

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

**“ESTUDIO SOBRE EL CICLO BIOLÓGICO DE *Gnathostoma
binucleatum* EN CONDICIONES NATURALES Y
EXPERIMENTALES”**

**TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
CÉSAR ALVAREZ GUERRERO**

TUTOR: DR. FERNANDO ALBA HURTADO

**COMITÉ TUTOTAL:
DR. FROYLAN IBARRA VELARDE
DR. GERMINAL JORGE CANTÓ ALARCÓN**

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Generalidades	3
Taxonomía	6
Morfología de larvas L3A	6
Morfología de parásitos adultos de <i>G. spinigerum</i>	7
Ciclo biológico	10
Epidemiología	14
Hospederos definitivos	14
Hospederos intermediarios y paraténicos	15
Patogenia y cuadro clínico en animales	18
Patogenia en humanos	19
Respuesta inmune en pacientes	20
Cuadro clínico en pacientes	20
Diagnóstico	23
Tratamiento	24
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS GENERALES	28
OBJETIVOS PARTICULARES	29
MATERIAL Y MÉTODOS	30
Lugar de realización	30
Muestreo de peces estuarinos	30
Muestreo de aves ictiófagas	31
Muestreo de tortugas	32
Detección de larvas de <i>G. binucleatum</i> en tejido muscular	32
Caracterización de la infección en peces y tortugas	32

Morfometría de larvas de <i>G. binucleatum</i> en peces y tortugas	33
Cortes intestinales de larvas encontradas en peces y tortugas	34
Cortes de larvas enquistadas en músculo de peces y tortugas	34
Efecto de los factores físicos sobre la viabilidad de larvas de <i>Gnathostoma binucleatum</i> .	34 35
Medición de la viabilidad	36
Animales experimentales	36
Diseño de infección experimental en perros y gatos	37
Identificación de nódulos gástricos en vivo	38
Necropsia de animales experimentales	38
Morfometría de parásitos adultos recuperados	38
Estudio secuencial del DNA ribosomal	39
Técnica de digestión artificial	39
Cuantificación y aislamiento de huevos en animales infectados	40
Animales para el estudio inmunológico	40
Obtención de antígenos somáticos de L3A y fases adultas de <i>G. binucleatum</i> .	41
ELISA para determinación de IgG específica a <i>G. binucleatum</i>	41
Obtención de larvas de primer estadio	42
Colección de copépodos y dípteros	43
Infección experimental de copépodos y dípteros	43
Muestreo de mamíferos silvestres	43
Microscopia electrónica de barrido	43
RESULTADOS	45
Peces infectados con larvas L3A de <i>G. binucleatum</i>	45
Aves infectadas con larvas L3A de <i>G. binucleatum</i>	45
Tortugas infectadas con larvas L3A de <i>G. binucleatum</i>	45
Caracterización de la infección en peces y tortugas analizadas	46
Morfometría de larvas obtenidas en peces y tortugas analizadas	46
Morfología de quistes y larvas recuperadas en peces y tortugas	47
Cortes del intestino de larvas L3A, obtenidas de peces y tortugas	48
Alteraciones histopatológicas provocadas por larvas L3A de <i>G.</i>	48

<i>binucleatum</i> en músculo de peces y tortugas.	
Efecto de algunos factores físicos sobre las larvas de <i>G. binucleatum</i>	49
Evaluación experimental en perros infectados con L3A	49
Evaluación experimental en gatos infectados con L3A	50
Identificación de nódulos gástricos en vivo	50
Conteo de huevos en un perro infectado con <i>G. binucleatum</i>	50
Manifestaciones clínicas observadas en animales infectados	51
Morfometría de parásitos adultos recuperados	52
Obtención de larvas de primer estadio	52
Organismos acuáticos infectados con larvas L1	53
Alteraciones histopatológicas provocadas por parásitos adultos	53
Secuenciación del ADN de parásitos adultos	54
Cinética de anticuerpos IgG anti-AgL3A e IgG anti-AgGA en gatos infectados experimentalmente con <i>G. binucleatum</i> .	54
Cinética de anticuerpos IgG anti-AgL3A e IgG anti-AgGA en perros infectados experimentalmente con <i>G. binucleatum</i> .	55
Niveles de anticuerpos IgG anti-AgL3A en perros de zonas endémicas y no endémicas	56
Mamíferos silvestres	56
Microscopia electrónica de barrido	56
Larvas L3A de <i>G. binucleatum</i> .	56
Parásitos adultos de <i>G. binucleatum</i>	57
Huevos de <i>G. binucleatum</i>	58
Cuadros y figuras de resultados	59
DISCUSIONES	86
CONCLUSIONES	96
LITERATURA CITADA	99

ABREVIATURAS

Abundancia	A
Anchura máxima	AM
Ancho del bulbo cefálico	AB
Antígeno de larva de tercer estadio avanzado	AgL3G
Antígeno de gusano adulto	AgGA
Ácido desoxirribonucleico	DNA
Antígeno	Ag
Anticuerpo	Ab
Albúmina sérica bovina	ABS
Bolas de carne molida de pescado	BCMP
Buffer de Carbonato Bicarbonato	BCB
Bióxido de Carbono	CO2
Banco genómico	Genbank
Centímetro	cm
Cloruro de sodio	NaCl
Coproparasitoscópico	CPS
Diferencia entre la cuarta y primera hilera del bulbo cefálico	IV-I
Distancia del ano al extremo posterior	CEP
Densidad óptica	DO
Dodecil sulfato de sodio	SDS
Enzyme-linked immunosorbent assay	ELISA
Gramo	Gr
Geles de poliacrilamida	PAGE
Hospedero intermediario	HI
Hospedero paraténico	HP
Hospedero definitivo	HD
Hospederos analizados	HA
Hospederos parasitados	HP

Intensidad promedio	IP
Intervalo de intensidad	II
Inmunoglobulina tipo G	IgG
Inmunoglobulina tipo E	IgE
Interleucina	IL
Kilogramo	Kg
Kilovoltios	KV
Kilodaltones	KDa
Larva de primer estadio	L1
Larva de segundo estadio	L2
Larva de tercer estadio temprano	L3T
Larva de tercer estadio avanzado	L3A
Longitud total	LT
Largo del bulbo cefálico	LB
Localización de la papila cervical	PC
Longitud de sacos cervicales	LSC
Longitud del esófago	LE
Longitud de espinas reproductivas	LER
Localización de la vulva	LV
Linfocitos cooperadores	Th2
Libra	LB
Molar	M
Micra	μ
Microgramo	μ g
Microlitro	μ l
Marcadores de peso molecular	MPM
Milímetro	mm
Micrómetro	μ m
Mililitro	ml
Miligramo	mg
Número de anillos en el bulbo cefálico	ANB
Número de ganchos por anillo del bulbo cefálico	GPA

Número de estrías transversales	ET
Parásitos encontrados	PE
Prevalencia	P
Patrón de espinas cuticulares	PEC
Patrón de papilas caudales (machos)	PPC
Período de incubación	Pi
Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂
Potencial de hidrogeniones	pH
Revoluciones por minuto	rpm
Reacción en cadena de la polimerasa	PCR
Solución salina amortiguadora de fosfatos	SSAF
Solución reguladora de citratos	SRC
Voltios	V

RESUMEN

La gnathostomosis representa un problema de salud pública en el estado de Nayarit. Una gran cantidad de pacientes infectados con larvas de *Gnathostoma binucleatum* se han diagnosticado clínicamente con gnathostomosis cutánea. Entre 1995 y 2005 se registraron oficialmente 6,328 casos clínicos, lo que ubica al estado de Nayarit como la principal zona endémica del país. Tomando como base los antecedentes, se planteó como objetivo general estudiar el ciclo biológico de *Gnathostoma binucleatum* en condiciones naturales y experimentales en la laguna de Agua Brava, ya que el ciclo no se ha descrito completamente en México, su conocimiento será la base teórica para la formulación de programas de prevención y control de la enfermedad.

En la búsqueda de larvas de tercer estadio avanzado (L3A) de *G. binucleatum*, se muestrearon peces (n = 5,700), aves (n = 31) y tortugas (n = 247) de la laguna de Agua Brava localizada en la zona norte del estado de Nayarit. Las especies de pescado: *Cathorops fuerthi* (4.8%), *Pomadasys macracanthus* (1.8%), *Mugil curema* (2.1%) y *Dormitator latifrons* (2.6%), se encontraron infectadas con larvas de tercer estadio avanzado (L3A) de *G. binucleatum*. Las especies *Oreochromys aureus* y *Chanos chanos* resultaron negativas. Se detectaron L3A en 2 de las aves muestreadas, en *Ardea herodias* (garzón cenizo) se encontró una larva enquistada y en *Casmerodius albus* (garzón blanco) se encontraron tres.

Las especies de tortugas *Kinosternun integrum* (79.1%) y *Trachemys scripta* (52.5%) resultaron infectadas con larvas L3A de *G. binucleatum*. Se muestrearon 13 mapaches y 12 tlacuaches en zonas aledañas a la laguna de Agua Brava, y a la necropsia se revisaron exhaustivamente los órganos de cavidad torácica y abdominal, en especial del aparato gastrointestinal y no se detectaron nódulos o parásitos adultos de la especie en estudio. Para determinar la morfometría de las larvas, se midieron 30 larvas obtenidas de peces y 30 larvas obtenidas de tortugas. No se observaron diferencias morfológicas ni morfométricas entre ellas, por lo que concluimos que se trata de la misma especie. Estudios adicionales de microscopia electrónica de barrido, no revelaron diferencias morfológicas entre larvas y adultos obtenidos de perros y gatos experimentalmente infectados.

L3A obtenidas de pescados y tortugas fueron sometidas a diferentes tratamientos físicos para evaluar su efecto sobre la viabilidad de las mismas. Se observó que la congelación mató a todas las larvas a partir de las 48 horas. La refrigeración eliminó el total de larvas hasta los 30 días. La ebullición mató el total de larvas en 4 minutos. El asado

(tatemado) de pescado mató las larvas a los 40 minutos. Las larvas tratadas con jugo de limón (pH=2.5) murieron a los 5 días de exposición.

Se inocularon por vía oral con L3A de *G. binucleatum*, 8 perros y 13 gatos de 2 a 4 meses de edad y de raza no definida. Se detectaron 3 perros con fases juveniles y uno con parásitos adultos dentro de un nódulo gástrico. Este perro eliminó huevos durante 3.5 meses y el período de prepatencia fue de 5.5 meses. Un fragmento de parásito adulto fue secuenciado (DNA ITS2 ribosomal), las divergencias obtenidas (0.48%) se alinearon con las divergencias del Genbank para *G. binucleatum* y se determinó que la especie correspondió a *G. binucleatum*. Dos de trece gatos resultaron infectados con parásitos juveniles. La inoculación de perros y gatos con L3A de *G. binucleatum* indujo la producción de anticuerpos. Se estandarizó la técnica de ELISA y se obtuvieron las cinéticas de producción de anticuerpos en perros y gatos infectados experimentalmente. Como complemento se comparó la cantidad de anticuerpos séricos de la clase IgG contra antígenos de L3A (AgL3A) y de gusanos adultos (AgGA) de *G. binucleatum* en perros de una zona endémica y perros de una zona libre. Los perros de una zona no endémica presentaron menores ($P>0.05$) niveles de anticuerpos contra AgL3A que los perros de la zona endémica de Nayarit. No se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) de los niveles de anticuerpos contra AgGA entre los perros de la zona endémica y los perros de una zona no endémica

A partir de la eliminación de huevos por el perro infectado, se obtuvieron larvas de primer estadio y se utilizaron para infectar copépodos (*Mesocyclops longicetus*) y larvas de dípteros (Familia: *Chironominae*). Este trabajo aporta datos importantes sobre el ciclo biológico de *Gnathostoma binucleatum* y ofrece alternativas de prevención para el control de la gnathostomosis humana en el estado de Nayarit. Para finalizar, es importante recalcar que la información generada en esta investigación, debe ser aplicada en los sectores relacionados con la salud pública, turismo y la industria pesquera (captura, almacenamiento, transporte, procesamiento y comercialización de pescado), de tal manera que esta se traduzca en un bienestar social para el mejoramiento de la economía y salud de la población del estado de Nayarit.

INTRODUCCIÓN

Generalidades

La gnathostomosis es una zoonosis frecuente en países de Asia, Europa, África y América, principalmente en Tailandia y Japón. El hombre desarrolla la enfermedad por consumir pescado crudo (sushi, sashimi, cebiche, callos) infectado con larvas de tercer estadio avanzado L3A de *Gnathostoma spinigerum*, especie responsable del alto registro de pacientes infectados en Asia. Las manifestaciones clínicas provocadas por la migración errática en el organismo humano, tienen presentación dermatológica, visceral, ocular o neurológica, en este último sitio las consecuencias pueden ser fatales (Miyazaki, 1960; 1991; Peláez y Pérez-Reyes, 1970; Martínez-Cruz *et al.* 1989).

Prommas y Daengsvang (1933; 1937), estudiaron el ciclo biológico de *G. spinigerum* y determinaron que los copépodos *Cyclops* y peces de agua dulce, participan como primeros y segundos hospederos intermediarios. Los anfibios, reptiles y aves silvestres como hospederos paraténicos. Los perros, gatos y felinos silvestres como hospederos definitivos, y el hombre como un hospedero accidental.

Owen (1836), encontró el parásito adulto en estómago de un tigre de bengala fallecido en un zoológico de Londres y lo identificó como *Gnathostoma spinigerum*. A partir de ahí se le encontró parasitando perros, gatos y felinos salvajes en la India, Filipinas, Viet-nam, China, Tailandia, Palestina, Japón, Australia y Siam, (Prommas y Daengsvang, 1933). También se le encontró en leopardos, perros y gatos domésticos en Dacca Bangladesh, (Bashirullah, 1972; Chellappa 1978). En gatos salvajes *Prionodon linsang* de Malasia (Boo, 1976) y en gatos ferales del sur de New Gales, (Beveridge *et al.* 1978). En América se encontraron variantes de esta especie en mapaches *Raccoon spp* del sur de Georgia Estados Unidos, (Babero y Shepersen, 1958; 1959). En tlacuache *Opossum Didelphis marsupialis* de Jaltenango, Chiapas, México (Caballero, 1958) y en perros de Ecuador, (Ollague *et al.* 1988).

Se han identificado más de 20 especies de *Gnathostoma spp*, en distintos países del mundo, de las cuales Daengsvang (1980), reconoce 12 como las únicas válidas, el resto las considera sinónimas de estas y las describe enlistadas con el nombre científico de su especie, el primer descubridor, sitio anatómico de su localización, hospedero definitivo correspondiente y el país de su hallazgo. *Gnathostoma spinigerum*, (Owen, 1836), se encontró en el estómago de un tigre de bengala (*Felis tigris*), en Londres; *Gnathostoma hispidum* (Fedchenko, 1872), en el estómago de cerdos silvestres y domésticos (*Sus scrofa ferus*) y (*Sus scrofa domesticus*) en Turkestan y Hungría; *Gnathostoma turgidum* (Stossich, 1902) en el estómago de tlacuache (*Didelphis azarae*) en Argentina. *Gnathostoma americanum* (Travassos, 1925) en (*Felis tigrina*) de Brasil; *Gnathostoma doloresi* (Tubangui, 1925), en estómago de cerdo doméstico (*Sus scrofa domesticus*) en Filipinas; *Gnathostoma nipponicum* (Yamaguti, 1941), en esófago de comadreja (*Mustela sibirica itatsi*) de Japón. *Gnathostoma procyonis* (Chandler, 1942), en estómago de mapache (*Procyon lotor lotor*) de EE.UU.AA.; *Gnathostoma miyazakii* (Anderson, 1964), en riñón de nutria (*Lutra c. canadensis*) de Ontario Canadá. *Gnathostoma vietnamicum* (Le-van-Hoa, 1965), en riñón de nutria (*Lutra elioti*) de Vietnam. *Gnathostoma malaysiae* (Miyazaki y Dunn, 1965) en estómago de ratas (*Rattus surifer*) de Malasia; *Gnathostoma didelphis* (Chandler, 1932), en hígado de mapaches (*Didelphis virginiana*) de EE.UU.AA.; *Gnathostoma brasiliense* (Ruiz, 1952), en hígado de nutria (*Lutreolina crassicaudata*) de Brasil. Recientemente se identificaron dos nuevas especies de *Gnathostoma* en México: *Gnathostoma binucleatum* (Almeyda-Artigas, 1991), encontrada en estómago de un ocelote (*Felis pardalis*) en la cuenca baja del río Papaloapan, Oaxaca-Veracruz, México y *Gnathostoma lamothei* (Bertoni-Ruiz, et al 2005), en estómago de mapache (*Procyon lotor hernandezii*) en Tlacotalpan, Veracruz, México.

Cinco de las 14 especies identificadas *G. spinigerum*, *G. hispidum*, *G. doloresi*, *G. nipponicum* y *G. binucleatum*, están relacionadas con la gnathostomosis humana, de estas especies *G. spinigerum* es el principal agente etiológico de la gnathostomosis en Asia (Miyazaki, 1954; 1966; 1991) y *G. binucleatum* en México y probablemente en América (Almeyda, 1991; Almeyda, et al. 2000; León Regagnón, et al. 2002).

De acuerdo con Miyazaki (1991), el primer caso clínico de gnathostomosis humana, fue reportado por Levinsen en 1889 en una mujer indígena de la raza Thai en Bangkok Tailandia, provocado por larvas de tercer estadio avanzado L3A de *Gnathostoma spinigerum*, muchos casos mas, fueron registrados en Tailandia, Japón, India, Palestina, Malasia, Corea, Australia, China e Indonesia, teniendo como antecedente el consumo de pescado crudo o parcialmente cocinado como sushi o sashimi Miyazaki, (1966). Estudios epidemiológicos realizados demostraron que las especies (peces) *Ophicephalus argus*, *Misgurnus anguilicaudatus*, *Ciprinus auratus*, (60-100%) y *Gallus gallus domesticus*, participan como vectores de la gnathostomosis en Japón, las ranas y reptiles en Malasia, (Daengsvang, 1980). Las ranas (92%), anguilas (80%) y pescado (37%) en Tailandia (Miyazaki, 1966; Daengsvang, 1982; Wallace and Wuilles, 1989; Salfelder, 1992).

Las especies de *Gnathostoma spp*, que afectan la salud humana en Asia, se han localizado causando daño en la cámara anterior del ojo (Chen, 1949), sistema nervioso central (Chitanondh y Rosen, 1967; Punyagupta *et al.* 1968; Bunnag *et al.* 1970; Boongird *et al.* 1977; Kawamura *et al.* 1983), en mano (Prommas y Daengsvang, 1973), pared abdominal (Margono *et al.* 1978; Ando *et al.* 1988), cérvix uterino (Hadidjaja *et al.* 1979), tórax (Pinkus *et al.* 1981; Sato y Hanada, 1992), en seno (Tesjaroen *et al.* 1990), pulmón (Miyamoto *et al.* 1994).

Los primeros casos clínicos de gnathostomosis en México, fueron registrados por Peláez y Pérez-Reyes (1970). El primer caso se encontró en la cámara anterior del ojo y el segundo en la pared abdominal. En el estado de Sinaloa Baquera, *et al.* (2002), reportó un caso de gnathostomosis ocular, al igual que Barcelata, (1988), en Tierra blanca Veracruz. Dos casos oculares mas fueron registrados en el estado de Aguascalientes (Gómez, *et al.* 2004) y en Acapulco Guerrero se reportaron cuatro casos con confirmación histológica (Pérez-Polito *et al.* 1995). En el contexto mundial se compilaron 61 casos de gnathostomosis ocular de los cuales 33 se presentaron en hombres, 20 en mujeres y en 8 no se señaló el sexo de los pacientes (Lamothe, 2006). Tres casos dermatológicos fueron reportados en el Perú con localización en abdomen, tórax y cara (Villar, 2004). En Baja California y Colima, México; se han registrado pacientes infectados con *Gnathostoma spp*, procedentes del estado de Nayarit (Lamothe, 2003; García, 2005), este fenómeno se

presentó en una paciente de los EE.UU.AA, procedente de Tailandia, denominándosele a ésta como la enfermedad del viajero (Rusnak y Lucey, 1992).

Taxonomía

De acuerdo con Daengsvang (1980), el parásito pertenece al 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), Genero: *Gnathostoma* Owen, (1836).

Morfología de larvas L3A.

Las L3A de *Gnathostoma spinigerum* se localizan enquistadas en músculo de sus hospederos intermediarios y paraténicos, miden de 2 a 4 mm de longitud, la cabeza o bulbo cefálico presenta 4 hileras concéntricas de ganchos con una sola punta que varían en número y tamaño, internamente contiene cuatro bayonetas que se comunican con los sacos cervicales, dentro de los cuales se desplaza un líquido que favorece la dilatación y retracción del bulbo, presenta un estrechamiento cervical denominado cuello, la boca presenta labios fuertes con un par de papilas cada uno y entre ambas papilas se localizan los anfidios o receptores sensoriales (figura 1). La cutícula del cuerpo es transparente, presenta estrías transversales con espinas de una sola punta que en el tercio anterior son más densas y disminuyen gradualmente su tamaño conforme se acercan al extremo posterior, un par de papilas cervicales se localizan en el extremo anterior del parásito en la hilera 14 (Daengsvang, 1982; Miyazaki, 1991).

Dorsalmente al esófago se observan cuatro sacos cervicales, el poro excretor se localiza en la superficie ventral un poco abajo de la papila cervical entre las hileras 20 a 21, el intestino es de conformación gruesa y contiene gránulos de color rojo sangre, el extremo caudal es parcialmente afilado y la abertura anal subterminal (Anantaphruti *et al.* 1982).

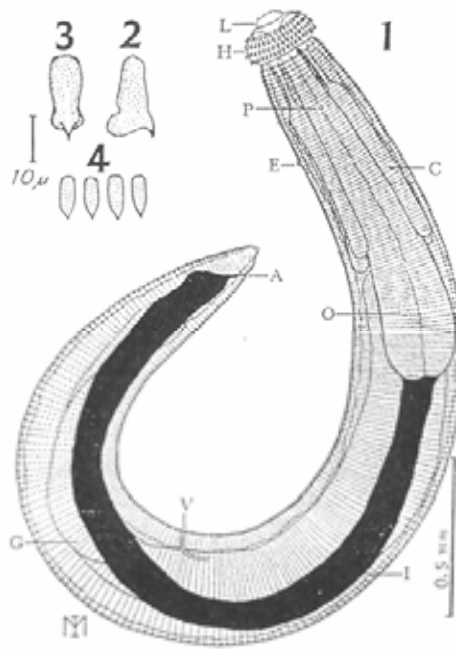


Figura 1. Larva 3 avanzada de *Gnathostoma spinigerum* 1. vista lateral del cuerpo: L: labios C: sacos cervicales G: línea lateral H: bulbo cefálico O: esófago P: papila cervical E: poro excretor I: intestino V: vulva A: ano. 2. - vista lateral de ganchos del bulbo cefálico 3. - vista frontal de ganchos del bulbo cefálico 4. - espinas cuticulares con una sola punta, tomado de Miyazaki, (1954).

