

11281

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

5

2ej

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

**“ ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO Y CLINICO
SOBRE GNATHOSTOMOSIS EN
SINALOA, MEXICO “**

TESIS

Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biomédicas
presenta la

M. en C. SYLVIA PAZ DIAZ CAMACHO

México D.F.

Agosto de 1998

267735

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigaciones en Salud Pública "Louis Pasteur" de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa y en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

TUTORES

Dra. Kaethe Willms Manning
Dr. Alejandro Cravioto Quintana
Dr. Mauricio Hernández Avila

JURADO

PRESIDENTE: Dr. Alejandro Cravioto Quintana
SECRETARIO: Dr. Alejandro Escobar Gutierrez
PRIMER VOCAL: Dra. Kaethe Willms Manning
SEGUNDO VOCAL: Dr. Rafael Lamothe Argumedo
TERCER VOCAL: Dr. Juan Pedro Laclette San Román
SUPLENTE: Dra. Patricia Tato Saldivar
SUPLENTE: Dra. Ana Flisser Steinbruch

AGRADECIMIENTOS

Debo agradecer en primer término el permanente impulso y decidido apoyo que he recibido de la Dra. Kaethe Willms, no solo para la realización de esta tesis sino en el trayecto de mis logros académicos y profesionales.

Al destacado grupo de tutores y jurado, cuya orientación y revisión mejoraron sustancialmente la presentación de este trabajo.

Al Dr. Hiroshige Akahane, cuya visión científica, permitió que un eventual intercambio de experiencias académicas, propiciara esta línea de investigación.

A los Dres. Yukifumi Nawa, Katsumi Ogata e Ichiro Miyazaki, de quienes siempre he recibido una respuesta adecuada.

Al Dr. Rafael Lamothe Argumedo y al M. en C. David Osorio, por su alto espíritu de colaboración y su desprendido entusiasmo.

Especialmente a la M. en C. Ma. del Carmen de la Cruz, a la QFB Magda Luz Zazueta, a los Lic. en Informática Humberto Ledesma y Octavio Hernández, al Lic. en Matemáticas Ignacio Osuna y al IBQ Francisco Robles, por su pleno compromiso en la realización de este trabajo.

A la Dra. Silvia Antuna, a Marie Therese Merchant y al M. en C. Guadalupe Rendón por su invaluable apoyo en los estudios de microscopía electrónica

A mis compañeros de la Unidad de Investigaciones en Salud Pública de la Universidad Autónoma de Sinaloa, no solo por compartir sueños sino por su participación en convertirlos en realidades.

A mi familia, por renovar mis energías y hacer suyos mis propósitos con su comprensión y apoyo.

INDICE

	Pág.
Lista de abreviaturas.....	i
Resumen.....	1
I. INTRODUCCION.....	3
1. Generalidades	3
2. Historia y distribución geográfica	3
3. Ciclo biológico	7
4. Morfología	10
5. Manifestaciones clínicas y tratamiento	12
6. Relación hospedero-parásito	16
II. ANTECEDENTES	19
III. OBJETIVOS	25
IV. MATERIAL Y METODOS.....	27
1. Areas y poblaciones de estudio	27
A) Estudio de casos y controles.....	27
B) Estudio epidemiológico en poblaciones de alto (PAR) y bajo riesgo (PBR).....	27
C) Búsqueda de hospederos naturales.....	28
2. Criterios de exclusión	30
3. Muestreo	30
4. Encuestas	30
5. Recolección de muestras	30
6. Métodos inmunológicos para el diagnóstico de gnathostomosis.....	31
A) ELISA.....	31
B) Dot-ELISA.....	32
7. Cuantificación de IgE sérica total	34
8. Recuento de eosinófilos	34
9. Material histopatológico	35
10. Microscopía electrónica.....	35
11. Métodos coproparasitoscópicos (CPS)	36
12. Identificación de hospederos naturales y aislamiento de larvas L3A.....	36
13. Infecciones experimentales con larvas L3A	37
14. Métodos estadísticos	37

V. RESULTADOS.....	38
1. Estudio de casos y controles	38
A) Aspectos clínicos.....	38
B) Diagnóstico inmunológico.....	41
ELISA.....	41
Dot-ELISA.....	43
C) IgE sérica total y recuento de eosinófilos.....	45
D) Hispatología y morfología de larvas L3A obtenidas de humanos.....	46
E) Factores de riesgo en la transmisión de gnathostomosis.....	51
2. Estudio epidemiológico	52
A) Características de las familias o conglomerados.....	52
B) Prevalencia de antígenos contra <i>G. doloresi</i> en PAR y PBR...53	
C) Prevalencia de parasitosis intestinales.....	55
3. Hospederos naturales de <i>Gnathostoma</i>	59
A) Peces.....	59
B) Aves.....	60
4. Identificación de la especie de <i>Gnathostoma</i>	63
A) Morfología de larvas L3A.....	63
B) Morfología de parásitos adultos.....	66
 VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	 75
 VII. BILIOGRAFIA	 82

RESUMEN

En el estado de Sinaloa, a partir de 1989 aparecieron casos clínicos compatibles con el síndrome de *larva migrans* por *Gnathostoma*, cuyas manifestaciones clínicas pueden ser cutáneas, oculares, viscerales, neurológicas o bien una combinación de ellas.

Esta parasitosis es ocasionada por diversas especies del género *Gnathostoma*. Los parásitos adultos se alojan en el estómago o esófago de mamíferos domésticos o silvestres como tigres, tlacuaches, comadreas, perros, gatos y cerdos. La forma infectante para el hombre son las larvas de tercer estadio avanzado (L3A), que se ingieren principalmente a través de platillos como "cebiche", "callos" y "shushi", preparados con carne cruda o insuficientemente cocida de peces dulceacuícolas parasitados.

El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio integral, epidemiológico y clínico sobre gnathostomosis, en la zona centro del estado de Sinaloa, que permitiera diagnosticar la parasitosis en humanos, identificar hospederos naturales y la(s) especie(s) de *Gnathostoma* que los parasitan, además de definir factores de riesgo que intervienen en la transmisión de esta zoonosis.

En la ciudad de Culiacán, Sinaloa, se desarrolló un estudio de 447 casos con sospecha clínica de gnathostomosis cutánea y 231 controles (individuos aparentemente sanos). Se encontró que las manifestaciones clínicas de los casos presentaron similitud con las ocasionadas con *Gnathostoma spinigerum* y se caracterizaron por la presentación de edemas migratorios recurrentes; con menor frecuencia se observaron lesiones superficiales de las variedades serpiginosa y pseudofurunculosa. Un alto porcentaje de casos mostraron eosinofilia y niveles elevados de IgE sérica total. Mediante ELISA se detectaron anticuerpos IgG contra adultos de *G. doloresi* en el 94.4% de los casos clínicos, porcentaje significativamente mayor al 1% encontrado en los controles ($p < 0.05$). Estos datos confirman la utilidad de esta prueba para el diagnóstico de gnathostomosis.

I. INTRODUCCION

1. Generalidades

La gnathostomosis es una parasitosis ocasionada por diversas especies del género *Gnathostoma*. Los parásitos adultos se alojan en el estómago o esófago de animales mamíferos silvestres o domésticos y en el hombre, las larvas de tercer estadio avanzado (L3A), ocasionan un síndrome de *larva migrans* cuyas manifestaciones pueden ser cutáneas, oculares, viscerales y neurológicas o bien una combinación de ellas (1).

La clasificación taxonómica del parásito es la siguiente:

Phylum: *Nemathelminthes*

Clase: *Nematoda* (Rudolphi, 1808)

Orden: *Eunematoda* (Ward, 1916)

Superfamilia: *Spiruroidea* (Railliet y Henry, 1915)

Familia: *Gnathostomidae* (Railliet, 1895)

Subfamilia: *Gnathostominae* (Baylis y Lane, 1920)

Género: *Gnathostoma* (Owen, 1836)

2. Historia y distribución geográfica

La gnathostomosis es una zoonosis ampliamente distribuida en zonas tropicales del continente asiático, particularmente en Tailandia donde la enfermedad se ha conocido desde hace mucho tiempo con el nombre de "Tua-chid" (tumor doloroso). En India, China y Japón también le llamaban "edema del Changchiang", "reumatismo de

Shanghai", "enfermedad del Consulado de Nangching" y "edema de Quincke". Desde aquellas épocas el padecimiento se relacionó con el consumo de pescado crudo por personas que vivían cerca de algunos ríos como el Yangtzechiang (2).

El género *Gnathostoma* fue descrito por Owen en 1836, cuando encontró parásitos adultos en el estómago de un tigre (*Felis tigris*) que había muerto por ruptura de la arteria aorta, en el Parque Zoológico de Londres. La especie se designó con el nombre de *G. spinigerum* (3).

En 1960 Miyazaki (4) realizó una revisión del género que incluía 19 especies y concluyó que algunas de ellas eran sinónimos de otras ya descritas, validando únicamente a siete:

- G. spinigerum* (Owen, 1836)
- G. hispidum* (Fedchenko, 1872)
- G. turgidum* (Stossich, 1902)
- G. americanum* (Travassos, 1925)
- G. doloresi* (Tubanguí, 1925)
- G. nipponicum* (Yamaguti, 1941)
- G. procyonis* (Chandler, 1942)

Posteriormente Daensvang (3) adicionó dos más a esta revisión: *G. didelphis* (Chandler, 1932) y *G. brasiliense* (Ruiz, 1952) y en fechas mas recientes se registraron a *G. miyazakii* (Anderson, 1964), *G. vietnamicum* (Le-Van-Hoa, 1965) y *G. malaysiae* (Miyazaki y Dunn, 1965) (5, 6, 7). En México, en 1991 Almeyda (8) informó sobre una nueva especie llamada *G. binucleatum*, sin embargo aún existen desacuerdos con los criterios taxonómicos empleados para su clasificación (9).

De las especies anteriormente señaladas únicamente cuatro se han asociado con parasitosis humanas: *G. spinigerum*, *G. hispidum*, *G. nipponicum* y *G. doloresi*.

Gnathostoma spinigerum, es la especie más importante desde el punto de vista médico ya que es el agente causal en la mayoría de los casos humanos registrados en la literatura (2,10).

El primer caso de gnathostomosis humana, fue descrito por Levinsen en 1889, quien identificó un parásito obtenido por el Dr. Deuntzer a partir de una lesión inflamatoria localizada en el pecho de una mujer Tailandesa (3). Los parásitos adultos de *G. spinigerum*, habitan en la pared gástrica de mamíferos silvestres o domésticos como tigres, gatos, perros, y se han encontrado en países como Inglaterra, India, Filipinas, Viet-Nam, China, Australia, Estados Unidos, Malasia, Tailandia, Rusia, Israel, Japón, Zimbawe, México, Birmania y Bangladesh (11, 12, 13). Las formas larvarias se han detectado en una gran variedad de peces dulceacuícolas, aves, reptiles y anfibios (14, 15).

Gnathostoma hispidum, fue descrito por Fedchenko en 1872 cuando encontró un parásito adulto en el estómago de un cerdo silvestre (*Sus scrofa ferus*) de Turquía y en un cerdo doméstico (*Sus suscrofa domesticus*) de Hungría. Este parásito también se ha encontrado en Australia, Viet-Nam, Japón, China, Taiwan, Filipinas, Malasia y Camboya (16, 17). En China se han identificado como hospederos intermediarios a 14 especies de peces además de seis especies de anfibios, aves y roedores que actúan como hospederos paraténicos (18) y en Japón, las formas larvarias se han recuperado de peces dulceacuícolas como *Misgurnus anguillicaudatus* importados de China (19). Hasta 1980, sólo dos casos humanos causados por *G. hispidum* habían sido registrados en la literatura, aunque Miyazaki opinó que ambos casos fueron ocasionados por *G. spinigerum* (2). Sin embargo, Morita *et al.* (20) en 1984 informaron de ocho casos donde con certeza fue identificada esta especie.

Gnathostoma doloresi, fue descrito por Tubangui en 1925 cuando encontró un parásito adulto hembra, en la cavidad gástrica de un cerdo (*Sus scrofa domesticus*) en Filipinas.

En 1930 Malpestone describió la morfología de un parásito macho, recuperado también del estómago de un cerdo procedente de India (4).

En Japón, Miyazaki (21) en 1960, realizó los primeros hallazgos de esta especie al examinar parásitos conservados desde 1950, obtenidos de dos cerdos sacrificados en Tokio, y que anteriormente habían sido clasificados como *G. hispidum*. El mismo autor, en 1951 y 1953, encontró un gran número de parásitos de esta especie, en jabalíes (*Sus scrofa leucomystax*) capturados en el Distrito de Kyushu (2). En fechas recientes, esta misma especie se ha encontrado en la Prefectura de Miyazaki donde prácticamente cada año, se presentan casos de gnathostomosis humana (22).

Los adultos de *G. doloresi* también se han encontrado en cavidades gástricas de cerdos y jabalíes en Singapur, Taiwan y Okinawa (23, 24). Los hospederos intermediarios o paraténicos son peces de agua dulce (*Lepomis macrochirus*), serpientes (*Agkistrodon halys*, *Rhabdophis tigrinus*) y otros reptiles y anfibios (25, 26, 27).

En Japón, Nawa *et al.* (28) y Ogata *et al.* (29), en 1989 y 1988 dieron a conocer los primeros casos de gnathostomosis humana causada por esta especie y para 1994 Miyamoto *et al.* (30) informaron sobre más de 20 casos acumulados, incluyendo un caso de gnathostomosis pulmonar.

Gnathostoma nipponicum, se encuentra ampliamente distribuido en Japón. Los parásitos adultos se alojan en el esófago de comadrejas (*Mustela sibirica itatsi* y *M. s. coreana*). Desde 1941, Yamaguti realizó una descripción morfológica de las formas adultas pero hasta hoy a pesar de los esfuerzos de algunos investigadores, aún no se conoce completamente su ciclo vital. Las formas larvarias se han identificado en hospederos naturales como serpientes (*Rhabdophis tigrinus*) (31) y peces de agua dulce (*M. anguillicaudatus*) (32). En 1992, Ando *et al.* (33) propusieron un posible ciclo de vida de esta especie, basándose en estudios de campo e infecciones experimentales. El mismo autor (34, 35), en 1988 y 1991 describió los primeros casos humanos en los cuales se identificó *G. nipponicum*.

3. Ciclo biológico

El ciclo biológico de los nematodos del género *Gnathostoma* es complejo e involucra diferentes hospederos definitivos (mamíferos silvestres o domésticos), intermediarios (diversas especies de crustáceos y peces de agua dulce) y paraténicos (aves ictiófagas, anfibios y reptiles). El ciclo más conocido es el de *G. spinigerum* y fue descrito por Prommas y Daensvang (36, 37) entre 1933 y 1937.

Los parásitos adultos se alojan en el estómago o esófago de félidos, cánidos, marsupiales, prociónidos y suídos, entre otros, **Fig. 1**.

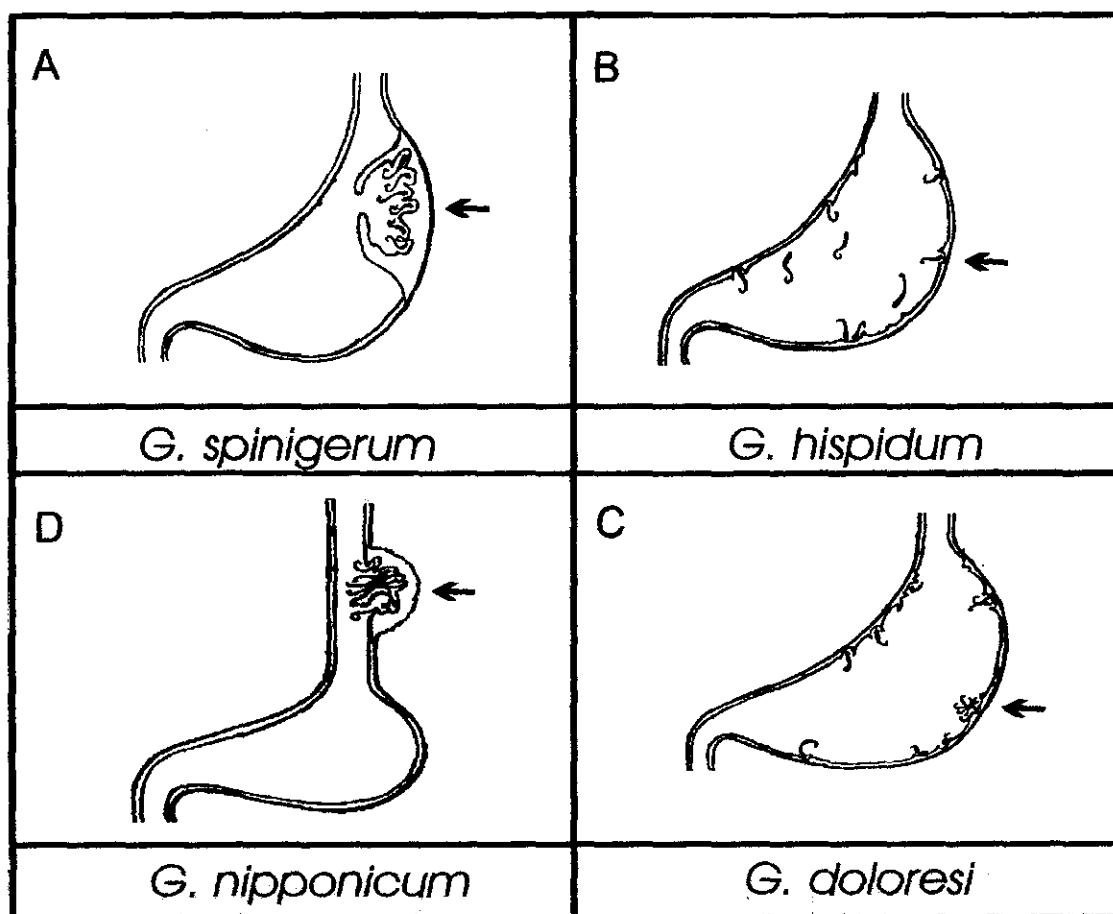


Fig.1 Hábitat de los adultos (←) de: A) *Gnathostoma spinigerum*, B) *Gnathostoma hispidum*, C) *Gnathostoma doloresi* y D) *Gnathostoma nipponicum* en sus hospederos naturales.

Los adultos de *G. spinigerum*, habitan en cavidades formadas por células hiperplásicas infiltradas por un exudado inflamatorio de la mucosa gástrica de perros, tigres, gatos, mapaches y tlacuaches entre otros. En estas cavidades ocupadas por varios organismos de ambos sexos, las hembras después de la cópula, expulsan huevos fertilizados hacia la luz del estómago de donde salen al exterior junto con las heces del hospedero.

Cuando los huevos fertilizados son depositados en cuerpos de agua dulce como ríos, lagos, presas, diques, etc. y se encuentran a temperatura entre 24°C y 28°C, inician su desarrollo diferenciándose una forma joven llamada larva de primer estadio (L1). Dentro del mismo huevo la L1 sufre una muda, transformándose en L2.

La L2 es una larva rhabditoide que abandona las cubiertas del huevo a través de un opérculo, nadando activamente en el medio. En este proceso, que dura aproximadamente 7 días, la larva es ingerida por pequeños crustáceos de los géneros *Cyclops*, *Eucyclops*, *Mesocyclops*, *Tropocyclops* y *Acantocyclops*. En el hemocele de estos copépodos, en un periodo de 7 a 10 días la L2 se desarrolla hasta L3 temprana (L3T).

Los copépodos infectados que forman parte del zooplancton, sirven de alimento a diversas especies de peces dulceacuícolas y estos participan como segundos hospederos intermediarios. En el estómago de los peces, los copépodos son digeridos, liberándose la L3T y después de perforar la pared de este órgano, migra principalmente hacia tejido muscular esquelético donde se enquistas y transforma en L3 estadio avanzado (L3 A).

Los peces infectados con L3A pueden ser depredados por otros vertebrados ectotérmicos como ranas y culebras así como aves ictiófagas o mamíferos que no son hospederos naturales del parásito, comportándose como hospederos paraténicos (3, 4).

Es importante señalar que la L3A es la forma que parasita al hombre, el cual es

considerado como un hospedero accidental que adquiere la enfermedad cuando consume principalmente carne de pescado infectada, cruda o insuficientemente cocida en platillos como "cebiche", "sushi" y "sashimi", entre otros.

El ciclo biológico se completa cuando los segundos hospederos intermediarios o paraténicos son ingeridos por los hospederos definitivos, donde la L3A se transforma en parásito adulto, aproximadamente en 100 días, Fig. 2.

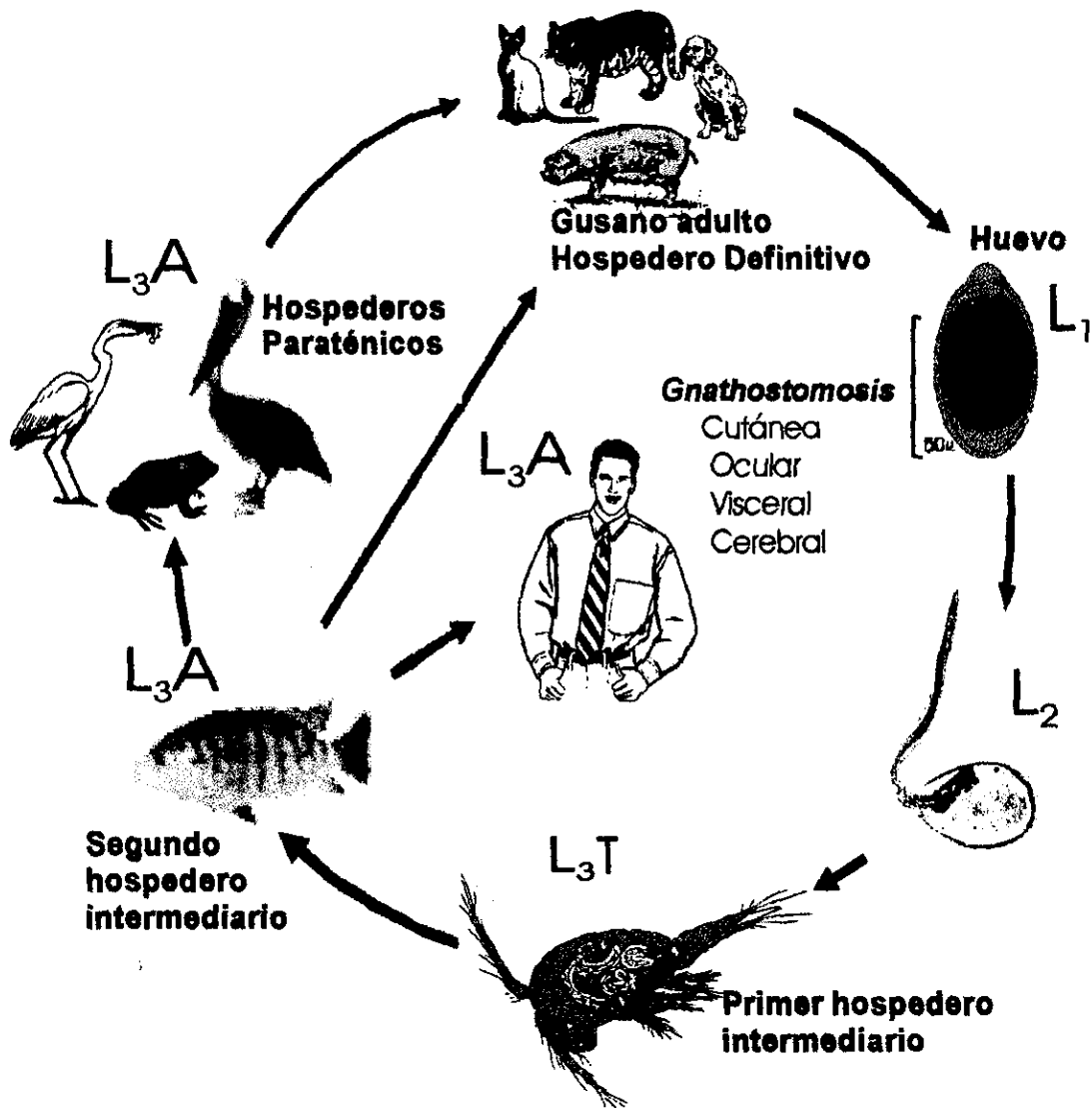


Fig. 2 Ciclo biológico de *Gnathostoma* spp

4. Morfología

El estudio morfológico de los parásitos adultos de *Gnathostoma*, constituye hasta hoy, una de las principales herramientas para identificar las diferentes especies.

Los adultos presentan un cuerpo cilíndrico cuya longitud varía de acuerdo a la edad y el sexo, entre 1.50 y 3.30 cm en la hembra y de 1.20 a 3.00 cm en el macho. Generalmente las hembras son más delgadas que los machos.

En el extremo anterior presentan un bulbo cefálico con hileras concéntricas de ganchos y en su parte central, tienen un par de grandes labios que rodean una boca de forma alargada. *Gnathostoma*, significa "gusano que tiene boca con mandíbulas", considerando que los labios se asemejan a estas estructuras.

Sobre la superficie del cuerpo existen espinas cuticulares que dependiendo de la especie varían su distribución, forma y tamaño, Fig. 3.

