97175) y *Gnathostoma* spp. (Genbank Z97172 y Z97173).

## RESULTADOS

De las cuatro especies de peces examinadas, tres se encontraron parasitadas por L<sub>3</sub>A de *Gnathostoma*: *C. managuense* (prevalencia= 8.6%, abundancia promedio= 0.08 larvas por hospedero revisado), *P. splendida* (15.5%, 0.15) y *G. dormitor* (22.2%, 0.3). Las dos primeras especies pertenecen a la familia Cichlidae y la última a la familia Eleotridae, recuperándose un total de 15 larvas. De éstas, únicamente seis presentaron condiciones óptimas para su estudio morfométrico; asimismo, considerando que todas eran indistinguibles, se utilizaron dos para su estudio molecular, número que asegura la obtención de ADN en cantidad suficiente.

Las L<sub>3</sub>A analizadas, son menores a 0.5 cm de longitud; se caracterizan por presentar un bulbo cefálico armado con cuatro hileras de ganchos y un par de labios flanqueando la boca; cada labio está provisto de un par de papilas. El cuerpo está totalmente cubierto por hileras transversales de espinas simples. En el Cuadro 1 se resumen los caracteres morfométricos comúnmente empleados para la diferenciación de las especies del género en etapa larvaria.

Finalmente, en este estudio se obtuvo la secuencia completa del ITS2 de dos L<sub>3</sub>A recolectadas de la musculatura de *C. managuense* y *G. dormitor*. El segmento secuenciado tiene un total de 421 pares de bases y es idéntico en los dos ejemplares (Figura 1; número de acceso Genbank: AF503204). A su vez, esas dos secuencias difieren únicamente en dos sitios con respecto a la de *G. binucleatum* disponible en Genbank (Z97072), por lo que se asignaron a esta especie.

CUADRO 1

Comparación morfométrica de larvas de tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* spp.

TABLE 1

Morphometric comparison of advanced third stage larvae of *Gnathostoma* spp.

Caracter	<i>G. spinigerum</i> <sup>1</sup>	<i>G. binucleatum</i> <sup>2</sup>	<i>G. procyonis</i> <sup>3</sup>	<i>G. binucleatum</i> <sup>4</sup>
Longitud corporal (mm)	5 (4.6-5.5)	4.3 (2.6-5.9)	5.2	3.1 (2-4.3)
Número de ganchos / hilera:				
Hilera 1	44 (39-49)	39 (35-44)	33 (29-36)	40.2 (38-41)
Hilera 2	47 (42-54)	42 (38-47)	37 (32-40)	43 (40-48)
Hilera 3	50 (45-56)	45 (40-49)	41 (37-45)	47 (44-50)
Hilera 4	52 (45-58)	48 (43-52)	45 (42-47)	50 (48-52)
Anillo 4 – anillo 1*	8	9.5	12	10
Hileras transversales de espinas (No.)	+200	260	–	225 (152-274)
Posición pc/pe**	–/–	13/30	–	12.6/26

1. Miyazaki (1954); 2. Almeyda-Artigas (1991); 3. Ash (1962); 4. presente estudio; \*diferencia entre el número de ganchos del anillo 4 con respecto al del anillo 1; \*\* posición de la papila cervical (pc) y del poro excretor (pe) con relación al número de hilera transversal de espinas en el que se ubican; – información no disponible.

## DISCUSIÓN

*Petenia splendida* y *G. dormitor* representan nuevos hospederos para el parásito en la zona, ya que anteriormente se le había registrado (como *Gnathostoma* sp.) en *Belonesox belizanus* Kner, 1860, *C. managuense* y *Rhamdia guatemalensis* Günther, 1864 en la misma localidad (López-Jiménez y García-Magaña 2000). Ambas especies de peces han sido señaladas previamente como hospederos intermediarios de *G. binucleatum* en seis localidades de México (Pérez-Ponce de León *et al.* 1996, Lamothe-Argumedo 1997, Almeyda-Artigas *et al.* 2000); sin embargo, en ninguna se ha establecido el nivel de la infección, lo que impide realizar comparaciones con nuestros resultados. De la misma forma, la prevalencia y abundancia promedio registradas para *G. dormitor* en Tabasco, sugieren su actuación como hospedero preferencial del parásito en la zona; no obstante, el tamaño reducido y desigual de las distintas muestras analizadas, no permite concluir al respecto.