Morfología de parásitos adultos de *G. binucleatum*

Los parásitos adultos de *Gnathostoma spinigerum* se localizan formando nódulos en la submucosa gástrica de sus hospederos definitivos (perros, gatos, felinos silvestres), los gusanos machos en mamíferos de talla grande (*Felis tigris*), miden de 11 a 25 mm de longitud y las hembras de 25 a 54 mm, mientras que en mamíferos de talla pequeña, el tamaño de los gusanos es menor (Cheng, 1973; Chester *et al.* 1994).

El bulbo cefálico presenta de 8 a 11 hileras concéntricas de ganchos triangulares agudos y curvos no muy largos de base mas o menos ancha, la boca de posición media en el bulbo, está provista de un par de labios fuertes (trilobulados), cada uno presenta un par de papilas labiales y entre ambas papilas se localizan los anfidios o receptores sensoriales (Faust, 1974). El esófago presenta una porción muscular delgada y otra glandular más ancha, el intestino es un tubo de paredes más o menos gruesas, de color rojo y manchas de color café oscuro (Daengsvang, 1982) .

Los gusanos son de conformación gruesa, de color rojizo (pseudocelóma) y sus extremos se encuentran curvados hacia su posición ventral, el cuerpo presenta estrías transversales con espinas cuticulares que en la región anterior tienen en su mayoría de 3 a 4 puntas y pocas con 5, siendo la espina central mas grande. Estas espinas disminuyen a tres puntas y se extienden mas allá del esófago, hacia la región media disminuyen a 2 y una puntas y conforme se acercan al extremo posterior son mas pequeñas y tienden a desaparecer (Miyazaki, 1954).

El extremo posterior del macho es la región mas importante para identificar las especies de *Gnathostoma* a nivel morfológico, este presenta cuatro pares de papilas laterales de tamaño grande y cuatro pares más pequeñas en posición ventral; la cloaca está desprovista de espinas y presenta un área en forma de Y a través de la cual se observa perfectamente las desembocaduras del intestino y del conducto eyaculador (Figura 2). Un par de espículas copuladoras (desiguales) salen de la cloaca, la mayor mide de 3.5 a 11 mm de longitud y la menor de 0.4 a 1.05 mm (Miyazaki, 1954; 1966).

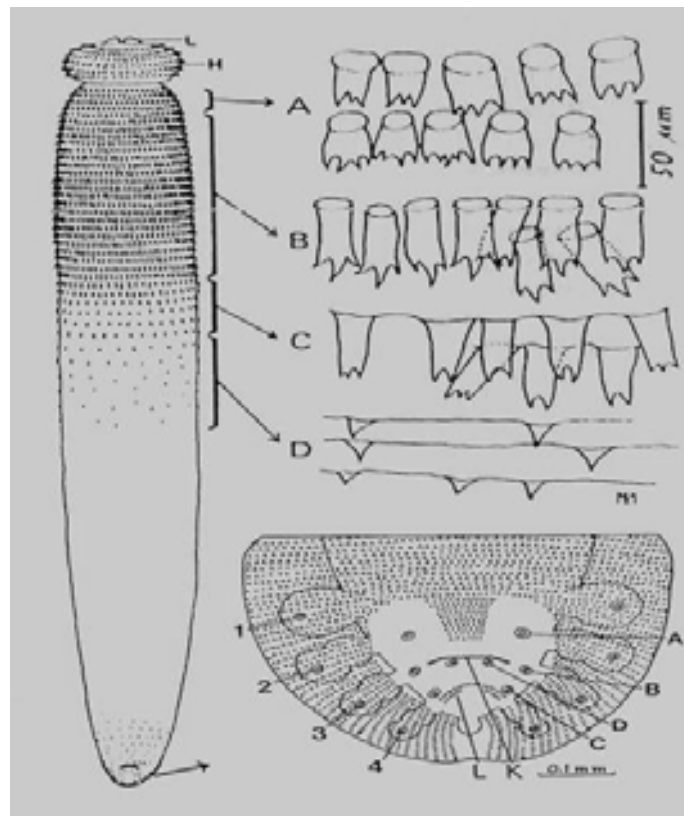


Figura 2. Morfología de un macho adulto de *Gnathostoma spinigerum*. Región anterior: L labios trilobulados, H bulbo cefálico, A, B, C, D, distribución de espinas cuticulares. Extremo posterior: 1-4 papilas laterales grandes y pedunculadas. A, B, C, D, papilas ventrales pequeñas, K abertura cloacal y L líneas espinosas (tomado de Miyazaki, 1960).

El aparato genital masculino está compuesto por un testículo que se une al conducto deferente y la vesícula seminal desemboca en el conducto eyaculador. La hembra presenta una vulva situada en la porción media y ventral del cuerpo, la vagina es larga y el útero doble, (Daengsvang, 1982).

Los huevos son ovales, su color varía de amarillo verdoso a café oscuro y son transparentes, presentan uno o dos blastómeros en el momento de su eliminación, la superficie esta irregularmente marcada con finas granulaciones que a la microscopia de barrido se observan como hoyos (Miyazaki, 1960). El promedio de 100 huevos medidos en perros y gatos varió de 55.9 a 79.0 μm de largo por 34.6 a 42.6 μm de ancho y presentan un opérculo en uno de sus extremos por donde escapa el embrión (Chellappa, 1970).

Las larvas de primer estadio emergen por el opérculo del huevo y son muy activas, están cubiertas con una delicada vaina transparente mas grande que la misma larva, miden aproximadamente 0.3 mm de longitud, y no presenta estriaciones transversales sino arrugas cuticulares (Miyazaki, 1991).

Distintos factores morfológicos son importantes para identificar las especies de *Gnathostoma sp.* a nivel morfológico, en los machos se toma en cuenta el número de hileras concéntricas de ganchos en el bulbo cefálico, localización de la papila cervical, forma y distribución de espinas cuticulares en el cuerpo (patrón de espinas), número de papilas cloacales en el extremo posterior, forma y tamaño de las espículas reproductivas. En las hembras a diferencia de los machos, se toma en cuenta la localización de la vulva y el número de opérculos en los huevos. En la figura 3, se observa que en *G. turgidum* y *G. doloresi* los huevos presentan un par de opérculos y el resto de las especies solo presentan uno (Miyazaki, 1960).

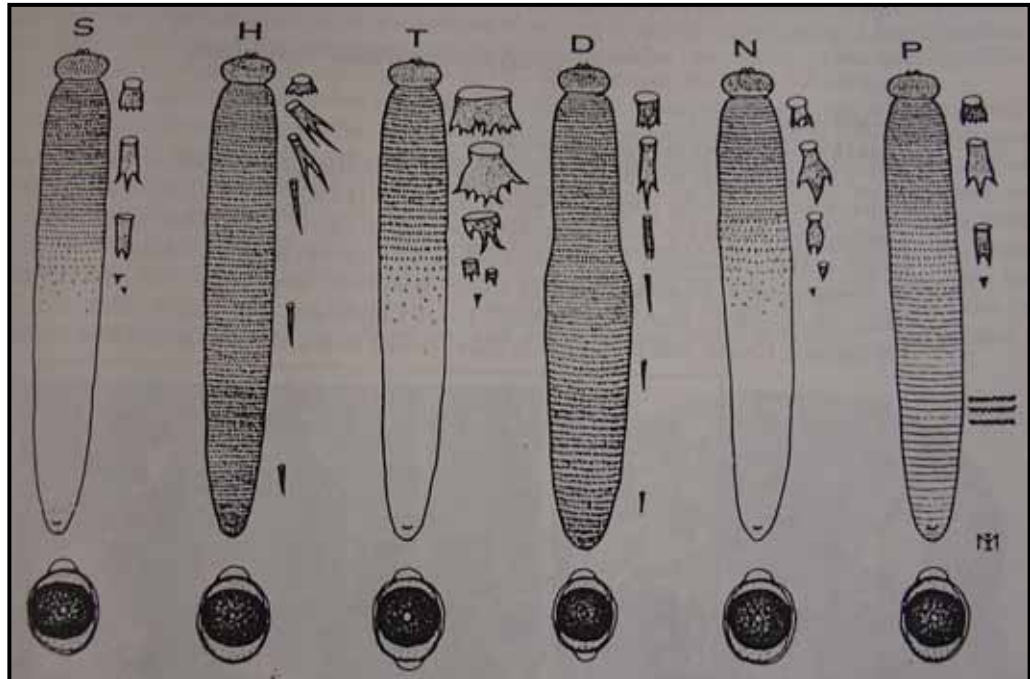


Figura 3. Diferencias morfológicas y patrón de espinas cuticulares entre seis hembras adultas del genero *Gnathostoma*: **s** *G. spinigerum*, **h** *G. hispidum*, **t** *G. turgidum*, **d** *G. doloresi*, **n** *G. nipponicum*, **p** *G. procyonis* (tomado de Miyazaki, 1966).

Ciclo biológico

Gnathostoma spinigerum es el principal agente etiológico de la gnathostomosis animal y humana en países de Asia (Tailandia, Japón). Es la única de las 14 especies identificadas en el mundo, de la cual su ciclo biológico se encuentra claramente estudiado, razón por la cual se utiliza como referencia para describir el resto de las especies del genero *Gnathostoma* en las que su ciclo biológico no se ha descrito completamente, y entre ellas se incluye a la especie *G. binucleatum*. Los perros, gatos, y felinos silvestres participan como hospederos definitivos, desarrollan la enfermedad por consumir peces, anfibios, reptiles o aves silvestres, infectados con L3A que actúan como hospederos intermediarios y paraténicos. Las larvas ingeridas son liberadas de su cubierta quística por acción de los jugos gástricos, e inicialmente atraviesan el estómago para llegar al hígado, y después migran en el tejido conectivo en donde crecen, y ya casi maduras regresan al estómago, perforándolo de nuevo y se establecen en la submucosa en donde forman nódulos, dentro de los cuales maduran a su estadio adulto en un término de 6 a 8 meses después de la

infección, los nódulos se comunican con el lumen gástrico a través de una pequeña abertura de 1 a 2 mm de largo (Prommas y Daengsvang, 1937; Soulsby, 1987; Ollague *et al.* 1984).

Los nematodos sexualmente maduros ahí se reproducen y a través de las heces eliminan huevos fértiles al ambiente a los 100 días o más postinfección, diseminándose en lagos, lagunas, presas, ríos, para continuar su desarrollo, (Miyazaki, 1954).

Los huevos maduran en el agua a 27 °C y en un lapso de 5 a 7 días, liberan larvas de primer estadio (L1), estas larvas presentan una vaina que les confiere protección al ambiente, y miden 0.3 mm de longitud. La larva nada activamente en el agua hasta ser ingerida por los copépodos *Cyclops strenuus*, *Cyclops vicinus*, *Mesocyclops leuckarti* o *Eucyclops serrulatos*, que actúan como primeros hospederos intermediarios (Miyazaki, 1960), de no ser así las larvas mueren en 48 a 72 horas, (Chellappa, 1970). Las larvas ingeridas, continúan su evolución en el hemocéle del crustáceo como larvas de segundo L2 y tercer estadio temprano L3T en 7 a 10 días después de la ingestión, alcanzando una longitud aproximada de 0.5 mm (Prommas y Daengsvang, 1933).

Cuando los crustáceos infectados son ingeridos por peces de agua dulce *Clarias batrachus*, *Ophicephalus striatus*, (Prommas y Daengsvang, 1933; 1936; 1937). *Glossobius giurus*, *Therapon argenteus*, (Africa Refuerzo y García, 1936 a; 1936 b), las L3T son liberadas en el estómago y lo atraviesan para llegar al hígado y en 30 días o más se enquistan en el músculo como larva de tercer estadio avanzado L3A siendo la forma infectiva para el hombre y animales, las larvas permanecen ahí por tiempo indefinido hasta ser ingerida por un hospedero definitivo, donde alcanza su estadio adulto (Miyazaki, 1966).

El ciclo biológico se puede alterar cuando los peces infectados, son devorados por anfibios, reptiles o aves ictiófagas que actúan como hospederos paraténicos o de transporte. En estos animales las larvas se reenquistan en el músculo y permanecen ahí sin evolucionar, pasando de un animal a otro por la depredación, de esta manera se mantiene y propaga la vida del parásito en la naturaleza por un fenómeno conocido como paraténesis, complicando así cualquier medida de prevención y control del nematodo (Miyazaki, 1960).

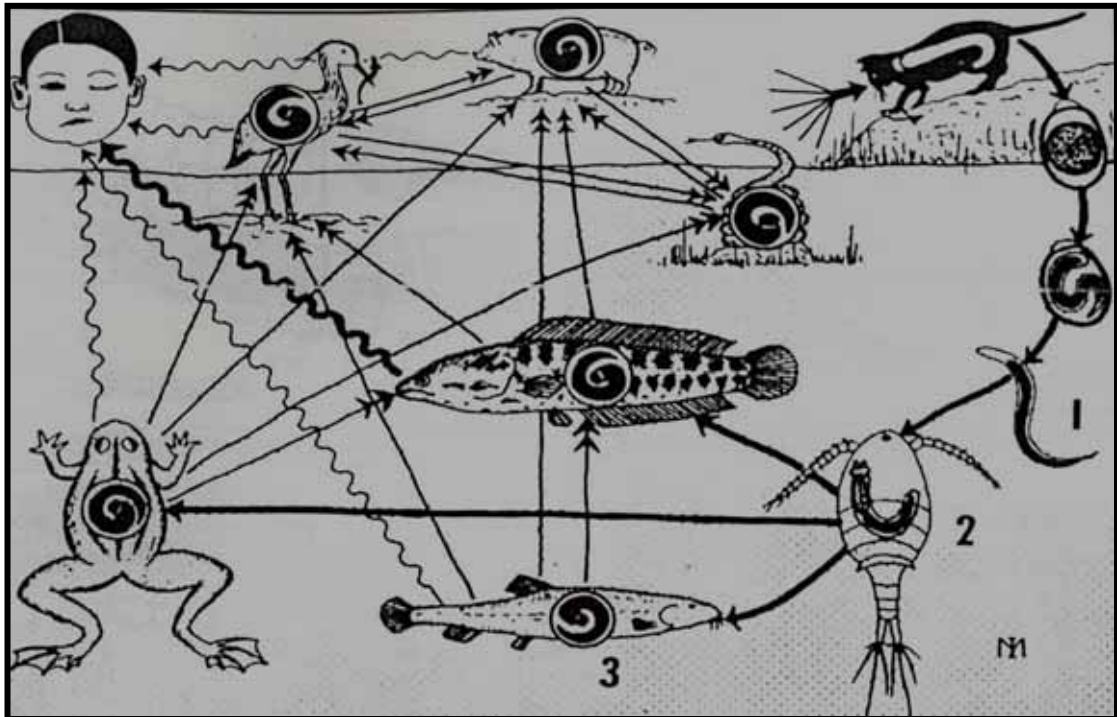


Figura 4. Ciclo biológico de *G. spinigerum*. Los copépodos *Cyclops* y peces de agua dulce, participan como primeros y segundos hospederos intermediarios. Los anfibios, reptiles y aves ictiófagas, participan como hospederos paraténicos. Los perros, gatos y cerdos, participan como hospederos definitivos y el hombre como un hospedero accidental (tomado de Miyazaki, 1991).

El resto de las especies de *Gnathostoma* sp, que tienen importancia médica, son menos frecuentes que *Gnathostoma spinigerum*, de ahí que su ciclo biológico no se conoce completamente, sin embargo usan diferentes hospederos lo que sin duda repercute en diferencias epidemiológicas para cada una de las especies que participan en el ciclo.

Gnathostoma hispidum; los cerdos domésticos (*Sus scrofa domesticus*) y cerdos salvajes (*Sus scrofa ferus*) actúan como hospederos definitivos en países como Hungría, Australia, Vietnam, Taiwán y Japón (Chester, 1994). Las especies de copépodos (*Mesocyclops leuckarti*) y (*Cyclops varicans*), actúan como primeros hospederos intermediarios. Los peces de agua dulce (*Anabas spp*), (*Ophicephalus striatus*) y (*Misgurnus anguillicaudatus*) actúan como segundos hospederos intermediarios para el hombre, (Sato y Hanada, 1992). Los anfibios, reptiles, aves ictiófagas o roedores actúan como hospederos paraténicos. Morfológicamente el parásito adulto es más corpulento que *G. spinigerum*, presenta 10 anillos de ganchos en el bulbo cefálico, las espinas cuticulares se extienden hasta la extremidad caudal (Miyazaki, 1991; Ando et al. 1992).

Gnathostoma doloresi; los cerdos domésticos (*Sus scrofa domesticus*) y cerdos salvajes (*Sus scrofa leucomystax*) actúan como hospederos definitivos en Filipinas, Tailandia, Japón, India, Nueva Guinea, Vietnam, Singapur, Japón y Taiwán (Miyazaki, 1960; Prommas y Daengsvang, 1982). Los copépodos *Mesocyclops leuckarti*, *Eucyclops serrulatus*, *Cyclops vicinus* y *Cyclops strenuus*, actúan como primeros hospederos intermediarios en Japón, (Miyazaki, 1960). Los hospederos intermediarios son peces de agua dulce del género *Lepomis macrochirus* (blue-gill). Los reptiles *Agkistrodon halys* y anfibios actúan como hospederos paraténicos (Ogata, 1988; Nawa 1989). Los machos de esta especie miden de 14 a 18 mm de longitud y las hembras de 20 a 30 mm el bulbo cefálico presenta de 9 a 10 hileras concéntricas de ganchos, el tercio anterior del cuerpo es más delgado que los dos tercios posteriores y los huevos presentan dos opérculos (Miyazaki, 1954).

Gnathostoma nipponicum; las comadreas (*Mustela sibirica itatsi*) y (*Mustela sibirica coreana*), actúan como hospederos definitivos en Japón (Miyazaki, 1960; Ando *et al.* 1992). Los peces de agua dulce (*Misgurnus anguillicaudatus*) y (*Silurus asotus*) importados de Taiwan, China y Corea, actúan como hospederos intermediarios para el hombre (Ando *et al.* 1988).

Los caracteres morfológicos son parecidos a *G. spinigerum* en la extensión de sus espinas cuticulares excepto el extremo posterior, el macho joven presenta 7 hileras concéntricas de ganchos en el bulbo cefálico, las hembras adultas miden de 2.9 a 3.4 cm de longitud y 2.0 a 2.3 cm en los machos. Las L3A de *G. nipponicum* son la única especie que presentan tres hileras concéntricas de ganchos en el bulbo cefálico (Sato y Hanada, 1992). La localización de los nódulos en el estómago varía según la especie de *Gnathostoma*, en la Figura 5 se presenta la localización de las especies estudiadas.

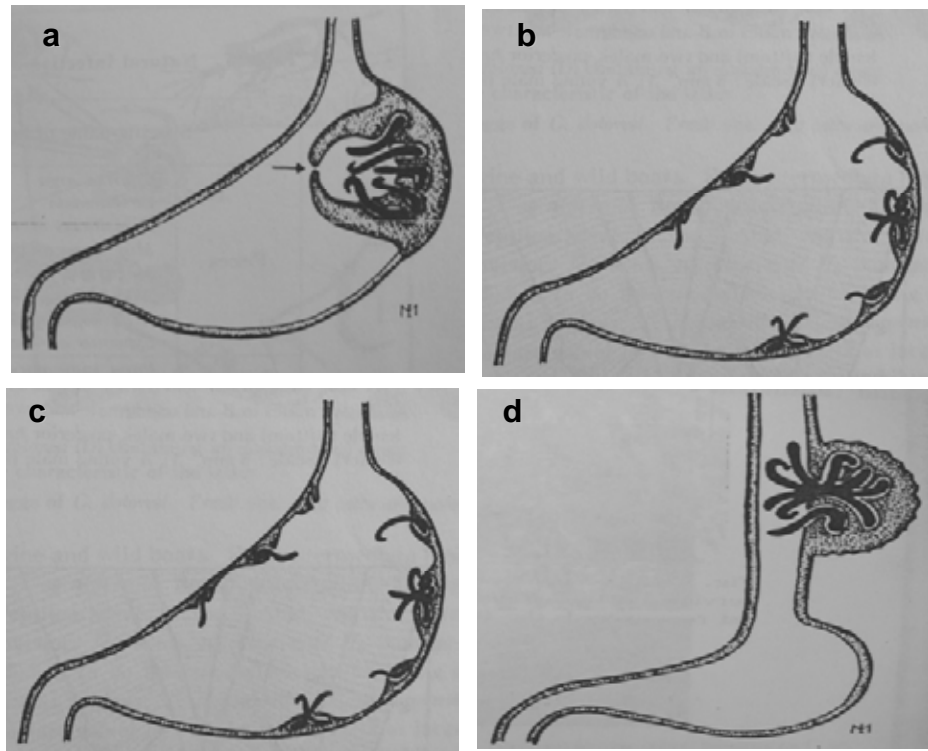


Figura 5. Localización anatómica de nódulos formados, por los gusanos adultos en los hospederos definitivos. **a** *G. spinigerum*, **b** *G. hispidum*, **c** *G. doloresi*, **d** *G. nipponicum* (tomado de Miyazaki, 1966).

Epidemiología

Hospederos definitivos

Una gran variedad de mamíferos, peces, reptiles (acuáticos, terrestres), anfibios y aves silvestres, se han identificado como hospederos definitivos, intermediarios y paraténicos de *Gnathostoma* en países del este y sureste de Asia, principalmente en Tailandia y Japón (Prommas y Daengsvang 1933).

Los hospederos definitivos desarrollan la enfermedad por consumir pescado crudo infectado con larvas L3A de *Gnathostoma spp.* el período de prepatencia es de 3 a 8 meses p.i., los adultos se establecen en la mucosa del estómago causando daño. Las hembras eliminan huevos fértiles en las heces que contaminan los cuerpos de agua con actividad pesquera y en condiciones adecuadas de temperatura, producen larvas de primer estadio

que son comidas por copépodos *Cyclops* y se transforman como L3T. Los copépodos cuando son comidos por organismos acuáticos (peces, ranas, reptiles) las larvas maduran a L3A que son la fase infectante y permanecen enquistadas hasta ser comidas por un hospedero definitivo, en donde alcanzan su estadio adulto (Daengsvang, 1980).

En México Caballero (1958), registró los primeros hallazgos de *Gnathostoma* (2 machos, 1 hembra) en estómago de un tlacuache (*Didelphis marsupialis*) en Jaltenango Chiapas, que equivocadamente identificó como *G. spinigerum*. Acevedo *et al.* (1988), encontraron huevos de *Gnathostoma* en heces de perros y cerdos aledaños a la presa Miguel Alemán en Temascal Oaxaca, dejando el antecedente de dos posibles especies en hospederos definitivos de México. Ortiz Villaseñor *et al.* (1990), identificaron por primera vez en México la especie *Gnathostoma procyonis* en (*Didelphis virginiana*) en Tepoztlán Morelos. Almeyda-Artigas *et al.* (1991), identificaron una nueva especie en estómago de un ocelote (*Felis pardalis*) en la cuenca baja del río Papaloapan Oaxaca-Veracruz México y la denominó *Gnathostoma binucleatum*,. Almeyda-Artigas (1994), identificó la especie *Gnathostoma procyonis*, en un mapache (*Procyon lotor hernandezii*) de Tlacotalpan, Veracruz, México. Lamothe *et al.* (1998), encontraron dos ejemplares de *Gnathostoma turgidum*, en (*Didelphis virginiana*) de Temascal Oaxaca, México. Koga *et al.* (1999), describieron la morfología del parásito adulto de *Gnathostoma binucleatum*, obtenidos de perros inoculados con L3A de pelícanos (*Pelecanus erythrorhynchos*).

