

INFORME BREVE

Identificación morfológica y molecular de *Cysticercus fasciolaris* aislado de un roedor (*Rattus norvegicus*) de la provincia de Buenos Aires (Argentina)

Mara L. Martínez^{a,*}, Mariana G. Domínguez^a, Gabriel E. Morici^a, Regino Cavia^b, Daniela P. Montes de Oca^b, Rosario Lovera^b, Javier H. Schapiro^a y Jorge L. Caracostantogolo^a

^a Instituto de Patobiología, CICVyA, INTA Castelar, Castelar, Argentina

^b Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA - IEGEBA (CONICET-UBA), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Recibido el 9 de abril de 2013; aceptado el 18 de julio de 2013

PALABRAS CLAVE

Rattus norvegicus;
Hígado;
Cysticercus fasciolaris

Resumen

En un estudio exploratorio de roedores de la especie *Rattus norvegicus* de la provincia de Buenos Aires, se observó que ciertos metacestodos de tenias se encontraban enquistados en el hígado del hospedador. Nuestro objetivo fue identificar esta forma larval, basándonos en estudios morfológicos y moleculares. Para la caracterización molecular del parásito, se amplificó y secuenció el ADN ribosomal (28S) y mitocondrial (COI). Sobre la base de los datos tanto morfológicos como moleculares, y utilizando herramientas bioinformáticas, el metacestodo se identificó como *Cysticercus fasciolaris*. La forma adulta (*Taenia taeniaeformis*) comúnmente infecta hospedadores mamíferos félicos y cánidos. Esta es la primera vez que se caracteriza molecularmente este helminto, aislado de roedores de la provincia de Buenos Aires.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

KEYWORDS

Rattus norvegicus;
Liver;
Cysticercus fasciolaris

Morphological and molecular identification of *Cysticercus fasciolaris* isolated from rodent hosts (*Rattus norvegicus*) in Buenos Aires province (Argentina)

Abstract

In a rodent (*Rattus norvegicus*) survey in Buenos Aires province, metacestodes of tapeworms were found encysted in the liver of the host. The aim of this work was the morphological and molecular identification of this parasite. To achieve the molecular characterization of the parasite, ribosomal (28S) and mitochondrial (COI) DNA were

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mlmartinez@cnia.inta.gov.ar (M.L. Martínez).

amplified and sequenced. Based on both morphological and molecular data using bioinformatic tools, the metacestode was identified as *Cysticercus fasciolaris*. The adult form of this tapeworm (*Taenia taeniaeformis*) commonly infects felid and canid mammalian hosts. This is the first report on the molecular identification of *Cysticercus fasciolaris* in Buenos Aires province (Argentina).

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Entre los años 2008 y 2011, en un estudio exploratorio de roedores de la especie *Rattus norvegicus* realizado en los partidos de San Andrés de Giles, General Las Heras, Cañuelas, Exaltación de la Cruz y Marcos Paz (provincia de Buenos Aires), se observó que ciertos metacestodos de tenias se encontraban enquistados en los tejidos del hígado en el 39,5 % de los hospedadores recolectados (n= 279). En la presente investigación nuestro objetivo fue identificar esta forma larval, basándonos en estudios morfológicos y moleculares.

Las relaciones filogenéticas de los cestodos ténidos se han construido utilizando la morfología, la especificidad de hospedador y los rasgos biológicos. Sin embargo, sigue siendo difícil llegar a una conclusión fiable sobre la relación filogenética entre los miembros de la familia *Taeniidae*⁷. En cuanto a la caracterización molecular, diversos estudios demostraron la existencia de variaciones interespecíficas para caracteres moleculares que resultan útiles para la definición de especies de *Taenia*. Mediante el empleo de técnicas de biología molecular, se han caracterizado muchas especies y genotipos nuevos de tenias^{2,5}. El estudio del ADN ribosomal ha sido ampliamente utilizado para estudios taxonómicos. Los genes mitocondriales también se han utilizado para estudiar las relaciones filogenéticas, ya que tienen una tasa rápida de evolución⁶.