El hallazgo de estas larvas en peces dulceacuícolas de Tabasco y su identificación como *G. binucleatum*, ponen de manifiesto el

peligro potencial de la transmisión de la infección al hombre, ya que esta especie es la única registrada hasta ahora como parásito del mismo en México (León-Règagnon *et al.* 2002). Lo anterior es ratificado por Wong-Ortiz *et al.* (2001), quienes reportaron el primer caso humano de gnatostomiasis en el estado de Tabasco.

Hasta la fecha, el número de especies de peces registradas como segundos hospederos intermediarios de *Gnathostoma* spp., en México asciende a 25, pertenecientes a ocho familias; entre ellas, las mejor representadas son Cichlidae con 11 especies, Eleotridae con cinco y Ariidae con tres. La frecuencia con la que se registra a miembros de estas tres familias como hospederos de las L<sub>3</sub>A en distintas zonas de México como Guerrero (León-Règagnon *et al.* 2000), Nayarit (León-Règagnon *et al.* 2002), Oaxaca-Veracruz (Lamothe-Argumedo 1997), Tamaulipas (Almeyda-Artigas *et al.* 2000) y ahora Tabasco (López-Jiménez y García Magaña 2000 y el presente estudio), podría ser indicativa de la composición característica del espectro hospedatorio del nematodo en los cuerpos de agua del país.

La identificación específica de las larvas del género *Gnathostoma* en Asia, se basa