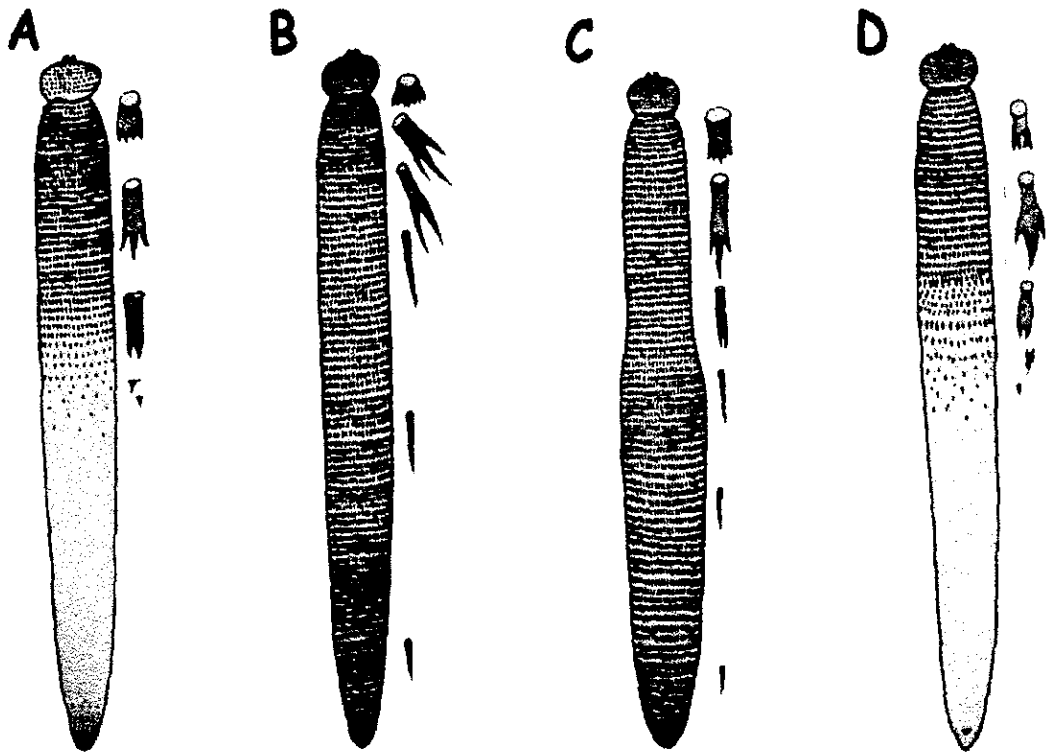


Fig. 3 Morfología externa de adultos de cuatro especies de *Gnathostoma* que muestran diferente tamaño, distribución y forma en las espinas del cuerpo: A) *G. spinigerum*, B) *G. hispidum*, C) *G. doloresi* y D) *G. nipponicum*. (Tomado de Miyazaki, 1960).

Hacia la región caudal se encuentran los órganos genitales, éstos presentan papilas de diferente forma y distribución. En el macho, esta porción se encuentra encorvada hacia la parte ventral y presenta dos espículas de diferente longitud que facilitan el proceso de copulación. El aparato reproductor de la hembra está formado por un útero doble que se comunica con una vagina uterina y una vagina verdadera en cuyo interior se observan huevos en diferentes etapas de maduración; éstos, son expulsados al exterior a través de la vulva localizada en la parte media del cuerpo.

Los huevos fertilizados que expulsa la hembra son ovalados, de color amarillo o café claro, miden aproximadamente $70 \times 40 \mu\text{m}$ y presentan una pared gruesa con una o dos cápsulas polares (2), Fig. 4.

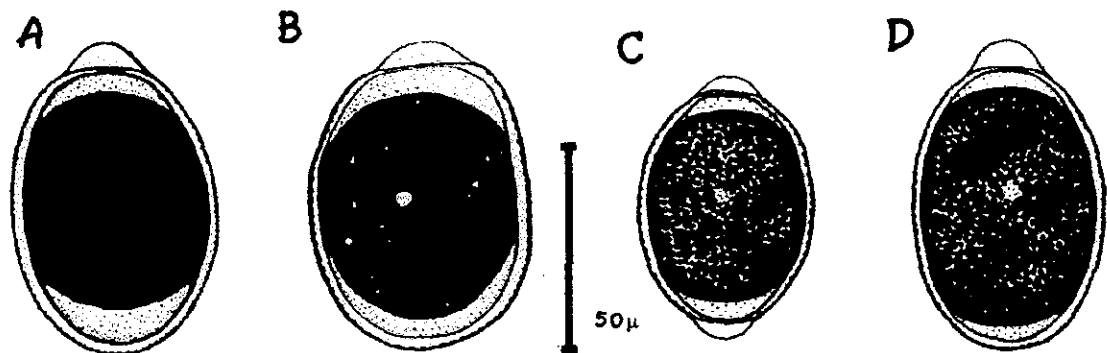


Fig. 4 Morfología de los huevos de cuatro especies de *Gnathostoma*: A) *G. spinigerum*, B) *G. hispidum*, C) *G. doloresi* y D) *G. nipponicum*.

Las L3A que parasitan a hospederos intermediarios, paraténicos y al hombre, son gusanos de cuerpo cilíndrico y extremos redondeados de 3.0 a 4.7 mm de longitud. En la porción anterior, se encuentra un bulbo cefálico donde sobresalen tres o cuatro hileras transversales de ganchos y en la parte frontal de esta misma estructura aparece una boca de forma oblonga rodeada por dos labios voluminosos que presentan un par de papilas cada uno.

Al igual que los parásitos adultos, en el interior del bulbo cefálico, se encuentran cuatro cámaras huecas llamadas ballonetitas que se comunican de manera independiente con cuatro sacos cervicales en forma de maza o clava que cuelgan libremente en el pseudoceloma y contienen un material líquido. Este sistema balloneta-saco cervical, constituye uno de los principales recursos del parásito para migrar en los tejidos y realizar los movimientos de expansión o retracción del bulbo.

El esófago que continúa de la boca, presenta una porción glandular que libera sustancias que participan en la digestión extracorporal y facilitan la migración del parásito a través de los tejidos. El esófago se comunica con el intestino, el cual termina en un poro anal, hacia la región ventral del cuerpo.

Akahane *et al.* (38) refieren que la morfología de las células del epitelio monoestratificado intestinal de las L3A de *Gnathostoma*, puede ser un parámetro de utilidad para la identificación de las especies. Estas células presentan diferentes patrones en el número de núcleos, los cuales pueden estar ausentes o bien contener hasta ocho.

La superficie de estas larvas también presenta espinas cuticulares que se hacen más pequeñas y escasas a medida que se alejan del bulbo cefálico. Entre las hileras 12 y 14 de las espinas cuticulares se localizan las papilas cervicales y más abajo, hacia las hileras 30-32, se encuentra un poro excretor (9).

5. Manifestaciones clínicas y tratamiento

Manifestaciones clínicas

Se conoce muy poco acerca de los mecanismos precisos que participan en la patogenicidad de las L3A de *Gnathostoma*, sin embargo existe acuerdo en que el daño

es ocasionado principalmente por una combinación de factores como: el efecto mecánico causado por la migración del parásito, la eliminación de sustancias tóxicas similares a acetil-colina, enzimas proteolíticas como la hialuronidasa, una sustancia hemolítica y la reacción inflamatoria del hospedero (4).

El hombre es un hospedero accidental de *Gnathostoma*. Cuando la L3A, es ingerida a través de carne insuficientemente cocida o cruda de hospederos intermediarios o paraténicos, se libera en el estómago, perfora la pared y migra hacia el hígado. En esa etapa los pacientes pueden presentar dolor epigástrico, náuseas y vómito. Posteriormente, la larva puede dirigirse prácticamente a cualquier parte del cuerpo y la sintomatología dependerá del área afectada. Este proceso ocasiona un síndrome de *larva migrans* y las manifestaciones pueden ser cutáneas, oculares, neurológicas, viscerales o una combinación de ellas.

Las manifestaciones cutáneas probablemente son las más frecuentes y se han clasificado en cuatro variedades: inflamatoria, serpiginosa, seudofurunculosa y mixta (39, 40). La variedad inflamatoria también llamada profunda, se caracteriza por la aparición de edemas migratorios e intermitentes, eritematosos, indurados, pruriginosos y con aumento de la temperatura local. Al desaparecer el edema, con frecuencia queda una zona hemorrágica o placa pigmentada que desaparece en aproximadamente dos a cinco semanas. En la variedad serpiginosa o superficial, se observan surcos poco sinuosos, eritematosos e indurados los cuales son mas anchos en el extremo por donde avanza la larva, ya que en esa área la reacción inflamatoria es más intensa. La forma seudofurunculosa se manifiesta como pápula roja e indurada que en ocasiones muestra un centro de color pardo, a través del cual la larva puede salir espontáneamente. Algunos pacientes pueden presentar mas de alguna de estas formas dermatológicas. Las lesiones son recurrentes con periodicidad de una semana a varios años.

Cuando la L3A migra hacia ojo, puede causar dolor, equimosis, uveítis anterior aguda, aumento de la presión intraocular y hemorragias en la retina y el vítreo; en ocasiones el daño puede conducir a la pérdida de la visión (41).

Las afecciones neurológicas del padecimiento han sido estudiadas principalmente en Tailandia (42); Boongird *et al.* (43), analizaron 24 casos neurológicos y encontraron como principales signos y síntomas: radiculomielitis, radiculomieloencefalitis, hemorragias subaracnoideas, cefalea intensa, deficiencias motoras y sensitivas de las extremidades, disfunción de los nervios craneales, pérdida de la conciencia, estado de coma y en seis pacientes sobrevino la muerte.

En los casos de gnathostomosis visceral, la L3A puede migrar hacia pulmones, estómago, intestinos, endometrio, vías urinarias, etc. (44, 45).

Cuando el parásito se encuentra en pulmones, el paciente puede presentar tos, dolor en el pecho, disnea, hemoptisis, neumotórax e hidroneumotórax (44, 46, 47). En algunos casos la larva ha sido expulsada durante la expectoración (48).

En el aparato digestivo, la enfermedad puede ser asintomática pero en ocasiones se puede formar un granuloma eosinofílico que ha sido confundido con apendicitis o carcinoma de colon (49, 50, 51). Los casos registrados de gnathostomosis en las vías genitourinarias son pocos y se han asociado con dolor, fiebre, hematuria, sangrado vaginal y cervicitis (52, 53, 54).

Tratamiento

No existe un tratamiento específico para la gnathostomosis, por ello, generalmente se recomienda tratar de recuperar al parásito a través de procesos quirúrgicos; sin embargo, resulta difícil principalmente por la naturaleza migratoria de la larva o bien por su

localización en órganos o tejidos diferentes de la piel.

Algunos medicamentos como: bitionol, tiabendazol, dietilcarbamacina, metronidazol, metrifonato, praziquantel, astiben y soluciones de yodo mostraron su ineficacia cuando fueron probados experimentalmente en animales infectados con L3A de *Gnathostoma* (55, 56, 57).

En estudios realizados en casos humanos, los tratamientos con tiabendazol, dietilcarbamacina, mebendazol, metronidazol, praziquantel, prednisona y quinina entre otros, también han mostrado poca capacidad de curación (2, 58, 59).

El albendazol fue probado inicialmente en ratas y gatos infectados, lográndose en algunos casos la muerte de la L3A (60). Con este antecedente, Kraivichian *et al.* (61), en 1992, investigaron la eficiencia de este medicamento en 112 pacientes con gnathostomosis cutánea sintomática. Emplearon dos esquemas terapéuticos: a) 400 mg de albendazol por día, durante 21 días y b) la misma dosis, pero administrada dos veces al día, durante el mismo tiempo. Se llevó a cabo el seguimiento de los pacientes durante seis meses después de administrado el tratamiento, y consideraron como curación la desaparición de los síntomas. De acuerdo a sus observaciones, la eficacia fue del 93.9% y 94.1% en los esquemas a y b respectivamente.

Recientemente, en 1997, Rizzitelli *et al.* (62) administraron albendazol dosificado a 400 mg por día, durante siete días, a 11 pacientes con sospecha clínica de gnathostomosis cutánea, y refieren que todos los pacientes se curaron al finalizar el tratamiento.

Cabe señalar, que de acuerdo con nuestra experiencia (datos no publicados) en estos estudios el tiempo de seguimiento de los pacientes debió ser más prolongado, ya que existen casos en los cuales la recurrencia puede ser mayor de un año y esto puede aparentar un proceso de curación.

El uso de albendazol administrado a pacientes de Sinaloa, México, en dosis de 10 mg/Kg de peso durante 20 días (sin exceder 1000 mg), ha mostrado que las larvas emergen hacia planos superficiales de la piel, durante los días 10 al 14 post-tratamiento, formándose una lesión pseudofurunculosa que indica el momento más oportuno para realizar una biopsia escisional y recuperar el parásito. De 20 biopsias realizadas utilizando este esquema de tratamiento, se recuperaron siete (35%) larvas viables, lo cual demuestra que al menos en 10 a 14 días, el albendazol no destruye el parásito en todos los casos. Nuestras observaciones sobre el efecto del albendazol en la migración de la larva hacia la superficie de la piel, concuerdan con los resultados obtenidos por Suntharasamai *et al.* (63).

Por otra parte, observamos casos en los que con la misma dosis de albendazol no se formó la lesión tipo "grano" o pseudofurunculosa y los pacientes aparentemente se curaron. Un porcentaje bajo de estos casos, continuaron con los síntomas de gnathostomosis cutánea y requirieron más de un esquema de tratamiento.

En nuestro país, algunos grupos de trabajo actualmente se encuentran evaluando el uso de la ivermectina (64), medicamento efectivo para el tratamiento de algunas nematodiasis tisulares como oncocercosis. Este medicamento ha sido probado experimentalmente en conejos infectados con L3A de *Gnathostoma* y aparentemente se han obtenido buenos resultados (65).

6. Relación hospedero-parásito

La información sobre los mecanismos de interacción entre *Gnathostoma* y sus hospederos, es muy escasa. Desde el punto de vista histológico Ollage-Torres y Ollage-Loaiza (40), describieron los cambios histológicos que acontecen cronológicamente en las lesiones de algunos casos de gnathostomosis cutánea.

En los dos primeros días, la reacción inflamatoria presenta un infiltrado perivascular superficial y profundo constituido principalmente por linfocitos e histiocitos y muy pocos eosinófilos. La epidermis presenta características normales. Del tercer al sexto día de evolución, en el infiltrado se observa una gran cantidad de eosinófilos localizados entre los adipocitos y los septos interlobulARES. También aparecen entre los eosinófilos algunos focos de células linfoides y zonas hemorrágicas.

Del séptimo al décimo día, el panículo adiposo se encuentra completamente infiltrado de eosinófilos y los linfocitos son muy escasos; los vasos sanguíneos se encuentran dilatados y se observan grandes zonas hemorrágicas. De acuerdo a los autores, esta imagen de paniculitis eosinofílica es característica y diagnóstica de *larva migrans* por *Gnathostoma* y propusieron el nombre de paniculitis nodular migratoria eosinofílica como sinónimo de gnathostomosis cutánea.

Otros autores no concuerdan con esta nomenclatura, ya que otras entidades nosológicas sobre todo de origen parasitario, comparten algunas de estas características histológicas (66, 67).

En relación con la respuesta inmune humoral al igual que *Toxocara canis*, nematodo que ocasiona un síndrome de *larva migrans* visceral, *Gnathostoma* induce la síntesis de anticuerpos específicos al menos de las clases IgG e IgE (68, 69, 70, 71, 72). En algunos casos en ambas parasitosis, también se ha señalado elevación de la IgE sérica total y eosinofilia (72, 73, 43), pero además en Toxocarosis se ha observado asociación de seropositividad con manifestaciones alérgicas como asma o bronquitis recurrente y dermatitis por contacto con animales (74).

Con base en estas observaciones, aparentemente las larvas L3A de *Gnathostoma* inducen principalmente una respuesta inmune tipo Th2 ya que esta subpoblación de linfocitos a través de la liberación de diferentes interleucinas como: IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10,

IL-13 y el factor estimulador de colonias granulocíticas y monocíticas (GM-CSF), activan linfocitos B, promueven la viabilidad de células plasmáticas, inducen la secreción de IgE y la generación y maduración de eosinófilos (75, 76, 77).

II. ANTECEDENTES

La gnathostomosis humana o *larva migrans* por *Gnathostoma* es una parasitosis que se adquiere principalmente por la ingestión de carne cruda o insuficientemente cocida de peces dulceacuícolas y aves ictiófagas que albergan a las L3A en tejido muscular esquelético. Con base en estudios de infecciones experimentales, se han propuesto otros mecanismos de transmisión como la penetración de la larva a través de la piel, consumo de agua con crustáceos infectados y transplacentario (3, 14, 15).

Es una parasitosis endémica en países asiáticos como Tailandia, Japón, China, India y Filipinas, entre otros (9). En Tailandia, es la enfermedad parasitaria más importante que afecta el sistema nervioso central y constituye una de las principales causas de hemorragias intracraneales que, en ocasiones conducen a la muerte (42, 43).

En la **tabla 1**, se resume la casuística mundial de gnathostomosis humana en el período de 1889 a 1997. Se registró un total 1,449 casos, de los cuales el mayor número, correspondió a gnathostomosis cutánea reportada en México, seguida de las formas visceral y neurológica detectadas principalmente en Tailandia y Japón.

Cabe destacar, que en la mayoría de los casos, el diagnóstico se basó únicamente en las manifestaciones clínicas que presentaron los pacientes. Sólo en algunos de ellos se identificó el agente causal, o bien, se emplearon métodos inmunológicos para su diagnóstico.

El diagnóstico definitivo de la gnathostomosis humana se confirma con la demostración parasitológica de L3A, pero presenta serias dificultades principalmente por la naturaleza migratoria del parásito. Esto ha hecho necesario el desarrollo de métodos

Tabla 1. Casos de gnathostomosis humana registrados en la literatura mundial desde 1889 hasta 1997.

GNATHOSTOMOSIS	CASOS	PERIODO	PAISES
CUTANEA	1,117	1889-1997	Tailandia, Japón, Filipinas, China , India, Viet-Nam, México, Ecuador e Italia.
OCULAR	24	1937-1994	Tailandia, India, China, Japón Camerún, Palestina, Burma, México, Malasia, Filipinas y Pakistan.
PULMONAR	23	1922-1994	Tailandia, Japón, Laos, Filipinas, Malasia, Israel y Bangladesh.
GASTROINTESTINAL	17	1939-1995	Tailandia, Japón, Laos y Kuwait.
GENITOURINARIA	10	1955-1992	Tailandia, Indonesia y Laos.
NARIZ, OIDO Y GARGANTA	6	1930-1988	Tailandia e India.
NEUROLOGICA	252	1961-1997	Tailandia y Japón.
TOTAL	1, 449		

inmunológicos para el diagnóstico, como pruebas cutáneas, doble inmunodifusión, hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e inmunoelectrotransferencia (Western blot), principalmente en países como Tailandia y Japón (72, 78-82, 83-91), **tabla 2**.

Los antígenos que se han usado con mayor frecuencia en estas pruebas han sido extractos crudos de L3A de *G. spinigerum* y de adultos de *G. doloresi* ya que existe menor dificultad para obtenerlos a partir de hospederos naturales. Esto es válido ya que, las cuatro especies que ocasionan gnathostomosis humana presentan un gran número de antígenos compartidos.

Tabla 2. Métodos usados para el diagnóstico inmunológico de gnathostomosis humana.

AÑO	PAIS	MÉTODOS	ANTIGENOS	AUTOR PRINCIPAL
1966	Japón	Pruebas cutáneas	Adultos <i>G. nipponicum</i>	(78) Tada I.
1985	Tailandia	ELISA	L3A <i>G. spinigerum</i>	(79) Suntharasamai P.
1986	Tailandia	ELISA	L3A <i>G. spinigerum</i>	(80) Dharmkrong A.
1987	Japón	Pruebas cutáneas, ELISA	Adultos <i>G. doloresi</i>	(81) Mimori T.
1987	Japón	ELISA, doble inmuno difusión	Adultos <i>G. doloresi</i> y <i>G. hispidum</i>	(82) Tada I.
1987	Tailandia	ELISA (IgE)	L3A <i>G. spinigerum</i>	(72) Soesaty M.
1988	Tailandia	Western blot (proteína "A" ¹²⁵)	L3A <i>G. spinigerum</i>	(83) Nopparatana Ch.
1988	Tailandia	ELISA, HI, CIE	L3A <i>G. spinigerum</i>	(84) Maleewong W.
1989	Japón	ELISA	L3A <i>G. spinigerum</i> y adultos <i>G. doloresi</i>	(85) Anataphruti MT.
1989	Tailandia	IFI	L3A <i>G. spinigerum</i>	(86) Morakote N.
1989	Tailandia	ELISA, (Ac y Ag en LCR) complejos inmunes (LCR)	L3A <i>G. spinigerum</i>	(87) Tuntipopipat S.
1989	Japón	Western blot	L3A <i>G. spinigerum</i>	(88) Akao N.
1991	Tailandia	IFI (LCR)	L3A <i>G. spinigerum</i>	(89) Morakote N.
1991	Tailandia	Western blot (anti-IgG humana- I ¹²⁵)	L3A <i>G. spinigerum</i>	(90) Tapchaisri P.
1994	Japón	ELISA, dot-ELISA, DID	Adultos <i>G. doloresi</i>	(91) Miyamoto N.

Las pruebas cutáneas (78, 81) originalmente consideradas sensibles y específicas fueron sustituidas mas tarde por métodos de precipitación (82) y en la actualidad por ELISA (84, 85, 87, 91).

ELISA se ha utilizado principalmente con extractos antigénicos crudos somáticos y de excreción-secreción, mostrando en algunos estudios, sensibilidad y especificidad superiores al 90% (70), lo que ha reforzado su aplicación en el diagnóstico de esta zoonosis.

Las pruebas de inmunofluorescencia indirecta e inmunohistoquímica enzimática se han empleado básicamente para detectar antígenos específicos del parásito usando sueros de pacientes o anticuerpos monoclonales (86, 92). Los antígenos de varias estructuras parasitarias como cordones laterales, músculo, cutícula, pseudoceloma y células intestinales comparten epítomos, siendo éstas últimas estructuras aparentemente las mas inmunogénicas. Adicionalmente, se han realizado algunos esfuerzos para identificar antígenos específicos mediante Western blot y se ha encontrado que algunos de ellos presentan pesos moleculares entre 24 y 29 kD (90, 93, 94).

En el Continente Americano en 1970, Peláez y Pérez-Reyes (95) dieron a conocer los primeros casos autóctonos de gnathostomosis humana en México y Ollage-Loaiza en Ecuador, en 1984 (96). Posteriormente Martínez-Cruz (39) informó sobre un número creciente de individuos con edemas migratorios que provenían de Temascal, Oaxaca , Tierra Blanca, Veracruz y otras poblaciones de la cuenca del río Papaloapan. A partir de 1990, también se han presentado casos de gnathostomosis cutánea y ocular en los estados de Guerrero, Nayarit, Tamaulipas y Sinaloa (64, 97, 98, 99).

En lo concerniente a la identificación de hospederos definitivos y especies de *Gnathostoma* en México, Caballero y Caballero (100) en 1958, encontró tres parásitos

adultos en un tlacuache (*Didelphis marsupialis*) capturado en Jaltenango, Chiapas. La especie de *Gnathostoma* fue clasificada como *spinigerum* pero cuando fue analizada por Peláez y Pérez Reyes no concordaron con esta asignación (95).

Posteriormente, Ortiz Villaseñor *et al.* (101) en 1990, identificaron por primera vez en México, a *G. procyonis* parasitando el estómago de tlacuaches (*Didelphis virginiana*) capturados en Tepoztlán y Cuernavaca en el estado de Morelos.

En el año siguiente, Almeyda (8), describió una nueva especie, *G. binucleatum*, encontrada en félidos silvestres (*Felis pardalis* y *Felis catus*) procedentes de la cuenca del río Papaloapan en Oaxaca-Veracruz. En la misma área se identificó a *G. turgidum* en un tlacuache de una especie no identificada (102).

Adicionalmente, en Tlacotalpan, Veracruz, en 1994 se informó sobre el hallazgo de *Gnathostoma procyonis* aislado de un mapache (*Procyon lotor*), (103).

En lo que respecta a los hospederos intermediarios de *Gnathostoma*, Lamothe *et al.* (104) mostraron que las larvas L3A, parasitan al menos cuatro especies de peces de agua dulce: *Petenia splendida* ("mojarra tenhuayaca"), *Cichlasoma urophthalmus* ("castarrica"), *Cichlasoma gadovii* ("mojarra criolla") y *Oreochromis spp* ("mojarra tilapia"). Este hallazgo se realizó en Temascal, Oaxaca, zona endémica de gnathostomosis humana en nuestro país.

En esa misma región, también se han encontrado fungiendo como hospederos paraténicos nueve especies de aves ictiófagas, cuatro de anfibios, y seis de reptiles (105).

Debido a la escasa información que existe en México acerca de este padecimiento y el creciente número de casos clínicamente compatibles con gnathostomosis cutánea y un caso ocular (**Fig. 5**) confirmado parasitoscópicamente, observados en el estado de

Sinaloa, se consideró importante realizar un estudio epidemiológico y clínico de esta parasitosis, que constituye un problema de salud pública y sanidad acuícola en la región.

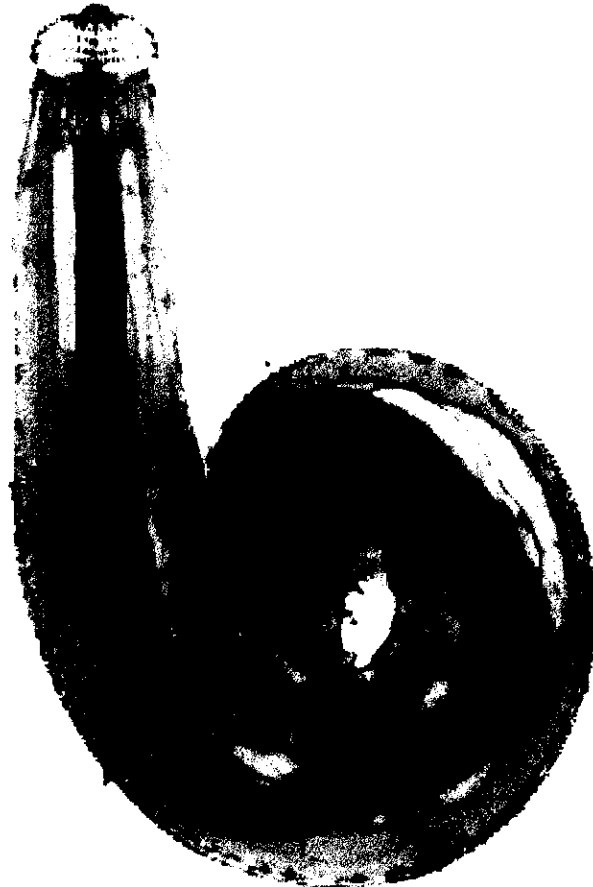


Fig.5. L3A de *Gnathostoma* recuperada de la cámara anterior del ojo de una paciente de 42 años de edad, con antecedentes de gnathostomosis cutánea. Fue remitida al Laboratorio por médicos del Instituto Mexicano del Seguro Social de Culiacán, Sinaloa (Cirujano: Eligio Díaz Simental, Patólogos: Héctor Herrera Gastelum y Javier Baquera Heredia).