En el presente trabajo, el examen morfológico se realizó mediante la observación de la estructura de un ejemplar con una lupa Nikon, modelo SMZ800, a 4X. Para la caracterización molecular del parásito, se aisló y purificó el ADN genómico del quiste parasitario utilizando el DNAeasy Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se analizaron por PCR y posterior secuenciación dos secuencias de ADN: una región de la subunidad 1 citocromo c oxidasa del gen mitocondrial (COI) y una región de ADN ribosomal 28S (ADNr 28S). Para la amplificación por PCR de la COI, se utilizaron los siguientes cebadores: COI 1 (sentido): 5'-TTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3' y COI 2 (antisentido): 5'-AAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3'¹, y en la amplificación por PCR de la región de ADNr 28S, los cebadores fueron los siguientes: JB 10 (sentido): 5' GATACCCGCTGA-ACTTAAGCATAT3' y JB9 (antisentido): 5' GCTOCATTCACAA-CACCCCGACTC 3'². Para la detección de los productos de amplificación de ambas reacciones de PCR, se separaron 10 µl de amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %, los que fueron teñidos con bromuro de etidio. Luego, estos fueron purificados usando Wizard® SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, EE.UU.). La secuenciación (ambos sentidos) se llevó a cabo usando un equipo ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystem) en el laboratorio de secuenciación de INTA Castelar (Buenos Aires, Argentina). Las secuencias obtenidas se analizaron utili-

zando los programas bioinformáticos BLAST y ClustalW2. La secuencia de ADNr 28S se presentó al GenBank para obtener su número de entrada. Los árboles filogenéticos del metacestodo se construyeron utilizando la plataforma Phylogeny.fr (<http://www.phylogeny.fr/>).

El examen morfológico del helminto reveló características típicas de un metacestodo estrobilocerco (familia *Taeniidae*)⁸: el cuerpo medía 9 cm de longitud, poseía un gran escólex de 0,9 mm de largo y 1,1 mm de ancho, cuatro ventosas laterales prominentes, rostelo armado con doble hilera de 32 ganchos, la hilera exterior de ganchos más grandes (0,40 mm de longitud), la hilera interior de ganchos más pequeños (0,24 mm), y el estróbilo segmentado terminaba con una vejiga (figs. 1A y 1B).

La amplificación por PCR del ADNr 28S y COI mostró, para cada uno de ellos, una única banda de 276 pb y 399 pb, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos obtenidas a partir de los productos de PCR fueron comparadas con otras secuencias de cestodos disponibles en el GenBank. El resultado del BLAST para ambas secuencias (ADNr 28S y COI) mostró que el metacestodo estaría más cerca de las especies de *Taenia*, con máxima similitud con *Taenia taeniaeformis* (100 % y 99 % de identidad para las secuencias del ADNr 28S y COI, respectivamente). Los árboles filogenéticos se obtuvieron mediante la comparación de las secuencias analizadas con las de otras especies de cestodos, utilizando el método de máxima verosimilitud. Dichos árboles muestran una agrupación perfecta del metacestodo en estudio con *T. taeniaeformis* (figs. 2A y 2B). En el árbol construido para el ADNr 28S, la secuencia obtenida del metacestodo se coloca en el mismo grupo con los aislamientos de *T. taeniaeformis* de India (JN020350.1, JN020349.1) y Kenia (AM503314.1), con valores de *bootstrap* de 1 (fig. 2A).

El tamaño y el número de ganchos son características importantes para la identificación de especies de la familia *Taeniidae*. El metacestodo en estudio mostró claramente la presencia de dobles filas de ganchos y cuatro ventosas laterales, que son caracteres distintivos de *T. taeniaeformis*⁹ (fig. 1B).