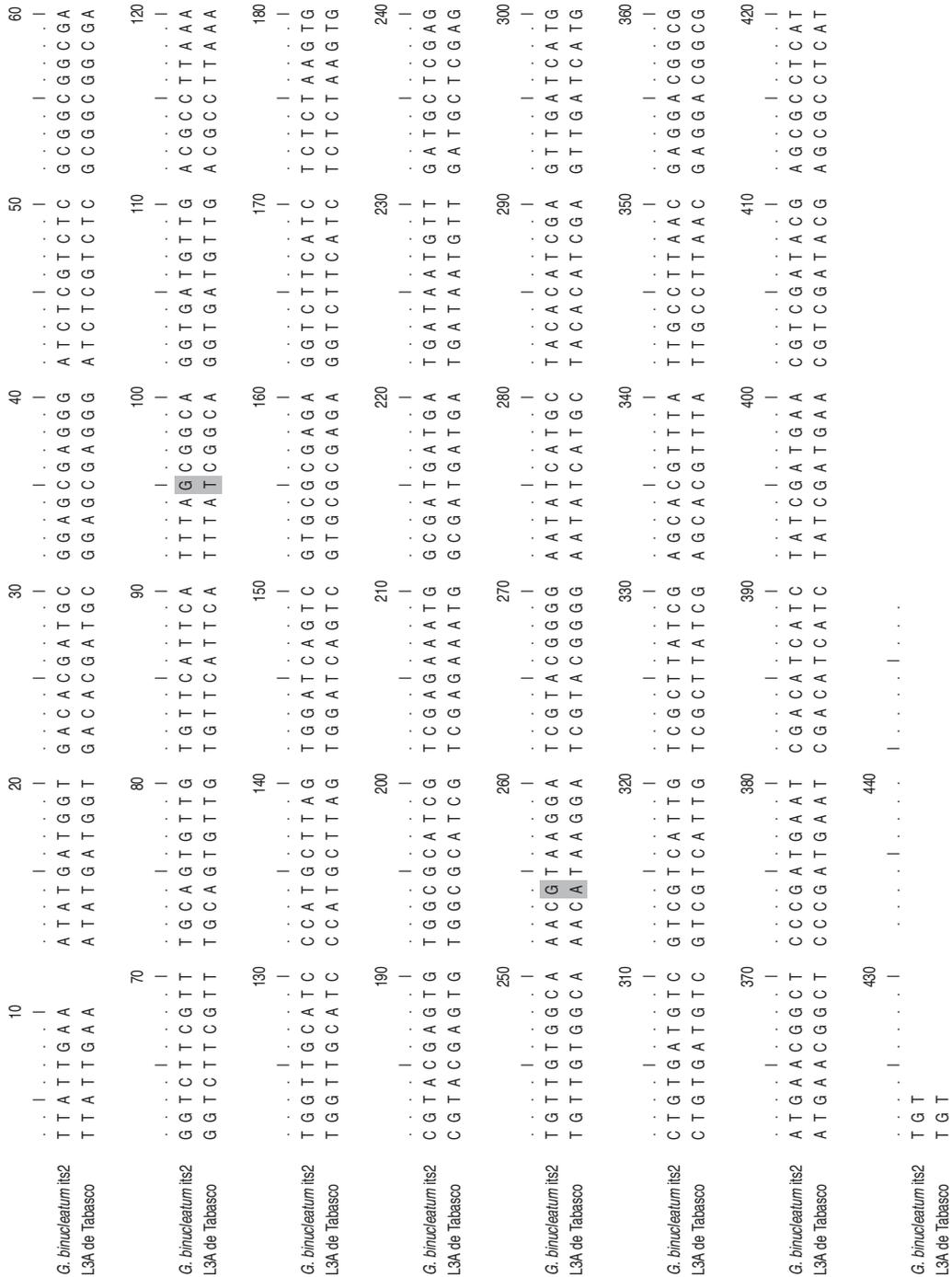


Fig. 1. Alineación de las secuencias de la región ITS2 del ADN ribosomal de *Gnathostoma binucleatum* (Genbank Z97072) con las de las larvas analizadas en este estudio (Genbank AF503204). Los pares de bases sombreadas representan las diferencias encontradas entre ambas secuencias.

Fig. 1. Alignment of the rDNA ITS2 sequences of *Gnathostoma binucleatum* (Genbank Z97072) with those obtained in this study (Genbank AF503204). Highlighted base pairs represent differences between sequences.

principalmente en el número de ganchos de las cuatro hileras del bulbo cefálico, así como en el valor promedio de los núcleos presentes en las células intestinales (Akahane *et al.* 1994). Más aún, especies como *G. nipponicum* Yamaguti, 1941, pueden identificarse por carecer de una cuarta hilera de ganchos cefálicos (Miyazaki 1991). Sin embargo, la utilización de la morfometría para la determinación de las especies registradas en México se dificulta por el conocimiento parcial de las características de L<sub>3</sub>A de *G. procyonis* (Ash, 1962), la carencia total de información sobre el mismo estadio en el caso de *G. turgidum* y por el solapamiento de rasgos que *G. binucleatum* exhibe con respecto a *G. spinigerum* y *G. procyonis*, particularmente si consideramos el intervalo de variación de los mismos (Cuadro 1). Lo anterior ha determinado que numerosos estudios efectuados sobre el parásito en México hayan realizado su determinación a nivel genérico exclusivamente (Lamothe-Argumedo *et al.* 1989, Funata *et al.* 1993, Akahane *et al.* 1994, Rojas-Molina *et al.* 1999, León-Règagnon *et al.* 2000, López-Jiménez y García-Magaña 2000). Esta problemática taxonómica, común a diversos grupos de organismos, ha propiciado el uso de otro tipo de herramientas para lograr su solución; entre ellas sobresalen los datos moleculares y en particular las secuencias de ADN, que ofrecen una gran cantidad de caracteres potencialmente útiles para resolver problemas taxonómicos.