III. OBJETIVOS

Objetivo principal

Realizar un estudio integral epidemiológico y clínico sobre gnathostomosis, aplicando un modelo metodológico que permita diagnosticar la parasitosis en humanos, identificar hospederos naturales y la(s) especie(s) de *Gnathostoma* que los parasitan.

La información recabada será de utilidad para proponer medidas de control de esta zoonosis en los campos de salud pública y sanidad acuícola y el modelo de estudio podrá ser aplicado en otros estados de la república, donde ya se han presentado casos de gnathostomosis humana.

Objetivos particulares

1. Definir las manifestaciones clínicas en al menos 300 casos de gnathostomosis cutánea que se presenten en la ciudad de Culiacán, Sinaloa.
2. Desarrollar y evaluar métodos inmunológicos como ELISA y dot-ELISA, para su aplicación en el diagnóstico de gnathostomosis humana.
3. Definir los factores de riesgo que intervienen en la dinámica de transmisión de esta zoonosis, mediante un estudio de casos y controles.
4. Determinar la prevalencia de *larva migrans* por *Gnathostoma* en una población de alto riesgo y otra de bajo riesgo, teniendo como indicador la frecuencia de consumo de pescado de agua dulce crudo.

5. Detectar hospederos naturales de *Gnathostoma*, en cuerpos de agua dulce cercanos a los sitios donde se estudiarán los casos humanos de esta parasitosis.

6. Identificar la (s) especie(s) de *Gnathostoma* aislada(s) de los hospederos naturales, empleando métodos morfológicos.

IV. MATERIAL Y METODOS

1. Areas y poblaciones de estudio

A) Estudio de casos y controles

El estudio de casos y controles se llevó a cabo para definir aspectos clínicos e histopatológicos de *gnathostomosis cutánea*, además de evaluar métodos para el diagnóstico inmunológico e investigar la relación de esta parasitosis con el aumento de IgE sérica total y eosinofilia. Adicionalmente a través de la aplicación de encuestas precodificadas en ambos grupos, se determinaron los probables factores de riesgo que se asocian con la parasitosis humana. Los casos se definieron como individuos de cualquier edad y sexo que presentaron sintomatología compatible con *gnathostomosis*, y que además, han vivido más de 10 años en la ciudad de Culiacán. Los controles fueron individuos con las mismas características pero aparentemente sanos.

Esta parte del trabajo se realizó en la ciudad de Culiacán, capital del estado de Sinaloa, la cual se ubica geográficamente en el centro del estado, hacia el noroeste del Distrito Federal. Al norte colinda con el municipio de Badiraguato, al oeste con el de Navolato y el Golfo de California, al sur con los municipios de Elota y Cosalá y al este con el estado de Durango. La población que consta de aproximadamente 750,000 habitantes, se ubica en los márgenes de los ríos Humaya y Tamazula los que al unirse forman el río Culiacán que desemboca en el Océano Pacífico.

B) Estudio epidemiológico en Poblaciones de Alto (PAR) y Bajo Riesgo (PBR)

Se realizó en dos comunidades rurales de Sinaloa, designadas como poblaciones de alto riesgo (PAR) y de bajo riesgo (PBR), considerando como indicador el consumo de

pescado de agua dulce crudo.

El poblado de alto riesgo (PAR), es una sindicatura del municipio de Culiacán, situada en la zona centro del estado a 45 Km hacia el noroeste de la ciudad de Culiacán y a 6.5 Km de la presa "Lic. Adolfo López Mateos", llamada también "Varejonal". Tiene aproximadamente 2,015 habitantes que se desempeñan principalmente en actividades de pesca dulceacuícola. El poblado cuenta con servicios de energía eléctrica y agua entubada sin potabilizar. Carece de servicios de drenaje y recolección de basura y los servicios para la salud incluyen un Centro de Salud y un médico de consulta privada.

El poblado de bajo riesgo (PBR), es una colonia ubicada hacia el noroeste de la sindicatura de Villa Juárez, municipio de Navolato, también localizado en la zona centro de Sinaloa; la colonia se encuentra a 40 Km hacia el sureste de la ciudad de Culiacán y tiene aproximadamente 1,300 habitantes cuya actividad económica principal es la de jornalero agrícola. En la localidad existen servicios de energía eléctrica y agua entubada sin potabilizar. La infraestructura para atención a la salud consta de un Centro de Salud, una clínica del Instituto Mexicano del Seguro Social y algunos médicos y laboratorios clínicos privados. No cuenta con servicios de drenaje, pavimentación, ni manejo de basura.

C) Búsqueda de hospederos naturales

La investigación de hospederos naturales de *Gnathostoma* se realizó en : 1) Presa "Lic. Adolfo López Mateos" ("Varejonal"), 2) Presa "Lic. José López Portillo" ("Comedero"), 3) Presa "Ing. Aurelio Benassini" ("El Salto"), 4) Dique "El Alhuate", 5) Río San Lorenzo, 6) Río Culiacán, 7) Laguna "Caimanero" y 8) Laguna "Chiricagüeto". En estos cuerpos de agua dulce, se lleva a cabo la explotación de peces dulceacuícolas que abastecen los mercados locales y regionales. En la **figura 6**, se muestran las áreas y poblaciones de estudio.

2. Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión para el estudio fueron los siguientes: individuos que no procedían del estado de Sinaloa o bien que hubieran residido los últimos 10 años en lugares diferentes a los sitios de estudio y aquellos que no estuvieran de acuerdo en colaborar.

3. Muestreo

La selección de la población para el estudio epidemiológico en las zonas rurales PAR y PBR, se realizó mediante un muestreo aleatorio estratificado, seguido de un muestreo por conglomerados, considerando como conglomerados a las familias (106).

4. Encuestas

Se elaboraron y aplicaron dos tipos de encuestas precodificadas. Una de ellas se empleó en PAR y PBR para recabar datos del conglomerado o familia: identificación de los individuos, datos generales, características de la vivienda, hábitos alimenticios y antecedentes familiares del padecimiento en estudio. La otra encuesta, fue aplicada a los individuos de la ciudad de Culiacán incluidos en el estudio de casos y controles. La información obtenida comprendió: identificación individual y antecedentes clínico-epidemiológicos de gnathostomosis. Todos los datos se almacenaron en una base de datos creada para este fin, en Microsoft Visual Foxpro 5.0.

5. Recolección de muestras

Las muestras de sangre se obtuvieron por venipunción y se separaron en dos fracciones; la sangre coagulada se centrifugó para separar el suero que fue almacenado en alícuotas

a -20°C hasta su uso, y la fracción con anticoagulante se utilizó para realizar el recuento de eosinófilos y glóbulos blancos.

Adicionalmente se colectaron tres muestras de heces de cada individuo estudiado y en el laboratorio fueron procesadas por los métodos de Faust, Ritchie y Kato-Miura (107, 108, 109).

6. Métodos inmunológicos para el diagnóstico de gnathostomosis

A) ELISA

Se desarrolló el método indirecto de ELISA, utilizando como antígeno un extracto crudo de adultos de *G. doloresi*. Los parásitos liofilizados (donación del Dr. Yukifumi Nawa, Colegio Médico de Miyazaki, Japón), fueron macerados y sonicados (Cole-Parmer, Instrument Co.) en solución salina amortiguada (SSA) 0.2 M, pH 7.6, que contenía 0.2% de p-metil sulfonil fluoruro (Sigma Chem. Co.), 0.1% de p-mercuribenzoato (Sigma Chem. Co.), 10 mM etilendiaminotetracético (Baker) y 0.2% de una mezcla de antibióticos-antimicóticos (penicilina G sódica, 10,000 µg/mL y sulfato de estreptomicina, 25 µg/mL y fungizona en solución salina al 0.85%) (Gibco).

El extracto crudo obtenido se centrifugó 20 minutos a 6,400g a temperatura ambiente. El sobrenadante se filtró (Millipore 0.25 µm) y las proteínas se cuantificaron por el método de Lowry (110). Después de determinar la concentración óptima de antígeno para el ensayo, cada pozo de la microplaca de fondo plano (Immulon II, Dinattech Lab) se incubó con 200 ng/100 µL durante 24 horas a 4°C.

Los pozos se bloquearon durante 30 minutos a temperatura ambiente con SSA que contenía albúmina sérica bovina (ASB) (Sigma Chem. Co.) y Tween 20 (Sigma Chem.

Co.) al 0.5% (SSA-ASB-Tween) y después se lavaron dos veces con una solución de Tween 20 (Sigma Chem. Co.) al 0.5% en SSA, (SSA-Tween).

Los sueros de 447 casos clínicos de gnathostomosis cutánea y 231 controles de la ciudad de Culiacán, así como los obtenidos de la población rural PAR (713) y PBR (222) se diluyeron 1:200 en SSA. Se añadieron 200µL a cada pozo y se incubaron durante 90 minutos a 37°C. Después de lavar tres veces las placas con SSA-Tween, se incubaron durante 90 minutos a 37°C con anti-IgG humana (cabra) conjugada a fosfatasa alcalina (Sigma Chem. Co.), diluída 1:1000 en SSA-ASB-Tween. Los pozos se lavaron de la manera descrita y se les agregó p-nitrofenilfosfato (Sigma Chem. Co.) a una concentración de 1.0 mg/mL, disuelto en una solución amortiguada de dietanolamina (Sigma Chem. Co.) 1.0 M, pH 9.8. La reacción se detuvo después de 30 minutos de incubación a 37°C, con hidróxido de sodio 3.0M (Baker).

Los valores de densidad óptica (DO) se leyeron a 405nm (Titer-Teck Multiskan MCC, Flow Laboratories). El punto de corte se obtuvo arbitrariamente sumando la media de las DO (MDO) de las muestras utilizadas como control, más tres desviaciones estandar (3DS). Se consideraron positivas las muestras que presentaron DO igual o mayor al punto de corte.

B) Dot-ELISA

Se utilizó el método descrito por Itoh y Sato (111), con algunas modificaciones.

Se procesaron los sueros de 100 casos y 100 controles de la ciudad de Culiacán y el método se valoró en 20 pacientes, durante la enfermedad y después de la curación, demostrada ésta, por la recuperación de la larva mediante biopsia cutánea escisional.

En la primer línea de cuadros de una membrana cuadrículada de nitrocelulosa de 30 x 30 cm (Millipore HAWG 304FO; diámetro de poro 0.45 µm, cuadros de 3x3 mm), se

adsorbió 1.0 μ L de suero de un individuo aparentemente sano (suero humano normal) diluido 1:2,000 en solución amortiguada de caseína (SAC) (Sigma Chem. Co.), pH 7.6 para ser usado como control positivo interno de la prueba.

En los cuadros siguientes, se aplicó 1.0 μ L del extracto antigénico crudo de adultos de *Gnathostoma doloresi* diluido en SAC, para obtener una concentración de 1.0mg/mL. De igual manera, se fijó antígeno obtenido de larvas L3A aisladas de aves provenientes de Temascal Oaxaca (donación de M. en C. David Osorio Sarabia y Dr. Rafael Lamothe Argumedo, Instituto de Biología, UNAM), para comparar la reactividad de dos antígenos de *Gnathostoma*, adultos y larvas L3A.

Con objeto de analizar la especificidad de la prueba, también se adsorbieron a la membrana extractos crudos de antígenos parasitarios no relacionados: fluido vesicular de cisticercos de *Taenia solium*, adultos de *Fasciola hepatica*, *Ascaris lumbricoides* y *Taenia saginata*; todos los antígenos se obtuvieron de la manera ya descrita y se utilizaron a la misma concentración.

La membrana se secó al aire y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en (SAC). Después de secar nuevamente, se cortó en tiras individuales que contenían suero humano normal y los antígenos señalados. Las piezas fueron almacenadas protegidas de la humedad a 4°C, hasta su uso.

Las muestras de suero se diluyeron 1:200 en SAC y se incubaron con los antígenos adsorbidos a la membranas previamente hidratadas en SAC, agitando suavemente (Bellco) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con SAC, se agregó anti IgG humana (cabra) acoplada a peroxidasa (Dako) diluida 1:1000 en SAC. Nuevamente se incubaron con agitación lenta por 30 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con SAC.

Finalmente se adicionó el sustrato (5 μ L de peróxido de hidrógeno en una solución de cloronaftol al 0.2% en etanol al 80%) y la reacción se detuvo con agua destilada después

de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente. Se consideró positiva una prueba que presentara un color azul en el sitio donde fue fijado el antígeno; esta coloración siempre se comparó con la observada en el control positivo incluido en cada tira.

7. Cuantificación de IgE sérica total

La cuantificación de IgE, se llevó a cabo en 123 casos de gnathostomosis cutánea. Se empleó ELISA tipo sandwich, tomando en cuenta las indicaciones del proveedor (Medix Biotech Inc.).

Brevemente, a los pozos de fondo plano con anticuerpos monoclonales clase IgE previamente fijados, se les agregó 20 μ L de suero de los pacientes y dos gotas de solución amortiguada de Tris que contenía 0.02% de timerosal. Después de mezclar 10 segundos, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y se lavaron cinco veces con agua destilada. Posteriormente se adicionaron tres gotas de anti-IgE humana (cabra) marcada con peroxidasa, se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente y se lavaron de la manera ya señalada. Después, se les añadió 200 μ L de peróxido de hidrógeno en solución amortiguada de acetato y 3,3,5,5 tetrametilbencidina y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con una gota de HCl 2.0 N y las DO se leyeron a 450 nm (Titer-Tek Multiskan MCC, Flow Laboratories). Este mismo proceso se llevó a cabo, utilizando soluciones valoradas con diferente concentración de IgE para elaborar una gráfica en la cual se interpolaron los valores de las DO de los pacientes y se obtuvieron los niveles séricos de IgE.

8. Recuento de eosinófilos

Para obtener el porcentaje de eosinófilos, se preparó un frotis de sangre, que se fijó con metanol y después fue teñido con colorante de Wright. El recuento se realizó

identificando 100 células sanguíneas en un microscopio óptico. Adicionalmente se contaron los glóbulos blancos/ μL utilizando un hemocitómetro de Neubauer (112). El número de eosinófilos/ μL , se obtuvo con la fórmula:

$$\text{eosinófilos}/\mu\text{L} = (\text{glóbulos blancos}/100) (\% \text{ eosinófilos})$$

El recuento se llevó a cabo en 316 casos y el mismo número de controles.

9. Material histopatológico

Se realizaron 51 biopsias cutáneas de los casos estudiados en la ciudad de Culiacán y una más de un individuo procedente de PAR.

El material recuperado, se fijó en solución de formol al 10% y se incluyó en parafina. Se prepararon cortes de $5\mu\text{m}$, que fueron teñidos con eosina-azul de metileno antes de su observación al microscopio óptico. Veinte de estas biopsias no se sometieron al proceso de fijación con formol, únicamente se colocaron en solución salina para recuperar L3A viables que posteriormente fueron sometidas a estudios morfológicos.

10. Microscopía electrónica

Las formas parasitarias de *Gnathostoma* recuperadas de biopsias cutáneas, hospederos naturales e infecciones experimentales (pág. 37), se lavaron varias veces con RPMI 1640 (Gibco), se fijaron con solución de Karnovsky (113) durante 24 horas a 4°C y se lavaron con solución amortiguada de cacodilato de sodio 0.15 M, durante al menos 24 horas. Después se postfijaron con tetraóxido de osmio al 3%, durante 2 horas a 4°C . Los parásitos se deshidrataron y prepararon para microscopía electrónica de barrido mediante desecación a punto crítico y evaporación con oro.

Algunas larvas L3A, se prepararon para microscopía electrónica de transmisión; después de la postfijación se cortaron fragmentos que contenían los intestinos de las larvas y se deshidrataron incubándolos en soluciones de etanol al 70, 80, y 90%, durante 10 minutos, seguido por tres cambios de 20 minutos cada uno, en etanol absoluto. Finalmente se incluyeron en poly/Bed (Polyscience, Inc.) y se dejaron polimerizar durante 12 horas a 60°C en una atmósfera seca. Se realizaron cortes transversales semifinos del epitelio intestinal, manteniendo una separación de 30 µm entre ellos.

11. Métodos coproparasitológicos (CPS)

La detección de parasitosis intestinales se realizó con la finalidad de valorar posibles reacciones cruzadas que interfirieran en el diagnóstico inmunológico de gnathostomosis. Mediante los métodos de Faust (105), Ritchie (106) y Kato-Miura (107), se procesó un total de 3,667 muestras de heces, correspondientes a 1,201 individuos de Culiacán y de las poblaciones rurales PAR y PBR. Faust y Ritchie son técnicas cualitativas que concentran formas parasitarias por centrifugación-flotación y sedimentación, respectivamente. Kato-Miura es un método cuantitativo útil para el diagnóstico de helmintiasis.

12. Identificación de hospederos naturales y aislamiento de larvas L3A

En las presas, ríos, diques y lagunas señalados en la **figura 6**, se capturaron 2,723 peces dulceacuícolas y 192 aves ictiófagas para investigar la presencia de L3A de *Gnathostoma*.

Después de registrar los datos merísticos y el sexo de cada uno de los ejemplares recolectados, el tejido muscular se disecó, molió y comprimió entre dos placas de vidrio de 10 x 12 cm. Estas preparaciones se observaron cuidadosamente a través de una fuente de iluminación intensa (lámpara de 100 watts). Adicionalmente, la masa muscular

revisada por transluminación, se sometió a un proceso de digestión con jugo gástrico artificial (1.0 g de pepsina en 1.0 L de HCl al 0.7%). La mezcla se mantuvo a 37°C durante 4-5 horas y el sedimento después de lavarlo dos veces con agua corriente, fue analizado en pequeñas porciones a través del estereomicroscopio (114).

Las larvas recuperadas libres de tejido, se utilizaron para los estudios morfológicos o para realizar infecciones experimentales en gatos domésticos.

13. Infecciones experimentales con larvas L3A

Cinco gatos domésticos que se mantuvieron con una dieta comercial (gatina, purina), se infectaron por vía oral con al menos veinte larvas L3A aisladas de *Egretta alba* capturadas en el dique "El Alhuate", Fig. 6. Las heces de estos animales fueron analizadas mediante los métodos de Faust, Ritchie y Kato cada tercer día, para identificar huevos de *Gnathostoma* en caso de ocurrir la maduración de las L3A hacia la etapa adulta. Se sacrificaron en períodos post-infección de 17 días y 2, 3, 7, y 8 meses.

14. Métodos estadísticos

Los resultados obtenidos a través del trabajo de campo y de laboratorio fueron procesados mediante técnicas estadísticas descriptivas e inferenciales. Las prevalencias se mostraron en gráficas y tablas. Las pruebas de X^2 , así como los modelos logísticos y log-lineal fueron empleados para comparar proporciones.

Un valor $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los datos se procesaron utilizando los programas Statgraphics versión 6.0, EP16 y EPIDAT.

V. RESULTADOS

1. Estudio de casos y controles

A) Aspectos clínicos

En la ciudad de Culiacán, se registraron 447 casos (183 hombres y 264 mujeres) con sintomatología compatible con gnathostomosis. La mayoría de ellos, presentó edades entre los 30 y 45 años (65%), solo el 4% tuvo menos de 14 años.

Las lesiones migratorias intermitentes que se observaron en estos pacientes, fueron principalmente de la variedad inflamatoria o profunda (80%). Las placas edematosas generalmente poco dolorosas, presentaron eritema, induración, prurito, ardor y aumento de la temperatura local. Las dimensiones de estos edemas de forma circular o alargada, fueron muy variables, desde dos hasta 20 cm de diámetro. Las inflamaciones más severas, generalmente se localizaron en el abdomen y la parte superior de los brazos.

En ocasiones las lesiones mostraron zonas hemorrágicas que dejaban una huella pigmentada en la piel, que perduraba durante varios días, mostrando el recorrido del parásito. Algunos pacientes presentaron edemas intermitentes sin eritema. Estos usualmente se manifestaron en cara o extremidades superiores y con mayor frecuencia se acompañaron de dolor.

Las formas superficiales, serpiginosa y pseudofurunculosa, fueron menos frecuentes y cuando aparecieron casi siempre se registró el antecedente de haber presentado placas eritematosas, (lesiones mixtas).

Cabe hacer notar, que con mucha frecuencia se observó la aparición de lesiones pseudofurunculosas en los pacientes que recibieron tratamiento con albendazol, posterior al diagnóstico inmunológico.

En las **figuras 7 y 8** se muestran lesiones de las diferentes variedades de gnathostomosis cutánea y su distribución en los casos estudiados.

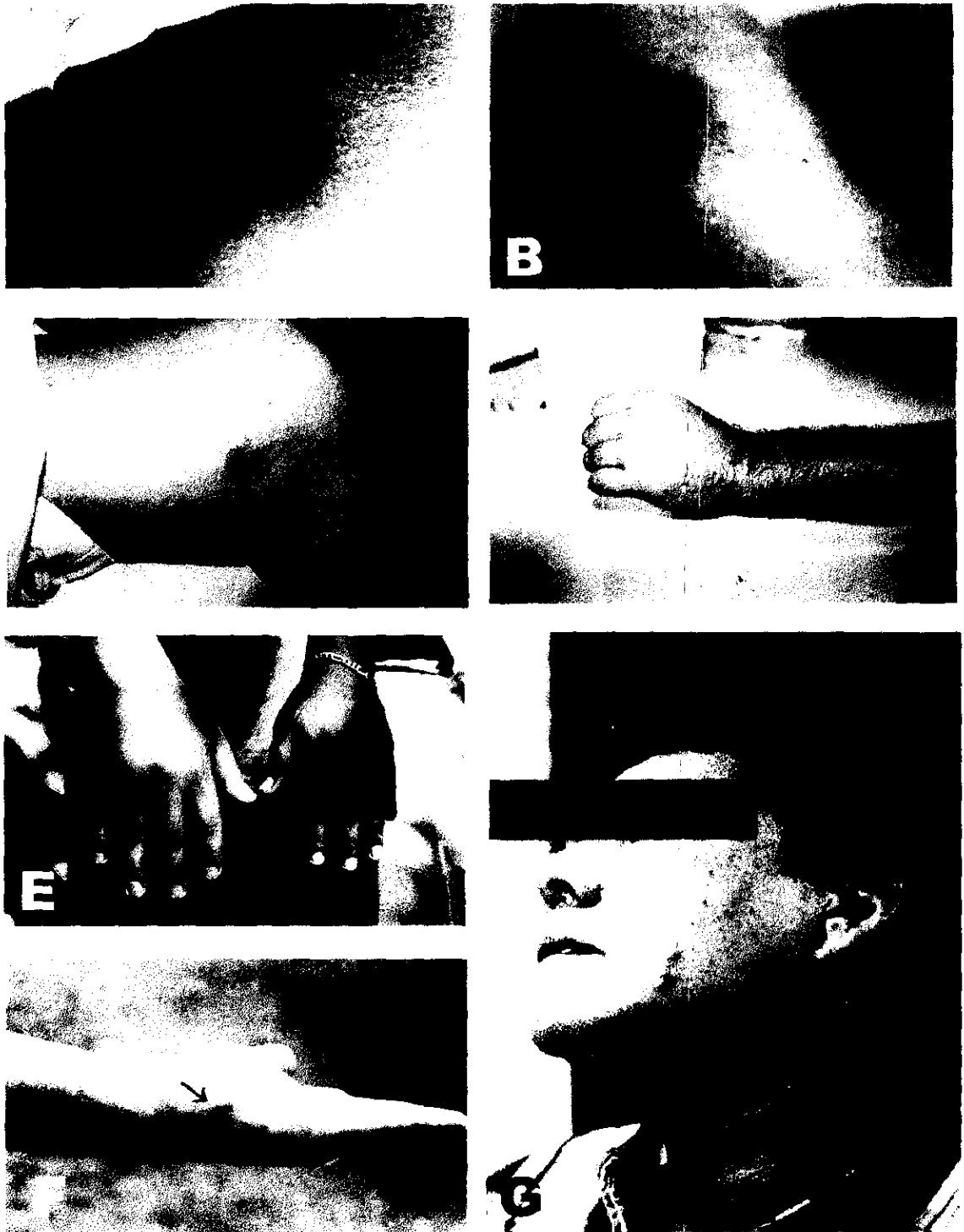


Fig. 7 A, B y C muestran lesiones de gnathostomosis cutánea variedad inflamatoria o profunda donde se observan las placas eritematosas; D y E presentan solamente un gran edema sin aparición de eritema; F y G muestran lesiones superficiales pseudofurunculosa(←) y serpiginosa, respectivamente.