Hospederos intermediarios y paraténicos

Lamothe en (1989), encontró la forma infectiva de *Gnathostoma*, en hospederos intermediarios (peces) de la presa Miguel Alemán en Temascal Oaxaca. Se detectaron infectadas las mojarra “tenhuayacas” (*Petenia splendida*) 21.9%, mojarra “castarricas” (*Cichlasoma urophthalmus*) 17.5%, mojarra “criollas” (*Cichlasoma gadovii*) 11.11% y mojarra “tilapias” *Oreochromis* sp, 2.06%. Akahane, (1994), comparó la morfología de larvas mexicanas con larvas de Japón, encontrando similitud con *Gnathostoma spinigerum*. Díaz Camacho *et al.* (1998 a), registraron los primeros hallazgo de larvas de *Gnathostoma* en hospederos paraténicos del estado de Sinaloa, se aislaron 203 parásitos en las aves: (*Egretta alba*, *Ardea herodias*, *Pelecanus erythrorhynchus*, *Pelecanus occidentales*).

Díaz-Camacho *et al.* (2002), determinaron la morfometría de parásitos juveniles, obtenidos de perros y gatos inoculados experimentalmente con larvas L3A de *Gnathostoma spp*, obtenidas de aves y peces en Sinaloa. Kifune *et al.* (2004), encontraron L3A en peces de agua dulce: (*Petenia splendida*, *Cichlasoma managuense*, *Gobiomorus dormitor*), en los pantanos de Centla, Tabasco y se confirmó la especie de *G. binucleatum* por secuenciación del DNA ITS2 ribosomal. Martínez-Salazar *et al.* (2005), confirmaron por estudio morfológico y molecular DNA ITS2 ribosomal la especie de larvas de *G. binucleatum* encontradas en los peces: (*Dormitator latifrons*, *Eleotris picta*, *Gobiomorus maculatus*, *Ariopsis guatemalensis*, *Cichlasoma trimaculatum*), en la laguna de Tres Palos Guerrero,

Los primeros casos clínicos de gnathostomosis humana en México, fueron reportados por Peláez y Pérez Reyes, (1970). Actualmente se han reportado cuatro especies de *Gnathostoma* en mamíferos de México, ellas son: *Gnathostoma procyonis*, *Gnathostoma turgidum*, *Gnathostoma binucleatum* y *Gnathostoma lamothei*, de las cuales se determinó por biología molecular (DNA), que *G. binucleatum* es el agente etiológico de la gnathostomosis humana en los estados de Nayarit, Sinaloa, Veracruz, Tabasco y el estado de Guerrero (Almeyda *et al.* 2000; León Regagnón *et al.* 2002; Kifune *et al.* 2004; Martínez-Salazar y León-Regagnón, 2005; Bertoni *et al.* 2005).

De acuerdo con lo reportado por Lamothe-Argumedo (2003), el registro de casos de gnathostomosis humana es de 1617 en los municipios de Temascal y Tuxtepec Oaxaca; de 450 en Tampico Tamaulipas, de 253 en Tierra Blanca, Uspanapa y Cozoleacaque Veracruz; de 165 en Acapulco y Zihuatanejo Guerrero; de 2000 en Culiacán Sinaloa; de 3 en Mascota y Guadalajara Jalisco; de 1 en ensenada Baja California; de 1 en Tabasco y 3 en el Distrito Federal. Recientemente Gómez *et al.* (2004), reportaron 2 casos clínicos en el estado de Aguascalientes. El sistema único automatizado para la vigilancia epidemiológica (SUAVE) de los Servicios de Salud de Nayarit, reportaron 6328 casos en los años de 1995 al 2005.

La enfermedad es relativamente reciente en México, su difusión en la población urbana se ha relacionado con la popularidad de consumir cebiche o callos, platillos que se preparan con carne cruda de peces de agua dulce, las especies que más se utilizan para este fin, son las comúnmente llamados mojarras y que corresponden a las especies *Petenia splendida*, *Cichlasoma urophthalmus*, *Cichlasoma gadovii* y *Oreochromis sp*, (Lamothe *et*

al. 1989). Muchos de estos peces se introdujeron hace pocos años a los lagos, lagunas, presas y esteros, con el fin de favorecer la economía de los pobladores ribereños. Es importante valorar el impacto del consumo de sushi y de otros platillos asiáticos preparados con pescado crudo que han alcanzado gran popularidad en México, (Martínez Cruz *et al.* 1989; Rojas *et al.* 1994).

La gnatostomosis representa un problema serio de salud pública en el estado de Nayarit, de acuerdo con las estadísticas oficiales el número de casos clínicos registrados durante los años de 1995 al 2005 fueron: 209, 996, 897, 730, 795, 1083, 603, 513, 228, 169 y 105 respectivamente (SUAVE; Sistema único automatizado para la vigilancia epidemiológica: Secretaría de Salud de Nayarit 1995-2005). Este programa recibe y procesa la información de todo el sector salud estatal (IMSS, ISSSTE, SSN, DIF, IMSS-COPLAMAR) sin considerar la consulta privada. A diez años de su primer registro, el número de pacientes infectados es de 6328 casos, que ubican al estado de Nayarit en el primer lugar nacional. Las lesiones observadas fueron de tipo edematosas, pruriginosas, eritematosas y serpiginosas, con características muy similares a las reportadas en *G. spinigerum* (Miyazaki, 1954; 1960;1966;1991; Prommas y Daengsvang, 1980;1982). La enfermedad se encuentra distribuida en 15 de los 21 municipios que integran el estado, siendo los más frecuentes los municipios de Tepic, Santiago Ixcuintla, Acaponeta, Tecuala y Xalisco. Los grupos de edad mayormente afectados oscilan entre los 25 a 44 años de edad, se siguen registrando casos clínicos en la población sin encontrar el mecanismo adecuado para su control ya que no se cuenta con diagnósticos y medicamentos específicos (Alvarez-Guerrero y Lamothe-Argumedo, 2002).

Las lesiones provocadas por L3A de *Gnathostoma sp* en 1305 pacientes diagnosticados clínicamente en el hospital general de Tepic, determinaron que el 46% se localizaron en el tronco, el 21% en miembros superiores, 17% en miembros inferiores, 16% en la cabeza y 1% en el cuello (Messina-Robles y Bustamante-Martínez, 2002)

Los primeros estudios epidemiológicos realizados en el estado de Nayarit por Alvarez-Guerrero, (2000 a) Alvarez-Guerrero y Lamothe-Argumedo (2000 b); registraron el hallazgo de la forma infectiva L3A de *Gnathostoma spp* en peces estuarinos: *Cathorops fuerthi* y *Dormitator latifrons*. En aves ictiófagas: *Pelecanus erythrorhynchus*, *Ardea herodias* y *Phalacrocorax olivaceus*. Se detectó el foco de infección de L3A de

Gnathostoma spp, en pescaderías de la ciudad de Tepic, que comercializan carne molida para elaboración de cebiche. En colaboración con médicos de la consulta privada, se recuperaron cinco larvas en cinco pacientes diagnosticados clínicamente con gnathostomosis cutánea. Dos parásitos adultos se encontraron en estómago de un gato doméstico que era alimentado con desechos de pescado, del cual se observaron huevos con un opérculo y se determinó a la laguna de Agua Brava como la primera zona endémica del estado de Nayarit. En colaboración con la Dra. León-Regagnón *et al.* (2002) se estudiaron las secuencias del DNA ITS2 ribosomal de larvas obtenidas de peces y humanos de los estados de Sinaloa y Nayarit, los resultados de las secuencias realizadas determinaron que corresponden a la especie *Gnathostoma binucleatum*.

Patogenia y cuadro clínico en animales

Los hospederos definitivos, desarrollan la enfermedad por consumir pescado crudo infectado con larvas L3A de *Gnathostoma sp*. Las larvas en el estómago se desenquistan e inicialmente lo atraviesan y se establecen en el hígado. La migración por el parénquima hepático, deja tras ella cicatrices blanquecinas de tipo fibróticas sobre la superficie y repletas de material necrótico. Las lesiones provocadas en órganos y tejidos no están del todo bien definidas, Las alteraciones agudas son producidas por una gran cantidad de larvas ingeridas y la sintomatología es proporcional al órgano afectado. Las larvas después de migrar en el tejido conectivo regresan al estómago, perforándolo nuevamente y se establecen en él formando nódulos fibrosos con cavidades llenas de un líquido mucosanguinolento pudiendo contener hasta nueve gusanos cada uno. Los nódulos tienen comunicación con el lumen gástrico a través de un diminuto canal y los gusanos pueden producir peritonitis cuando perforan la cavidad peritoneal, este parásito es muy patógeno para el gato y generalmente producen la muerte del hospedador (Soulsby, 1987).

Los animales usualmente muestran uno o dos nódulos gástricos redondeados, fácilmente visibles en la cavidad peritoneal y su tamaño depende del número de gusanos que contiene. Superficialmente al nódulo los vasos sanguíneos están congestionados y sobre la mucosa se observa una o dos aberturas a través de las cuales el parásito se

comunica con el lumen gástrico. Raramente se observa un orificio sobre la superficie del nódulo, probablemente causado por la penetración del parásito y a veces uno o dos gusanos adultos son vistos en la cavidad peritoneal. El máximo número de gusanos encontrados en un perro naturalmente infectado, fue de 47 y el tamaño del nódulo de 3 cm de diámetro. Microscópicamente se observa tejido conectivo con proliferación de vasos sanguíneos e infiltración de células mononucleares y células eosinófilas en algunos sitios. Experimentos realizados en gatos sin la presencia de parásitos adultos no existieron cambios patológicos aparentes en el tejido nodular, experimentos realizados en gatos infectados demostraron una cura espontánea que varió de 235 a 554 días p.i (Daengsvang, 1982).

Patogenia en humanos

En la piel las alteraciones iniciales se presentan durante los primeros días después de la infección. Se caracterizan por un infiltrado perivascular superficial y profundo con presencia de linfocitos y escasos eosinófilos, posteriormente estos se incrementan alrededor de los adipositos y de los septos interlobulares, con zonas de hemorragia. En el panículo adiposo se observa un gran infiltrado inflamatorio con predominio de eosinófilos, los linfocitos son escasos y existen grandes zonas con hemorragias (Ollague *et al.* 1984; 1985; Díaz-Camacho *et al.* 1998).

Muchos síntomas de la gnathostomosis humana, pueden explicarse por la acción de la llamada toxina del *Gnathostoma* que está compuesta por una sustancia hemolítica, similar a la acetilcolina, un factor de difusión que contiene hialurodinasa y una enzima proteolítica, la migración del parásito se realiza merced a este factor de difusión y a los movimientos de bayoneta del bulbo cefálico y la reacción inmunológica del hospedero, que se traduce en un proceso inflamatorio. El parásito puede permanecer hasta 10 años en el organismo humano, hasta que la larva es eliminada o muere en los tejidos, (Miyazaki, 1966; 1991).

Respuesta inmune en pacientes

En relación con la respuesta inmune humoral, al igual que *Toxocara canis*, nematodo que ocasiona un síndrome de *larva migrans visceral*, *Gnathostoma spp* induce la síntesis de anticuerpos específicos al menos de las clases IgG e IgE. En ambas parasitosis, se ha comprobado elevación de la IgE sérica total y eosinofilia. Además, en toxocariosis se ha observado asociación de seropositividad con manifestaciones alérgicas como asma o bronquitis recurrente y dermatitis por contacto con animales (Díaz-camacho, et al. 2000)

Durante la migración por los tejidos del huésped, *Gnathostoma* induce una respuesta inmune-humoral y celular tipo Th2, con liberación de interleucinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) así como el factor estimulador de colonias granulocíticas y monocíticas (GM-CSF), que induce producción de IgE por las células plasmáticas, generando la producción de eosinófilos y su maduración (Vazquez Tsuji, et al. 2006).

El conocimiento que se tiene de los antígenos específicos responsables de la respuesta inmune del hospedero, su localización y la forma en que son transportados al exterior es limitado. Tanto el extracto somático crudo como los productos de excreción/secreción del estadio L3 de *G. spinigerum*, analizados por electroforesis (SDS-PAGE), exhiben perfiles proteicos muy complicados, cada uno de ellos con más de veinte polipéptidos de pesos moleculares que oscilan de 14 a 200 kd (Nopparatana et al. 1991).

Los resultados del análisis inmunohistoquímico sugieren que existen antígenos que comparten epítopes comunes en diferentes estructuras de la larva y que las secreciones intestinales parecen tener un papel potencial como sustancias inmunogénicas principales. Se han identificado componentes inmunoreactivos específicos de peso molecular menor a 29 KD, cuya importancia radica principalmente en su utilidad para el inmunodiagnóstico (Camargo, et al. 1992).

Cuadro clínico en pacientes

En el hombre las larvas de *Gnathostoma sp* ingeridas a través de pescado crudo (sushi, sashimi, cebiche o callos), se desenquistan en el estómago, lo atraviesan y se establecen en el hígado por un corto tiempo y entre 15 a 30 días después de la ingestión, se

presenta alguna de las cuatro formas de *larva migrans* con manifestación clínica en tejido subcutáneo, vísceras, ojo o cerebro, (Miyazaki, 1966).

Gnathostomosis cutánea

Es la forma más frecuente y menos grave, aparece en cualquier parte del cuerpo y tiene cuatro formas de presentación:

A) edematosa o reptante, se le conoce como paniculitis nodular migratoria eosinofílica, se presenta como una placa edematosa, migratoria intermitente y eritematosa de 1 a 10 cm de diámetro, indurada y caliente al tacto, acompañada de dolor o prurito, Ollague *et al.* 1984). el edema puede persistir con remisiones y exacerbaciones esporádicas, en donde la lesión desaparece temporalmente y después de una latencia de días, meses o años, reaparece en el mismo sitio o sitio distante al de origen, (Miyazaki, 1960; Tesjaroen *et al.* 1990; B)

serpiginosa o profunda, la migración larvaria en el tejido subcutáneo no provoca reacción inflamatoria, solo deja un trayecto sinuoso u obscuro a manera de túnel como ocurre con *Ancylostoma caninum* y *Ancylostoma brasiliense*, *Ancylostoma ceylanicum* o *Strongyloides stercoralis*, llamada dermatitis reptante, (Miyazaki, 1991), las lesiones producidas por *Gnathostoma sp*, no son tan sinuosas, sino mas rectas y anchas Lamothe, 1999; Rojas *et al.* 1994).

C) pseudofurunculosa, la placa inflamatoria (edematosa) disminuye su tamaño, superficialmente se observa un pequeño nódulo de color obscuro y en ocasiones con necrosis central, por donde puede emerger el parásito permitiendo el diagnóstico de certeza, siempre y cuando no exista más de una larva en el organismo (Daengsvang, 1982; Miyazaki, 1966).

D) mixta, se puede presentar en pacientes con una infección aguda, con entrada de una gran cantidad de larvas que pueden provocar una combinación de síntomas (Díaz-Camacho *et al.* 1998).

Gnathostomosis visceral

Las larvas en su migración por la cavidad torácica pueden desencadenar neumotórax espontáneo, derrame pleural, afección pericárdica o dificultad respiratoria con opacidad neumónica y expulsión del parásito con los accesos de tos que provoca, (Miyamoto *et al.* 1994). En la cavidad abdominal las lesiones se presentan con dolor epigástrico, lesiones hepáticas, distensión abdominal y náuseas, producto de la migración del parásito (Miyazaki 1991). En el aparato reproductor se ha detectado cervicitis crónica, vaginitis, sangrado vaginal Hadidjaja *et al.* (1979), daños urológicos, infección transplacentaria y balanitis asociadas al parásito Pinkus *et al.* (1981).

Gnathostomosis ocular

Se ha observado que las larvas en su migración pueden afectar la cara o cuero cabelludo y al desplazarse provocar un intenso edema inflamatorio en párpados, conjuntiva ocular y acompañarse de cefalea, dolor ocular violento cuando el parásito penetra el globo ocular, Pélaez y Pérez-Reyes (1970), situándose en la cámara anterior produciendo uveítis anterior aguda Lamothe, (2006), glaucoma secundario, hemorragias en retina y vítreo hasta ocurrir pérdida de la visión (Baquera, *et al.* 2002).

Gnathostomosis neurológica

Esta forma de presentación es mas frecuente en Tailandia y Japón, por lo general se presenta con daños fatales e irreversibles, el parásito penetra el conducto raquídeo y posteriormente a la cavidad craneana a través del agujero occipital, provocando a su paso lesiones necróticas y hemorragias en médula y encéfalo Chitanondh y Rosen (1967). La meningitis eosinofílica ha sido ampliamente distribuida en pacientes del este y sureste de Asia, principalmente en Tailandia. La mayor manifestación de este desorden se presenta con dolor de cabeza con o sin signos de irritación meningeal, parestesia de tronco y extremidades inferiores y parálisis facial (Punyagupta, *et al* 1968).

En la mieloencefalitis eosinofílica, se han detectado hemorragias prominentes intracerebrales e interventriculares y áreas necróticas, (Bunnag, *et al.* 1970).

En la encefalomiелitis y radiculomiелitis eosinofílica, clínicamente el paciente cursa con dolores radiculares, parestesias en tronco, miembros inferiores, trastornos medulares variables y complejos, alteración de los reflejos osteotendinosos en miembros inferiores Kawamura *et al.* (1983), paraplejia, retención de orina, afección de pares craneales VI y VII, parálisis facial, nistagmo, cefalea, fiebre, confusión, estado comatoso y muerte del paciente (Daengsvang, 1982; Miyazaki, 1991).

Diagnóstico

El diagnóstico humano mas frecuente es clínico y en el se toma en cuenta: la inflamación subcutánea, que el paciente proceda de zona endémica y que en él exista el antecedente de consumir cebiche de pescado crudo, colateralmente se toma muestra sanguínea para su valoración, leucocitosis superiores a 10,000 y eosinofilia mayor de 50% son frecuentes en etapas tempranas de la enfermedad, estos resultados aunque no son patognomónicos son muy útiles para el diagnóstico, (Miyazaki, 1960).

La intradermorreacción es de mucha utilidad para el diagnóstico. En Japón se han utilizado 0.05 ml de una solución salina en concentración 1: 50,000 del antígeno, preparado a partir de larvas o parásitos adultos de *Gnathostoma spinigerum* o *Gnathostoma doloresi* inyectado intracutaneo y 15 minutos después, se forma una pápula mayor de 10 cm rodeada de una areola de color rojo, reportándose como positivo. La reacción de precipitación en suero de pacientes infectados, es también una medida valuable para el diagnóstico de gnathostomosis. (Miyazaki, 1991).

Las larvas o fragmentos obtenidos por biopsia o cirugía de piel, se diagnostican de acuerdo a las características morfológicas de su especie y se comparan con la morfología de otros nematodos tisulares, estableciendo el diagnóstico de certeza (Daengsvang, 1980).

Actualmente se han implementado técnicas inmunológicas como hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia, doble inmunodifusión, radioinmunoensayo, ELISA y Western blot para el diagnóstico serológico de la gnathostomosis humana, a partir de extractos crudos obtenidos de larvas y parásitos adultos, estas técnicas podrían tener la misma utilidad para el diagnóstico de la gnathostomosis en los animales (Nopparatana, *et al* 1991; Tapchaisri, *et al.* 1991)

En los hospederos definitivos, se han utilizado técnicas coproparasitoscópicas de Faust y Mc Master, para el diagnóstico de la gnathostomosis animal, la primera técnica facilita la identificación morfológica de huevos de *Gnathostoma spp*, y la segunda para la cuantificación de los mismos (Alvarez Guerrero, 2000 b; koga, *et al.* 1999).

En los hospederos intermediarios y paraténicos, (peces, aves, reptiles, anfibios), se ha utilizado la técnica de compresión, con la cual se recuperan L3A de *Gnathostoma spp*, que se encuentran enquistadas en el músculo, (Miyazaki, 1960; Nawa, *et al.* 1993).

Tratamiento

Varios antihelmínticos han sido evaluados en ratones infectados experimentalmente con larvas L3A de *Gnathostoma spinigerum* para el control de la gnathostomosis, con resultados terapéuticos no satisfactorios, entre ellos el bitionol, tiabendazol, niridazole, banocide, hetol combinado con niridazole, fouadin, metronidazol, dihidroemetina, metrifonate, astiban, lucanthone, hycanthone, solución de lugol y trodax, prazicuantel (Daengsvang, 1980; Miyazaki, 1991).

Aunque no existe tratamiento específico para el control de la gnathostomosis humana, el mejor tratamiento fue la remoción quirúrgica del parásito, sobre todo cuando se localiza superficialmente en la piel. En raras ocasiones el gusano emerge a través de la piel, pero en la mayoría de los casos si el paciente no recibe tratamiento, el gusano sobrevive en el organismo hasta por diez años (Miyazaki, 1966). La extracción del parásito puede significar la cura en los pacientes, siempre y cuando no exista mas de una larva en el organismo, sin embargo su uso es poco exitoso, debido al rápido desplazamiento del parásito en los tejidos (Daengsvang, 1980).

El medicamento de mayor uso es Albendazol, la dosis utilizada es de 400 a 800 mg/21 días, sin embargo se han observado recidivas en pacientes, el antihelmíntico tiene la cualidad de estimular la migración larvaria de tejidos profundos a tejidos superficiales de la piel, para facilitar su extracción quirúrgica, (kraivichian *et al.* 1992).

Evaluaciones realizadas en pacientes tratados con una sola dosis oral de 400 mg de albendazol y 12 mg con ivermectina, se observó una eficacia del 46% en el primer caso y de 100% en el segundo. Sin embargo la eficacia del albendazol se incrementa de 75 a 89 % cuando se utiliza a dosis repetidas, (Caumes *et al.* 1993).

Los medicamentos mas utilizados para el control de la gnathostomosis en el estado de Nayarit, han sido el albendazol y la ivermectina. El primero se utiliza a dosis de 400 mg por 21 días en dos tomas de 200 mg c/u. (mañana, tarde). El segundo se utiliza a dosis única de 12 Mg, sin embargo; con albendazol se han observado recidivas mayores al 20% y de 5 a 10% con ivermectina, otros fármacos como el metronidazol, nitasoxanida, levamisol y prazicuantel se han utilizado con poco éxito (Alvarez-Guerrero, datos por publicar).

En los animales el disofenol parenteral utilizado en dosis de .2 ml por kg de peso corporal, arrojó buenos resultados en el tratamiento de parásitos adultos (Daengsvang, 1982). El mismo compuesto utilizado en 12 dosis de 0.1 ml/kg aplicado subcutáneamente a 10 días de intervalos, resultó efectivo contra las larvas migrantes en los gatos (Rusnak and Lucey, 1992).

JUSTIFICACIÓN

La gnathostomosis humana se encuentra distribuida en once estados de la República Mexicana, entre los más afectados se encuentra el estado de Nayarit en donde se han registrado 6328 casos clínicos en diez años (1995–2005) y en donde se pudo identificar la especie involucrada, la cual correspondió a *Gnathostoma binucleatum*, por lo que estudiar el ciclo en este estado, no solo es de interés local, sino que permitirá generar conocimiento para entender su comportamiento en la naturaleza.