Específicamente sobre el género *Gnathostoma*, se han realizado estudios moleculares con el fin de probar la validez de *G. binucleatum*, especie americana de morfología muy similar a *G. spinigerum* (Almeyda-Artigas *et al.* 2000) y de lograr la identificación específica de las L<sub>3</sub>A en otras regiones del país (León-Règagnon *et al.* 2002).

Al comparar las secuencias de *G. binucleatum*, *G. turgidum* y *Gnathostoma* spp., disponibles en Genbank con la obtenida en este estudio, observamos que en cuanto a la primera, presentan solo dos diferencias, esto es, una divergencia de 0.475%, mientras que con las restantes no se logró un alineamiento

confiable, registrándose una divergencia mayor al 50%.

La divergencia encontrada entre las secuencias de las larvas de Tabasco y la de *G. binucleatum* en Genbank es ligeramente mayor que la reportada en estudios previos (Almeyda-Artigas *et al.* 2000, León-Règagnon *et al.* 2002). No obstante, identificamos a los ejemplares aquí estudiados como *G. binucleatum*, ya que de acuerdo con Almeyda-Artigas *et al.* (2000), esta región del ADN ribosomal presenta una alta variación interespecífica, mayor al 7.29%, porcentaje claramente superior al obtenido en este estudio con relación a *G. binucleatum* (0.475%), que asumimos como variación propia de la especie.

Finalmente, consideramos necesario profundizar en el estudio de la variación del ITS2 en este grupo y explorar otras regiones del ADN para obtener información precisa acerca de los límites específicos y la variación de los caracteres morfológicos de las L<sub>3</sub>A de las especies americanas del género.

#### AGRADECIMIENTOS

A Leticia García Magaña y Serapio López Jiménez, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo. Este estudio fue parcialmente financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT-UNAM, proyecto IN204600 y por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica Internacional del Ministerio de Educación, Ciencia, Deportes y Cultura de Japón.

#### RESUMEN

La gnatostomiasis humana se adquiere al ingerir pescado de agua dulce crudo o insuficientemente cocido, infectado con larvas de tercer estadio avanzado (L<sub>3</sub>A) de nemátodos del género *Gnathostoma*. En el sureste de Asia, este padecimiento tiene una importancia relativa; en México, se le considera un problema de salud pública emergente desde 1970, cuando fueron registrados los primeros casos.

Hasta la fecha, no se han establecido con precisión los caracteres morfométricos para diferenciar las L<sub>3</sub>A de las tres especies del género distribuidas en este país. Recientemente, se registraron larvas del parásito en peces dulceacuícolas de los Pantanos de Centla, Tabasco, sin definir su identidad específica. El análisis de cuatro especies de peces de la misma localidad reveló que tres de ellos: *Petenia splendida* (n=58), *Cichlasoma managuense* (n=35) y *Gobiomorus dormitor* (n=9), resultaron positivas a la infección por *Gnathostoma binucleatum*. La identificación del parásito se obtuvo comparando la secuencia del espaciador interno 2 (ITS2) del ADN ribosomal del material de Tabasco, con secuencias disponibles en Genbank. Este trabajo constituye el primer registro de *G. binucleatum* en *P. splendida* y *G. dormitor* de Tabasco y la primera determinación a nivel específico del parásito en la localidad.