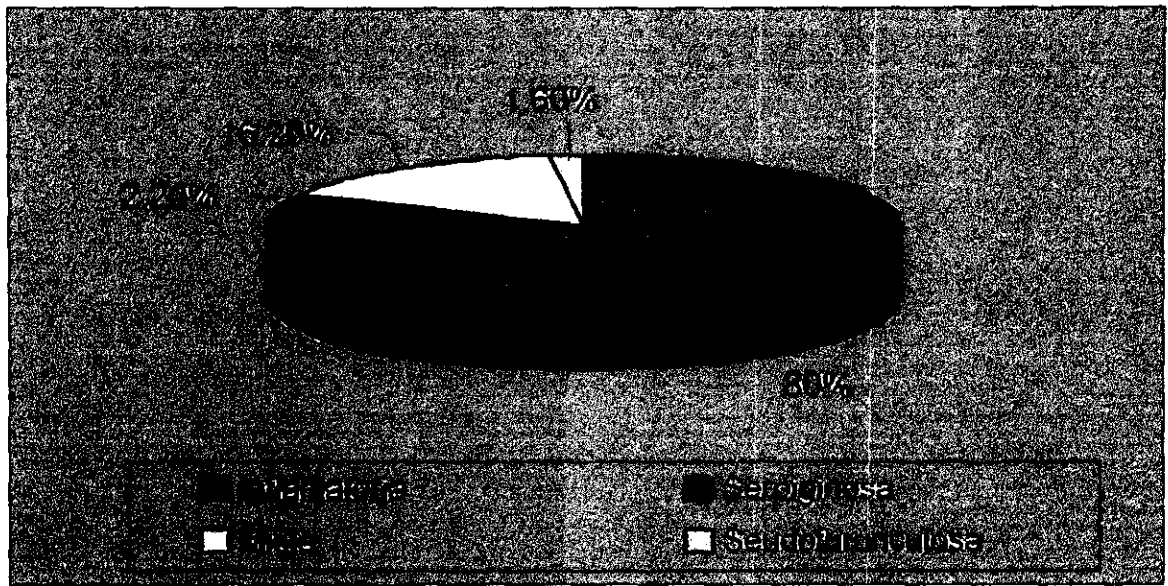


Fig. 8. Distribución de las variedades de gnathostomosis cutánea observada en 447 casos.

La topografía de las lesiones fue la siguiente: cabeza y cuello 20%; extremidades superiores 33%; tronco 27% y extremidades inferiores 20%, **Fig. 9.**

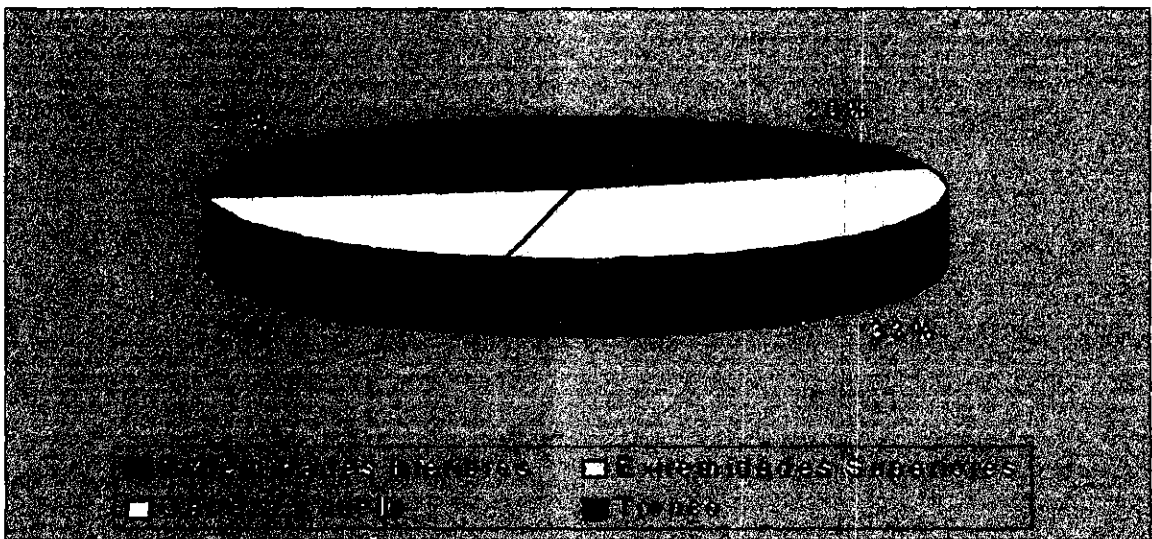


Fig. 9. Localización de las lesiones de gnathostomosis cutánea en 447 casos.

Los periodos de intermitencia, que reflejan el movimiento de la larva, oscilaron entre un día hasta dos años; es decir, la reacción inflamatoria cambiaba de lugar cada día o cada

tercer-cuarto día para finalmente desaparecer y reaparecer en algunos meses o después de un año. Esto en ocasiones hacía suponer a los pacientes y médicos que el problema se había resuelto. El tiempo de evolución del padecimiento en los casos estudiados, también fue muy variable, desde una semana hasta diez años.

B) Diagnóstico inmunológico

ELISA

Se procesaron 447 muestras de los casos descritos anteriormente, más 231 sueros de individuos aparentemente sanos considerados como controles.

El punto de corte obtenido de la media de las DO de los controles, más tres desviaciones estándar fue de 0.5 y se consideraron seropositivas aquellas muestras que presentaron DO iguales o mayores a éste valor. La sensibilidad y especificidad de la prueba (115), estimada bajo criterios clínicos, fue de 94% y 98.7%, respectivamente.

De las 447 muestras de pacientes con *larva migrans*, 422 casos (94.4%) mostraron seropositividad y 22 (5.6%) fueron negativos. Se observó que en algunos casos cuando se formaba la lesión pseudofurunculosa, es decir cuando la L3A se encontraba en planos superficiales de la piel, por evolución natural del padecimiento o post-tratamiento con albendazol, los títulos de anticuerpos fueron bajos. Dos casos seronegativos, poco tiempo después del diagnóstico inmunológico, presentaron la salida espontánea de la larva a través de una lesión pseudofurunculosa. Por otra parte, un individuo que había sido estudiado como control y quien presentó títulos elevados de anticuerpos anti-*Gnathostoma*, durante el periodo de estudio, presentó manifestaciones clínicas por primera vez. Después de recibir tratamiento médico, se recuperó una larva L3A de la lesión edematosa.

En la **figura 10** se muestran los resultados obtenidos por ELISA en los casos y controles.

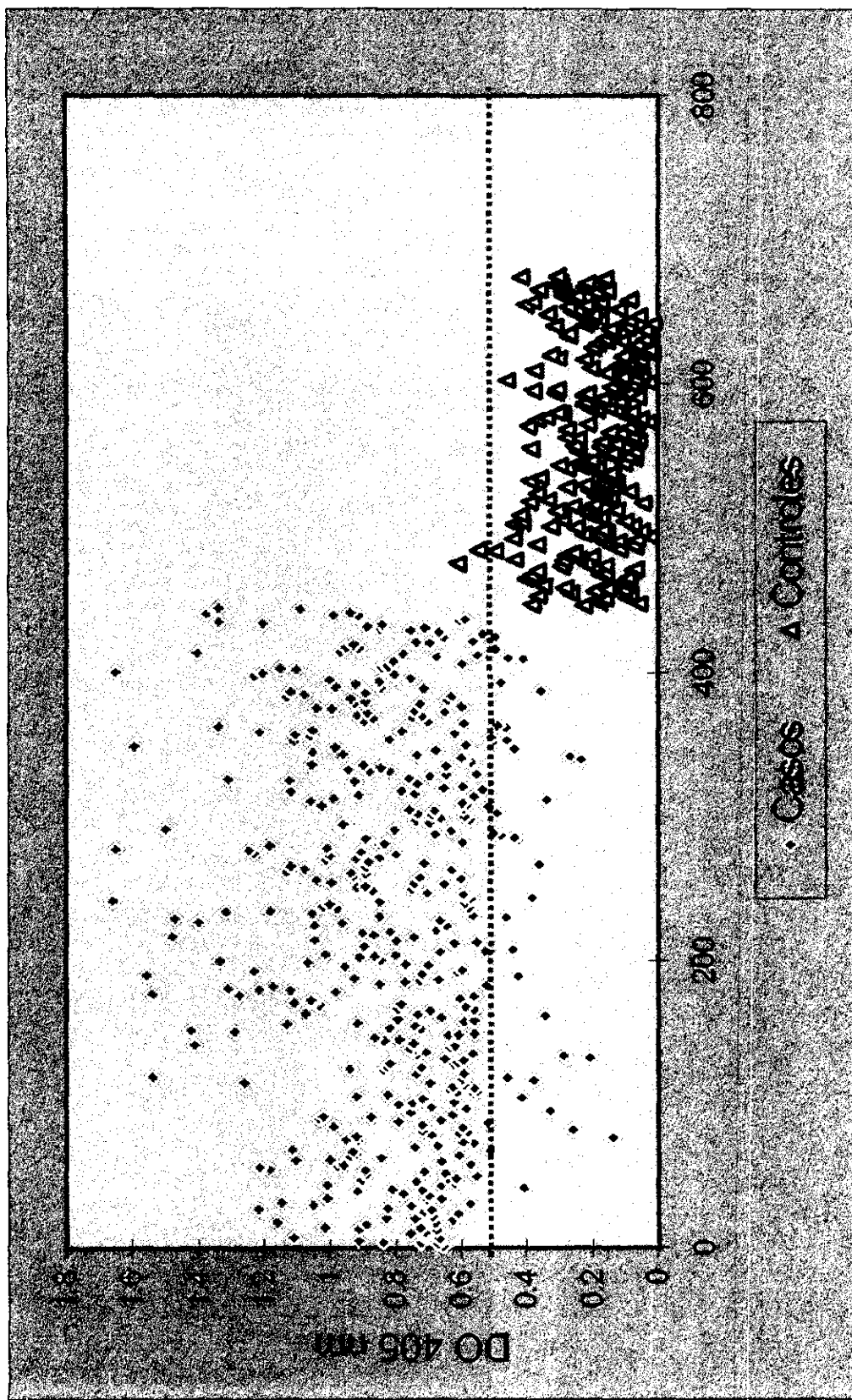


Fig. 10 Anticuerpos contra *Gnathostoma doloresi* por ELISA en 447 casos de gnathostomosis cutánea y 231 controles. (.....) Punto de corte DO = 0.5

Dot - ELISA

Mediante este método se procesaron 100 muestras séricas de casos de gnathostomosis cutánea estudiados en la ciudad de Culiacán que previamente habían resultado positivos por ELISA. Veinte de estos casos fueron confirmados parasitoscópicamente y 30 se valoraron con ambos métodos antes y después del tratamiento con albendazol (10 mg/kg peso, durante 21 días); también se analizaron 100 muestras de individuos aparentemente sanos, usadas como controles.

En el estudio comparativo de la respuesta de los casos de gnathostomosis ante extractos antigénicos de adultos de *G. doloresi* y larvas L3A de *Gnathostoma spp* aisladas de aves ictiófagas provenientes de Temascal, Oaxaca, se encontró una correlación del 98%. Sin embargo hubo diferencias en la intensidad de la coloración a la cual se consideró positiva la prueba; en el 18% de los casos ésta fué mas debil con *G. doloresi* y al contrario, en el 15% la reacción fué menos intensa con las larvas L3A de Temascal.

Adicionalmente la seropositividad obtenida por dot-ELISA con ambos antígenos , mostró también una correlación del 98% cuando se comparó con la demostrada por ELISA.

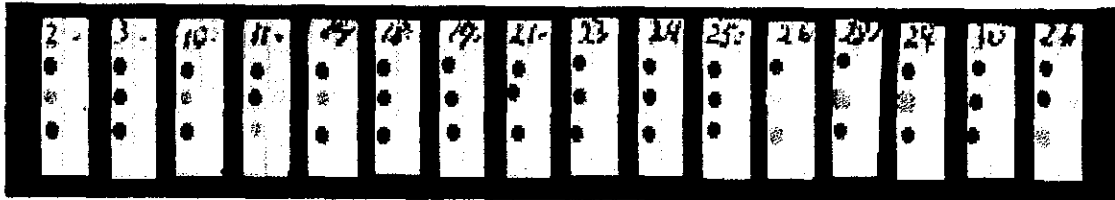
Las reacciones cruzadas con los antígenos no relacionados fueron débiles y no interfirieron en la interpretación de los resultados; el 5% de los casos mostró respuesta ante antígenos de *F. hepatica* y un 3% contra *A. lumbricoides* y *T. saginata*. En lo que respecta a los controles solo el 5% mostró seropositividad.

Los datos obtenidos con dot-ELISA se consideraron importantes, ya que es una prueba económica, rápida y no requiere personal especializado. En la **figura 11** se muestran los resultados obtenidos con algunas muestras de los casos y controles estudiados.

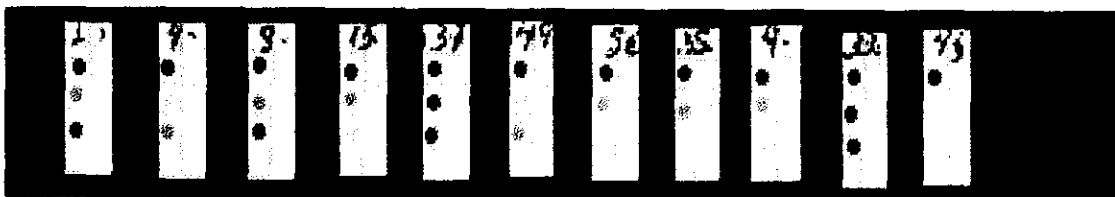
CLAVE PARA LECTURA

#	
Sc	
Gd	Fh
Gm	Al
Cs	Ts

#: Número de muestra
 Sc: Suero control
 Gd: Adultos de *G. doloresi*
 Fh: *F. hepatica*
 Gm: L3A *Gnathostoma sp* (México)
 Al: *A. lumbricoides*
 Cs: Cisticercos de *T. solium*
 Ts: *T. saginata*



CP: Casos con confirmación parasitológica, ELISA positivos

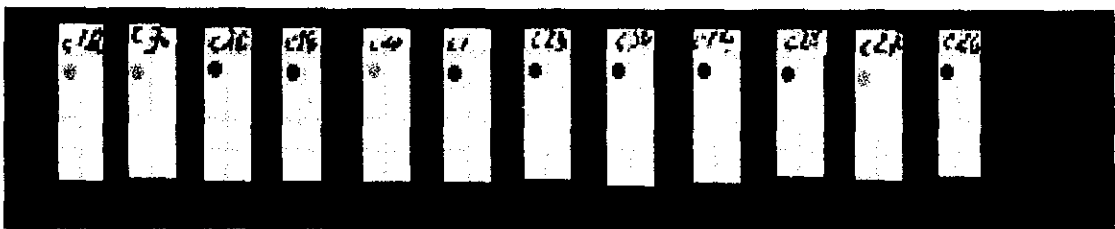


AT: Antes de Tratamiento

AT DT

DT: Después de Tratamiento

CE: Casos con diagnóstico clínico, ELISA positivos



C: Controles (Individuos aparentemente sanos)

Fig. 11 Dot-ELISA de casos de gnathostomosis cutánea confirmados parasitológicamente (CP) y con diagnóstico clínico, ELISA positivos (CE). Se muestra un caso antes (AT) y después (DT) de tratamiento con albendazol además de los controles(C).

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DIVISION OF THE PHYSICAL SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
5780 SOUTH CAMPUS DRIVE
CHICAGO, ILLINOIS 60637

RESEARCH ASSISTANT
JAMES H. HARRIS
5780 SOUTH CAMPUS DRIVE
CHICAGO, ILLINOIS 60637

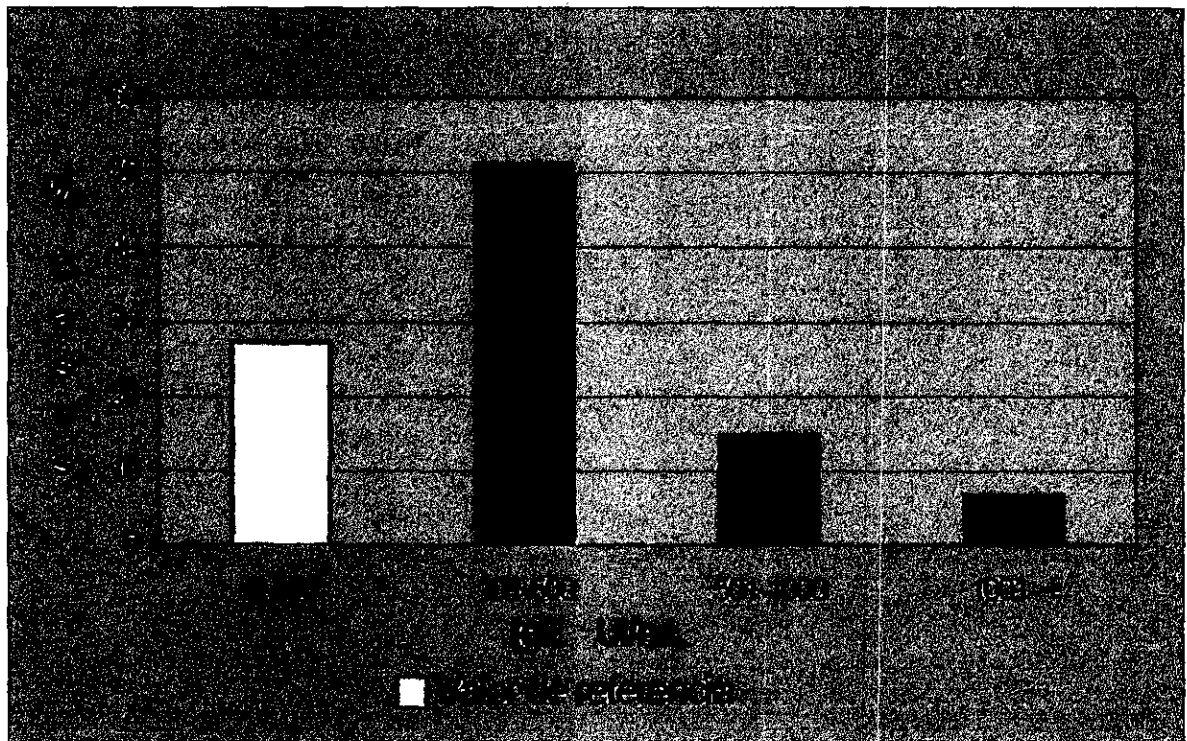
RESEARCH ASSISTANT
JAMES H. HARRIS
5780 SOUTH CAMPUS DRIVE
CHICAGO, ILLINOIS 60637

RESEARCH ASSISTANT
JAMES H. HARRIS
5780 SOUTH CAMPUS DRIVE
CHICAGO, ILLINOIS 60637

C) IgE sérica total y recuento de eosinófilos

Se determinó la concentración de IgE total por ELISA, en 123 casos de gnathostomosis cutánea. Presentaron valores superiores al valor de referencia (0-100 UI/mL) un total de 88 casos (71.5%), de los cuales 62 mostraron valores en el rango de 101-500 UI/mL y 26 entre 501 a más de 1,000 UI/mL, Fig. 12.

Fig. 12. IgE sérica determinado por ELISA en 123 casos de gnathostomosis cutánea.



El recuento absoluto de eosinófilos en sangre periférica, se practicó en 316 casos y en un número igual de controles. Los casos presentaron eosinófilos significativamente más elevados que el grupo control, (χ^2 por corrección de continuidad de Yates, $p=0.0000$). Considerando el valor de referencia de 0-400/ μ L, 50.3% de los casos presentó eosinofilia, Fig. 13.

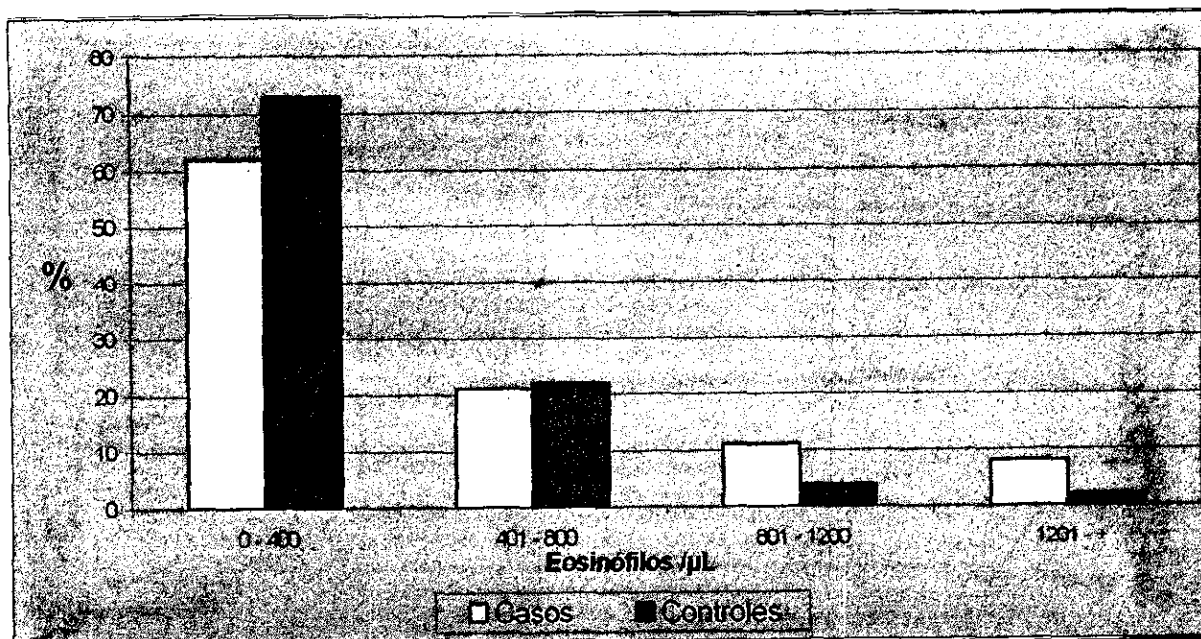


Fig. 13. Valores absolutos de eosinófilos en 316 casos y el mismo número de controles. Valor de referencia 0-400/ μ L.

D) Histopatología y morfología de larvas L3A obtenidas de humanos

A través del estudio, fue posible realizar 51 biopsias cutáneas y en 29 casos (56.7%) se identificó al parásito. Asimismo, en seis pacientes las larvas L3A de *Gnathostoma* salieron de manera espontánea a través de la piel, sin recurrir al proceso quirúrgico.

En la **figura 14** se muestra un corte transversal de una L3A de *Gnathostoma*, con un intenso infiltrado inflamatorio constituido por linfocitos, células plasmáticas y abundantes eosinófilos.

Diecisiete larvas se recuperaron de 20 biopsias, en las que el material no se sometió al proceso de fijación con formol, practicadas en lesiones seudofurunculosas que aparecieron después del tratamiento con albendazol; nueve L3A (45%) permanecían viables, y se utilizaron para comparar su morfología con parásitos aislados de aves ictiófagas, analizadas en este estudio.

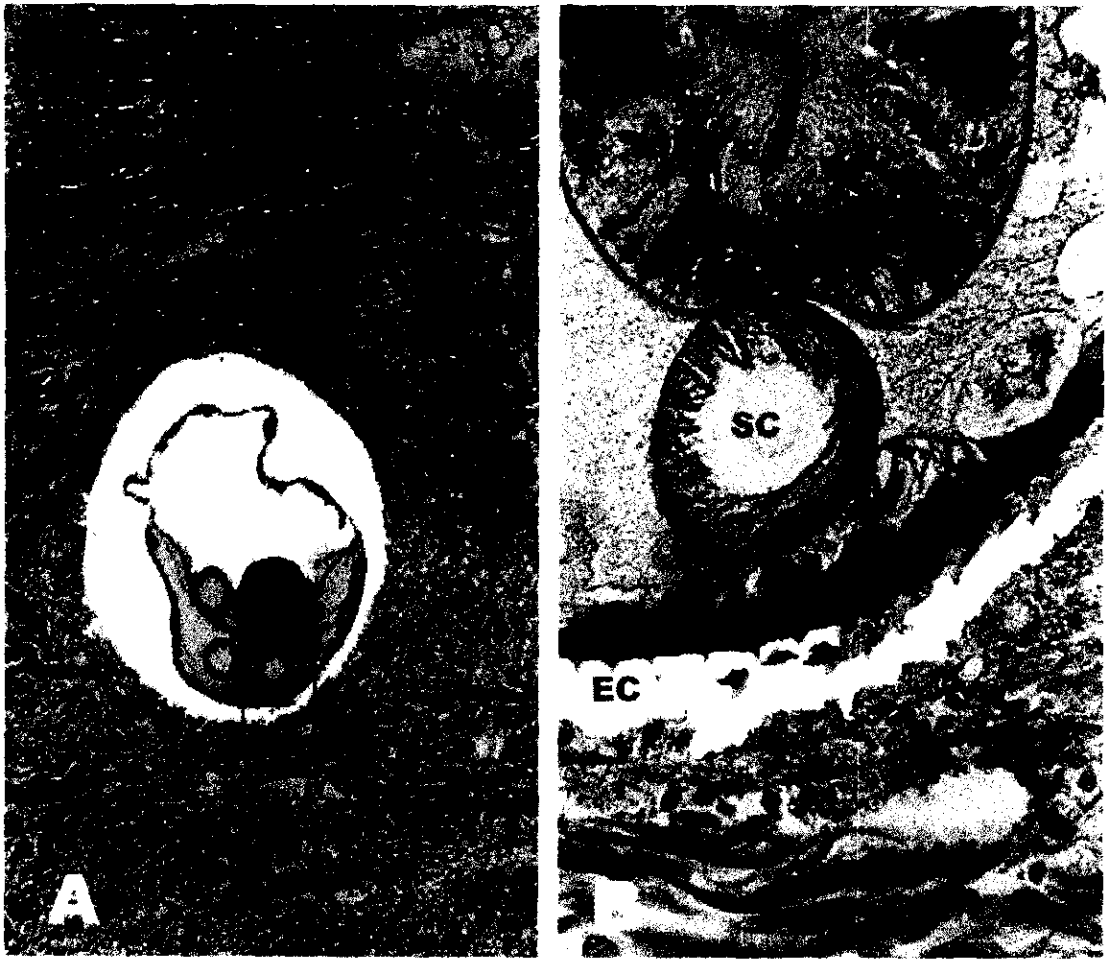


Fig. 14. Fotografía en microscopía de luz de una biopsia cutánea incluida en parafina, que muestra **A:** corte transversal de una larva L3A de *Gnathostoma* y la reacción inflamatoria. **B:** parásito a mayor aumento: esófago (E), saco cervical (SC) y espinas cuticulares (EC).