Los conocimientos actuales sobre este género, giran en el entorno a *G. spinigerum*, sin embargo como se ha demostrado, las otras especies restantes tienen diferentes particularidades, por ejemplo tienen diferentes hospederos definitivos e intermediarios lo que sin duda modifica las características epidemiológicas para la presentación del parásito.

HIPÓTESIS

Tomando en cuenta los hallazgos previos del agente etiológico en la zona, se presupone que el ciclo biológico de *Gnatostoma binucleatum* se encuentra establecido en la laguna de Agua Brava, principal zona endémica del estado de Nayarit.

OBJETIVOS GENERALES

Estudiar el ciclo biológico de *Gnathostoma binucleatum* en condiciones naturales y experimentales en la laguna de Agua Brava, principal zona endémica del estado de Nayarit.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar si las principales especies comerciales de peces capturados en esteros de la laguna de Agua Brava, participan como segundos hospederos intermediarios de *Gnathostoma binucleatum*.
- 2) Determinar si las tortugas y algunas aves que se alimentan de peces de la laguna de Agua Brava, actúan como hospederos paraténicos de *G. binucleatum*.
- 3) Evaluar la viabilidad de L3A de *G. binucleatum* obtenidas de peces y tortugas, bajo el efecto de diversos tratamientos físicos.
- 4) Infectar perros y gatos con L3A de *G. binucleatum* para determinar si participan como hospederos definitivos, y evaluar experimentalmente la infección.
- 5) Determinar si los mapaches y tlacuaches que se alimentan de peces de la laguna de Agua Brava, participan como hospederos definitivos de *G. binucleatum*.
- 6) Infectar experimentalmente copépodos y larvas de dípteros, con larvas de primer estadio obtenidas por incubación de huevos, para determinar si participan como primeros hospederos intermediarios de *G. binucleatum*.
- 7) Caracterizar morfométricamente los huevos, larvas y parásitos adultos de *G. binucleatum*, recuperados de hospederos silvestres y de las infecciones experimentales, utilizando microscopía óptica y electrónica de barrido.

MATERIALES Y METODOS

Lugar de realización

Laboratorio de Parasitología. Dirección de Investigación Científica y postgrado. Universidad Autónoma de Nayarit.

Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC). Universidad Nacional Autónoma de México.

El trabajo de campo se realizó en comunidades pesqueras aledañas a la laguna de Agua Brava, este complejo lagunar se localiza en la zona norte del estado de Nayarit y colinda al sur con el estado de Sinaloa, se ubica entre los paralelos 22° 04' y 22° 35' latitud norte y los meridianos 105° 20' y 105° 50' longitud oeste. Al norte esta limitado por el estero el Mezcal y la laguna de Agua Grande Sinaloa, al sur por las marismas de Canoas y la laguna de Pericos Nayarit. El sistema se encuentra integrado por la boca de Teacapán y Palmar de Cuátla, esta última es una boca artificial abierta en 1977 para enriquecer la ictiofauna de las lagunas, ambas bocas se comunican con el Océano Pacífico. En la laguna de Agua Brava existen mas de 76 especies de peces, de los cuales 18 son dominantes por su amplia distribución, alta frecuencia y abundancia, la dinámica de la comunidad de peces se encuentra en relación estrecha con la descarga pluvial y otros componentes ambientales (Amescua y Castillo, 1992).

Muestreo de peces estuarinos

Se calculó el tamaño mínimo de muestra de los peces para evaluar la infección y se determinó con base en un muestreo preliminar de 100 peces *Cathorops fuerthi*, utilizando la formula para proporciones en poblaciones infinitas (Cochram, 1982).

$$n = \frac{Z^2 (p) (q)}{d^2} ; \quad d^2 = \frac{Z^2 (p) (q)}{n}$$

El tamaño calculado fue de 91 peces, sin embargo para aumentar la confianza se muestreó un mínimo de 300 ejemplares por especie y un máximo de 600.

Se muestrearon 5,700 peces estuarinos en la búsqueda de L3A de *G. binucleatum* como probables hospederos intermediarios de este parásito en el estado de Nayarit, de los cuales 3000 fueron *Cathorops fuerthi* (chihuiles), 600 *Pomadasys macracanthus* (burros), 600 *Mugil curema* (lisetas), 600 *Oreochromys aureus* (tilapias), 600 *Chanos chanos* (sábalos) y 300 *Dormitator latifrons* (puyeques). Los peces fueron comprados en cooperativas pesqueras localizadas en los municipios de Rosamorada, Tuxpan, Santiago Ixcuintla y Tecuala Nayarit, que integran la laguna de Agua Brava y se transportaron al laboratorio en hielo molido para su estudio.

La identificación de las especies de peces, se realizó en el departamento de Ictiología del Instituto de Biología de la UNAM., y se tomó como base la literatura de Winckley (1986); Guía FAO (1995) y Castro Aguirre (1999).

Muestreo de aves ictiófagas

Se muestrearon 31 aves ictiófagas como hospederos paraténicos de *G. binucleatum*, de los cuales 8 fueron *Pelecanus occidentalis* (pelícanos grises), 4 *Ardea herodias* (garzón cenizo), 5 *Phalacrocorax olivaceus* (patos buzos), 8 *Fregata magnificiens* (tijeretas), 3 *Anhinga anhinga* (cormoranes) y 3 *Casmerodius albus* (garzón blanco). Los especímenes fueron muestreados en esteros de los municipios de Rosamorada y Tecuala Nayarit y el número dependió de la cantidad de animales disponibles.

La identificación de las especies de aves muestreadas, se realizó en base a las características morfológicas de la cabeza y patas. Se realizó en el departamento de Ornitología del Instituto de Biología de la UNAM., y se tomó como base la literatura de Chandler (1966) y Roger (1994).

Muestreo de tortugas

Se muestrearon 247 tortugas como hospederos paraténicos de *G. binucleatum*, de las cuales 207 fueron *Kinosternun integrum* (chacuanas) y 40 *Trachemys scripta* (escurridizas). Los animales fueron capturados en esteros del municipio de Rosamorada y se transportaron al laboratorio para su estudio.

La identificación de las especies de tortugas se realizó en el departamento de Herpetología del Instituto de Biología de la UNAM., y se tomó como base la literatura de Alderton, (1994) y Flores Villela, *et al.* (1995).

Detección de larvas de *G. binucleatum* en tejido muscular

La detección de larvas de *Gnathostoma* en los peces, aves y tortugas, se realizó por la técnica de compresión Miyazaki, (1954) modificada por Alvarez-Guerrero y Alba-Hurtado, (2007). Los animales muestreados fueron disectados individualmente, la carne de los especímenes se molió en un molino casero (Pica-lica, Moulinex). Un volumen de carne molida (50 gr) se colocó entre dos cristales de 15 cm de ancho por 18 cm de largo y un espesor de 4 mm. El tejido se comprimió hasta formar una tela delgada transparente y se observó con una lupa manual a contra luz de una lámpara de 100 watts, se revisaron ambos lados de la muestra para obtener una revisión completa y se revisó a la vez el esqueleto de los animales analizados. Las L3A, se localizaron enquistadas en el músculo de los hospederos intermediarios y paraténicos, fueron de color rojo sangre y se encontraron enrolladas dentro de un quiste de membrana transparente.

Caracterización de la infección en peces y tortugas

La infección en los peces y tortugas, se caracterizó de acuerdo a las definiciones propuestas por Mǎrgolis *et al.* (1982), bajo los siguientes criterios:

Prevalencia; representó el porcentaje de hospederos parasitados por una o más especies de parásitos.

Intensidad promedio; número promedio de parásitos de una especie por hospedero parasitado.

Abundancia; número promedio de parásitos de una especie por hospedero analizado.

Intervalo de intensidad; número mínimo y máximo de individuos de una especie particular de parásitos, encontrados en una muestra de hospederos.

En cada una de las variables estudiadas, se obtuvieron los promedios y desviación estándar, empleando el programa estadístico microsoft Excel (2003).

Morfometría de larvas de *G. binucleatum* en peces y tortugas

Para determinar la morfometría, se utilizaron 30 larvas obtenidas de peces y 30 larvas obtenidas de tortugas. Las larvas fueron liberadas de su cubierta quística con agujas entomológicas, se fijaron en formol al 10% por 48 horas y se midieron en microscopio compuesto calibrado, previa aclararon con lactofenol de Hamman considerando las variables: **(LT)** longitud total, **(AM)** anchura máxima, **(AB)** ancho del bulbo, **(LB)** largo del bulbo, **(ANB)** número de anillos en el bulbo cefálico, **(GPA)** número de ganchos por anillo del bulbo cefálico, **(IV-I)** diferencia existente entre los promedios de la cuarta y la primera hilera de ganchos del bulbo cefálico, **(PC)** localización de la papila cervical, **(CEP)** distancia existente del ano al extremo posterior y **(ET)** número de estrías transversales distribuidas a lo largo del parásito (Miyazaki, 1966).

Para el conteo de ganchos del bulbo cefálico, las larvas se montaron en un porta objetos y bajo un microscopio estereoscópico se les separó el bulbo cefálico con un bisturí de hoja delgada, los bulbos obtenidos se acomodaron en posición frontal y se les colocó un cubre objetos para facilitar su observación. Se tomaron fotomicrografías de las estructuras usando cámara digital de 5 megapíxeles, las imágenes se descargaron en software image-transfer y se amplificaron en una computadora para realizar el conteo de ganchos.

Se obtuvieron los promedios y desviación estándar en cada una de las hileras concéntricas de ganchos del bulbo cefálico.

Se compararon los promedios morfométricos, obtenidos entre las larvas de peces y tortugas utilizando una prueba *T* de Student, con el programa software Excel, (2003).

Cortes intestinales de larvas encontradas en peces y tortugas

Se realizaron cortes transversales del intestino de larvas recuperadas en peces y tortugas, para determinar el número de células epiteliales y el promedio de núcleos por célula, estas variables de acuerdo con Miyazaki (1954) son importantes en la identificación de especies de *Gnathostoma spp*, a nivel morfológico.

Las larvas fueron liberadas de su cubierta quística con agujas entomológicas y se incluyeron en 1 cm³ de carne que le sirvió de soporte, ambas estructuras se fijaron en formol al 10% por 48 horas para su inclusión en parafina y se realizaron cortes de 4μ de espesor considerando las regiones anterior, media y posterior del cuerpo del parásito. Los cortes se tiñeron con hematoxilina eosina bajo técnicas convencionales, las estructuras observadas fueron amplificadas y contadas en microscopio compuesto con el objetivo de inmersión (100X).

Cortes de larvas enquistadas en músculo de peces y tortugas

Se realizaron cortes de larvas enquistadas en el músculo de peces y tortugas infectadas con L3A de *G. binucleatum*, para determinar las alteraciones histopatológicas provocadas por las larvas en el músculo de sus hospederos, para ello; se obtuvieron fragmentos de tejido muscular de los animales infectados y se fijaron en formol al 10% por 48 horas para su estudio. Se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 4μ de espesor. Los cortes se tiñeron con Hematoxilina Eosina bajo técnicas convencionales y se describieron las

lesiones. histopatológicas provocadas por las larvas en el músculo. Los cortes se realizaron bajo el mismo criterio establecido en los peces.

Efecto de los factores físicos sobre la viabilidad de larvas de *Gnathostoma binucleatum*

Para desarrollar el estudio, se estandarizaron las técnicas que aquí se describen ya que no existen trabajos publicados sobre la viabilidad de las larvas del genero *Gnathostoma spp*, que nos permitan disponer de sus técnicas. Para ello se utilizaron 135 larvas de *G. binucleatum* para evaluar el efecto de la congelación. Se utilizaron 27 bolas de 500 gr de carne molida de pescado (BCMP), en el centro de cada una se colocaron 5 larvas enquistadas y por separado cada BCMP se guardaron en bolsas de plástico. Las BCMP se dividieron en tres grupos de nueve BCMP cada uno. El primer grupo se congeló a -10°C, el segundo a -15°C y el tercero a -20°C. Tres BCMP de cada grupo se trataron por 24 horas, tres a las 48 horas y tres a las 72 horas, en cuanto estuvieron descongeladas se recuperaron las larvas y se evaluó su viabilidad.

Se utilizaron 45 larvas para evaluar el efecto de la refrigeración. Se emplearon 9 BCMP de 500 gramos, en el centro de cada una se colocaron 5 larvas enquistadas y cada BCMP se guardó en bolsas de plástico por separado. Todas las BCMP se refrigeraron a 5°C y se evaluó la viabilidad de las larvas de tres BCMP a los 10 días, tres a los 20 y tres a los 30 días después.

Se utilizaron 45 larvas para evaluar el efecto de la ebullición a 100°C. Cada larva se incluyó en el centro de una BCMP de aproximadamente 2 cm de diámetro y se envolvieron con gasa para evitar su extravío, grupos de cinco de estos paquetes con una larva incluida se mezclaron con un kg de carne molida de pescado. La carne se introdujo en una olla en agua en ebullición y se agitó con una cuchara para obtener partículas uniformes que favorezca la penetración del calor. Tres grupos de larvas (15) se expusieron a la ebullición por tres minutos, tres grupos a los cuatro y tres grupos a los cinco. Al final del estudio las larvas fueron recuperadas de su envoltura y se evaluó su viabilidad.

Se utilizaron 45 larvas de *G. binucleatum* para evaluar el efecto del asado, conocido regionalmente como pescado tatemado. Se depositaron las larvas dentro de un círculo marcado con azul de metileno para evitar su extravío, en la masa muscular de 9 pescados de la especie *Mugil curema* de aproximadamente 400 gr (cinco larvas por pescado). Los pescados se expusieron al calor generado por leña (120 a 150°C. Tres pescados se retiraron a los 40 minutos, tres a los 60 minutos y tres a los 80 minutos. Las larvas se extrajeron de cada pescado y se evaluó su viabilidad.

Se utilizaron 45 larvas enquistadas de *G. binucleatum*, para evaluar el efecto del jugo de limón sobre la viabilidad de las mismas. Se colocaron tres grupos de cinco larvas (15) en cajas Petri, conteniendo jugo de limón ácido y se mantuvieron a temperatura ambiente por un día, tres grupos por tres días y tres grupos por cinco días.

Se utilizaron 45 larvas desenquistadas de *G. binucleatum*, para evaluar el efecto del jugo de limón sobre la viabilidad de las mismas. Se colocaron tres grupos de cinco larvas (15) en cajas Petri, conteniendo jugo de limón ácido y se mantuvieron a temperatura ambiente por 1 hora, tres grupos por 3 horas y tres grupos por 7 horas. Al final de cada período las larvas se extrajeron del medio ácido y se evaluó su viabilidad.

Medición de la viabilidad

Después de cada tratamiento físico, las larvas fueron extraídas de su cubierta quística con agujas entomológicas y se colocaron en un porta objetos, para evaluar su viabilidad bajo tres distintos criterios. Primero que las larvas mantuvieran su integridad interna y externa de su morfología, el segundo que respondan con movimiento a la exposición del calor y luz de un microscopio óptico, y tercero que respondan al efecto provocado por la aplicación de formol al 4%, con exposiciones de 15 a 20 minutos en cada una de las larvas evaluadas.

Animales experimentales

Se utilizaron ocho perros y trece gatos de 2 a 4 meses de edad y de raza no definida. Los perros fueron donados por el centro antirrábico de la ciudad de Tepic Nayarit y los gatos por donaciones de particulares. A la llegada de los animales, se practicaron análisis coproparasitoscópicos (cps) por la técnica de Faust para identificar huevos de helmintos que pudieran alterar el estudio, y en los casos positivos se estableció doble tratamiento con una fórmula que contiene prazicuantel, pamoato de pyrantel y febantel (Drontal plus de Bayer). La eliminación de ectoparásitos se realizó con pulverizaciones que contienen 2-metiletoxifenil carbamato (Bolfo Bayer) y se estableció doble inmunización contra moquillo y parvovirus. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales fabricadas dentro del bioterio, perteneciente a la Dirección de Investigación y Postgrado de la Universidad Autónoma de Nayarit. La limpieza se realizó diariamente y el mantenimiento consistió en agua y alimentos balanceados de la marca Purina *ad limitum*.

Diseño de infección experimental en perros y gatos

Las larvas colectadas en los peces y en las tortugas se contaron y sin romper la pared quística se mezclaron en 50 gr de carne molida de pescado (albóndiga). Los perros fueron inoculados oralmente con 42, 40, 47, 36, 35, 33, 52, 52 larvas (total 337) y los gatos con 30, 30, 40, 35, 35, 35, 42, 37, 35, 30, 35, 35 y 40 (total 459) respectivamente. A partir de inóculo se realizaron análisis cps de Faust diariamente para identificación de huevos de *G. binucleatum* y con la técnica macroscópica directa se detectaron los parásitos adultos para su estudio morfométrico (hanson and Kruse, 1982, Laurence and Thomas, 1984; Alba-Hurtado, 2007).

Mensualmente se obtuvo por punción venosa sangre de todos los animales, se obtuvo el suero y se almacenó a -20°C para realizar pruebas inmunológicas. Diariamente se registraron las manifestaciones clínicas en los animales infectados. En cuatro de los perros inoculados se buscaron *in vivo* nódulos gástricos del parásito por laparotomía exploratoria,

ultrasonido y endoscopia. En estos perros se realizó una digestión artificial para buscar larvas o parásitos juveniles en la pared del estómago que no hubieran producido nódulos.

Identificación de nódulos gástricos en vivo

La identificación de nódulos gástricos en los animales infectados con L3A de *G. binucleatum* se realizó con las técnicas de laparotomía exploratoria, ultrasonido y endoscopia. En la laparotomía exploratoria los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (1 ml /2.5 kg) por vía endovenosa previo ayuno de 12 horas, por incisión antero-umbilical se abrió la cavidad abdominal y con separadores de Gosset se expuso el estómago para detectar la presencia de nódulos (Alexander, 1981). Para el ultrasonido, se depiló la región abdominal en los animales y se aplicó un gel conductor y con un transductor convexo, se realizaron barridos multidireccionales en la búsqueda de nódulos. Para la endoscopia, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (1 ml /2.5 kg) previo ayuno de 12 horas, se colocó un abre bocas y se introdujo una extensión (lente) conectada a un equipo de computo, los nódulos se detectaron por rastreos de la mucosa gástrica.

Necropsia de animales experimentales

Todos los animales se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico por vía endovenosa. La necropsia incluyó una revisión exhaustiva de órganos de cavidad abdominal y torácica.

De los nódulos recuperados, se tomaron muestras de aproximadamente 1 cm³. Las muestras se fijaron en formaldehído al 10% por 48 horas, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 4µ de espesor. Los cortes se procesaron y tiñeron con Hematoxilina-Eosina, bajo técnicas convencionales.

Morfometría de parásitos adultos recuperados

Los parásitos adultos fueron recuperados de los nódulos gástricos por disección de los mismos y se fijaron en formol al 10% para estudiar su morfometría, previamente fueron aclarados con lactofenol y se consideraron las variables: **(LT)** longitud total, **(AM)** anchura máxima, **(AB)** número de anillos en el bulbo cefálico, **(LB)** largo del bulbo, **(ANB)** ancho del bulbo, **(PC)** localización de la papila cervical, **(LE)** longitud del esófago, **(CEP)** distancia de la cloaca al extremo posterior.

Estudio secuencial del DNA ribosomal

Para identificar la especie de *Gnathostoma spp* en el estado de Nayarit, se realizó la secuenciación del DNA ITS² ribosomal de un pequeño fragmento de parásito adulto, obtenido de un perro infectado con L3A de tortugas (las secuencias se realizaron en el laboratorio de biología molecular de la Dra. Virginia León-Regagnón). La muestra se conservó en alcohol absoluto, se extrajo el DNA mediante la técnica estándar de fenol-cloroformo (Palumbi, 1996) y se amplificó por PCR el espaciador interno del DNA ribosomal con la técnica descrita por León-Regagnón *et al.* 2002 y Martínez-Salazar & León-Regagnón, 2005. La amplificación y secuenciación fue desarrollada usando los primers NEWS² (forward) 5' TGTGTCGATGAAGAACGCAG y ITS²-RIXO (reverse) 5' TTCTATGCTTAAATTCAGGGG. La Amplificación se programó a 1 minuto a 94°C; 35 ciclos de 30 s a 92°C, 30 s a 50°C por 1 minuto a 72°C; el estiramiento final de 4 minutos a 72 °C, los productos fueron secuenciados directamente sobre 410 bases. Las secuencias obtenidas fueron alineadas con las secuencias AY744632, AY061740 y AB181159 obtenidas del genbank perteneciente a la especie *Gnathostoma binucleatum*.

Técnica de digestión artificial

Se trituró el estómago de perros infectados con larvas de *G. binucleatum* y se colocó en frascos de boca ancha, se agregaron 200 ml de jugo gástrico artificial preparado con 1000 ml de agua destilada, 7 ml de ácido clorhídrico al 37% y 2 gr de pepsina a concentración de 1: 10,000. Los frascos se colocaron en estufa bacteriológica a temperatura de 33°C durante 4 a 6 horas, posteriormente se decantó el sobrenadante y se revisaron las muestras del sedimento en cajas de Petri en microscopio estereoscópico hasta agotar la muestra, este método favorece la digestión de tejidos liberando los parásitos titulares (L3A, parásitos juveniles) para su identificación morfológica Hanson and Kruse, 1982; Nawa *et al.* 1993; Koga *et al.* 1999).

Cuantificación y aislamiento de huevos en animales infectados

En los animales positivos, las heces fueron homogenizadas con agua común y con la técnica de Mc Master se realizó conteo de huevos por gramo de heces (hgh) y se obtuvieron los promedios por semana y día de eliminación. Un volumen de 5 ml de heces homogenizadas y 15 ml de solución saturada de NaCl al 38%, se colocaron en tubos de ensaye y se centrifugaron a 5,000 rpm /5 minutos para favorecer la flotación de los huevos, terminado el proceso se recuperó con una pipeta Pasteur el 50% del volumen centrifugado y se depositó en frascos de boca ancha con agua corriente para eliminar los residuos de NaCl. Los lavados se repitieron por tres ocasiones con intervalos de dos horas cada uno, tiempo después se decantó el sobrenadante (agua) de los frascos, dejando el sedimento en donde se concentraron los huevos lo mas limpio posible para su incubación en estufa bacteriológica y se midieron 100 con microscopio compuesto calibrado para determinar su morfometría.

Animales para el estudio inmunológico

En todos los gatos infectados experimentalmente y los cuatro perros se encontraron parásitos, se evaluaron mensualmente los anticuerpos séricos de la clase IgG contra L3a y adultos de *G. binucleatum*.

Como complemento se comparó el título de anticuerpos séricos de la clase IgG contra L3A y adultos de *G. binucleatum* en perros de una zona endémica y perros de una zona libre. Se colectaron sueros de 40 perros de zonas aledañas a la laguna de Agua Brava en el estado de Nayarit (alimentados con desechos de pescado), estos sueros fueron almacenados a -20°C hasta su uso. Además se colectó suero de 62 perros del centro de atención canina y felina (antirrábico) ubicado en Cuautitlán, estado de México. Posterior a la toma de muestra, dos perros de la zona endémica fueron sacrificados en forma humanitaria y se les realizó la necropsia, los parásitos del tracto digestivo encontrados en cada perro fueron identificados y registrados.