## REFERENCIAS

- Akahane, H., R. Lamothe-Argumedo, J.M. Martínez-Cruz, D. Osorio-Sarabia & L. García-Prieto. 1994. A Morphological Observation of the Advanced Third-stage Larvae of Mexican *Gnathostoma*. Jpn. J. Parasitol. 43: 18-22.
- Almeyda-Artigas, R.J. 1991. Hallazgo de *Gnathostoma binucleatum* n. sp. (Nematoda: Spirurida) en felinos silvestres y el papel de peces dulceacuícolas y oligohalinos como vectores de la Gnatostomiasis humana en la cuenca baja del Río Papaloapan, Oaxaca-Veracruz, México. An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nac. Autón. Méx. 18: 137-155.
- Almeyda-Artigas, R.J., M.D. Bargas & S. Mas-Coma. 2000. ITS-2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human Gnatostomiasis in the Americas. J. Parasitol. 86: 537-544.
- Ash, L.R. 1962. Development of *Gnathostoma procyonis* Chandler, 1942, in the first and second intermediate host. J. Parasitol. 48: 298-305.
- Funata, M., P. Custis, Z. De la Cruz, E. De Juan & R. Green. 1993. Intraocular Gnatostomosis. Retina. 13: 240-244.
- Hillis, D.M., B.K. Mable, A. Larson, S.K. Davis & E.A. Zimmer. 1996. Sequencing and cloning, p. 321-378. In D.M. Hillis, C. Moritz & B.K. Mable (eds.). Molecular Systematics. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Lamothe-Argumedo, R. 1997. Hospederos definitivos, intermedarios y paraténicos de *Gnathostoma* en Veracruz y Oaxaca. Cuad. Mex. Zool. 3: 22-28.
- Lamothe-Argumedo, R., R. Medina-Vences, S. López-Jiménez & L. García-Prieto. 1989. Hallazgo de la forma infectiva de *Gnathostoma* sp. en peces de Temazcal, Oaxaca, México. An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. Méx. 60: 311-320.
- Lamothe-Argumedo, R., F. Alarcón-Oceguera & R. M. Sánchez-Manzano. 2001. Gnatostomiasis ocular. Un caso más registrado en México. Rev. Mex. Pat. Clin. 48: 219-222..
- León-Règagnon, V., L. García-Prieto, D. Osorio-Sarabia & A. Jiménez-Ruiz. 2000. Gnatostomosis in Fish from Tres Palos Lagoon. Emerg. Inf. Dis. 6: 4.
- León-Règagnon, V., D. Osorio-Sarabia, L. García-Prieto, H. Akahane, R. Lamothe-Argumedo, M. Koga, M. Messina-Robles & C. Alvarez-Guerrero. 2002. Study of the ethiological agent of Gnatostomosis in Nayarit, Mexico. Parasitol. Int. 51: 201-204.
- López-Jiménez, S. & L. García-Magaña. 2000. Estudio de larvas de *Gnathostoma* sp. en tres especies de peces de los pantanos de Centla, Tabasco, México. Univ. Cien. 16: 41-48.
- Margolis, L., E.W. Esch, J. C. Holmes, A.M. Kuris & G.A. Schad. 1982. The use of ecological terms in parasitology (report of an ad hoc committee of the American Society of Parasitologist). J. Parasitol. 68: 131-133.
- Miyazaki, I. 1991. An Illustrated Book of Helminthic Zoonoses. International Medical Foundation of Japan, Fukuoka, Japón. 494 p.
- Peláez, D. & R. Pérez-Reyes. 1970. Gnatostomiasis humana en América. Rev. Latinamer. Microbiol. 12: 83-91.
- Pérez-Ponce de León, G., L. García-Prieto, D. Osorio-Sarabia & V. León-Règagnon. 1996. Listados Faunísticos de México. VI. Helmintos Parásitos de Peces de Aguas Continentales de México. Instituto de Biología, UNAM, México, D.F. 100 p.
- Rojas-Molina, N., S. Pedraza-Sánchez, B. Torres-Bibiano, H. Meza-Martínez & A. Escobar-Gutiérrez. 1999. Gnatostomosis an Emerging Foodborne Zoonotic Disease in Acapulco, Mexico. Emerg. Infect. Dis. 5: 264-266.
- Wong-Ortíz, F., S. López-Jiménez & J.L. Ble-Castillo. 2001. Gnatostomiasis ocular. Registro del primer caso para el estado de Tabasco, México. Rev. Mex. Oftalmol. 75: 180-184.