En la **figura 15A**, se observa el material de una biopsia cutánea con una larva L3A que mostró intensos movimientos dentro del tejido del cual eventualmente migró, **figura 15B**.



Fig. 15. Biopsia cutánea que muestra una larva L3A (→), dentro (A) y fuera del tejido (B).

Esta larva L3A fue recuperada viva de una lesión cutánea de una paciente de 39 años, que había recibido tratamiento con albendazol durante 10 días. Mediante microscopía de luz, se observaron cuatro hileras de ganchos en el bulbo cefálico y en la parte interna de éste, se reconocieron las membranas de cuatro sacos cervicales que colgaban libremente en el pseudoceloma rodeando el esófago. Los sacos cervicales se movían de acuerdo a los movimientos de expansión o retracción del bulbo cefálico.

El esófago piriforme y el intestino se observaron de un color café oscuro. El intestino, presentaba movimientos ondulatorios junto con el movimiento progresivo de la larva. En la parte posterior ventral, se identificó el poro anal a través del cual expulsaba material de excreción, en pequeños grumos mediante fuertes movimientos del intestino, **Fig. 16.**

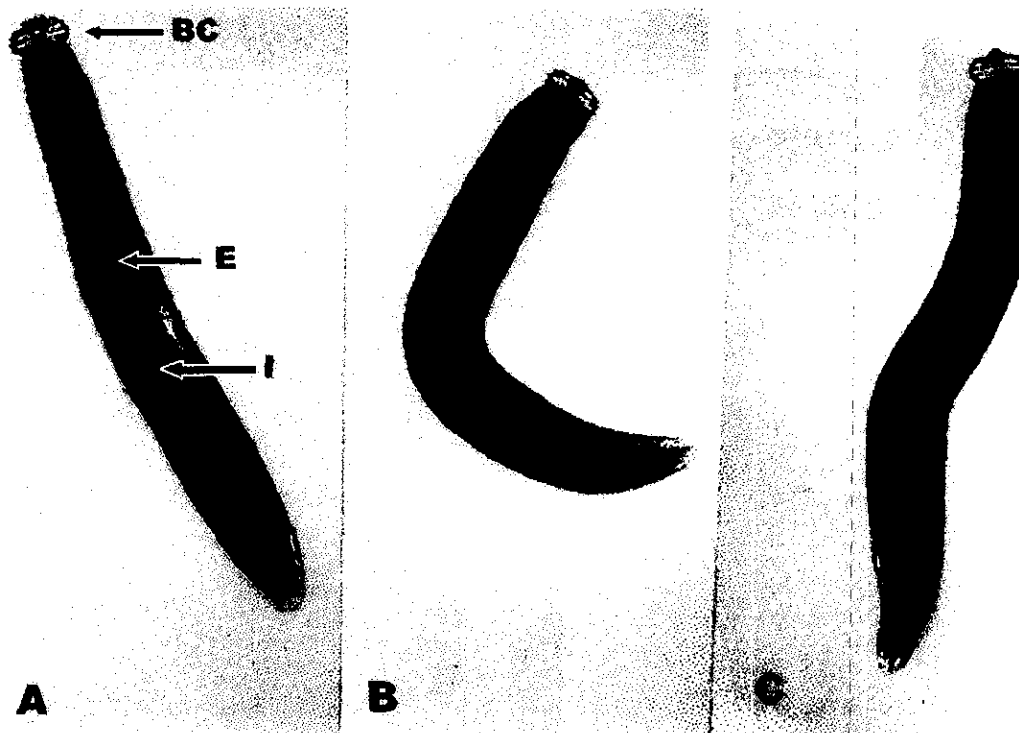


Fig. 16. A, B y C muestran diferentes movimientos de una larva L3A recuperada viva a partir de material sin fijar, de una biopsia cutánea: bulbo cefálico (BC), esófago (E) e intestino (I).

Otras L3A viables se procesaron para realizar estudios de microscopía electrónica de barrido, con apoyo de la Dra. Silvia Antuna y Marie Therese Merchant de la Facultad de Medicina, UNAM.

En la **figura 17**, se observa una larva L3A humana donde se muestran características morfológicas externas que fueron comparadas con las observadas en larvas recuperadas de aves. En el bulbo cefálico se apreciaron dos grandes labios con un par de papilas cada uno, rodeando una boca alargada. El número de ganchos en el bulbo cefálico, de las hileras uno a la cuatro fueron 35, 43, 46 y 49 respectivamente. El cuerpo en su totalidad, estuvo cubierto con espinas cuticulares, que se observaron más pequeñas a medida que se alejaban del bulbo y entre las décimo segunda y décimo tercera hileras, se reconoció una papila cervical.

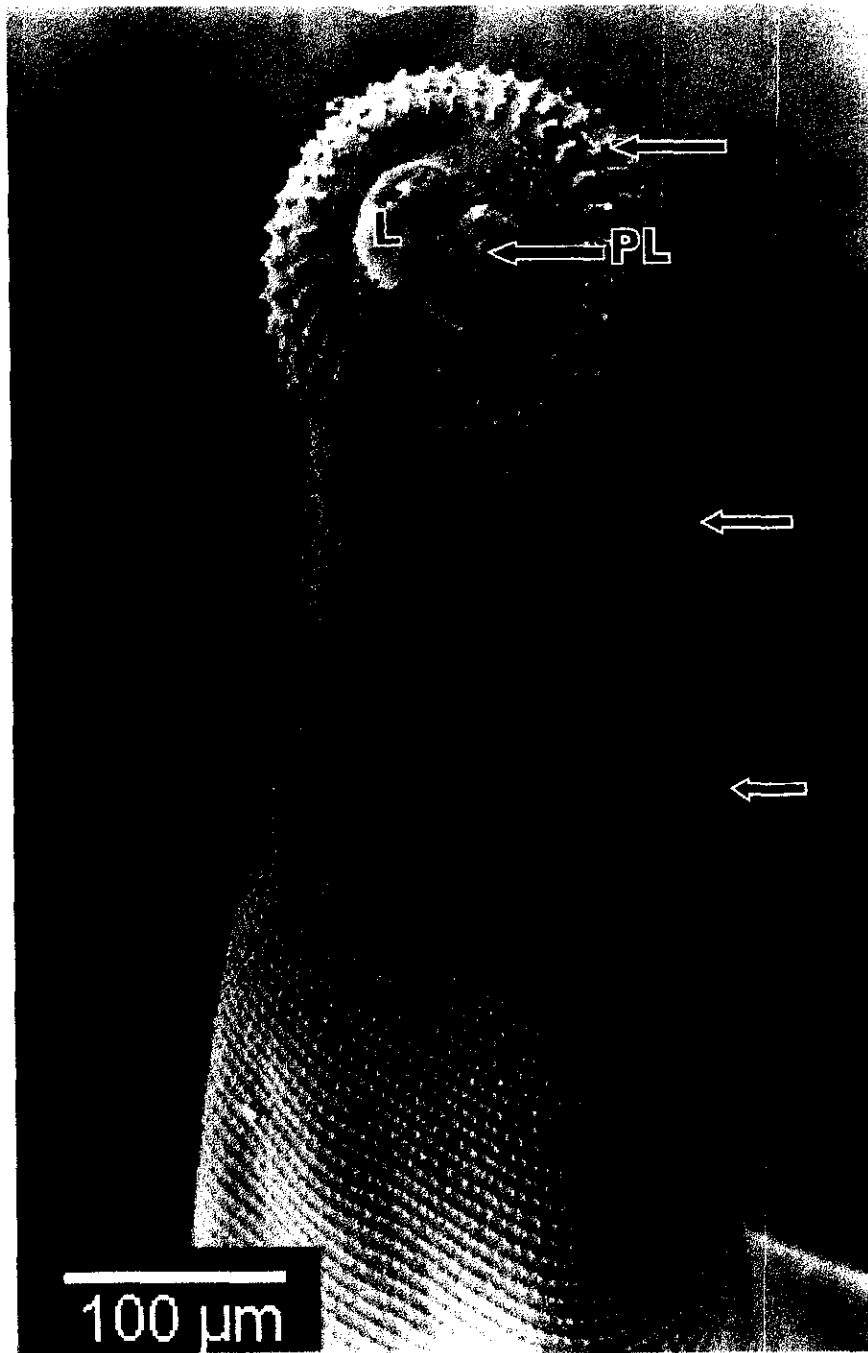


Fig. 17. Microscopía electrónica de barrido de una larva L3A que salió de manera espontánea de una lesión edematosa del hombro derecho de una paciente de 33 años. Ganchos del bulbo cefálico (GB), labios (L), papilas labiales (PL), papila cervical (PC) y espinas cuticulares (EC).

E) Factores de riesgo en la transmisión de gnathostomosis

Con objeto de definir factores de riesgo para adquirir esta parasitosis, inicialmente se analizó la información de las encuestas aplicadas a los 447 casos y 227 controles estudiados en la ciudad de Culiacán, utilizando pruebas estadísticas para muestras independientes. Se encontraron diferencias estadísticamente *significativas* entre casos y controles en los siguientes parámetros:

- a) La frecuencia con que se consume carne de pescado de agua dulce ($p=0.0001$).
- b) La frecuencia en el consumo de carne de pescado de agua dulce crudo, ($p=3.76 \times 10^{-14}$).
- c) Edad, cuya media muestral para los casos fue de 34.86 años, ($p=0.0000$).
- d) Peso corporal, media muestral de los casos 68.44 Kg, ($p=0.004$).

Posteriormente, se analizó la misma información en 100 casos y controles pareados por raza, edad, sexo y zona geográfica, utilizando la prueba t-student pareado. Se obtuvieron diferencias significativas en:

- a) Frecuencia con la cual los casos consumieron pescado de agua dulce crudo, ($p=0.018$).
- b) El tiempo que tenían consumiendo este producto, ($p=0.0000$).

En ninguno de los dos tipos de análisis, para muestras independientes y pareadas, se observaron diferencias significativas entre: la edad promedio a la cual empezaron a consumir carne cruda o insuficientemente cocida de pescado de agua dulce, beber agua sin tratamiento de ríos o lagunas, y en la ingestión de carne cruda de aves ictiófagas, ranas o culebras, probables hospederos paraténicos de *Gnathostoma*.

2. Estudio epidemiológico

Se llevó a cabo en las poblaciones rurales denominadas de alto (PAR) y bajo riesgo (PBR). Debido a que en México no existen trabajos epidemiológicos previos sobre gnathostomosis, se diseñó un estudio piloto seleccionando aleatoriamente 30 conglomerados en cada poblado, para determinar el tamaño de muestra. Se aplicaron encuestas previamente elaboradas y se encontró que en PAR el 23.3% de las familias seleccionadas se dedicaban a la pesca en agua dulce y el 60.0% de ellas consumía carne de pescado crudo, sazonado únicamente con limón. En PBR, no se encontraron familias de pescadores y sólo el 6.7% manifestó comer carne de pescado de agua dulce sin cocción. También se colectaron 174 (PAR) y 162 (PBR) muestras de sangre de los individuos incluidos en los conglomerados seleccionados y se determinó la prevalencia de anticuerpos anti-*Gnathostoma doloresi*, mediante ELISA previamente desarrollado. En PAR se encontró una seropositividad del 12.64%, en contraste con la detectada en PBR, que fue del 2.50%. Posteriormente, considerando los datos de seroprevalencia se obtuvo un tamaño de muestra de 116 a 202 conglomerados ($\alpha = 0.5$, $\beta = 0.01$).

A) Características de las familias o conglomerados

Con base en el estudio piloto, se inició la aplicación de encuestas codificadas a los conglomerados seleccionados en ambas poblaciones; en la **tabla 3**, se resume la información recabada.

Tabla 3. Características de las familias estudiadas en las poblaciones de PAR y PBR.

FAMILIAS	PAR	PBR
Encuestadas	190	122
De pescadores	62 (32.6%)	0 (0.0%)
Consumen pescado crudo	121 (63.7%)	21 (17.2%)
Al menos un individuo presenta edemas cutáneos migratorios	22 (11.6%)	2 (1.6%)

La presencia de edemas cutáneos migratorios intermitentes, en individuos de las familias de PAR fue significativamente mayor ($p=0.0000$). Una razón de momios (RM)=10.4 indicó que en este lugar, existen 10.4 veces mas probabilidades de presentar estos edemas, comparado con PBR. También en PAR el consumo de pescado crudo, fue mayor ($p=0.0000$), RM=8.43.

B) Prevalencia de anticuerpos contra *G. doloresi* en PAR y PBR

Adicionalmente, se procesaron por ELISA 713 muestras de sueros de PAR y 222 de PBR, correspondientes a 190 y 122 conglomerados, respectivamente. Por fallas en el suministro de energía eléctrica en el laboratorio se desechó un número importante de muestras colectadas en PBR. Utilizando métodos de estadística descriptiva aplicados a las lecturas de DO por ELISA, se obtuvieron los siguientes resultados:

	PAR	PBR
Tamaño de la muestra	713	222
Media de las DO	0.323125	0.260622
Mediana	0.322000	0.24250
Desviación estandar	0.21456	0.15882
Error estandar	0.00803	0.01066

La prueba t para muestras independientes mostró diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los valores de las DO, ($t=4.01107$, $p=3 \times 10^{-5}$).

Tomando en cuenta el punto de corte a una DO de 0.5, obtenida de los controles estudiados en la ciudad de Culiacán, la seroprevalencia en PAR fue de 15.6%, significativamente mayor que en PBR, 8.1% ($p= 0.005$), **Fig. 18**.

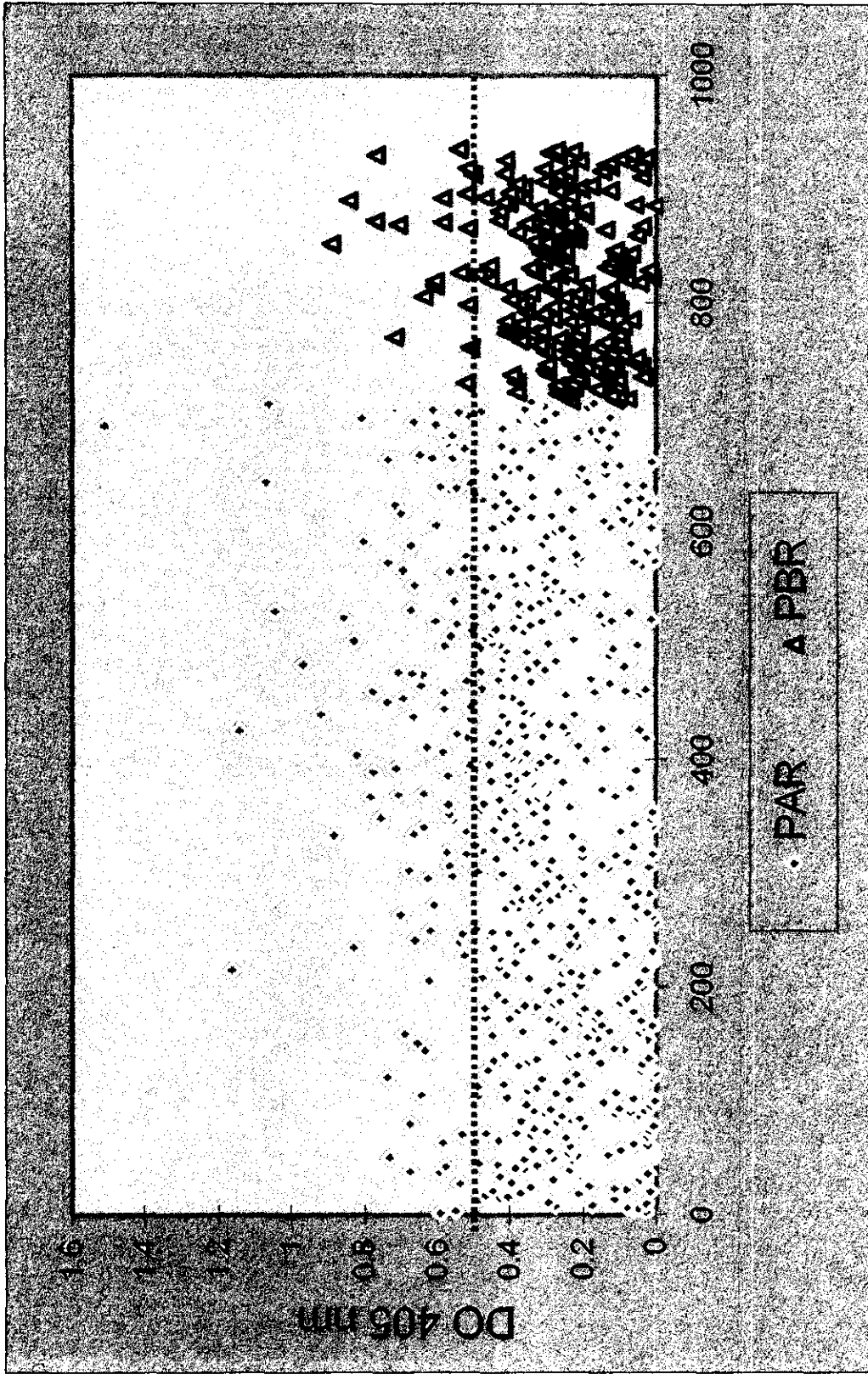


Fig. 18 Anticuerpos contra *Gnathostoma doloresi* por ELISA en PAR (713) y PBR (222) donde se observaron seroprevalencias de 15.6% y 8.1% respectivamente. Punto de corte (.....), DO = 0.5

Con los datos de seroprevalencia, se obtuvo una $RM=2.09$, lo cual significó que una persona que vive en PAR, presenta aproximadamente 2.09 veces mayor probabilidad de tener anticuerpos contra *Gnathostoma*, comparada con quien vive en PBR.

Cabe destacar que, a través del diagnóstico inmunológico por ELISA realizado en PAR, fue posible detectar un caso de gnathostomosis cutánea confirmado parasitoscópicamente: persona del sexo femenino de 40 años de edad, presentó una DO de 0.750 y en el interrogatorio manifestó haber presentado edemas migratorios intermitentes en tronco y extremidades superiores. El caso fue remitido al dermatólogo quien prescribió tratamiento con albendazol a una dosis de 10 mg/Kg de peso, durante 21 días. Veinte días post-tratamiento se realizó una biopsia escisional en la lesión ya involucionada. El material sin fijar, se examinó en el laboratorio y se recuperó una larva L3A muerta probablemente hacía poco tiempo, ya que lo único que se encontraba deteriorado era el bulbo cefálico.

En las **figuras 19 y 20**, se presentan los croquis poblacionales de PAR y PBR, que muestran la distribución de algunos datos obtenidos a través del trabajo de campo y de laboratorio.

C) Prevalencia de parasitosis intestinales

Los estudios coproparasitoscópicos (CPS) realizados en individuos de estas dos poblaciones y en los casos y controles de Culiacán, mostraron que la inmunidad hacia los parásitos intestinales que prevalecieron en la población estudiada, aparentemente no interfirió con el diagnóstico inmunológico de gnathostomosis.

El número de muestras de heces procesadas por Faust, Ritchie y Kato fue el siguiente:

	PAR	PBR	Casos	Controles
No. de muestras	1,950	636	462	597
No. de individuos	658	212	154	199

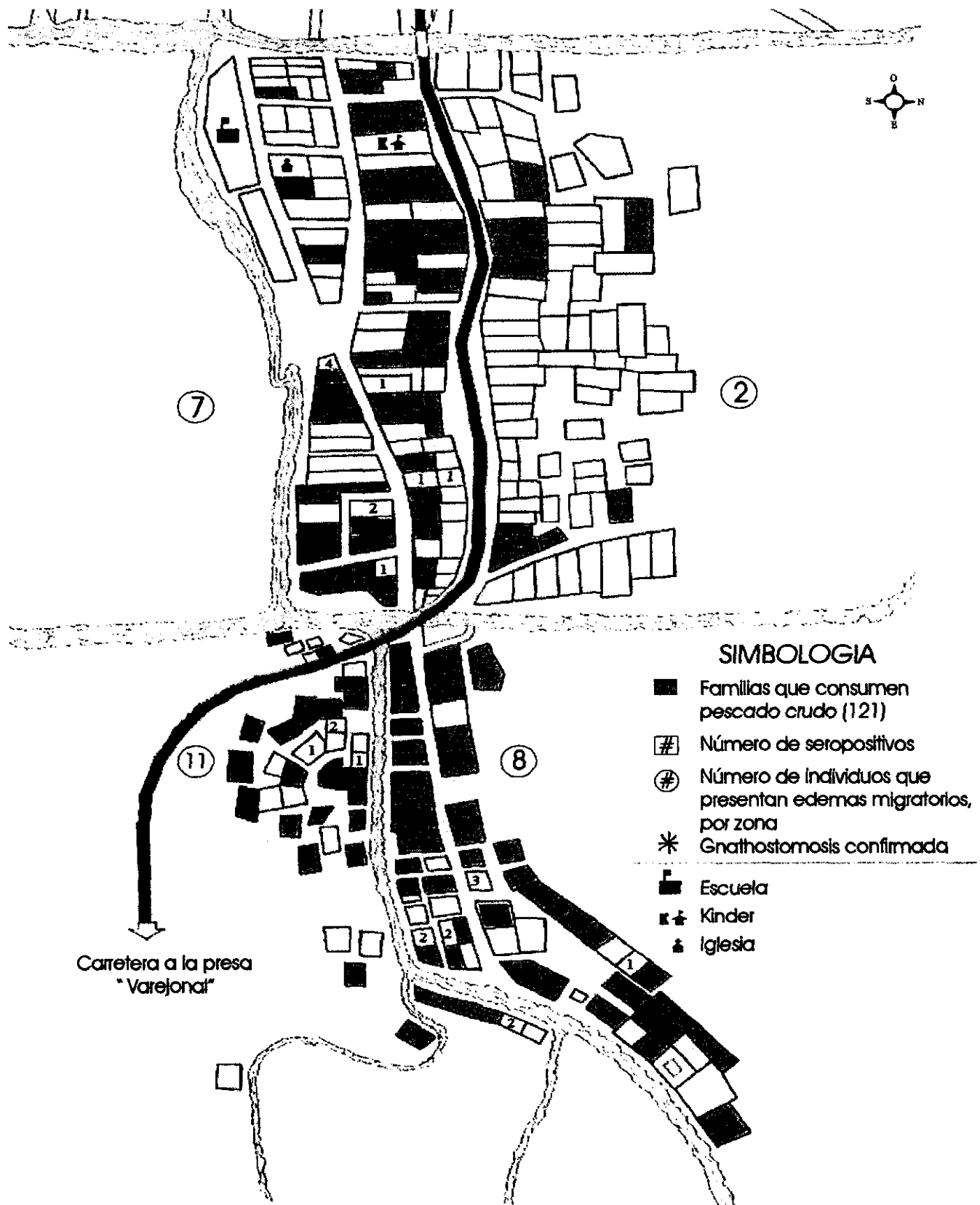


Fig. 19 Croquis que muestra la distribución de los conglomerados o familias, en la población de alto riesgo (PAR).

En las dos poblaciones rurales a pesar de que las protozoosis presentaron una distribución similar, PBR mostró prevalencias significativamente mayores de *Hymenolepis nana* ($p=2 \times 10^{-5}$), *Ascaris lumbricoides* ($p=0.0000$), *Trichuris trichiura* ($p=0.0000$) y *Strongyloides stercoralis* ($p=0.0000$). Por el contrario, las uncinarias fueron más prevalentes en PAR ($p=3 \times 10^{-4}$), **tabla 4**. La prevalencia de parasitosis intestinales entre los casos y controles en la ciudad de Culiacán, no mostró diferencias estadísticamente significativas, **tabla 5**.

Tabla 4. Prevalencia de parásitos intestinales en población de alto riesgo (PAR) y de bajo riesgo (PBR) determinada en tres muestras de cada individuo, por los métodos de Faust, Ritchie y Kato.

PARASITOS	PAR N (%)	PBR N (%)
<i>Giardia lamblia</i>	137 (20.0)	49 (23.1)
<i>Entamoeba histolytica</i>	22 (3.2)	12 (5.7)
<i>Taenia solium</i>	4 (0.5)	0 (0.0)
<i>Taenia saginata</i>	3 (0.4)	0 (0.0)
<i>Hymenolepis nana</i>	116 (16.9)	70 (33.0)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	54 (7.9)	48 (22.6)
<i>Trichuris trichiura</i>	23 (3.4)	33 (15.6)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1 (0.15)	14 (6.6)
Uncinarias	13 (1.9)	17 (8.0)
<i>Enterobius vermicularis</i>	18 (2.6)	7 (3.3)
<i>Entamoeba coli</i>	462 (62.2)	145 (68.1)
<i>Endolimax nana</i>	352 (51.4)	152 (71.7)
<i>Iodamoeba bütschlii</i>	70 (10.2)	20 (9.4)
<i>Chilomastix mesnili</i>	24 (3.5)	6 (2.8)
ESTUDIADOS	658	212

Tabla 5. Prevalencia de parasitosis intestinales en casos de gnathostomosis cutánea y controles de la Ciudad de Culiacán empleando los métodos CPS de Faust, Ritchie y Kato.