Obtención de antígenos somáticos de L3A y fases adultas de *Gnathostoma binucleatum*

El extracto de antígenos de L3A de *G. binucleatum* (AgL3A) se realizó a partir de 250 larvas, mientras que el extracto de antígenos de parásitos adultos (AgGA) se obtuvo a partir de 1.5 ejemplares provenientes de uno de los animales infectados experimentalmente. Los parásitos fueron lavados tres veces en solución salina fisiológica estéril con antibióticos (penicilina 10,000 UI, estreptomina 100 µg/ml, anfotericina B 10 µg/ml SIGMA Labs) y maceradas en un mortero en presencia de nitrógeno líquido y una mezcla de inhibidores de proteasas (aprotinina 10 µg/ml, leupeptina µg/ml, iodoacetamida 1.8 mg/ml y PMSF 1 mM SIGMA Labs) hasta la obtención de una pasta homogénea sin fragmentos de larvas.

Elisa para determinación de IgG específica a *G. binucleatum*

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos (Maxisorp NUNC Labs) sensibilizadas con 10 µg/ml de AgL3A ó AgGA en buffer de carbonatos (pH 9.6) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente las placas fueron bloqueadas con ABS 5% mas PBS-Tween 20 al 0.01% y buffer de carbonatos (pH 9.6), se conservaron a 4°C hasta su utilización. Para cada muestra se utilizaron por duplicado 50µl por pozo de una dilución de 1: 320 de AgL3A y de 1:80 AgGA de suero en PBS con ABS 1% por 2 horas a 37°C, en cada placa se utilizó un suero control positivo y uno negativo. Posteriormente, las placas fueron lavadas 3 veces con PBS-Tween 20 al 0.01% y a cada pozo se le colocaron 50µl de IgG de oveja peroxidada anti-IgG canina (serotec AA132P) ó 50µl de IgG de cabra peroxidado anti-IgG felina (serotec AA126P) a una dilñución de 1:5,000 por 2 horas a 37°C. Las placas se lavaron 3 veces como se describió anteriormente y el desarrollo del color se realizó con OPD al 0.05% y peróxido de hidrógeno al 0.001% en solución reguladora de citratos por 10 minutos en oscuridad. Después la reacción se detuvo con ácido ortofosfórico al 6% (Muñoz, 2007). La lectura de la placa se realizó a 492 nm en un lector de ELISA Multiscan AFCENT. En cada suero, la reacción inespecífica fue eliminada mediante la utilización de un pozo adyacente sin antígeno, en el que la absorbancia obtenida fue restada a la obtenida en presencia de antígeno. Los resultados obtenidos de los dos pozos en unidades de densidad óptica (D.O.) fueron promediados y posteriormente transformados a valores porcentuales de absorbancia (5 Abs) con respecto al control positivo mediante la siguiente formula:

$$X = \frac{\text{D.O. suero problema} (100)}{\text{D.O. control positivo}}$$

Obtención de larvas de primer estadio

Los huevos recuperados se colocaron en frascos de vidrio con agua y se incubaron en una estufa bacteriológica a 33°C. Los huevos se revisaron diariamente hasta su eclosión y se evaluaron las características morfológicas y morfométricas de 100 de las larvas de primer estadio.

Colección de copépodos y dípteros

Se colectaron copépodos y larvas de dípteros en veneros estuarinos de la laguna de Agua Brava, se utilizaron redes de arrastre para zooplancton con luz de malla de 50 μ y se conservaron vivos en cajas de Petri a temperatura ambiente. La identificación de las especies de copépodos y dípteros se realizó en la Facultad de Ciencias de la UNAM y en el laboratorio de Ecología de la Universidad autónoma de Aguascalientes, se tomó como base la literatura de Suárez-Morales, 1996; Gutiérrez and Suárez, 2001; 2003).

Infección experimental de organismos acuáticos

Las larvas de primer estadio (L1) fueron colectadas vivas con pipeta Pasteur, y se depositaron en cajas de petri junto con cincuenta copépodos y cincuenta larvas de dípteros a temperatura ambiente para provocar su ingestión. Se tomaron fotomicrografías y se realizó microscopia electrónica de barrido a los artrópodos que ingirieron las larvas de primer estadio.

Muestreo de mamíferos silvestres

Se capturaron y sacrificaron 13 mapaches y 12 tlacuaches en zonas aledañas a la laguna de Agua Brava. En la necropsia se revisaron exhaustivamente los órganos de la cavidad abdominal y torácica, en especial del aparato gastrointestinal en la búsqueda de nódulos y parásitos adultos de *G. binucleatum*.

Microscopía electrónica de barrido

Gusanos adultos, L3A, L1, huevos, copépodos y larvas de dípteros se procesaron por microscopía electrónica de barrido para determinar su morfología, el procesamiento se realizó en el departamento de microscopía electrónica del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Los organismos fueron fijados en glutaraldehído al 3% por 48 horas, se lavaron en amortiguador de fosfatos en tres tiempos de 1 minuto cada uno y se deshidrataron en alcoholes graduales (etanol) desde 30 hasta 100% , con tiempos de 10 minutos cada uno. El secado se realizó a punto crítico con CO₂ y las muestras se montaron en porta muestras de aluminio, con adhesivo de carbón de doble cara y se ionizaron con oro paladio por 4 minutos. Se tomaron microfotografías en condiciones de alto vacío a 15 KV, con un microscopio electrónico de barrido marca JEOL JSM-5410LV (Bozzola and Rusell 1992; Anantaphruti *et al.* 1982

RESULTADOS

Peces infectados con larvas (L3A) de *G. binucleatum*

Se detectaron L3A de *G. binucleatum* en cuatro de las seis especies analizadas entre ellas: *Cathorops fuerthi* (chihuiles), *Pomadasys macracanthus*, (burros), *Mugil curema* (liseta) y *Dormitator latifrons* (puyeque). En las especies *Oreochromys aureus* (tilapia) y *Chanos chanos* (sábalos) no se detectaron L3A (Figura 7).

Los pescados analizados fueron 5,700, los hospederos parasitados 186, parásitos encontrados 217, prevalencia 1.90%, intensidad promedio 0.73, abundancia 0.021 y el intervalo de intensidad de 1 a 3 larvas, por pescado analizado Cuadro 1.

Las comunidades pesqueras donde se detectaron peces infectados fueron Pericos, Pimientillo, San Miguelito, Llano del Tigre, Unión de Corrientes, Boca de Camichín y los Murillos, que se localizan en los municipios de Rosamorada, Tuxpan, Santiago Ixcuintla y Tecuala del estado de Nayarit, cuyos cuerpos de agua integran la laguna de Agua Brava (Figura 8).

Aves infectadas con larvas (L3A) de *G. binucleatum*

Se detectaron L3A de *G. binucleatum*, en 2 de las 31 aves ictiófagas muestreadas en esteros del municipio de Rosamorada. En *Ardea herodias* (garzón cenizo), se encontró una larva y en *Casmerodius albus* (garzón blanco) se encontraron tres. En ambos casos las larvas se localizaron enquistadas en los músculos pectorales (Figura 9).

Tortugas infectadas con larvas (L3A) de *G. binucleatum*

Las especies de tortugas (*Kinosternun integrum* chacuanas y *Trachemys scripta* escurridizas) se encontraron infectadas con larvas L3A de *G. binucleatum* (Figura 10).

Las tortugas analizadas fueron 247, los hospederos parasitados 184, parásitos encontrados 1,095, prevalencia 65.8%, intensidad promedio 3.78, abundancia 2.76, intervalo de intensidad 1 a 65 larvas por tortuga analizada. Todas las variables fueron estadísticamente mayores ($p < 0.05$) en las tortugas que en los pescados (Cuadro 1).

Cuadro 1. Caracterización de la infección en peces y tortugas de la laguna de Agua Brava del estado de Nayarit.

ESPECIES	HA	HP	PE	P	IP	A	II
PECES							
<i>Cathorops fuerthi</i>	3,000	154	183	4.8	1.25	0.061	1 a 3
<i>Pomadasys macracanthus</i>	600	11	11	1.83	1.0	0.018	1 a 1
<i>Mugil curema</i>	600	13	15	2.16	1.15	0.025	1 a 2
<i>Dormitator latifrons</i>	300	8	8	2.66	1.0	0.026	1 a 1
<i>Oreochromis aureus</i>	600	0	0	0	0	0	0
<i>Chanos chanos</i>	600	0	0	0	0	0	0
	5700	186	217	1.90 %	0.73	0.021	1 a 3
TORTUGAS							
<i>Kinosternon integrum</i>	207	163	1,070	79.1	6.28	4.91	1 a 65
<i>Trachemys scripta</i>	40	21	25	52.5	1.29	0.62	1 a 3
	247	184	1,095	65.8 %	3.78	2.76	1 a 65

HA hospederos analizados, HP hospederos parasitados, PE parásitos encontrados, P prevalencia, IP intensidad promedio, A abundancia, II intervalo de intensidad (Miyazaki, 1960).

Morfometría de larvas obtenidas en peces y tortugas analizadas

Las características morfométricas de las L3A de *G. binucleatum* encontradas en pescados y tortugas se encuentran resumidas en el Cuadro 2. No se presentaron diferencias ($P > 0.05$) entre las larvas encontradas en pescados y tortugas.

Cuadro 2.- Morfometría de 30 larvas obtenidas de peces y 30 larvas obtenidas de tortugas, muestreadas en la laguna de Agua Brava

PECES	LT	AM	AB	LB	ANB	GPA				IV-I	PC	CEP
						(1)	(2)	(3)	(4)			
MEDIA	3.988	0.308	4.0	0.147	0.235	38.4	41.6	43.8	46.2	7.3	14.6	0.065
DESVEST	0.586	0.054	0.0	0.020	0.042	3.1	3.1	3.1	3.2	3.5	1.4	0.018

TORTUGAS	LT	AM	AB	LB	ANB	GPA				IV-I	PC	CEP
						(1)	(2)	(3)	(4)			
MEDIA	4.057	0.308	4	0.218	0.118	38.2	41.2	43.7	45.9	7.47	14.2	0.061
DESVEST	0.522	0.069	0	0.023	0.025	2.80	2.7	3.1	3	1.3	1.4	0.028

LT longitud total, **AM** anchura máxima, **AB** anillos por bulbo, **LB** largo del bulbo, **ANB** ancho del bulbo, **GPA** número de ganchos por anillo 1, 2, 3, 4, **IV-I** diferencia entre los promedios de la cuarta a la primera hilera, **PC** papila cervical, **CEP** distancia de la cloaca al extremo posterior.

Morfología de quistes y larvas recuperadas en peces y tortugas

Todas las larvas se encontraron enquistadas en el músculo de los hospederos analizados, los quistes son de forma ovalada y presentaron una membrana transparente a través de la cual se observa el color rojo del esófago e intestino del parásito y a la vez enrollado sobre si mismo, las medidas promedio de 20 quistes fueron de 1.34 mm de longitud por 1.14 mm de ancho.

Las larvas de los peces y tortugas presentaron características morfológicas similares, midieron en promedio 3.988 y 4.057 de longitud total, la cutícula del cuerpo es quitinosa y presentó 268 y 276 estrías transversales, de las cuales se proyectan espinas de una sola punta, que varían de forma y tamaño dependiendo de la localización en el cuerpo. El bulbo cefálico presentó 4 hileras concéntricas de ganchos agudos y curvos proyectados hacia el extremo posterior del parásito, la boca se localizó en la región anterior del bulbo cefálico, presentó un par de labios fuertes con dos papilas cada uno, y entre ambas papilas se localizaron los anfidios o receptores sensoriales. El esófago presentó una región muscular angosta y otra región glandular mas ancha y ocupa el 30% del cuerpo del parásito, dorsalmente a este órgano se encontraron cuatro sacos cervicales a través del cual se desplaza un líquido que favorece la dilatación o retracción del bulbo cefálico, el intestino se encuentra unido al esófago, su conformación es gruesa y presenta gránulos de color rojo sangre y termina

en el ano. En las imágenes se distingue el pseudocéloma que contiene un líquido de color rojo transparente (Figura 11 a-b).

Cortes del intestino de larvas L3A, obtenidas de peces y tortugas

Se contaron los núcleos de 101 células del epitelio intestinal de larvas recuperadas en peces. De las cuales 25 células presentaron un solo núcleo, 35 presentaron 2 núcleos, 26 presentaron 3 núcleos, 11 presentaron 4 núcleos y 4 presentaron 5. El número total de núcleos fue de 227 y el número promedio de núcleos por célula fue de 2.24,

Se contaron los núcleos de 84 células del epitelio intestinal de larvas obtenidas en tortugas. De estas, 26 presentaron un solo núcleo, 27 presentaron 2 núcleos, 23 presentaron 3 núcleos, 7 presentaron 4 núcleos y 1 presentó 5. El número total de núcleos fue de 182 y el número promedio de núcleos por célula fue de 2.20. No se observaron diferencias estadísticas ($P>0.05$) entre los promedios de núcleos de las células del epitelio intestinal, entre las larvas obtenidas de pescados y larvas obtenidas de tortugas (Figura 11 c-d).

Alteraciones histopatológicas provocadas por las larvas L3A de *G. binucleatum* en el músculo de peces y tortugas

Las alteraciones provocadas por las larvas enquistadas en el músculo de peces y tortugas, presentaron un encapsulamiento fibroso alrededor de las larvas con un muy ligero infiltrado celular (Figura 12).

Efecto de algunos factores físicos sobre las larvas de *G. binucleatum*

El efecto de algunos factores físicos sobre L3A de *G. binucleatum* se presentan en el Cuadro 3. La congelación mató a todas las larvas a partir de las 48 horas. La refrigeración eliminó el total de larvas hasta los 30 días. La ebullición mató el total de

larvas en 4 minutos. El asado (tatemado) mató las larvas a los 40 minutos. Las larvas enquistadas y tratadas con jugo de limón (pH=2.5), murieron a los cinco días de exposición y las larvas desenquistadas murieron a las siete horas (Cuadro 3, Figura 13).

Evaluación experimental en perros infectados con L3A

En cuatro de los ocho perros inoculados con larvas de L3A de *Gnathostoma binucleatum*, se detectaron fases del parásito en estómago. Los animales infectados ingirieron 42, 47, 52 y 52 larvas enquistadas, el porcentaje de infectividad fue del 50%.

En el perro uno se detectó la eliminación de huevos en heces a los 5.5 meses p.i (período de prepatencia), y se mantuvo eliminando huevos por un período de 96 días (período de patencia). La necropsia se practicó a los 9 meses p.i., y se encontró un nódulo fibroso de 18 cm de diámetro, localizado en la curvatura mayor del estómago proyectado hacia la cavidad abdominal del cual se recuperaron 11 parásitos adultos (5 hembras, 6 machos). El nódulo era sólido, internamente presentó perforaciones que se comunicaban con la cavidad abdominal, y una pequeña abertura de aproximadamente 2 mm de diámetro, se comunicaba con el lumen gástrico. Las perforaciones contenían secreción mucosanguinolenta provocada por la estancia y la migración interna de los parásitos. A la microscopia óptica del contenido se observaron huevos inmaduros, fértiles, larvados y pequeños fragmentos de cutícula, tal vez eliminada durante la evolución de los parásitos. Al disectar el nódulo solo se observaron y aislaron gusanos machos que se encontraban incrustados en el tejido, mientras que las hembras fueron eliminadas en las heces después de la oviposición.

En el perro dos no se detectaron huevos, la necropsia se practicó a los 9 meses p.i., encontrándose cinco nódulos gástricos de 1 a 2 cm de diámetro y por digestión artificial, se recuperaron 3 parásitos juveniles y 2 larvas en fase de muda.

En el perro tres no se observó la eliminación de huevos, la necropsia se practicó a los siete meses p.i., y no se detectaron nódulos gástricos. Al realizar la digestión artificial del estómago se recuperaron cinco parásitos en fase juvenil.

En el perro cuatro no se detectaron huevos en heces, la necropsia se practicó a los 13 meses p.i., observándose varios nódulos de 1 a 2 cm de diámetro, localizados en

la mucosa gástrica, y por digestión artificial se recuperaron cinco parásitos juveniles (Figura 14 a-b).

Evaluación experimental de gatos inoculados con L3A

En dos de los trece gatos inoculados con L3A de *G. binucleatum* se encontraron fases larvianas del parásito en la pared gástrica. Cada uno de los animales ingirieron 30 larvas enquistadas incluidas en carne molida de pescado. El porcentaje de la infectividad fue del 15.38% en ambos gatos.

La necropsia en el gato uno se practicó a los 6 meses p.i., y se encontró un nódulo de 1.5 cm de diámetro localizado en la curvatura mayor del estómago, del cual se recuperó un parásito juvenil (Figura 14 c-d). En el gato dos la necropsia se practicó a los 10 meses p.i., y no se observaron nódulos, solo se recuperó una larva en el diafragma.

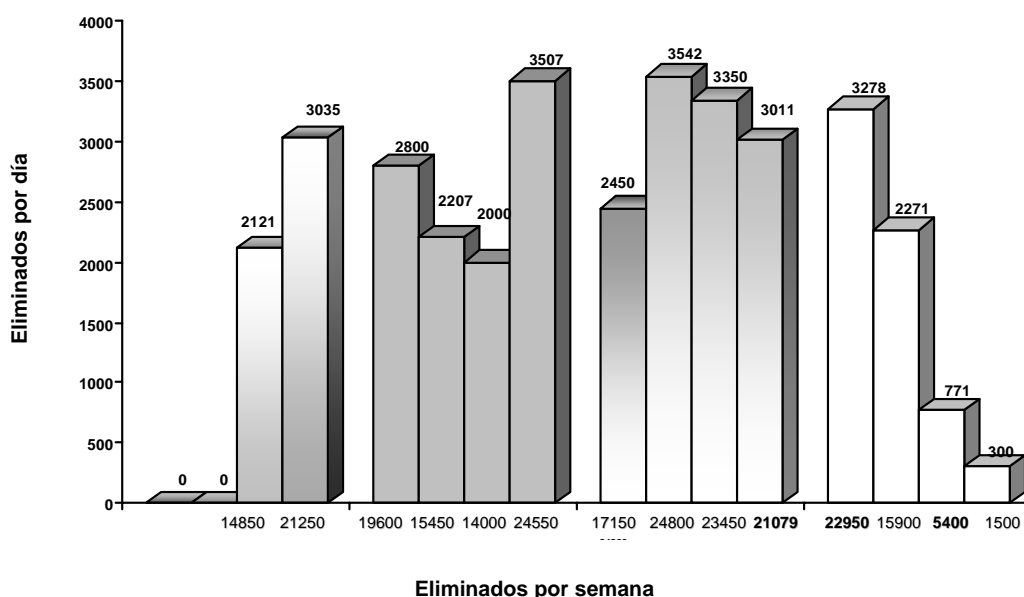
Identificación de nódulos gástricos en vivo

Por laparotomía exploratoria, se confirmó la presencia de nódulos gástricos a través de cirugía y por palpación de la pared gástrica. Por las técnicas de ultrasonido y endoscopia, los nódulos se detectaron a través de imágenes obtenidas con equipo especializado. Este es el primer reporte sobre el uso de estas técnicas para el diagnóstico de la gnathostomosis en hospederos definitivos vivos.

Conteo de huevos en un perro infectado con *G. binucleatum*

La eliminación de huevos en el perro uno, se inicio en la semana 22 p.i. y se mantuvo por 14 semanas más. Los promedios diarios de huevos eliminados por gramo de heces (hgh) se presentan en la (Figura 15).

Figura 15. Cuantificación de huevos por gramo de heces (hgh), eliminados por un perro infectado con parásitos adultos de *G. binucleatum*.



Manifestaciones clínicas observadas en animales infectados

En los perros y gatos infectados, se observó con frecuencia náuseas, vómito, dolor abdominal y postración, al inicio y durante los 2 a 3 primeros meses p.i. con L3A de *G. binucleatum*, posteriormente los animales presentaron apatía y disminución en el consumo de agua y alimentos en los meses restantes.

El perro que eliminó huevos presentó durante el periodo de patencia excitabilidad nerviosa, accesos de dolor abdominal agudo con postración, diarrea acuosa y olorosa, vómito sanguinolento esporádico, producto de la formación de pequeñas úlceras en el estómago, aumento en el consumo de agua, disminución en el consumo de alimento hacia el final del periodo de patencia, baja de peso, caída de pelo y transpiración corporal con olor desagradable.

Morfometría de parásitos adultos recuperados

La morfométricas de 10 parásitos adultos (6 machos, 4 hembras), obtenidos de un perro infectado con larvas de *G. binucleatum*, presentaron las siguientes medidas en mm. Los machos midieron 20.01 (18 a 23) de longitud total y 1.75 (1.44 a 2.06) de anchura máxima, largo del bulbo .745 (.462 a 1.028), ancho del bulbo .976 (.899 a 1.053), número de hileras en el bulbo cefálico 8 a 9, localización de la papila cervical 18 (16 a 23) estrías transversales, longitud del esófago 2.94 (2.54 a 3.34), distancia de la cloaca al extremo posterior .334 (.231 a .437).

Las hembras midieron 40.3 (35 a 57) de longitud total y 1.77 (1.49 a 2.06) de anchura máxima, largo del bulbo .693 (.565 a .822), ancho del bulbo .963 (.848 a 1.079), número de hileras en el bulbo cefálico 8 a 9, localización de la papila cervical 17 (16 a 19) estrías transversales, longitud del esófago .398 (4.11 a 3.85) y distancia de la cloaca al extremo posterior .282 (.205 a .359).

Obtención de larvas de primer estadio

Los huevos incubados se revisaron diariamente, a los 20 días del inicio se observó el desarrollo de 16 a 18 blastómeros dentro del huevo y el embrión se detectó 4 días después. La mayoría de las larvas emergieron por el opérculo en 28 días y unas pocas lo hicieron por regiones distintas. Las larvas al contacto con el agua son muy activas, microscópicamente se observa una vaina transparente mas ancha que su propio cuerpo, que les confiere protección al ambiente. Las larvas (L1) dorsalmente presentan una gran cantidad de granulaciones y al doblarse se observan arrugas en la cutícula. El extremo anterior es mas ancho que el extremo posterior y presenta una espina proyectada hacia delante, Prommas y Daengsvang, (1933; 1936) señalan que la espina es útil para liberarse de la vaina y continuar su evolución hasta larva de tercer estadio temprano L3T, en el hemocéle de los copépodos. El promedio de 100 larvas medidas en microscopio compuesto calibrado incluyendo la vaina, fue de 285.8 μm (231-334.1) de largo por 0.134 μm (0.077-0.205) de ancho (figura 16).