Sobre la base de los datos tanto morfológicos como moleculares, y utilizando herramientas bioinformáticas, se pudo concluir que el helminto hallado en los quistes del hígado de *R. norvegicus* en el área de estudio es el metacestodo *Cysticercus fasciolaris*. La forma adulta, *T. taeniaeformis*, comúnmente infecta hospedadores mamíferos felinos y cánidos.

La importancia del presente trabajo radica en que es la primera vez que se caracteriza molecularmente este helminto, que infecta roedores que habitan en la provincia de Buenos Aires. El uso de la biología molecular para la carac-

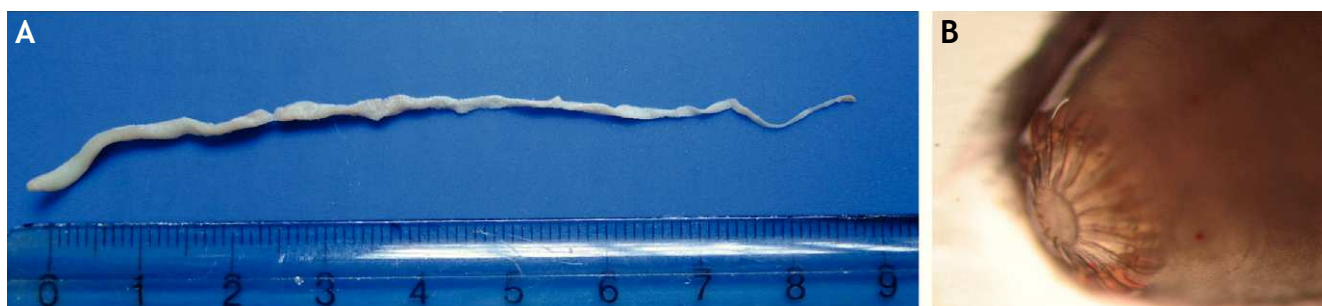


Figura 1 Morfología del metacestodo. A. Helminto extendido. B. Escólex del metacestodo con cuatro ventosas laterales prominentes y rostelo armado con doble hilera ganchos (4 X).