PARASITOS	CASOS N (%)	CONTROLES N (%)
<i>Giardia lamblia</i>	10 (6.5)	15 (7.5)
<i>Entamoeba histolytica</i>	3 (1.8)	1 (0.5)
<i>Hymenolepis nana</i>	10 (6.5)	4 (2.0)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	0 (0.0)	2 (1.0)
<i>Trichuris trichiura</i>	0 (0.0)	1 (0.5)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1 (1.9)	0 (0.0)
<i>Entamoeba coli</i>	47 (30.5)	50 (25.1)
<i>Endolimax nana</i>	63 (40.9)	70 (35.2)
<i>Iodamoeba bütschlii</i>	9 (5.8)	10 (5.0)
<i>Chilomastix mesnili</i>	3 (1.9)	2 (1.0)
ESTUDIADOS	154	199

3. Hospederos naturales de *Gnathostoma*

A) Peces

Las especies de peces de agua dulce estudiadas en los lugares señalados en la **figura 6** fueron: *Oreochromis spp* ("tilapia"), *Ictalurus punctatus* ("bagre"), *Micropterus salmoides* ("lobina"), *Mugil spp* ("lisa") y *Salmo spp* ("trucha"), **tabla 6**.

A pesar del análisis de 2,773 ejemplares de peces (que representaron un peso aproximado de 900 Kg), no se encontraron formas parasitarias de *Gnathostoma*.

Tabla 6. Especies de peces dulceacuícolas estudiadas, en los cuales no se detectaron larvas L3A de *Gnathostoma spp.*

LOCALIDAD		ESPECIES DE PECES					TOTAL
Presas	<i>Oreochromis spp</i>	<i>Micropterus salmoides</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	<i>Mugil spp</i>	<i>Salmo spp</i>		
"Varejonal"	800	58	140			998	
"Comedero"	223	10	2			235	
"El Salto"	109	1				110	
Sanalona	349	18				367	
Ríos, Lagunas y Diques							
R. San Lorenzo	92	10	5		17	124	
R. Culiacán	63					63	
D. Alhuate	501	30	46	23		600	
L. Caimanero	154					154	
L. Chiricagüeto	54	1		17		72	
TOTAL	2,345	128	193	40	17	2,723	

B) Aves

En las mismas áreas geográficas, se capturaron 192 aves ictiófagas, identificadas como *Egretta alba* ("garzon blanco"), *Pelecanus erythrorhynchos* ("pelícano blanco"), *Pelecanus occidentalis* ("pelícano gris"), *Nycticorax nycticorax* ("garza negra"), *Ardea herodias* ("garzón cenizo"), *Phalacrocorax olivaceus* ("pato buzo") y *Pandion haliaetus* ("águila pescadora"). Entre estas especies, se identificaron cuatro hospederos paraténicos de *Gnathostoma spp*: *Egretta alba*, *Pelecanus erythrorhynchos*, *Ardea herodias* y *Pelecanus occidentalis*. Esta última especie no había sido registrada anteriormente como hospedero paraténico de *Gnathostoma*, **tabla 7**.

Tabla 7. Aves ictiófagas estudiadas para identificar hospederos paraténicos de *Gnathostoma spp.* Cuatro especies se encontraron parasitadas.

ESPECIES DE AVES	LOCALIDAD					TOTAL (PARASITADAS)
	Presa Varejonal	Presa Comedero	Presa Sanalona	Río S.Lorenzo	Río Culiacán	
<i>Egretta alba</i>	7			84	4	95 (21)
<i>P. olivaceus</i>	9	1	3	40		53 (0)
<i>N. nycticorax</i>	1			4	1	6 (0)
<i>A. herodias</i>		1	1	12		14 (3)
<i>P. erythrorhynchos</i>			1	2		3 (1)
<i>P. occidentalis</i>				17	1	18 (5)
<i>P. haliaetus</i>	1	2				3 (0)
TOTAL	18	4	5	159	6	192(30)

A partir del material obtenido de las 30 aves parasitadas, se aislaron 203 L3A de *Gnathostoma* y el mayor número de larvas se encontró en la especie *Egretta alba*; ésta es una garza blanca, esbelta, con pico amarillo y patas negras que habita en aguas dulces y tierras bajas. Se alimenta de peces y batracios posándose con el cuello extendido hacia adelante.

El lugar de donde se capturaron las aves mas parasitadas fue en el dique "El Alhuate"; este cuerpo de agua dulce, se localiza aproximadamente 40 Km hacia el suroeste de la ciudad de Culiacán en los márgenes del poblado "Valle Escondido", Sindicatura de Quilá, municipio de Culiacán. El dique contiene aguas del río San Lorenzo en cuyo cauce también se encuentra la presa "Lic. José López Portillo" conocida como " El Comedero", (Tabla 8).

Tabla 8. Hospederos paraténicos de *Gnathostoma spp* en Sinaloa y número de larvas L3A recuperadas.

HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS	LOCALIDAD	No. L3A <i>Gnathostoma</i>
<i>Egretta alba</i> (Garzón blanco)	Presa "Varejonal" Dique "El Alhuate"	1 180
<i>Pelecanus occidentalis</i> (Pelicano gris)	Dique "El Alhuate"	5
<i>Pelecanus erythrorhynchos</i> (Pelicano blanco)	Dique "El Alhuate"	2
<i>Ardea herodias</i> (Garzón cenizo)	Dique "El Alhuate"	15
TOTAL		203

La frecuencia de gnathostomosis en 84 ejemplares de *Egretta alba*, estudiados en esta área geográfica fue de 29.8 %, (Tabla 9) y las larvas se localizaron en el cuerpo de esta garza, principalmente en piernas (37.2%) y alas (23.3%), (Tabla 10).

Tabla 9. Prevalencia de gnathostomosis en ejemplares de *Egretta alba* capturados en el dique "El Alhuate", río San Lorenzo.

Total Estudiados	Parasitados %	No. L3A	No. Promedio L3A (rango)
84	25 (29.8)	180	7.2 (1- 34)

Tabla 10. Localización corporal de las larvas L3A de *Gnathostoma* en *Egretta alba*.

Piernas	67	(37.2)
Alas	42	(23.3)
M. intercostales	27	(15.0)
Pechuga	30	(16.7)
Cuello	14	(7.8)
TOTAL	180	

4. Identificación de la especie de *Gnathostoma*

A) Morfología de larvas L3A

Las larvas aisladas del tejido muscular esquelético de las aves, inicialmente se observaron inmóviles enrolladas en su propio cuerpo adoptando una forma semicircular y cubiertas de tejido fibroso translúcido, a través del cual se observó claramente el intestino, Fig. 21.

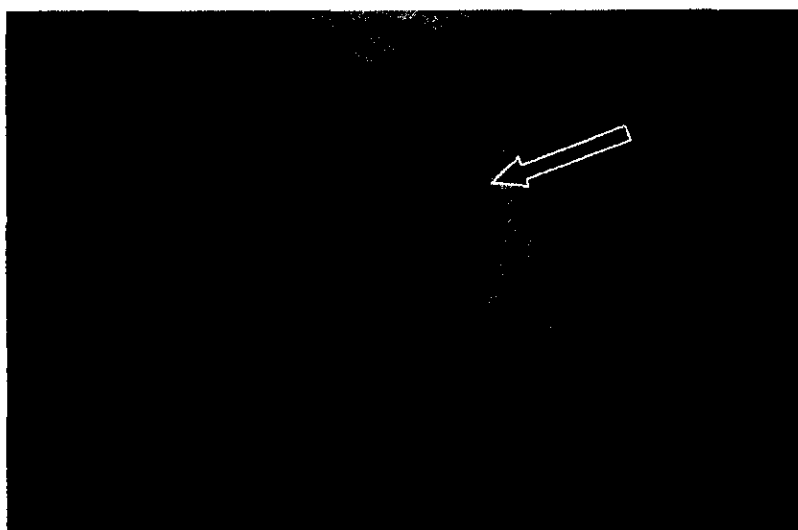


Fig. 21. Larva L3A de *Gnathostoma* encapsulada en músculo de *Egretta alba* (←).

La luz y el calor del microscopio óptico además del jugo gástrico artificial logran activar estas larvas encapsuladas, las cuales inician una serie de movimientos intensos para liberarse de la cápsula fibrosa que generalmente contiene un material pardo, probablemente sustancias de desecho del parásito.

Se realizó un estudio morfométrico de ocho larvas recuperadas de *Egretta alba* y *Pelecanus erythrorhynchos*, mediante microscopía de luz, transmisión y barrido.

Las larvas midieron de 2.0 a 3.3 mm de longitud, el bulbo cefálico se distinguió claramente del resto del cuerpo, por su aspecto globoso y por la presencia de cuatro hileras de ganchos unidentados y de base oblonga. En el bulbo cefálico también se

observó la boca con dos labios laterales de igual tamaño y forma semicircular. Cada labio mostró un par de papilas. El cuerpo cilíndrico también presentó más de 200 hileras transversales de espinas que aparecían inmediatamente debajo del bulbo. Las espinas cuticulares cubrieron todo el cuerpo y disminuían en número y tamaño, a medida que se alejaban del bulbo, cefálico. Entre las hileras de espinas cuticulares 12-13 y 14-15 se observó una de las dos papilas cervicales laterales y hacia la parte posterior ventral del cuerpo se encontró el poro anal rodeado de una cutícula con espinas diminutas y escasas, Fig. 22.

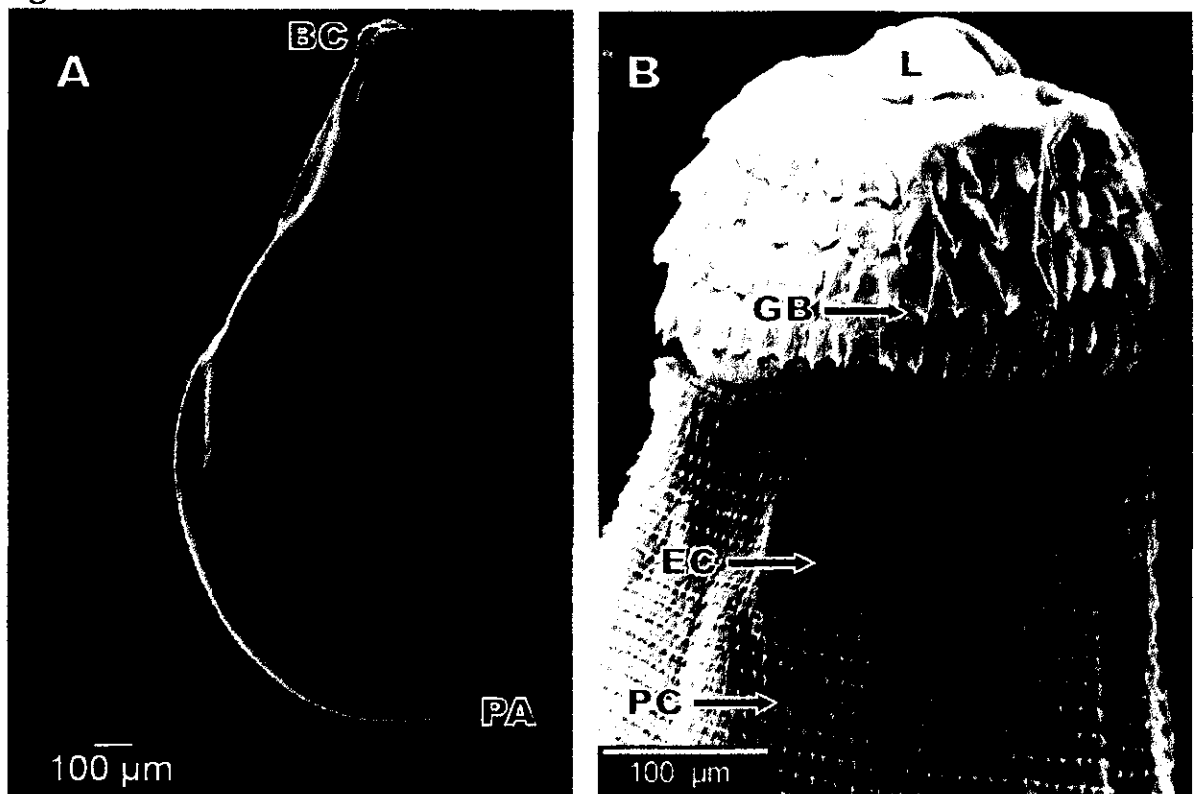


Fig. 22. Microscopía electrónica de barrido de una L3A aislada de *P. erythrorhynchus* que muestra la morfología externa. A: Bulbo cefálico (BC) y Poro anal (PA). B: Labios (L), Ganchos del bulbo (GB), Espinas cuticulares (EC) y Papila cervical (PC).

Adicionalmente se llevó a cabo el recuento de ganchos de diez bulbos cefálicos, seccionando las larvas previamente fijadas. Los bulbos se comprimieron entre un portaobjetos y un cubreobjetos y el recuento se realizó por hileras, en un microscopio óptico. Los resultados se compararon con los registrados para algunas especies de

Gnathostoma que parasitan al hombre; el promedio de ganchos por hilera fue: I (38.9), II (42.3), III (44.6) y IV (47.2) y presentaron similitud con los encontrados para algunas larvas L3A mexicanas sin identificar (104, 9), *G. binucleatum* (8) y *G. spinigerum* (2), (Tabla 11).

Tabla 11. Recuento de ganchos del bulbo cefálico de 10 L3A aisladas de *Egretta alba*.

HILERAS	No. de LARVAS										PROMEDIO
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
I	39	39	39	41	39	34	39	41	39	39	38.9
II	42	44	42	42	43	41	42	42	41	44	42.3
III	45	46	49	43	44	41	44	45	43	46	44.6
IV	48	49	46	44	50	45	49	42	50	49	47.2

Sin embargo el recuento de núcleos de las células del epitelio intestinal en cortes semifinos de una larva L3A aislada de *Pelecanus occidentalis* ("pelicano gris"), Fig. 23, especie no registrada como hospedero natural de *Gnathostoma*, mostró diferencias con las larvas L3A descritas en México y otros países, principalmente en el número de células que no presentaron núcleo, Fig. 24.

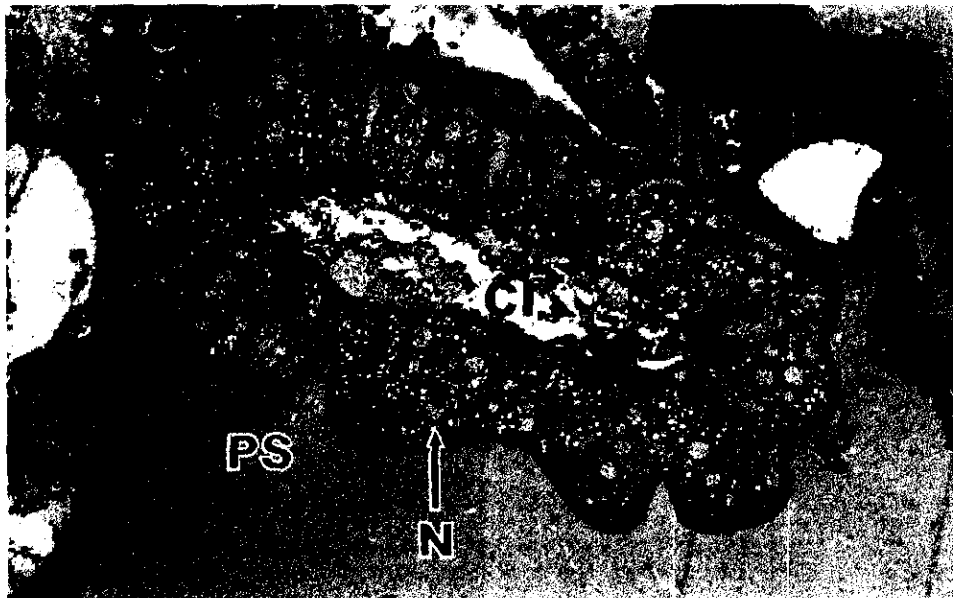


Fig. 23. Microscopía electrónica de transmisión de un corte del epitelio intestinal de una larva L3A de *Gnathostoma*, aislada de *Pelecanus occidentalis*. Pseudoceoloma (PS), Cavidad intestinal (CI) y Núcleos (N).

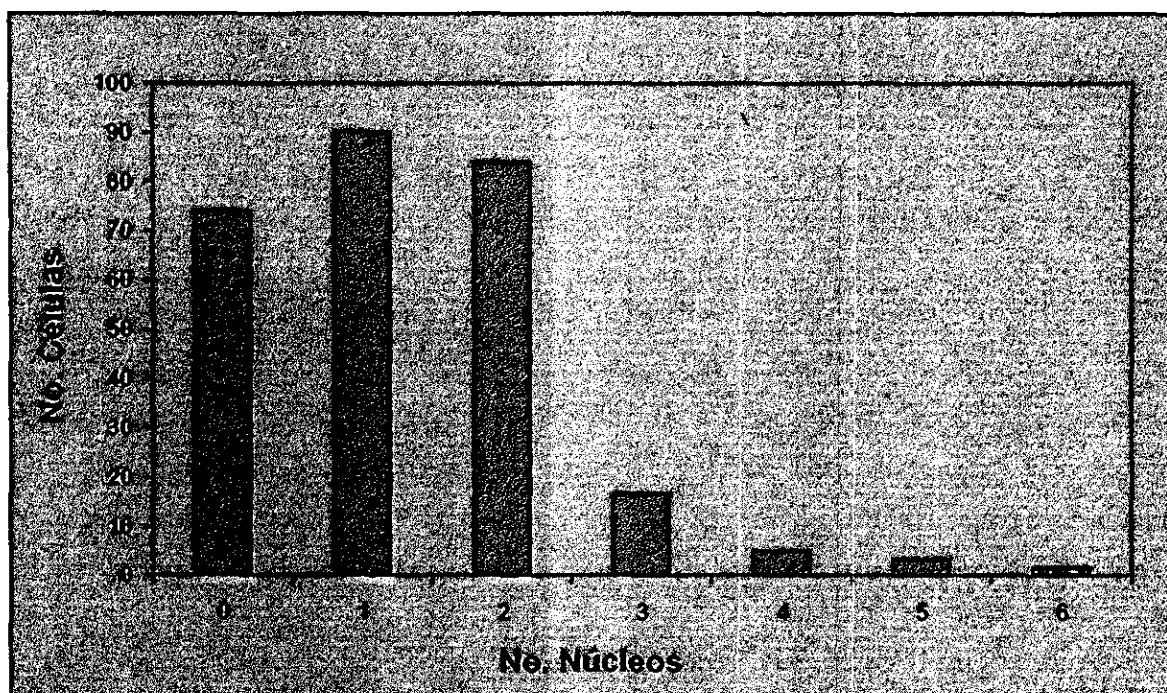


Fig. 24. Número de núcleos en 285 células en cortes del epitelio intestinal de cortes de una larva L3A de *Gnathostoma* aislada de *Pelecanus occidentalis*.

B) Morfología de parásitos adultos

Los parásitos adultos de *Gnathostoma* constituyen el mejor material para la identificación de las especies.

Al igual que para las larvas L3A, el tamaño, forma y distribución de los ganchos del bulbo cefálico y las espinas del cuerpo son datos morfológicos que deben estudiarse, además de la morfología de los órganos genitales y los huevos, (4).

Las infecciones experimentales en gatos, inoculados por vía oral con larvas L3A aisladas de *Egretta alba*, mostraron los siguientes resultados: en el estómago de un gato infectado durante 12 meses, se encontraron lesiones sugestivas de la presencia del parásito. Sorprendentemente en un segundo animal que sólo tenía 17 días de infectado, se

encontraron formas parasitarias en diferentes etapas de desarrollo en estómago, hígado y músculos intercostales, **Fig. 25**.



Fig. 25. Estómago (A) y músculos intercostales (B) de un gato doméstico infectado experimentalmente con larvas L3A de *Gnathostoma*, donde se observaron formas parasitarias en diferentes etapas de desarrollo (←).

En hígado se encontraron larvas L3A que presentaron características morfológicas similares a las anteriormente descritas. Sin embargo en el bulbo cefálico se observaron modificaciones que aparentemente sugieren la aparición de nuevas hileras de ganchos. La **figura 26**, muestra una L3A que midió aproximadamente 2.7 mm. El bulbo cefálico presentó 36, 37, 40 y 47 ganchos en las hileras uno a la cuatro respectivamente; la primera hilera se observó con los ganchos invaginados y en la porción distal aparentemente se dibujaron una quinta y sexta hileras de nuevos ganchos cuando se comparó esa región, con los bulbos de larvas L3A no utilizadas en las infecciones experimentales, (ver **Fig. 22 B**, pag. 64).

Cada labio presentó un anfidio; éste es un diminuto órgano receptor difícil de observar, situado lateralmente. En el cuerpo un poco más robusto entre las estrías cuticulares 13-14, se detectó una papila cervical y la parte posterior no mostró cambios significativos.

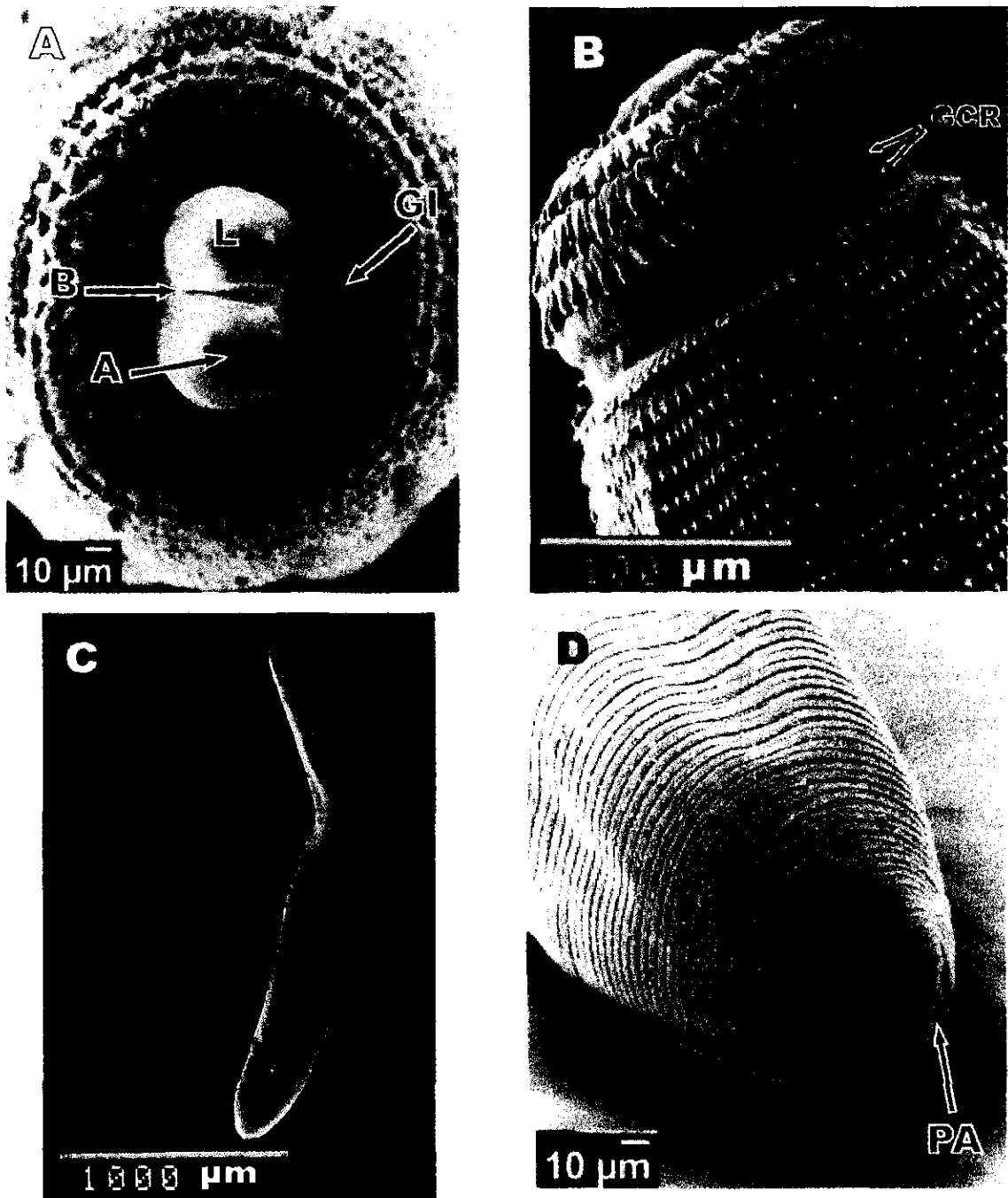


Fig. 26. Micrografía de barrido de una larva L3A obtenida del hígado de un gato doméstico infectado experimentalmente, 17 días post-infección. A: bulbo cefálico que muestra la primera hilera de ganchos invaginados (GI), labios (L), boca (B) y anfidio (A). B: la misma estructura con el aparente crecimiento de las quinta y sexta hileras de ganchos (GCR). C: cuerpo robusto de la larva y D: parte posterior sin modificaciones, que muestra el poro anal (PA).

En músculos intercostales se encontraron parásitos mudando la cutícula del bulbo cefálico, lugar donde aparentemente se inició este proceso.

En la **figura 27**, se observa una larva que presentó fuertes movimientos de expansión y retracción del bulbo; durante la retracción, introducía completamente la boca, labios y dos de las cuatro hileras de ganchos hacia el interior del cuerpo, sobresaliendo sólo la cutícula con las dos hileras restantes, simétricamente plegadas en cuatro puntos. El resto del cuerpo no mostró diferencias morfológicas con las larvas L3A inoculadas, pero a diferencia de las larvas examinadas anteriormente, en ésta, se localizó un poro excretor entre las estrias cuticulares 25 y 26.