Organismos acuáticos infectados con larvas L1

La incubación de 50 copépodos con L1 de *G. binucleatum* indujo que siete de ellos ingirieran larvas y que estas se desarrollaran a larvas de segundo y tercer estadio temprano en 6 a 9 días p.i.. El número de larvas por copépodo fue de 1 a 5 y se localizaron en el hemocele y bifurcación de la cola. Microscópicamente las larvas se observaron sin vaina, presencia de un pequeño bulbo cefálico e hileras concéntricas de pequeños ganchos, estrías transversales, pequeñas espinas cuticulares y en alguna de ellas se observó presencia de una espina en la región anterior. Los copépodos infectados fueron clasificados dentro del Orden: Cyclopoda, Familia: Cyclopidae, Sufamilia: Cyclopinae, Género: *Mesocyclops longisetus*

Doce de las cincuenta larvas de dípteros ingirieron L1 de *G. binucleatum*. Las L1 se localizaron en la región media y posterior del aparato digestivo de los dípteros y maduraron hasta larvas de segundo y tercer estadio de fase temprana entre 6 y 9 días p.i. Los dípteros fueron clasificados dentro del Subphylum: Uniramia, Clase: Insecta, Orden: Díptera, Familia: Chironomidae (Figura 17).

Alteraciones histopatológicas provocadas por parásitos adultos

Durante la necropsia del perro infectado con gusanos adultos, se observó un nódulo de 18 cm. de diámetro localizado en la curvatura mayor del estómago. El nódulo era de consistencia dura y con abundante vascularización, internamente se observó una cámara irregular y cavernas con secreción mucosanguinolenta y gusanos adultos incluidos en el tejido. Una de las cavernas tenía comunicación con la cavidad abdominal a través de la cual se observó un parásito adulto (hembra) fuera del nódulo y en contacto con las vísceras, encontrándose que el líquido peritoneal era de color rojizo y probablemente fue secretado por el nódulo. En dos perros más se encontraron nódulos de 1 a 2 cm de diámetro con parásitos juveniles localizados en la pared del estómago, estos nódulos se han observado como un proceso inflamatorio, producto del establecimiento de las larvas al regreso de su migración por el tejido conectivo. Otro perro infectado no presentó nódulos, pero por digestión artificial se recuperaron

parásitos juveniles en la pared del estómago. La necropsia practicada en los cuatro perros infectados con *G. binucleatum*, reveló la presencia de atrofia muscular, producto del mal estado general de los animales, así como hepatomegalia, esplenomegalia, linfangitis mesentérica, pancreatitis, hipertrofia gástrica, gastritis crónica y pequeñas úlceras gástricas.

Microscópicamente los perros infectados presentaron en los nódulos zonas de fibrosis, pequeñas zona de necrosis, gran cantidad de huevos capturados dentro del tejido e infiltrado de células plasmáticas, macrófagos y eosinófilos rodeando los huevos.

Sólo dos gatos se infectaron, uno presentó un pequeño nódulo de 1.5 cm de diámetro con una forma juvenil dentro, el otro presentó una larva en la pared muscular del diafragma. Ambos gatos presentaron hepatomegalia, esplenomegalia y pancreatitis. Microscópicamente el nódulo presentó zonas de fibrosis con fibroblastos, áreas de necrosis con degeneración muscular, infiltrado de macrófagos y sectores linfoplasmocitarios (Figura 18).

Secuenciación del ADN de parásitos adultos

La secuencias de bases del ADN ribosomal (ITS2) fueron obtenidas de un fragmento de parásito adulto recuperado por infección experimental en un perro inoculado con larvas de tortugas, el segmento amplificado presento una divergencia del 0.48 % (2 de 419 pb) con las secuencias reportadas en el genbank para *Gnathostoma binucleatum*. Por lo tanto, la especie estudiada corresponde a *Gnathostoma binucleatum*.

Cinética de anticuerpos IgG anti-AgL3A e IgG anti-AgGA en gatos infectados experimentalmente con *G. binucleatum*.

Los resultados de las cinéticas individuales de producción de anticuerpos IgG contra antígenos de L3A en los gatos infectados experimentalmente se muestran en la figura (19). En la figura (20), se observa la cinética del promedio de los porcentajes de

absorbancia de producción de anticuerpos IgG contra L3A en los 13 gatos infectados experimentalmente. Se puede observar que los niveles promedio de anticuerpos de estos animales se incrementó de manera significativa ($P < 0.05$) del mes cero (22.37 ± 24.60 %). al primer mes, p.i. (96.75 ± 19.52 %), a partir de aquí el promedio se mantuvo hasta el octavo mes p.i. (83.97 ± 24.17 %) sin diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$).

Con respecto a los anticuerpos IgG contra AgGA las cinéticas individuales de producción se muestran en la Figura 21. En la Figura 22 se observa la cinética del promedio de los porcentajes de absorbancia de producción de anticuerpos IgG contra AgGA en los 13 gatos infectados experimentalmente. Se puede observar un incremento paulatino en el porcentaje de absorbancia, este incremento fue estadísticamente significativo ($P < 0.05$) con respecto al cero (13.47 ± 19.80 % Abs); a partir del tercer mes (67.03 ± 55.87 % Abs) y se mantuvo sin diferencias estadísticas ($P > 0.05$) hasta el octavo mes pi (122.66 ± 62.41 % Abs).

Cinética de anticuerpos IgG anti-AgL3A e IgG anti-AgGA en perros infectados experimentalmente con *G. binucleatum*.

Los resultados de las cinéticas individuales de producción de IgG contra antígenos de L3A en los cuatro perros infectados experimentalmente que desarrollaron parásitos se muestran en la Figura 23. En la Figura 24 se observa la cinética del promedio de los porcentajes de absorbancia de producción de anticuerpos IgG contra L3A en los 4 perros infectados experimentalmente. Se puede observar que los niveles promedio de anticuerpos de estos animales se incrementó de manera significativa ($P < 0.05$) del mes cero (17.72 ± 14.90 % Abs) al segundo mes PI (100.56 ± 57.79 % Abs), a partir de aquí el promedio se mantuvo hasta el quinto mes p.i. (166.77 ± 54.89 % Abs) sin diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$).

Con respecto a los anticuerpos IgG contra AgGA las cinéticas individuales de producción se muestran en la Figura 25. En la figura 26 se observa la cinética del promedio de los porcentajes de absorbancia de producción de anticuerpos IgG contra AgGA en los 4 perros infectados experimentalmente. No se encontraron diferencias

estadísticas ($P>0.05$) en los promedios de % Abs entre los diferentes meses de muestreo.

Niveles de anticuerpos IgG anti-AgL3G en perros de zonas endémicas y no endémicas.

Los niveles de anticuerpos IgG contra AgL3A en perros de la zona endémica de Nayarit así como también los perros de una zona no endémica se muestran en la figura 27. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$) entre las dos poblaciones, siendo mayor el promedio de % Abs en los perros de la zona endémica (50 ± 19.9) en comparación a los de la zona no endémica (28.5 ± 25.5).

Los niveles de anticuerpos IgG contra AgGA en 10 perros de la zona endémica de Nayarit así como también de 10 perros de una zona no endémica se muestran en la figura 28. No se encontró diferencia estadística ($P>0.05$) entre los promedios de anticuerpos contra AgGA de las dos poblaciones.

Mamíferos silvestres

Los mamíferos silvestres, no se encontraron infectados con las formas juveniles o adultas de *G. binucleatum*, por tal razón no se encuentran relacionados con esta especie en la entidad.

Microscopia electrónica de barrido

Larvas L3A de *G. binucleatum*

En la Figura 29 se presentan microfotografías de larvas de *G. binucleatum* usando microscopia electrónica de barrido. El bulbo cefálico presentó cuatro hileras concéntricas de ganchos con una sola punta. La boca presentó labios fuertes con un par

de papilas cada uno y entre ellas se localizaron los anfidios o receptores sensoriales. La papila cervical de forma ovalada se localizó en la hilera transversal número 14. Las espinas cercanas al bulbo cefálico fueron de tamaño grande y densamente pobladas, en el tercio medio fueron de mediano tamaño y conforme se acercaron al extremo posterior, fueron de menor tamaño y menos pobladas. Las estrías transversales se interrumpen a lo largo del parásito y en dirección a la papila cervical, el ano se localiza en el extremo posterior y en el extremo posterior se localizaron los fasmidios.

Parásitos adultos de *G. binucleatum*

En la Figura 30, se observa la microscopia electrónica de barrido de gusanos adultos obtenidos de perros infectados. El bulbo cefálico se observó de forma circular y con 8 a 9 hileras concéntricas de ganchos. La boca presentó dos labios fuertes (trilobulados) con un par de papilas cada uno y entre ambas papilas se localizaron los anfidios o receptores sensoriales. Las espinas cuticulares más grandes se distribuyen en el 45 % del cuerpo, dentro de esta distribución las espinas cercanas al bulbo cefálico presentaron de dos a tres puntas, en la región media fueron de tres puntas observándose la punta central de mayor tamaño. En región posterior, el número de espinas disminuyeron a 2 y a una punta. El resto del cuerpo (55%) presentó diminutas espinas de una sola punta. La cauda del macho es una estructura importante y sirve como referencia para identificar las especies de *Gnathostoma spp*, a nivel morfológico. Presentó cuatro pares de papilas laterales grandes, tres pares mas en posición media y un par de espículas desiguales, la izquierda midió aproximadamente 90 μm de largo y la derecha 40. La cloaca se observó cubierta de pequeñas espinas, la vulva en la hembra se localizó en la región media y ventral del cuerpo y presentó pequeñas papilas en su entorno.

En la Figura 31, se observa la microscopia electrónica de barrido, de un gusano juvenil recuperado de un gato infectado. Las características morfológicas fueron muy similares a las observadas en los parásitos adultos, obtenidos de un perro. La papila cervical se localizó en la hilera transversal 17 y el poro excretor en la hilera 25. De

igual manera el extremo posterior presentó el mismo número de papilas que las observadas en los perros, pero no se observaron espículas.

Huevos de *G. binucleatum*

En la Figura 32, se observa la microscopia electrónica de barrido de huevos de *G. binucleatum*, eliminados en la materia fecal de un perro infectado con parásitos adultos, son de color amarillo verdoso de forma ovalada y presenta un opérculo en uno de sus extremos. La superficie de los huevos, presenta agrietamientos y no se observó puntilleo como los huevos de *G. spinigerum*. El interior de los huevos, asemeja una cámara afelpada que proporciona anidamiento a las larvas de primer estadio que ahí se desarrollan, y el opérculo presentó una red granular de tipo poroso.

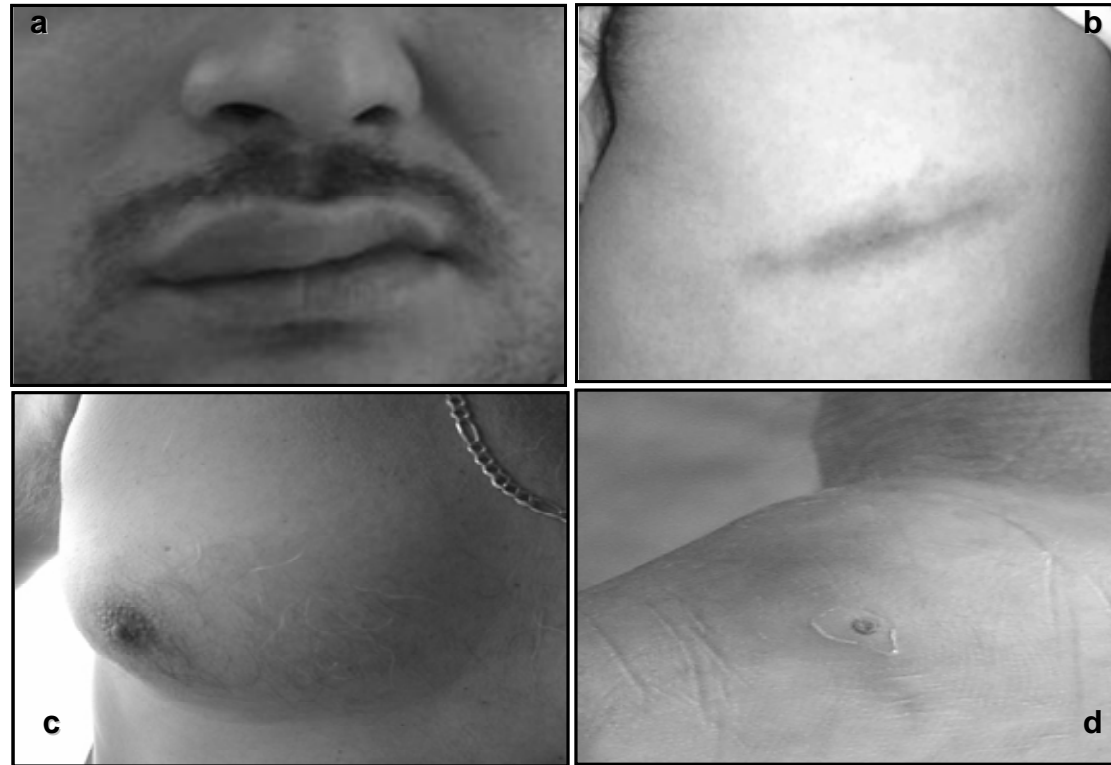


Figura 6. Pacientes diagnosticados clínicamente con gnathostomosis cutánea en el estado de Nayarit, con antecedentes de consumir cebiche de pescado crudo en establecimientos públicos de la ciudad de Tepic. a-c) *larva migrans* edematosa o reptante, b-d) *larva migrans* serpiginosa y pseudofurunculosa.

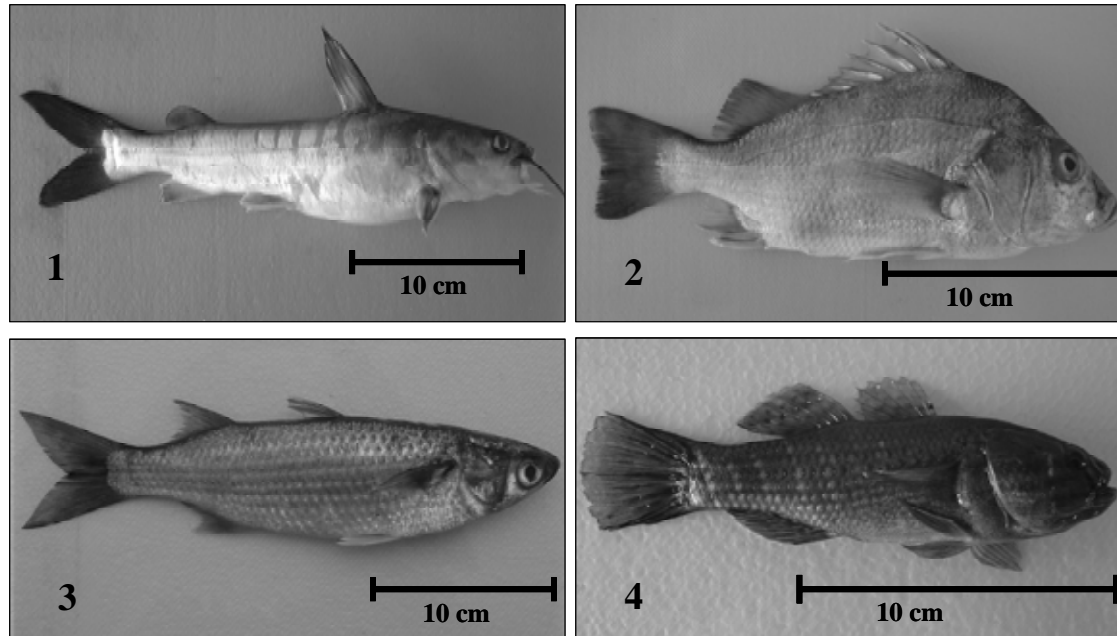


Figura 7. Hospederos intermediarios infectados con larvas de *Gnathostoma binucleatum* en la laguna de Agua Brava del estado de Nayarit. 1) *Cathorops fuerthi*, 2) *Pomadasys macracanthus*, 3) *Mugil curema*, 4) *Dormitator latifrons*.

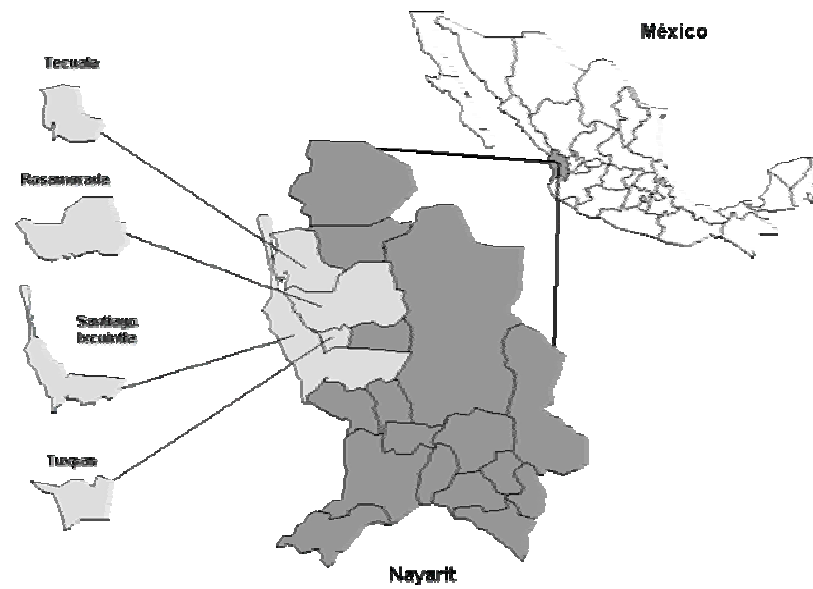


Figura 8. Municipios del estado de Nayarit, donde se colectaron pescados infectados con larvas de *Gnathostoma binucleatum*. Tecuala, Rosamorada, Santiago Ixcuintla, Tuxpan.



Figura 9. Hospederos paraténicos infectados con larvas de *Gnathostoma binucleatum*, en la laguna de Agua Brava del estado de Nayarit. a) *Casmerodius albus* garzón blanco, b) *Ardea herodias* garzón cenizo.

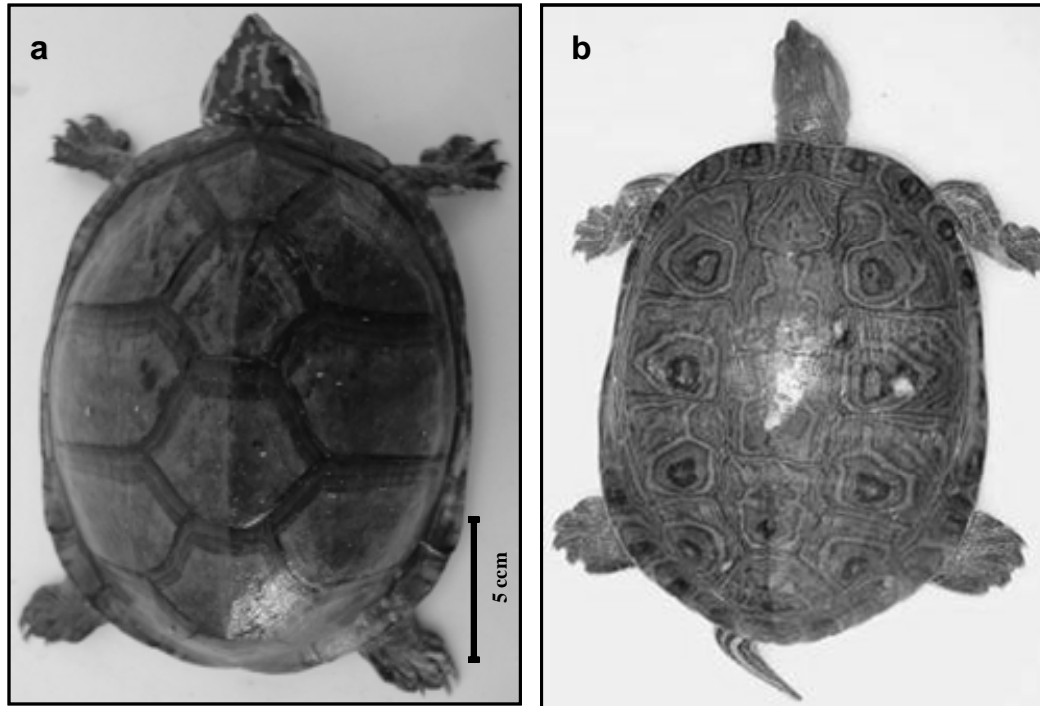


Figura 10. Hospederos paraténicos que fueron encontrados infectados con larvas de *Gnathostoma binucleatum* en la laguna de Agua Brava del estado de Nayarit. a) *Kinosternun integrum* chacuana, b) *Trachemys scripta* escurridiza.

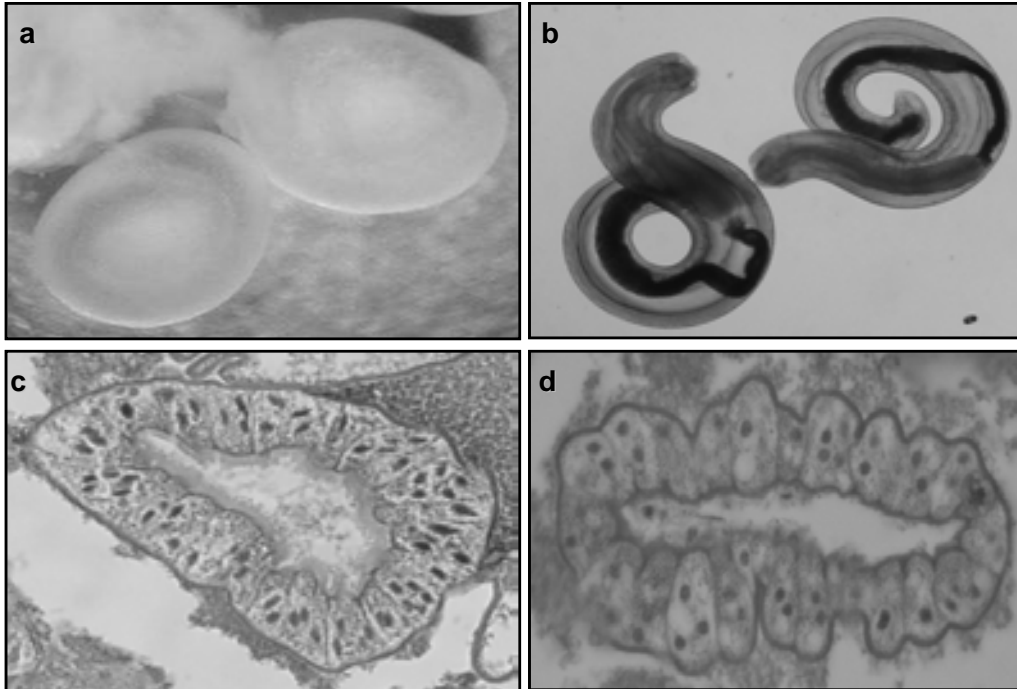


Figura 11. a-b) quistes (1.34 x 1.14mm) y larvas (3-4 mm) de *G. binucleatum*, obtenidas de tortugas. c-d) cortes intestinales de larvas (4 μ , HE.) obtenidas de peces y tortugas. Los promedios de núcleos fueron de 2.24 y 2.20 respectivamente.