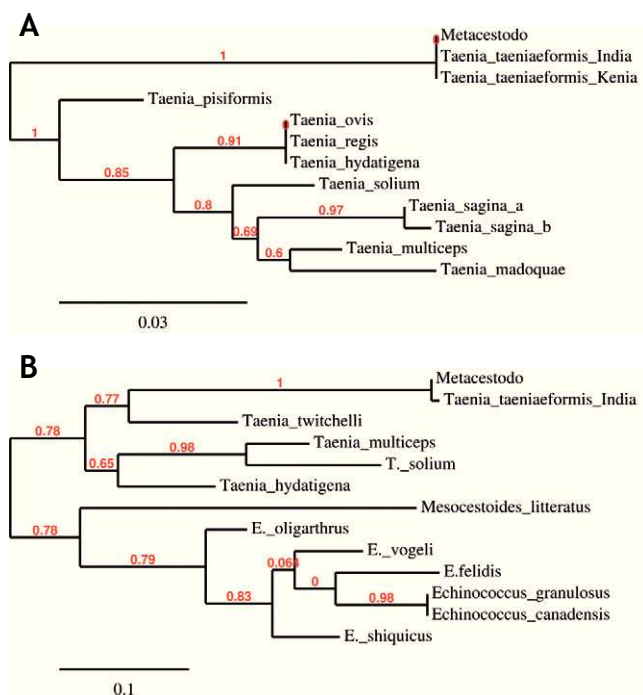


Figura 2 Árboles filogenéticos del metacestodo en estudio para (A) ADNr 28S (*Taenia pisiformis*: AM503311.1, *Taenia hydatigena*: AM503305.1, *Taenia saginata*: AF096224.2, *Taenia ovis*: AM503310.1, *Taenia regis*: AM503309.1, *Taenia taeniaeformis* INDIA: JN020350.1, *Taenia taeniaeformis* KENIA: AM503314.1, *Taenia taeniaeformis* INDIA: JN020349.1, *Taenia solium*: AM503313.1, *Taenia multiceps*: AM503312.1, *Taenia hydatigena*: AM503305.1, *Taenia madoquae*: AM503307.1, *Taenia saginata*: AM503308.1) y (B) COI (*Taenia taeniaeformis*: FJ939135.1, *Taenia twitchelli*: AB731759.1, *Echinococcus shiquicus*: JF906151.1, *Taenia multiceps*: HM143884.1, *Taenia hydatigena*: JQ710605.1, *Echinococcus granulosus*: HQ231399.1, *Mesocystoides litteratus*: JF268517.1, *Taenia solium*: JN084224.1, *Echinococcus felidis*: EF558356.1, *Echinococcus canadensis*: AF525457.1, *Echinococcus oligarthrus*: ECCMTSEQK, *Echinococcus vogeli*: ECCMTSEQJ.) Los números sobre las ramas indican el valor del bootstrap.

terización de cestodos ha permitido obtener conclusiones fiables sobre la relación filogenética entre los miembros de la familia *Taeniidae*, en muchos casos difícil de obtener mediante el estudio morfológico únicamente⁷. Estos resul-

tados son esperables, dado que existen informes previos de caracterizaciones morfológicas en la ciudad de Buenos Aires, donde se lo ha hallado con una frecuencia del 35 % en *R. norvegicus*³. Por otro lado, teniendo en cuenta el potencial zoonótico de *T. taeniaeformis*⁴, sería recomendable el control de los animales domésticos que puedan tomar contacto con los roedores que actúan como reservorio del parásito.

Nota

Los datos de la secuencia de nucleótidos informados para la región de ADNr 28S de este trabajo se depositaron en el GenBank con el número de acceso JX419380.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el laboratorio de Enfermedades Parasitarias del Instituto de Patobiología CICVyA. INTA Castelar y los subsidios UBACyT X609 y PICT-2007-01432.

Bibliografía

1. Bowles J, Blair D, McManus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol.* 1992;54:165-73.
2. Bowles J, McManus DP. Genetic characterization of the Asian taenia, a newly described taeniid cestode of humans. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;50:33-44.
3. Hancke D, Navone G, Suarez O. Endoparasite community of *Rattus norvegicus* captured in a shantytown of Buenos Aires City, Argentina. *Helminthologia.* 2011;48:167-73.
4. Kia EB, Shahryar-Rad E, Mohebbi M, Mahmoudi M, Mobedi I, Zahabiun, Z, Zarei F, Miahipoor A, Mowlavi GH, Akhavan AA, Vatandoost H. Endoparasites of rodents and their zoonotic importance in Germi, Dasht-e-Mogan, Ardabil Province, Iran. *J Parasitol.* 2010;5:15-20.
5. Kumar M, Reddy P, Aparna V, Srinivas G, Nagarajan P, Venkatesan R, Sreekumar C, Sesikaran B. *Strobilocercus fasciolaris* infection

- with hepatic sarcoma and gastroenteropathy in a Wistar colony. *Vet Parasitol.* 2006;141:362-7.
6. Malsawmtluangi C, Kumar Prasad P, Kumar Visual D, Tandon V. Morphological and molecular identification of the metacestode parasitizing the liver of rodent hosts in bamboo growing areas of mizoram, northeast India. *Bioinformation.* 2011;7:393-9 [Online]. Disponible en: <http://www.bioinformation.net> [consultado 7 Sep 2012].
7. Okamoto M, Bessho Y, Kamiya M, Kurosawa T, Horii T. Phylogenetic relationships within *Taenia taeniaeformis* variants and other taeniid cestodes inferred from the nucleotide sequence of the cytochrome c oxidase subunit I gene. *Parasitol Res.* 1995;81:451-8.
8. Soulsby E. *Familia Taeniidae*. En: Soulsby E. J. L., editor. *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 7.^a edición. México DF, Editorial Interamericana, 1987. p. 105-15.