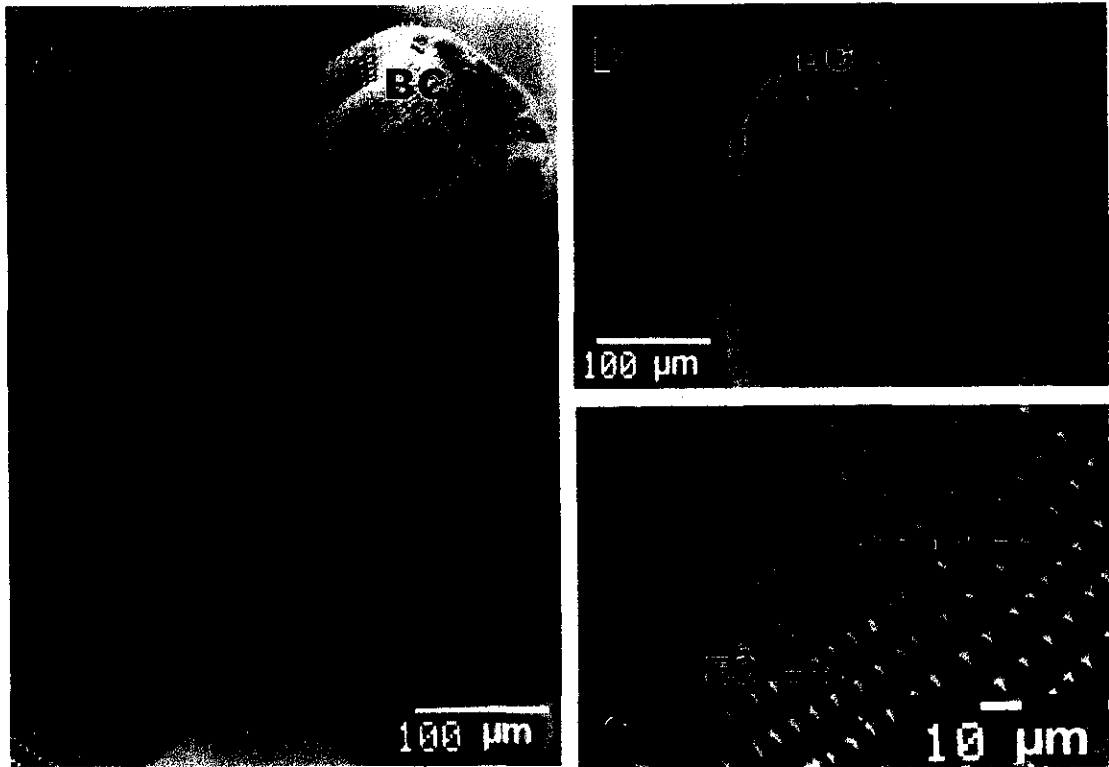


Fig. 27. Micrografía electrónica de barrido de una larva L3A iniciando el proceso de muda cuticular en su transformación hacia la forma adulta. A y B: parásito que muestra invaginación del bulbo cefálico (BC) plegado simétricamente en cuatro puntos. C: espinas cuticulares (EC) y un poro excretor (PE) entre las estrias 25 y 26.

También en los músculos intercostales, se identificaron formas de transición L3A-adultos jóvenes de *Gnathostoma*, con la cutícula del bulbo ya renovada.

El bulbo cefálico expandido, presentó nueve hileras de ganchos y las espinas cuticulares del cuerpo desde las más cercanas al bulbo, hasta aproximadamente el primer tercio, se apreciaron de mayor tamaño. La muda se fue enrollando del bulbo hacia la parte posterior del cuerpo y se localizó a nivel del esófago, Fig. 28.

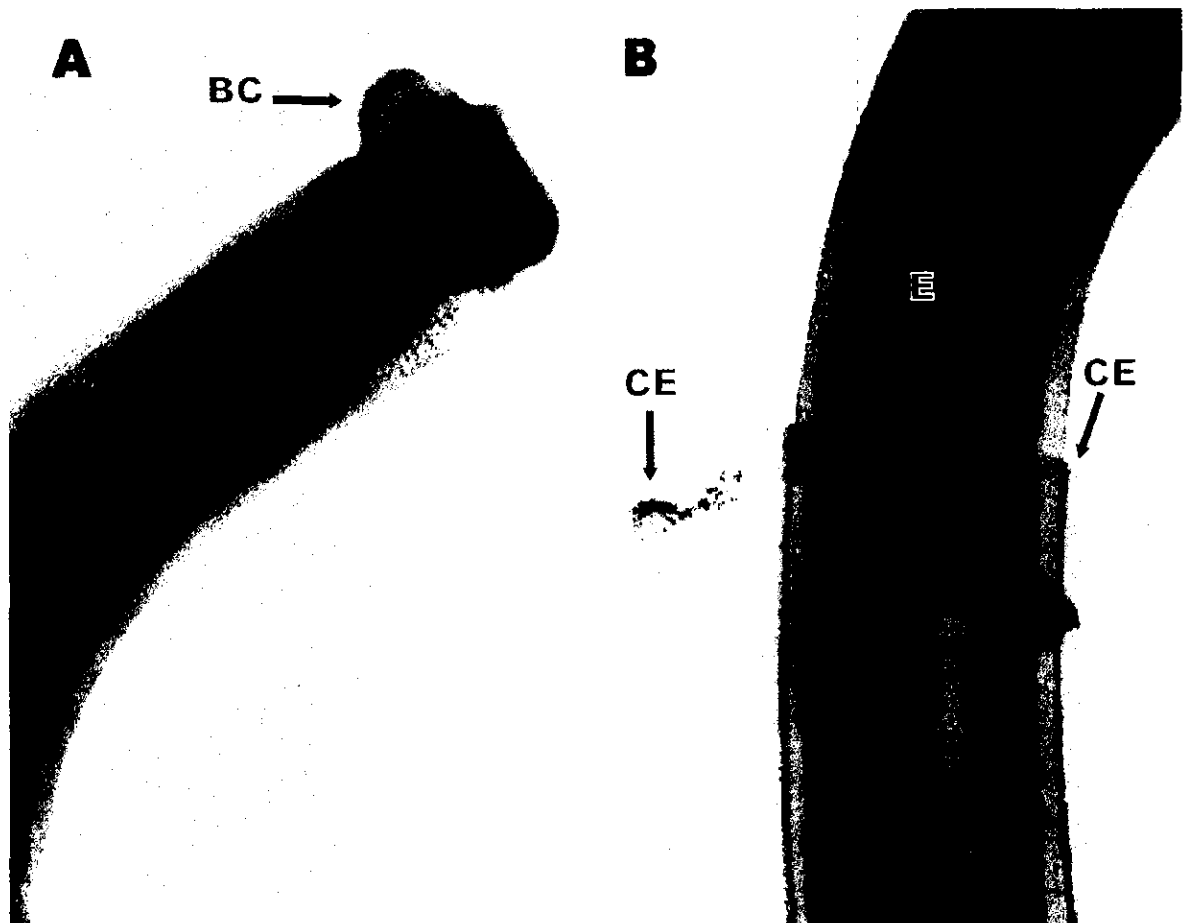


Fig. 28. Proceso de muda cuticular en una forma de larva L3A hacia adulto joven de *Gnathostoma*. A: el bulbo cefálico (BC) presenta nueve hileras concéntricas de ganchos y B: la cutícula parcialmente eliminada (CE) se observa a nivel del esófago (E).

En el estómago del mismo gato infectado, migrando libremente en la serosa, se recuperaron adultos jóvenes de *Gnathostoma*. Los parásitos mostraron muda completa de la cutícula del bulbo cefálico y del cuerpo.

El bulbo cefálico continuó presentando nueve hileras de ganchos con base triangular, pero las espinas del cuerpo ya presentaron cambios importantes en su forma y tamaño.

En la **figura 29**, se aprecia la estructura de las espinas cuticulares: en la primera hilera fueron unidentadas, sólo unas cuantas mostraron dos prolongaciones, pero a partir de la segunda hilera, este último tipo de espinas fue más abundante observándose un apéndice más largo que el otro.

Desde la tercera hilera, hasta aproximadamente la décimosegunda mostraron espinas bifurcadas, acentuándose la diferencia de longitud entre las dos prolongaciones.

Aproximadamente en la décimotercer hilera, empezaron a aparecer algunas espinas tridentadas donde el apéndice central se observó de menor longitud y hacia la hilera número 16, este mismo, apareció más largo que los dos laterales; en esta región se identificó una papila cervical, entre las estriaciones 15 y 16.

Las espinas de las hileras posteriores mantuvieron esta morfología, hasta aproximadamente la número 45, donde se observaron unidentadas nuevamente, después de la aparente fusión hacia el centro de las prolongaciones laterales.

La parte distal de este mismo parásito (**Fig. 30**) mostró una cutícula estriada desnuda, sin embargo en la parte final se apreciaron diminutas espinas que se hicieron más abundantes a medida que se acercaron al poro anal, característica morfológica de *Gnathostoma spinigerum*, que puede ser observada en la **figura 3, pag. 10**.

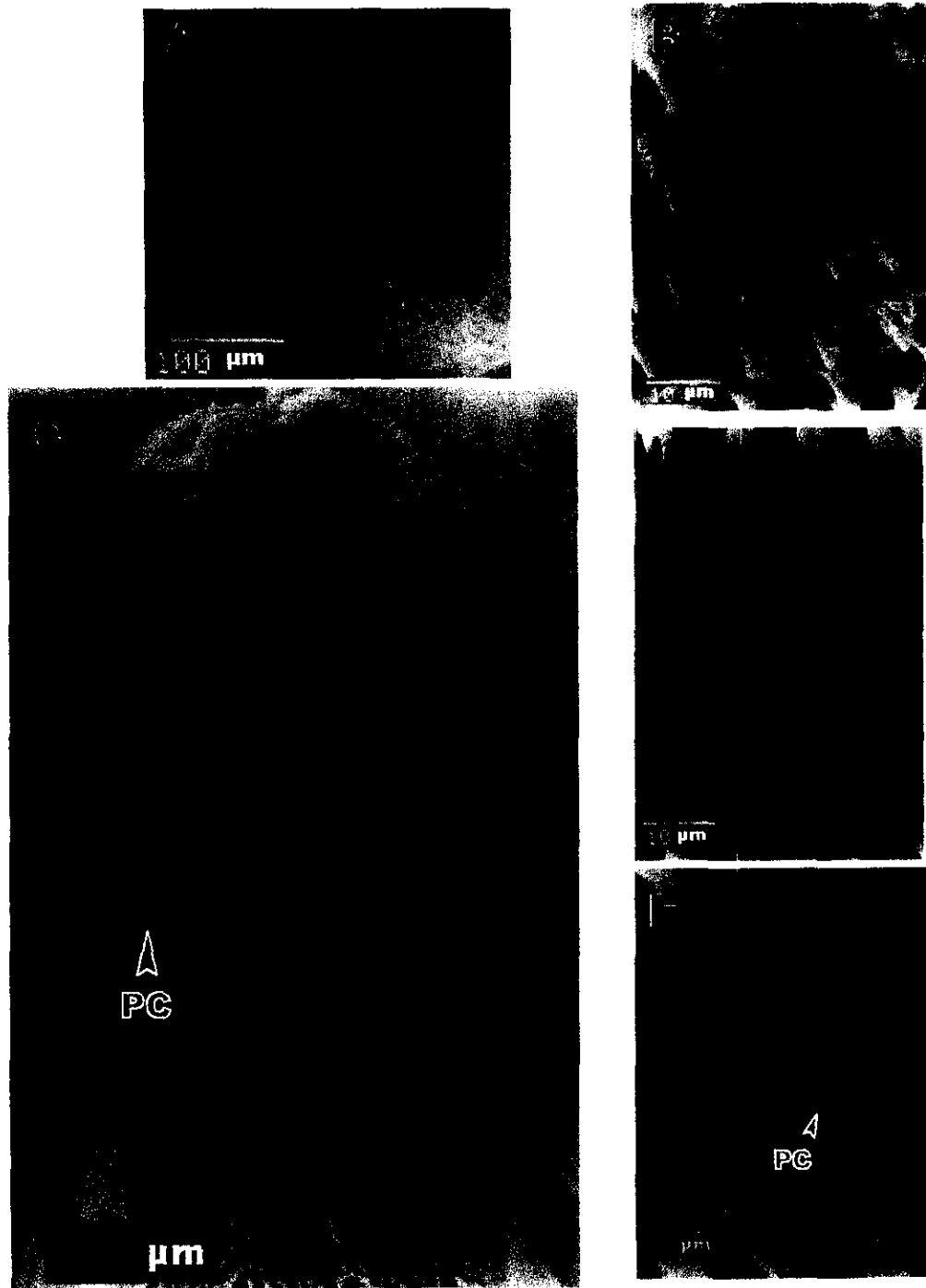


Fig. 29. Micrografía de barrido de un adulto joven de *Gnathostoma* recuperado del estómago de un gato infectado. A: bulbo cefálico con la primer hilera de ganchos incompleta. B: espinas del bulbo con base triangular. C: primer tercio del parásito que muestra una papila cervical (PC). D: espinas cuticulares bifurcadas y E: espinas cuticulares rodeando una papila cervical (PC), localizada entre las estriaciones 15 y 16.

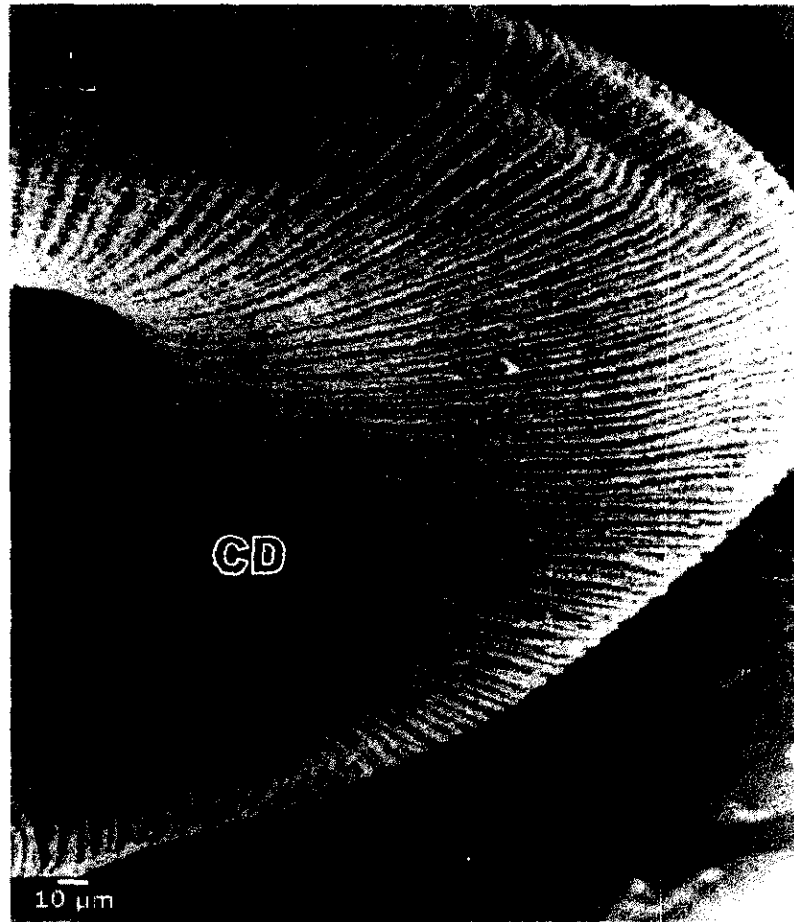


Fig. 30. Micrografía electrónica de barrido de la parte posterior de un adulto joven de *Gnathostoma* que muestra A: cutícula desnuda (CD) y B: área perianal densamente poblada con pequeñas espinas cuticulares (EC).

En la **figura 31** se observa un adulto joven completo, donde se aprecia claramente que las espinas cuticulares cubren el primer tercio del cuerpo.

La forma y disposición de las espinas del cuerpo para la etapa de adulto joven, anteriormente descrita no ha sido documentada, sin embargo, algunos datos morfológicos presentan similitud con los registrados para el adulto maduro de *Gnathostoma spinigerum*.

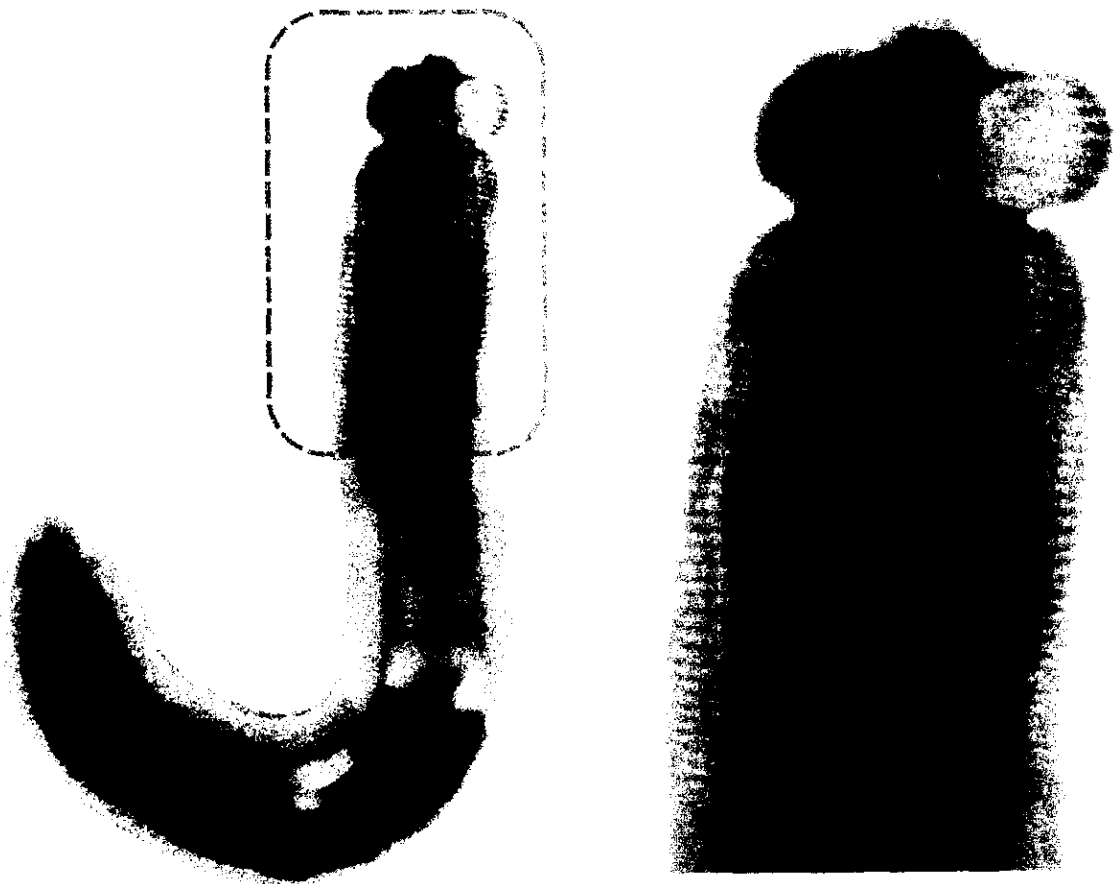


Fig. 31. Microscopía de luz de un adulto joven de *Gnathostoma* obtenido de un gato infectado experimentalmente que muestra las espinas cuticulares que cubren el primer tercio del cuerpo.

VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio, constituyen la primer evidencia de infecciones humanas y de animales silvestres ocasionadas por *Gnathostoma* en el estado de Sinaloa.

Sinaloa, se ubica hacia el noroeste del país, en la costa del oceano Pacifico; cruzan su territorio 11 ríos principales, en cuyos cauces se han construido 12 presas. Estas obras hidráulicas, que han fortalecido las actividades agrícolas, también han favorecido la apertura de nuevas fuentes de trabajo como la acuicultura, que ha propiciado entre otras alternativas alimentarias, el consumo de diferentes especies de peces de agua dulce.

Con estos nuevos recursos alimenticios, se observó que desde hace aproximadamente 20 años, la población empezó a consumir peces de cultivo como "tilapia" (*Oreochromis spp*) y "lobina" (*Micropterus salmoides*) aderezados con limón, en platillos como "cebiche" y "callo". Este afición ahora popularizada, probablemente se encuentra relacionada con la aparición del creciente número de casos de esta parasitosis, detectados en la ciudad de Culiacán, a partir de 1989.

En América y México los primeros dos casos de gnathostomosis, se registraron en 1970 (93); uno de ellos correspondió a un paciente que había radicado en Culiacán, Sinaloa, pero se desconoce si fué en este lugar donde adquirió la enfermedad.

Los 445 casos de gnathostomosis cutánea estudiados solamente en la ciudad de Culiacán, constituyen el 40% del total de casos reportados en la literatura mundial (1,117). Considerando la población total de esta ciudad, tendríamos una tasa de 7.45 por 10,000 habitantes, seguramente inferior a la real, ya que existen algunos factores que dificultan la obtención de datos en Sinaloa, entre ellos: a) no existe el registro obligatorio de este

padecimiento, b) la escasa información a nivel de atención médica, sobre esta parasitosis, c) la larva puede salir espontáneamente a través de la piel, sin conocimiento del paciente y d) existen infecciones subclínicas donde la larva puede ser destruida por la respuesta inmune, entre otros.

Las manifestaciones clínicas que presentaron los pacientes estudiados, se caracterizaron por la aparición de edemas migratorios recurrentes, eritematosos, indurados y muy pruriginosos; algunos casos mostraron edemas intermitentes sin eritema.

Con menor frecuencia se observaron los tipos de lesiones serpiginosa o pseudofurunculosa; el período de evolución del padecimiento fue muy variable, de una semana a doce años, y la recurrencia de las lesiones que refleja el movimiento de la larva, varió entre un día hasta dos años.

La localización preferente de los edemas, fué en extremidades superiores e inferiores y cabeza. Estas características clínicas presentaron gran similitud con las descritas en los casos registrados en otras localidades de México (39, 64, 98, 97), en Ecuador (40) y en pacientes parasitados con *Gnathostoma spinigerum* en Tailandia (3) y Japón (2). Sin embargo, difirieron de manera importante, con los signos y síntomas ocasionados por *G. hispidum*, *G. doloresi* y *G. nipponicum* donde se presentan principalmente lesiones serpiginosas localizadas con mayor frecuencia en tronco (20, 28, 29, 34, 35).

La reacción inflamatoria hacia el parásito, realmente ha sido poco estudiada y presenta características histopatológicas de una paniculitis eosinofílica: epidermis normal, infiltrado perivascular linfocitario, infiltración marcada de eosinófilos entre adipocitos y septos interlobulares, vasculitis y necrosis de colágena, entre otras. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de eosinófilos que se observan en diferentes etapas de degranulación en esta reacción, generalmente no se logra la destrucción del parásito,

probablemente por su gran tamaño y la rapidez con la que puede migrar; también es posible que el parásito presente alguno(s) mecanismos de evasión de esta respuesta ya que es común observar que la larva inmóvil en el tejido cutáneo, induce una pobre respuesta inflamatoria que le permite sobrevivir en el hospedero durante años.

En concordancia con otros autores, un alto porcentaje de pacientes mostraron elevación de los niveles séricos de IgE (71.5%) y en el recuento absoluto de eosinófilos (50.3%), (73, 74, 75). Aunque en este padecimiento no ha sido estudiado el significado de estas manifestaciones de la respuesta inmune Th2, en otras helmintosis tisulares como toxocarosis (68), se ha propuesto que los antígenos de la forma larvaria que se liberan en grandes cantidades, favorecen la inducción de esta subpoblación de linfocitos T de ayuda. Además se ha sugerido que este estímulo antigénico crónico puede conducir a alteraciones cardiovasculares y favorecer estados atópicos en los pacientes.

El diagnóstico de certeza de gnathostomosis humana se fundamenta en la identificación morfológica del parásito, pero éste presenta serias dificultades sobretodo cuando la larva migra hacia órganos y tejidos profundos. En este estudio se mostró la utilidad de ELISA (sensibilidad 94% y especificidad 98.7%) para el diagnóstico de este padecimiento ya que se detectó una seropositividad del 94.4% en los casos con sospecha clínica de gnathostomosis, significativamente mayor al 1% detectado en los controles, $p=(0.0000)$.

La elevada correlación (98%), encontrada en el estudio comparativo de ELISA y dot-ELISA, representa una alternativa, aun no explorada, para apoyar el diagnóstico clínico o llevar a cabo estudios epidemiológicos sobre gnathostomosis, en comunidades donde exista dificultad para adquirir equipos costosos y contar con personal especializado.

En la búsqueda de factores de riesgo para la transmisión de esta parasitosis a través del estudio de 100 casos y controles pareados, se encontró que los casos gnathostomosis,

habían consumido durante mas tiempo ($p=0.018$) y con mayor frecuencia ($p=0.0000$) carne cruda de pescado de agua dulce comparado con los controles. Asimismo en el estudio epidemiológico realizado en PAR y PBR se confirmó la relación de estos factores de riesgo con la enfermedad, analisis en el que las diferencias significativamente mayores en la seropositividad de los individuos de PAR, mostró un riesgo 10.4 veces mayor de padecer edemas migratorios intermitentes, comparado con los individuos de PBR. Cabe destacar que en PAR también se detectó un caso de gnathostomosis cutanea, confirmando la utilidad de ELISA en el diagnóstico.

En lo referente a la búsqueda de hospederos naturales de *Gnathostoma*, algo inesperado, fué que a pesar de analizar 2,723 peces de agua dulce no se logró identificar larvas L3A de *Gnathostoma*. Esto sugiere, por una parte, que la prevalencia de la infección en estas especies es baja y el número de ejemplares analizados deberá ser superior.

De acuerdo a estos resultados se sugiere que posiblemente la mayoría de los pacientes, se infectan después de consumir el pescado crudo por períodos prolongados y con mucha frecuencia. Estos hábitos manifestados por la mayoría de los casos de *larva migrans* a través de las encuestas aplicadas, resultaron ser factores de riesgo para adquirir esta parasitosis. De igual forma, también es probable que existan focos de infección de gnathostomosis solo en algunos de los numerosos cuerpos de agua dulce cercanos a la ciudad de Culiacán, que por su aparente poca importancia no se incluyeron en este estudio. Ambas hipótesis concuerdan con la baja prevalencia de la infección detectada en las aves ictiófagas las cuales a pesar de ser grandes consumidoras de peces de agua dulce, solo en el 15.6% de 192 ejemplares estudiados, se logró el aislamiento de larvas L3A de *Gnathostoma*. En estas aves, se detectaron los primeros hospederos naturales de *Gnathostoma* en Sinaloa: *Egretta alba*, ("garzón blanco"), *Ardea herodias* ("garzón cenizo"), *Pelecanus erythrorhynchos* ("pelicano blanco") y *Pelecanus occidentalis* ("pelicano gris").