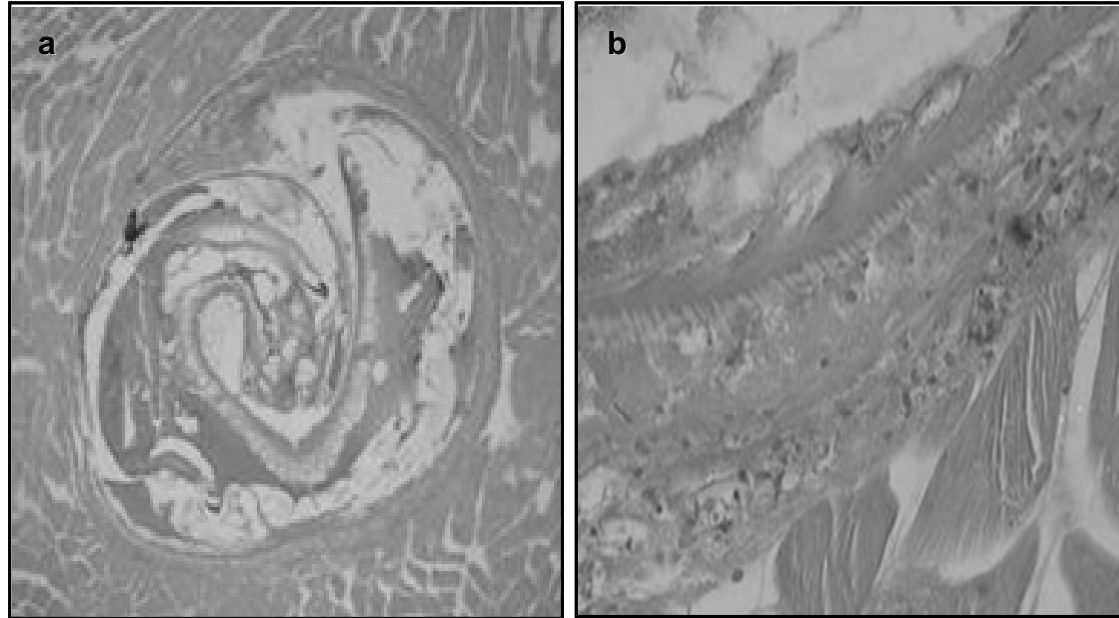


Figura 12. Microfotografía de L3A de *Gnathostoma binucleatum* obtenida de pescado. a) corte histológico (4 μ , HE.) de larva enquistada en el músculo, b) se observa ligera atrofia muscular, encapsulamiento e infiltración de eosinofilos y leucocitos

Cuadro 3. Efecto de diferentes factores físicos, sobre la viabilidad de larvas de tercer estadio avanzado de *G. binucleatum*

CONGELA	LARVAS TRATADA S	(24 horas)		LARVAS TRATADAS	(48 horas)		LARVAS TRATADAS	(72 horas)		Total 405
		vivas	muertas		vivas	muertas		vivas	muerta s	
(-10 °C)	15	6	9	15	0	15	15	0	15	45
(-15 °C)	15	2	13	15	0	15	15	0	15	45
(-20 °C)	15	0	15	15	0	15	15	0	15	45
REFRIGERA		(10 días)			(20 días)			(30 días)		
(5 °C)	15	11	4	15	6	9	15	0	15	45
EBULLICIÓN		(3 minutos)			(4 minutos)			(5 minutos)		
(100 °C)	15	3	12	15	0	15	15	0	15	45
TATEMADO		(40 minutos)			(60 minutos)			(80 minutos)		
	15	2	13	15	0	15	15	0	15	45
JUGO LIMÓN		(1 día)			(3 días)			(5 días)		
Con quiste	15	15	0		5	10		0	15	45
		(1 hora)			(3 horas)			(7 horas)		45
Sin quiste	15	15	0	15	15	0	15	0	15	45

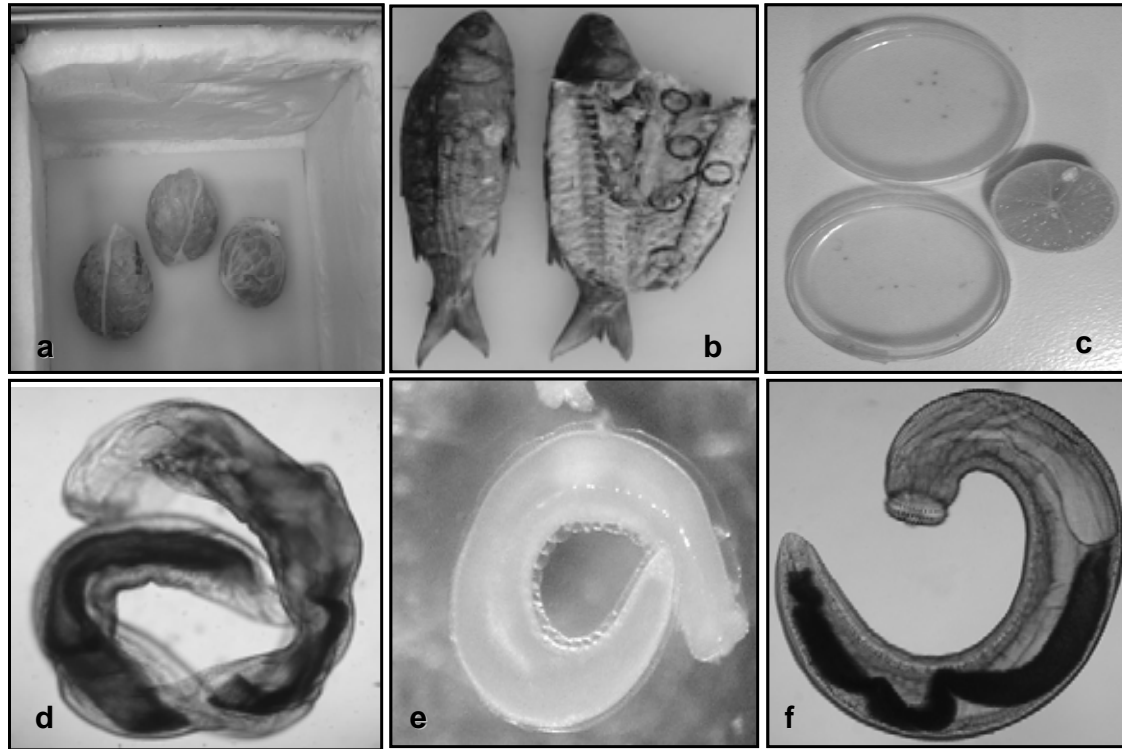


Figura 13. Efecto provocado por algunos factores físicos sobre las larvas de *G. binucleatum*. a) congelación a -10 y -20°C , b) asado y ebullición, c) tratamiento con limón. d) por congelación las larvas mostraron fuerte deshidratación, e) por asado y ebullición se observó desprendimiento de la cutícula, f) larva viva sin tratamiento.

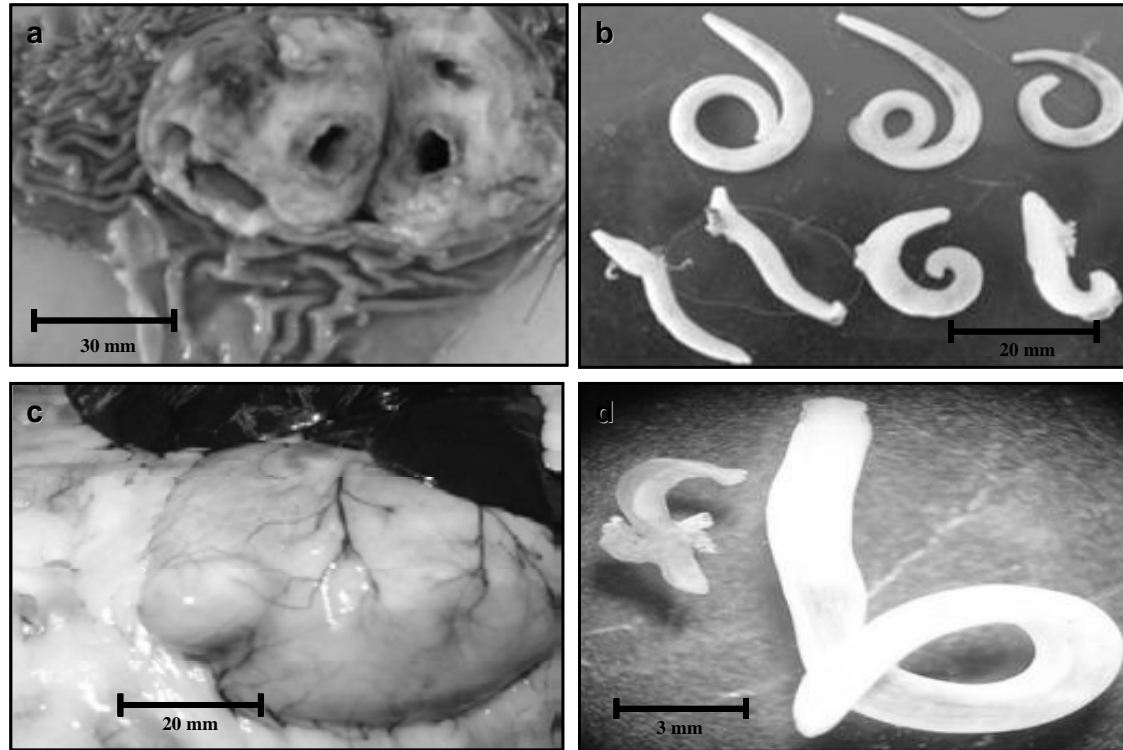


Figura 14. a-b) nódulo gástrico y parásitos adultos obtenidos de un perro infectado con *G. binucleatum*, se observan perforaciones y tejido fibroso. c-d) nódulo gástrico y parásitos juveniles, obtenidos de dos gatos infectados, los gusanos son mas pequeños



Figura 16. Obtención de larvas de primer estadio. a) Huevos blastomerados (71.87 x 33.85 μ), obtenidos de un perro infectado con *G. binucleatum*. b) larva de primer estadio dentro de una vaina grande, la región anterior es mas ancha que la posterior y el cuerpo presenta arrugas y granulaciones a lo largo del cuerpo (285.8 X 0.134 μ).

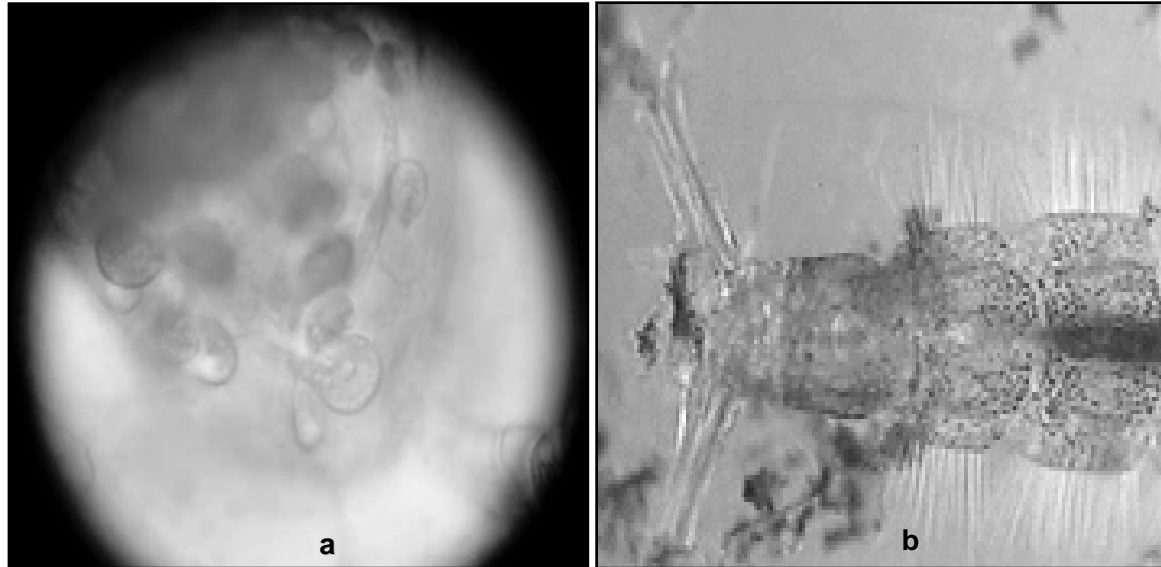


Figura 17. a) Larvas L2 de *G. binucleatum*, desarrolladas experimentalmente en el hemocéle de copéodos *Mesocyclops longicetus*. b) larva L2 desarrollada en la región media y posterior de larvas de díptero de la Familia: *Chironomidae*.

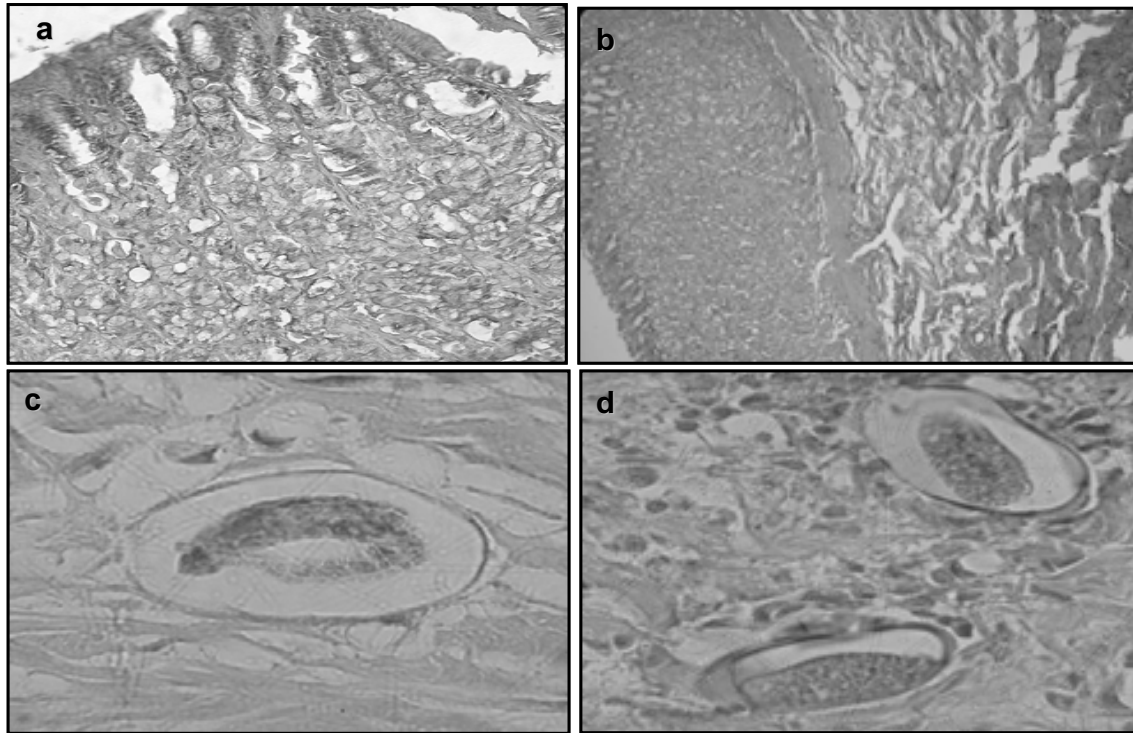


Figura 18. Cortes histológicos de nódulos gástricos, obtenidos de un perro infectado con parásitos adultos de *G. binucleatum*. a-b) el nódulo presentó tejido fibroso, c-d) se observaron huevos larvados y blastomerados capturados dentro del tejido nodular, infiltración de células plasmáticas, macrófagos y eosinófilos rodeando los huevos.

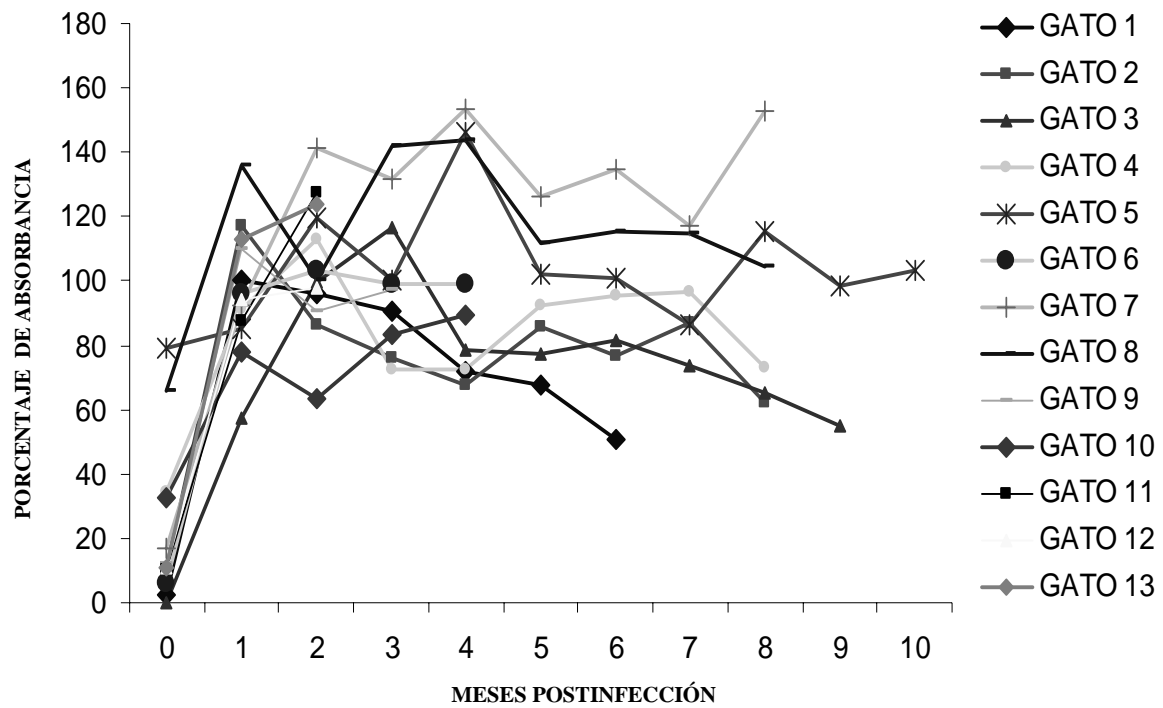


Figura 19. Cinética de anticuerpos IgG anti-AgL3A en 13 gatos infectados experimentalmente con *G. binucleatum* (mes 0, momento de la infección)

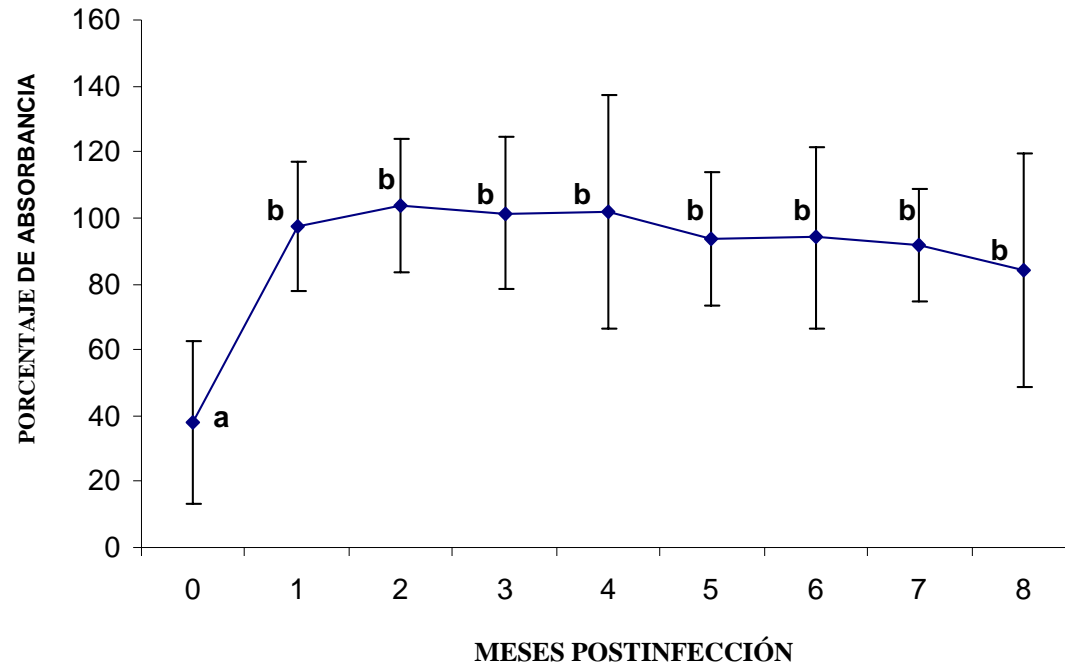


Figura 20. Cinética del porcentaje de absorbancia de los niveles de anticuerpos, contra antígeno de larvas de *G. binucleatum* en 13 gatos infectados.

(Letras iguales no hay diferencia estadística, letras diferentes si hay diferencia estadística)

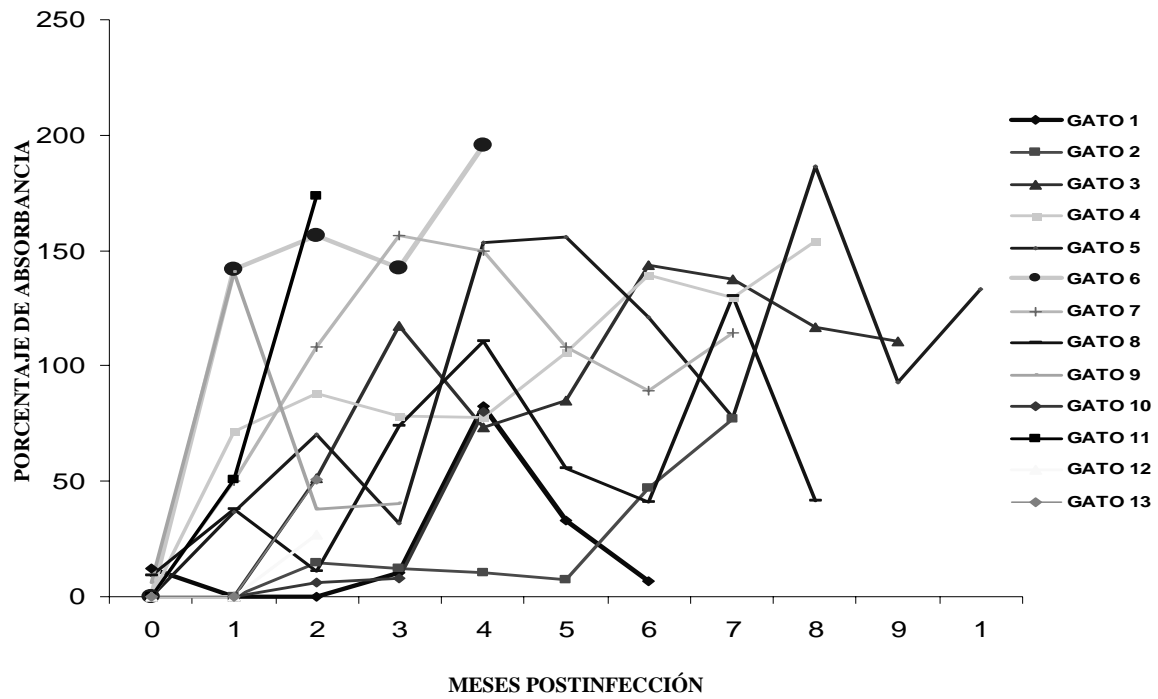


Figura 21. Cinética de anticuerpos IgG anti-AgGA de *G. binucleatum* en 13 gatos infectados experimentalmente.