Cabe hacer notar que la especie *Pelecasmus occidentalis*, se registra por vez primera como hospedero paraténico de *Gnathostoma*; su habitat natural son aguas marinas y su dieta la constituyen organismos de ese ambiente, pero los ejemplares estudiados fueron capturados cuando se alimentaban con peces de agua dulce. Esto quizá se observa como resultado de los cambios ecológicos propiciados por diversos factores, entre ellos la invasión de su habitat por el hombre, interfiriendo en su cadena alimenticia.

En relación con los estudios morfológicos llevados a cabo con las formas parasitarias de larvas L3A y adultos jóvenes de *Gnathostoma*, recuperadas de los casos humanos, hospederos naturales y de las infecciones experimentales en gatos domésticos, se encontró que la especie aislada en Sinaloa, presenta mayor similitud con *G. spinigerum*.

Las larvas L3A mostraron además, características morfológicas similares con especies no identificadas que se han encontrado parasitando cuatro géneros de peces y siete especies de aves ictiófagas en Temascal, Oaxaca, área endémica del padecimiento (104) y con *G. binucleatum* especie aislada de un gato feral en la misma zona geográfica (8).

Con base en la información recabada en este estudio sobre hospederos susceptibles a infecciones experimentales, número de larvas para la inoculación y tiempos de infección, se proyecta obtener adultos maduros, para la identificación definitiva de las especie, ya que la comparación morfológica de estas formas con las especies registradas, hasta ahora, constituye el principal medio para lograrlo.

A través de los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que el ciclo biológico de *Gnathostoma* se encuentra establecido en algunos cuerpos de agua dulce de la zona centro de Sinaloa, que actúan como fuentes de contaminación ocasionando problemas de salud en el hombre. Basado en las observaciones realizadas durante el trabajo de campo, se propone que el ciclo del parásito se puede mantener o dispersar a

través de probables hospederos definitivos como perros, gatos, cerdos, mapaches y tlacuaches que con mucha frecuencia se observaron alimentándose de peces y defecando dentro de los cuerpos de agua dulce estudiados.

Adicionalmente se considera importante la instrumentación de medidas de control para gnathostomosis, dentro de las cuales sería posible aplicar el modelo de estudio epidemiológico propuesto en este trabajo, para detectar zonas de riesgo, ya que esta zoonosis constituye un serio problema de salud pública y sanidad acuícola en la región.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Beaver PC. The nature of visceral *Larva migrans*. *J Parasitol* 1969;55(1):3- 12.
2. Miyazaki I. An Illustrated Book of Helminthic Zoonoses. Tokyo. 1991.
International Medical Foundation of Japan. pp 449.
3. Daengsvang S. A Monograph on the Genus *Gnathostoma* and Gnathostomiasis in Thailand. Southeast Asian Medical Information Center, Tokyo, 1980.
4. Miyazaki I. On the genus *Gnathostoma* and human gnathostomiasis, with special reference to Japan. *Exp Parasitol* 1960;9:338-370.
5. Anderson RC. *Gnathostoma miyazakii*, n. sp. from the otter (*Lutra c. canadensis*) with comments on *G. sociale* (Leidy, 1858) on mink (*Mustela vison*). *Canad J Zool* 1964;42: 249.
6. Le-Van-Hoa, Nguyen-Van-Ai, Ta-Van-Luyen. Gnathostomes et gnathostomose humaine au Viet-Nam. *Bull Soc Path Exot* 1965;58:236.
7. Miyazaki I and Dunn FL. *Gnathostoma malaysiae* sp. n. from rats on Tioman Island, Malaysia (Nematoda: Gnathostomidae). *J Parasitol* 1965;51:382.
8. Almeyda-Artigas RJ. Hallazgo de *Gnathostoma binucleatum* n. sp. (Nematoda: Sprurida) en felinos silvestres y el papel de peces dulceacuícolas y ologhalinos como vectores de la gnatostomiasis humana en la cuenca baja del Río Papaloapan, Oaxaca, Veracruz, México. *An Inst Cienc del Mar y Limnol UNAM* 1991;18:137-155.

9. Akahane H, Lamothe-Argumedo R, Martínez-Cruz JM, Osorio-Sarabia D, García-Prieto L. A morphological observation of the advanced third-stage larvae of Mexican *Gnathostoma*. *Jpn J Parasitol* 1994;43:18-22.
10. Daengsvang S. Human gnathostomiasis in Siam with reference to the method of prevention. *J Parasitol* 1949;35:116-121.
11. Daengsvang S. Gnathostomiasis in Southeast Asia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1981;12:319-32.
12. Babero BB, Shepperson JR. Some helminths of raccoons in Georgia. *J Parasitol* 1958;44:519-532.
13. Ahmad R. Some aspects of parasites of east Pakistan. *Agric Pakist* 1962;3:109-112.
14. Daengsvang S. Further observations on the experimental transmission of *Gnathostoma spinigerum*. *Ann Trop Med Parasit* 1968;62:88.
15. Daengsvang S. Penetration of the skin by *Gnathostoma spinigerum* larvae. *Ann Med Pub Helth* 1970;64:399-408.
16. Huang WC, Bao FX, Koga M, Ishii Y. A survey on *Gnathostoma hispidum* Fedchenko, 1872 in Jiangxi, People's Republic of China. *Jpn J Parasitol* 1986;35:223-227.

17. Wang DB, Li QX, Wang DT, Xia WF, Zhou XY. The epidemiological investigation of *Gnathostoma hispidum* and the research in applying vermicide levamisol phosphate. *J Human Agric Coll* 1986;2:85-93.
18. Chen Q and Lin X. A survey of epidemiology of *Gnathostoma hispidum* and experimental studies of its larvae in animals. *South Asian J Trop Med Pub Health* 1991;22(4):611-617.
19. Akahane H, Iwata K, Miyazaki I. Studies on *Gnathostoma hispidum* Fedchenko, 1872 parasitic in loaches imported from China. *Jpn J Parasitol* 1982;31:507-516.
20. Morita H, Segawa R, Nishiyama T. Gnathostomiasis cases caused by imported loaches. *J Nara Med Assoc* 1984;35:607-619.
21. Miyazaki I. The first finding of *Gnathostoma doloresi* in Japan. *Jpn J Clin Exptl Med* 1950;27:617-619.
22. Ishiwata K, Díaz-Camacho SP, Amrozi, Horii Y, Nawa N and Nawa Y. Gnathostomiasis in wild boars from Japan. *J Wilde Dis* 1998; 34(1):155-157.
23. Sandosham, A A. Malaysian parasites XV. Seven new worms from miscellaneous hosts. *Studies Inst Med Research Malaya* 1953;26:212-226.
24. Chiu JK. *Gnathostoma doloresi* Tubangui, 1925 (Nematoda: Gnathostomidae) found in Formosan wild board. *J F M A* 1959;58:261.

25. Imai J, Asada Y, Horii Y. and Nawa Y. *Gnathostoma doloresi* larvae found in snake, *Agkistrodon halys*, captured in the central part of Miyazaki Prefecture. *Jpn J Parasitol* 1988; 37(6):72-78.
26. Nawa I, Imai J, Horii Y, Ogata K and Otsuka K. *Gnathostoma doloresi* larvae found in *Lepomis macrochirus rafinesque*, a freshwater fish (common name: blue-gill), captured in the central part of Miyazaki Prefecture, Japan. *Jpn J Parasitol* 1993;42(1):40-43.
27. Ishiwata K, Nakao H, Nose R, Komiya M, Hanada S, Enomoto Y and Nawa Y. *Gnathostomiasis* in frog-eating snakes from Japan. *J Wilde Dis* 1997; 33(4):877-879.
28. Nawa I, Imai J, Ogata K and Otsuka K. The first record of confirmed human case of *Gnathostoma doloresi* infection. *J Parasitol* 1989;75:146-149.
29. Ogata K, Imai J and Nawa Y. Three confirmed and five suspected human cases of *Gnathostoma doloresi* infection found in Miyazaki Prefecture, Kyushu. *Jpn J Parasitol* 1988;37: 358-364.
30. Maruyama H, Noda S and Nawa Y. Emerging problems of parasitic diseases in southern Kyushu, Japan. *Jpn J Parasitol* 1996; 45:192-200.
31. Koga M and Ishii Y. Larval gnathostomes found in reptiles in Japan and experimental life cycle of *Gnathostoma nipponicum*. *J Parasitol* 1981;67:565-570.
32. Ando K, Tanaka H, Taniguchi Y, Shimizu M and Kondo K. Two human cases of gnathostomiasis and discovery of a second intermediate host of *Gnathostoma nipponicum* in Japan. *J Parasitol* 1988;74:623-627.

33. Ando K, Tokura H, Matsuoka H, Taylor D and Chinzei Y. Life cycle of *Gnathostoma nipponicum* Yamaguti, 1941. *J Helminthol* 1992;66:53-61.
34. Ando K, Tanaka Y, and Ohkawa C. A survey of geographical distribution of *Gnathostoma nipponicum* in Mie, Nara, Kyoto, and Siga Prefecture, Japan. *Jpn. J Parasitol* 1988;37:263-267.
35. Ando K, Hatsushika R, Akahane H, Matsuoka H, Taylor D, Miura K and Chinzei Y. *Gnathostoma nipponicum* infection in the past human cases in Japan. *Jpn J Parasitol* 1991;40: 184-186.
36. Prommas E and Daensvang S. Preliminary report of a study on the life cycle of *Gnathostoma spinigerum*. *J Parasitol* 1933; 22:180-186.
37. Prommas C and Daensvang S. Feeding experiments on cats with *Gnathostomas spinigerum* larvae obtained from the second intermediate host. *J Parasitol* 1937; 23:115-116.
38. Akahane H, Sano T and Mako T. Morphological differences of the advanced third-stage larvae of *G. spinigerum*, *G. hispidum* and *G. doloresi*. *Jpn J parasitol* 1986; 35:465-467.
39. Martínez-Cruz JM, Bravo-Zamudio R, Aranda-Patracca A y Martínez-Marañón R. La gnathostomiasis en México. *Salud Pùb Mex* 1989;31:541-549.
40. Ollage-Loaiza W. Gnathostomiasis. VII Monografía del Colegio Iberoamericano de Dermatología. Guayaquil, Ecuador. 1985, pp 84.

41. Tudor RC, Blair E. *Gnathostoma spinigerum*: an unusual cause of ocular nematodiasis in the Western Hemisphere. *Am J Ophthalmol* 1971;72:185-190.
42. Punyagupta S, Bunnag T and Juttidata D. Eosinophilic meningitis in Thailand. Clinical and epidemiological characteristics of 162 patients with myeloencephalitis probably caused by *Gnathostoma spinigerum*. *J Neurol Sci* 1990;96(2-3):241-256.
43. Boongird P, Phuapradit P, Siridej N, Chirachariyavej T, Chuahirun S, Vejjajiva A. Neurological manifestations of gnathostomiasis. *J Neurol Sci* 1977;31:279-291.
44. Bovornkitti S, Tandhanand S. A case of spontaneous pneumothorax complicating gnathostomiasis. *Dis Chest* 1959;35:328-331.
45. Hira PR, Neafile R, Prakash B, Tammim L, Behbehani K. Human gnathostomiasis: infection with an immature male *Gnathostoma spinigerum*. *Am J Trop Med Hyg* 1989;41:91-94.
46. Prommas C and Daensvang S. Nine cases of human gnathostomiasis. *Indian Medical Gazette* 1934;69:207-210.
47. Nagler A, Pollack S, Hassoun G, Kerner H, Barzilai D and Lengy J. Human pleuropulmonary gnathostomiasis: a case report from Israel. *Isr J Med Sci* 1983;17:147-149.
48. Nitidandaprabhas P, Hanchansin S and Vongsloesvidhya Y. A case of expectoration of *Gnathostoma spinigerum* in Thailandia. *Am J Trop Med Hyg* 1975;24:557-556.

49. Laohapand T, Sonakul D and Dharamdach A. Gnathostomiasis of the colon simulating malignancy: a case report. *J Med Assoc Thai* 1981; 64:192-195.
50. Sirikulchayanonta V and Chongchitnant N. Gnathostomiasis, a possible etiologic agent of eosinophilic granuloma of the gastrointestinal tract. *Am J Trop Med Hyg* 1979;28:42-44.
51. Kurathong P, Boonprasan C and Kurathong S. An evanescent malignancy-resembling colonic mass: probably due to visceral gnathostomiasis. *J Med Assoc Thai* 1979;62:512-515.
52. Nitidandaprabhas P, Sirikarna A, Harsomburana K and Thepsitthar P. Human urinary gnathostomiasis: a case report from Thailandia. *Am J Trop Med Hyg* 1975;24:49-51.
53. Norcross W, Johson B, Ganiats T and Siedler S. Urinary gnathostomiasis in a Laotian Refugee. *JABFP* 1992;5(5):533-535.
54. Srisongkranm T and Saraya P. Vaginal bleeding caused by *Gnathostoma spinigerum*. Report of a case. *J Med Assoc Thai* 1969;52:631-632.
55. Daensvang S. Gnathostomiasis in Southeast Asia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1981;12:319-332.
56. Yingyoud P and Daensvang S. Experimental treatment of *Gnathostoma spinigerum* infection in mice with thiabendazole. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1983;14:560-561.

57. Yingyourd P, Kulkumthorn M and Yuaykwarmdee N. Study of efficacy of praziquantel therapy in mice fed *Gnathostoma spinigerum* larvae. *Chulalongkorn Med J* 1989;35:349-354.
58. Jaroonvesama N and Harinusuta T. Comparison of quinine with prednisolone in treatment of gnathostomiasis. *J Med Assoc Thai* 1973;56:312-313.
59. Daensvang S. Chemotherapy of gnathostomiasis. *Ann Prog Rept SEATO Med Res Lab* 1972;pp 231.
60. Yingyourd P, Kulkumthorn M and Kraivichian P. A preliminary report on the experimental treatment of *Gnathostoma spinigerum* infection in mice with albendazole. *Chulalongkorn Med J* 1985;29:1083-1095.
61. Kraivichian P, Kulkumthorn M, Yinyourd P, Akarabovorn P and Paireepai Ch. Albendazole for the treatment of human gnathostomiasis. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 1992;86:418-421.
62. Rizzitelli G, Scarabelli G and Veraldi S. Albendazole: a new therapeutic regimen in cutaneous *Larva migrans*. *Int J dermatol* 1997;36(9):700-703.
63. Suntharasamai P, Riganti M, Chittamas S and Desakorn V. Albendazole stimulates outward migration of *Gnathostoma spinigerum* to the dermis in man. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1992;23(4):716-722.
64. Kuri-Con F. Gnathostomiasis en la cuenca del Pánuco, correlación clínico-patológica y avances terapéuticos. Presentado en el I Encuentro Binacional México-Japón sobre Gnathostomosis. Culiacán, Sinaloa, México. 13 de septiembre de 1997.

65. Anantaphruti MT, Nuantanong S and Waikagul J. Effect of ivermectin on experimental gnathostomiasis in rabbits. *Trop Med Parasitol* 1992;43:65-67.
66. Baquera J, Pichardo R y Reyes E. Paniculitis eosinofílica. Morfología de la respuesta tisular en la infección cutánea por larvas terciarias de *Gnathostoma spp.* Presentación en el I Encuentro Binacional México-Japón sobre Gnathostomosis. Culiacán, Sinaloa, Méx. 13 de septiembre de 1997.
67. Adame J and Cohen PR. Eosinophilic paniculitis: diagnostic considerations and evaluation. *J Am acad Dermatol* 1996;34(2):229-234.
68. Uhlikova M, Hubner J, Kolarova L and Polackova M. Immunological studies on larval toxocarosis. *Centr Eur Public Health* 1996;4(4):242-245.
69. Suntharasamai P, Desakorn V, Migasena S, Bunnag D and Harinasuta T. ELISA for immunodiagnosis of human gnathostomiasis. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth* 1985;16:274-278.
70. Taniguchi Y, Ando K, Isoda K, Shimizu M and Sonobe K. Human gnathostomiasis: Successful removal of *Gnathostoma hispidum*. *Inter J Dermatol* 1992;31(3):175-177.
71. Rusnak J and Lucey D. Clinical Gnathostomiasis: Case report and review of the english-language literature. *Clin Infect Dis* 1993;16:33-50.
72. Soesaty M, Ratanasiriwilai W, Suntharasamai P and Sirisinha S. IgE responses in human gnathostomiasis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1987;81:799-802.

73. Kawamura J, Kohri Y and Oka N. Eosinophilic meningoradiculomyelitis cause by *Gnathostoma spinigerum*. *Arch Neurol* 1983;40:583-585.
74. Burjs J, Borsboom G, Reting M, Hilgersom WJ, Vang Wieringen JC, Jansen G and Nijens J. Realtionship between allergic manifestations and *Toxocara* seropositivity: a cross-sectinal study among elementary scholl childre. *Eur Resp J* 1997;10(7):1467-1475.
75. Clark EA and Ledbetter JA. How B and T cell talk to each other. *Nature* 1994;367:425-428.
76. Cox FEG and Liew EY. T cell subsets and citokines in parasitic infections. *Parasitol Today* 1992;8(11):371-374.
77. Moreno-Rodríguez J. Respuesta inmne y mecanismos de autoinmunidad. Noriega Eds. 1a. edic. 1996, Editorial Limusa. pp 51.
78. Tada I, Kawashima K, Nishimura K and Miyahara M. Intradermal reactions with *Gnathostoma nipponicum* antigen. *Jpn J Parasitol* 1966;15:196-199.
79. Suntharasamai P, Desakorn V, Migasena S, Bunnag D and Harinasuta T. ELISA for immunodiagnosis of human gnathostomiasis. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth* 1985;16:274-279.
80. Dharmkrong A, Migasena S, Suntharasamai P, Bunnag D, Priwan R and Sirisinha S. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to *Gnathostoma* antigen in patients with intermittent cutaneous migratory swelling. *J Clin Microbiol*

1986;23:847.

81. Mimori T, Tada I, Kawabata M, Ollague W, Calero G and de Chong Y. Immunodiagnosis of human gnathostomiasis in Ecuador by skin test and ELISA using *Gnathostoma doloresi* antigen. *Jpn J Trop Med Hyg* 1987;15(3):191-193.
82. Tada I, Araki T, Matsuda H, Araki K, Akahane H and Mimori. A study on immunodiagnosis of gnathostomiasis by ELISA and double diffusion with special reference to the antigenicity of *Gnathostoma doloresi*. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth* 1987;18(4):444-448.
83. Nopparatana Ch, Tapchaisri P, Setasubun P, Chaicumpa W and Dekumyoy P. Antibody responses in human gnathostomiasis. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth* 1988;19(2):219-224.
84. Maleewong W, Morakote N, Thamasonthi W, Charuchinda K, Tesana S and Khamboonruang Ch. Serodiagnosis of human gnathostomiasis. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth* 1988;19(2): 201-205.
85. Anataphruti MT. ELISA for diagnosis of gnathostomiasis using antigens from *Gnathostoma doloresi* and *G. spinigerum*. *Southeast Asian J Trop Med Public Hlth* 1989;20:297-304.
86. Morakote N, Nateewatana N, Maleewong W, Uthong T. Anatomical localization of *Gnathostoma spinigerum* larval antigens by an indirect fluorescent antibody test. *Southeast Asian J Trop Med Public Hlth* 1989;20:291-295.
87. Tuntipopipat S, Chawengkirtikul R, Witoonpanich R, Chiemchanya S and Sirisinha

- S. Antigens, antibodies and immune complexes in cerebrospinal fluid of patients with cerebral gnathostomiasis. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth* 1989;20:439-446.
88. Akao N, Ohyama T, Kondo K, Takakura Y. Immunoblot analysis of human gnathostomiasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1989;83(6):635-637.
89. Morakote N, Nateewatana N, Navacharoen W, Jitpimolmard S, Chotmongkol V and Maleewong W. Specificity of antibodies in cerebrospinal fluid of human cerebral Gnathostomiasis cases. *Asian J Trop Med Public Hlth* 1991;22:228-231.
90. Tapchaisri P, Nopparatana Ch, Setasubun P, Chaicumpa W and Setasubun P. Specific antigen of *Gnathostoma spinigerum* for immunodiagnosis of human gnathostomiasis. *Inter J Parasitol* 1991;21(3):315-319.
91. Miyamoto N, Misjima KJ, Nagamoto K, Ishikawa N, Ohashi T, Eto T, Kobayashi T, Maruyama H and Nawa Y. A case report of serologically diagnosed pulmonary Gnathostomiasis. *Jpn J Parasitol* 1994;43(5):397-400.
92. Rojekittikhun W, Saito S, Yamashita T, Watanabe T and Sendo F. Immunohistochemical localization of *Gnathostoma spinigerum* larval antigens by monoclonal antibodies: I. Light microscopy. *Southeast Asian J Trop Med Public Hlth* 1993;24:494-500.
93. Nopparatana Ch, Chaicumpa W, Tapchaisri P, Setasuban P and Ruangkunaporn Y. Towards a suitable antigen for diagnosis of *Gnathostoma spinigerum* infection. *Intern J Parasitol* 1992;22(8):151-156.

94. Tuntipopipat S, Chawengkirtikul R, Witoonpanich R, and Sirisinha S. A simplified method for the fractionation of *Gnathostoma*-specific antigens for serodiagnosis of human gnathostomosis. *J Helmithol* 1993;67:297-304.
95. Pelaez D, Pérez-Reyes R. Gnathostomiasis humana en América. *Rev Latinoamer Microbiol* 1970;12:83-91.
96. Ollage W, Ollague J, Guevara de Veliz A, Peñaherrera S. Human gnathostomiasis in Ecuador (nodular migratory eosinophilic panniculitis): first finding of the parasite in South America. *Int J Dermatol* 1984;23:647-651.
97. Pérez A, Farias L, Chávez C y Estrada R. Gnathostomiasis humana. Informe de cuatro casos con confirmación histológica. *Dermatología Rev Mex* 1995;39(2):77-80.
98. Messina M y Bustamante F. Experiencia del Hospital General de Tepic en gnathostomosis sistémica. Presentado en el I Encuentro Binacional México-Japón sobre Gnathostomosis. Culiacán, Sinaloa, México. Septiembre 1997.
99. Díaz-Camacho SP, Zazueta M, Ponce E, Osuna I, Castro R, Baquera J, Flores A, Willms K, Nawa Y and Akahane H. Clinical manifestations and Immunodiagnosis of Gnathostomosis en Sinaloa, México. *Am J Trop Med Hyg* 1998.(en prensa).
100. Caballero y Caballero E. Estudios helmintológicos de la región oncocercosa de México y la República de Guatemala. *Nematoda An Esc Nal Cien Biol México* 1958;9:61-76.

101. Ortiz Villaseñor A, Sánchez-Albarrán A y Santillán Alarcón S. Helmintofauna del tlacuache *Didelphis virginiana* en los municipios de Cuernavaca y Tepozotlán, Morelos. Memorias del III Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical y 9º Congreso Nacional, de Parasitología. 1990 México D.F.
102. Almeyda J, Mosqueda M y Sánchez E. Ciclo de vida natural y experimental de *Gnathostoma turgidum* Stossich 1902 (Nematoda:Spiruridae) parásito de marsupiales en Temascal Oaxaca. Memorias del XI Congreso Nacional de Zoología. 1991, Mérida, Yucatán.
103. Almeyda J, Acosta VA, Alonso L, Castañeda M and Zarate VR. First record of *Gnathostoma procyonis* Chandler 1942 in México, with a note on larval *G. binucleatum* Almeyda-Artigas 1991 (Nematoda: Spirurida). *Res Rev Parasitol* 1994;54:93-98.
104. Lamothe-Argumedo R, Medina-Vences RL, López-Jiménez S y García-Prieto L. Hallazgo de la forma infectiva de *Gnathostoma sp.* en peces de Temascal, Oaxaca, México. *Ana Inst Biol. Univ Natl Aut Mex Ser Zool* 1989;60(3):311-320.
105. Lamothe-Argumedo R. Hospederos definitivos, intermediarios y paraténicos de *Gnathostoma* en Veracruz y Oaxaca, México. *Cuad Mex Zool* 1997;3(1):22-28.
106. Sheaffer RL, Mendenhall W y Ott L. Elementos de muestreo. Grupo Editorial Iberoamericano. 1987.
107. Beaver PC, Jung RC y Cupp EW. Parasitología Clínica. 2a. edic. Barcelona. Salvat Eds.,1986. pp 803.

- 108.** Ash L, and Orihel T. Parasites: A guide to laboratory procedures and identification. Chicago, 1991 Amer Soc Clin Pathol Press. pp 23.
- 109.** Martin LK and Beaver PC. Evaluation of Kato thick-smear technique for quantitative diagnosis of helminth infections. *Am J Trop Med Hyg* 1968;17:382-391.
- 110.** Lowry OH, Rosebrough HF, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;93:265-275.
- 111.** Itoh M and Sato S. Multi-dot enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of trematodiasis. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 1990;21:471-474.
- 112.** Platt W. Color atlas and textbook of Hematology. 2th edit. Lippincott Co. 1979 United States of America. 88-89, 157-163, pp 414.
- 113.** Karnovsky M.A formaldehyde-glutaraldehyde of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Bioll* 1965;27:137.
- 114.** Imai J, Akahane H, Horiuchi S, Maruyama H and Nawa Y. *Gnathostoma doloresi*: Development of the larvae obtained from snakes *Agkistrodon halys* to adult worms in pig. *Jpn J parasitol* 1989;38(4):221-225.
- 115.** Kahl-Martin Colimon. Fundamentos de epidemiología. Ediciones Díaz de Santos, S.A. 1990, Madrid, España. pp 257.