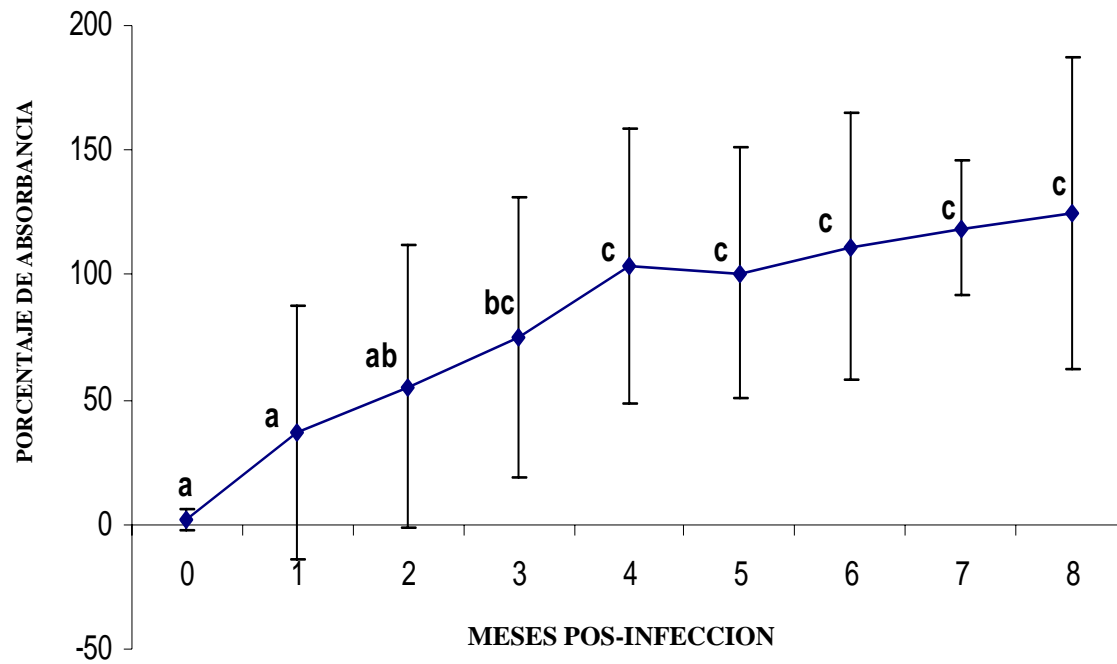


Figura 22. Cinética del porcentaje de absorbancia de los niveles de anticuerpos, contra antígeno de fases adultas (AgGA) de *G. binucleatum* en 13 gatos infectados.

(Letras iguales no hay diferencia estadística, letras diferentes si hay diferencia estadística)

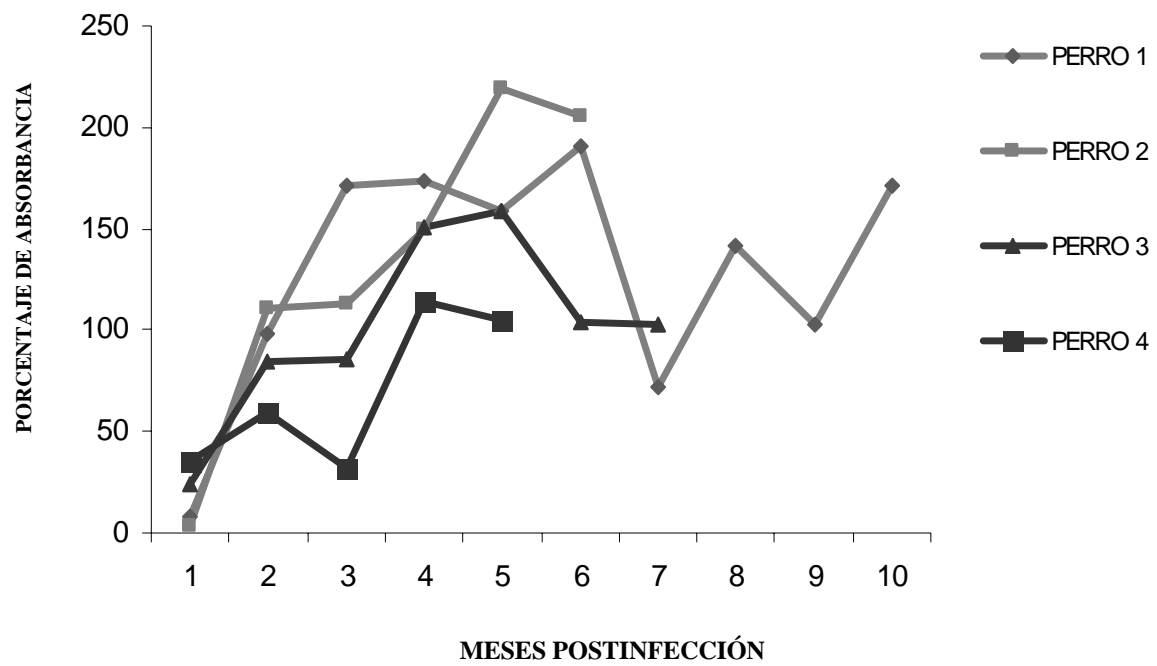


Figura 23. Cinética de anticuerpos IgG anti-AgL3A de *G. binucleatum* en 4 perros infectados experimentalmente.

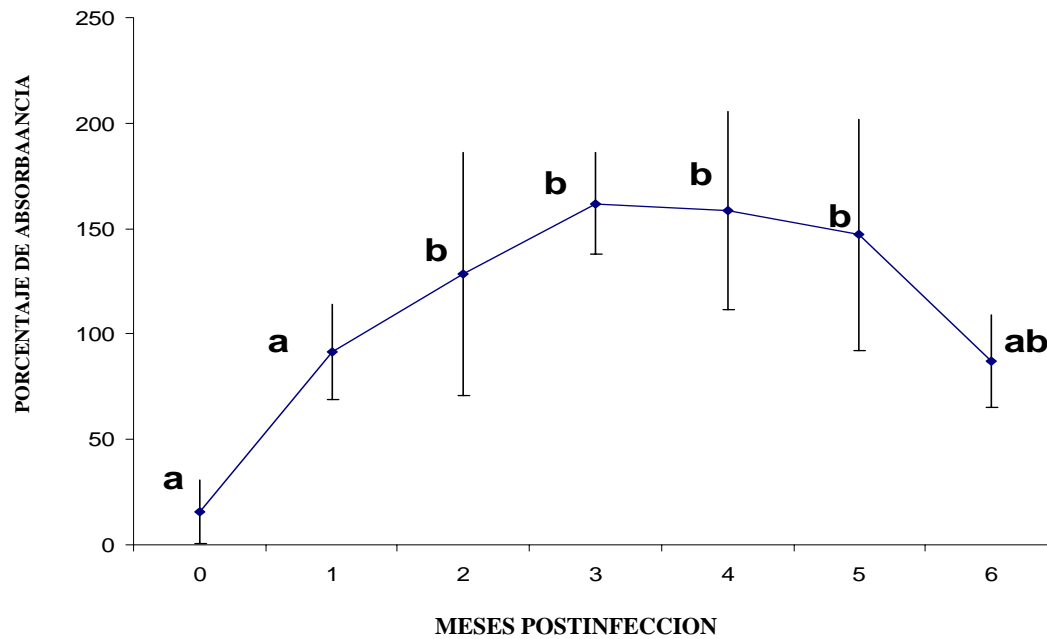


Figura 24. Cinética del porcentaje de absorbancia de los niveles de anticuerpos, contra antígeno de L3A de *G. binucleatum* en 4 perros infectados.

(letras iguales no hay diferencia estadística, letras diferentes si hay diferencia estadística)

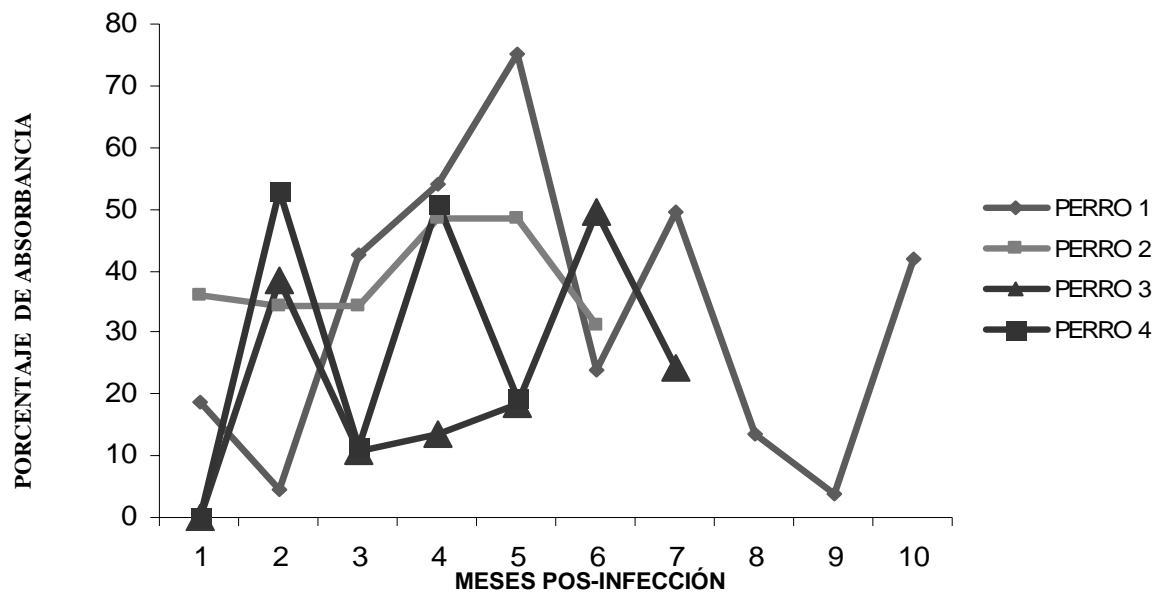


Figura 25. Cinética de anticuerpos IgG anti-AgGA de *G. binucleatum* en 4 perros infectados experimentalmente.

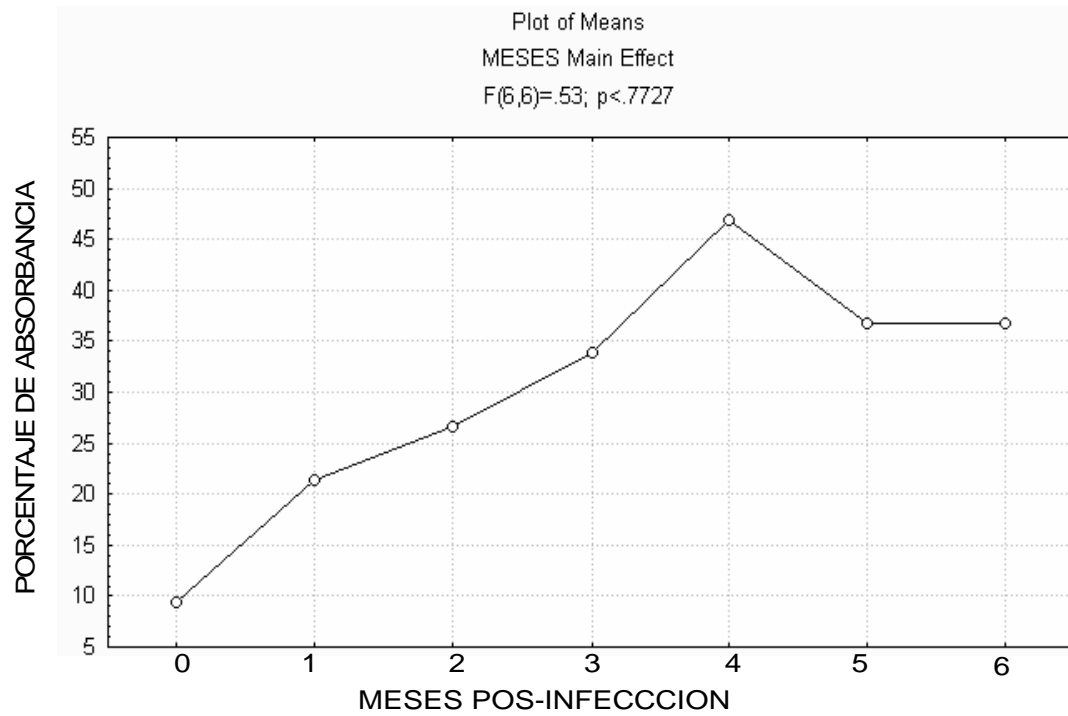


Figura 26. Cinética del porcentaje de absorbancia de los niveles de anticuerpos medidos, contra antígeno de fases adultas (AgGA) de *G. binucleatum* en 4 perros infectados.

(no se observó diferencia estadística $P>0.05$).

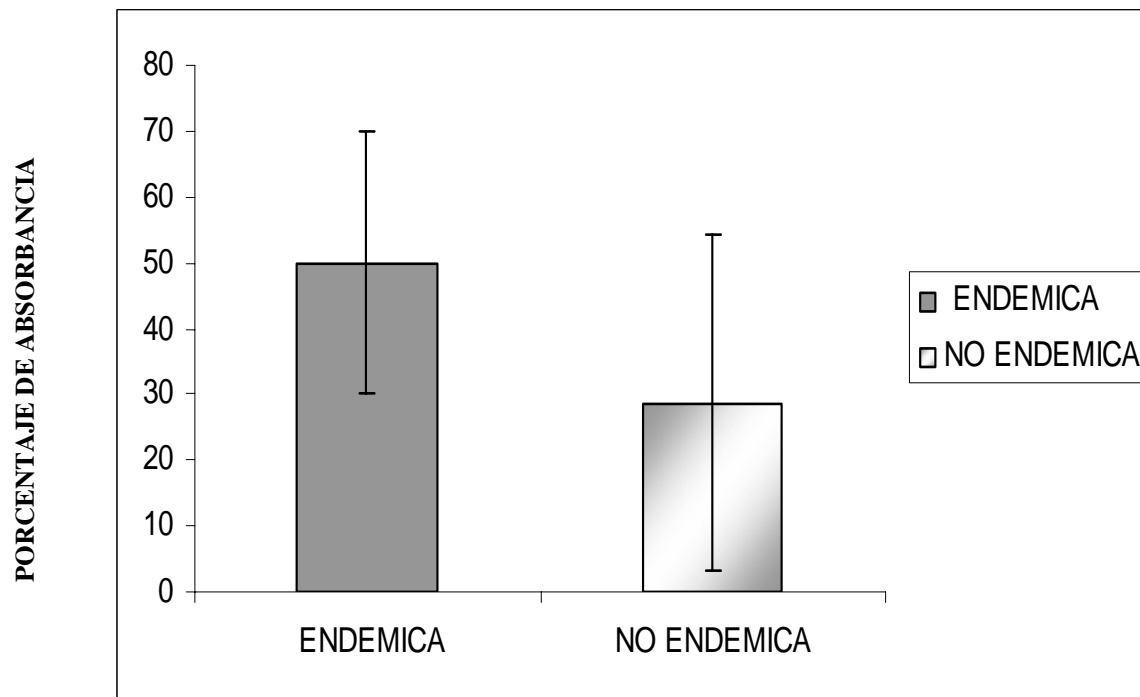


Figura 27. Niveles de anticuerpos IgG contra antígeno de larvas (AgL3A) en perros de zona endémica y no endémica de *G. binucleatum*.

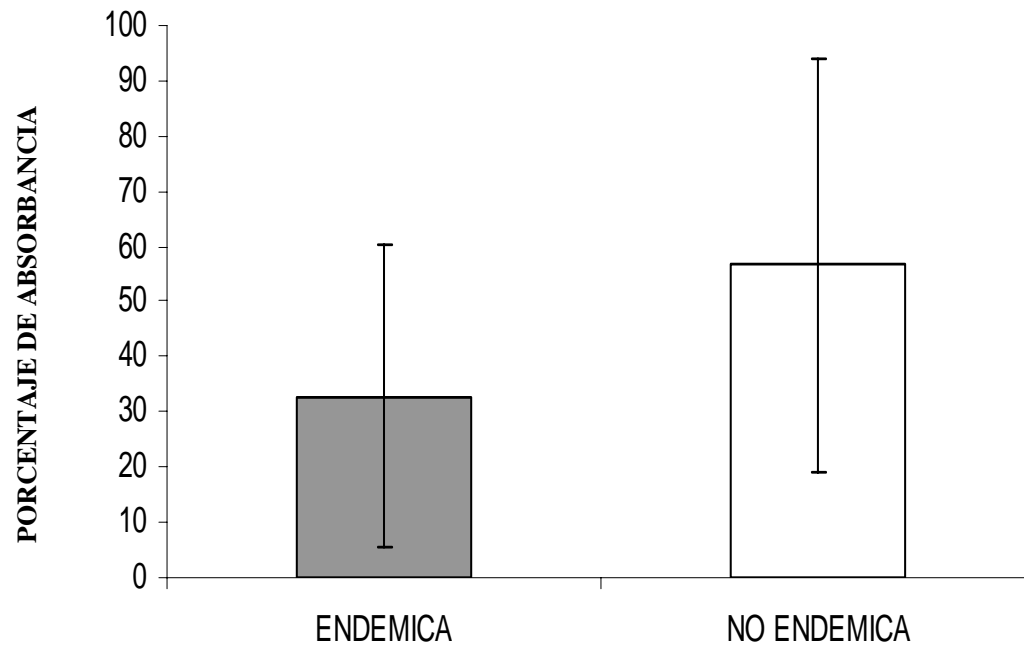


Figura 28. Niveles de anticuerpos IgG contra antígeno de gusano adulto (AgGA) en perros de zona endémica y no endémica de *G. binucleatum*

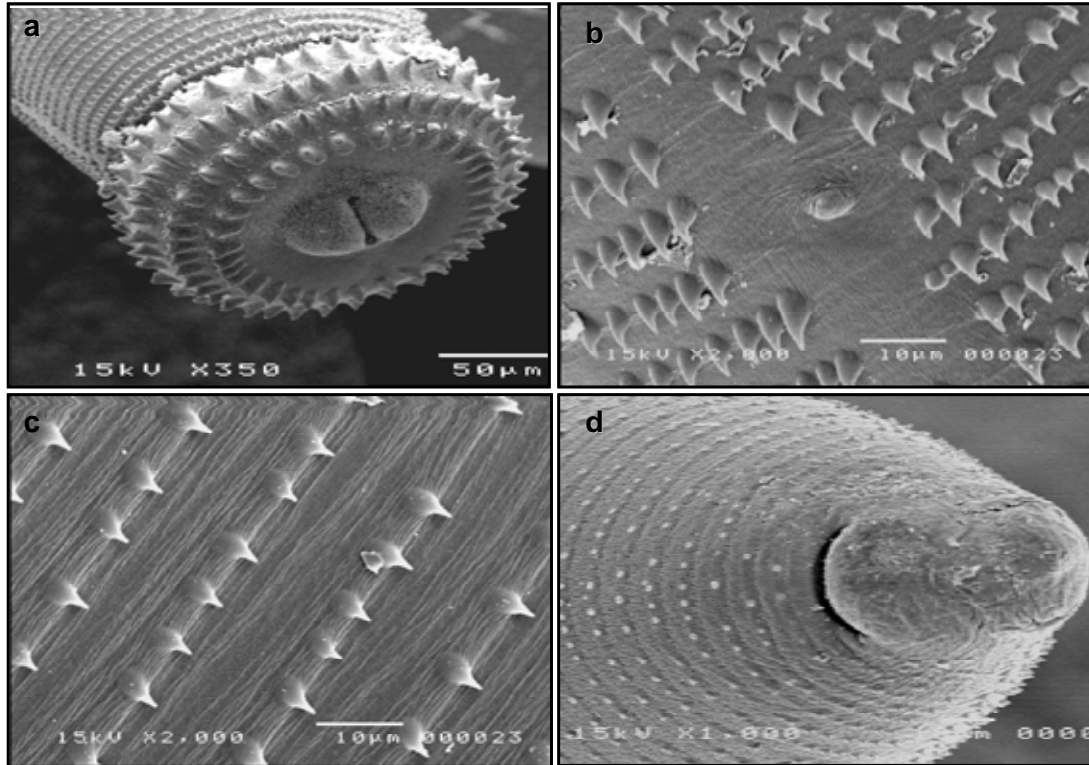


Figura 29. Microscopia electrónica de barrido de una larva L3A de *G. binucleatum* obtenida de tortuga. a) bulbo cefálico con 4 hileras de ganchos, b) papila cervical, c) espinas cuticulares, d) extremo posterior que presenta la abertura anal y los anidios.

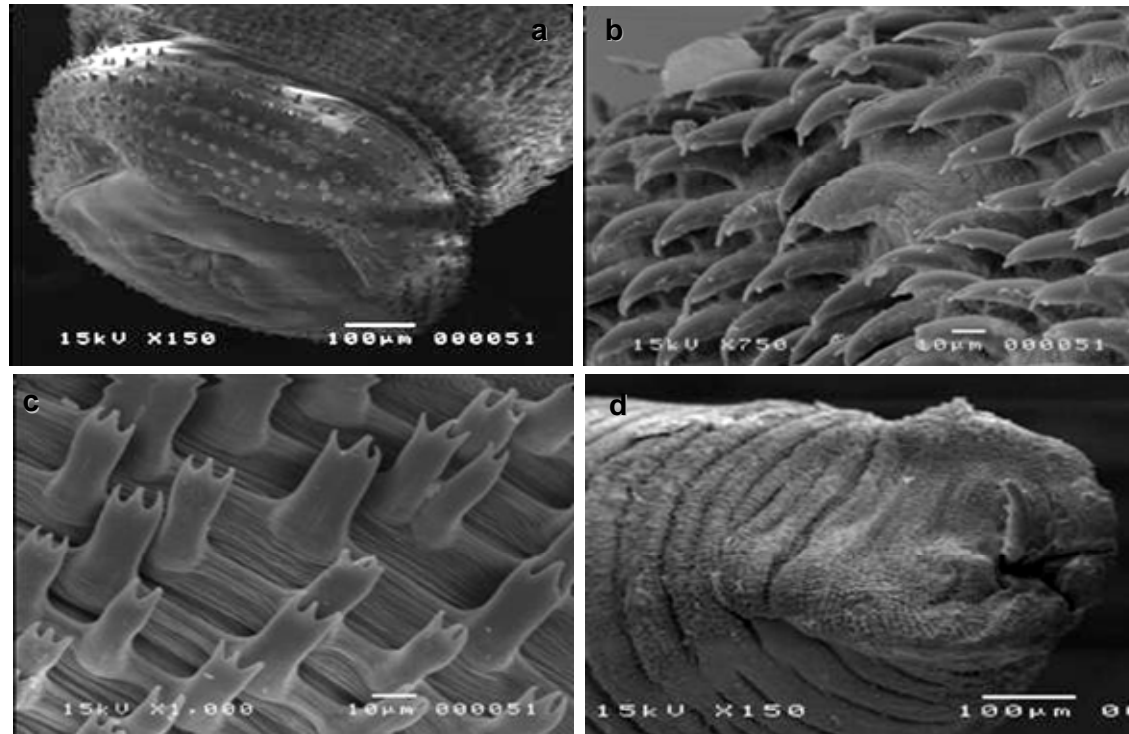


Figura 30. Microscopia electrónica de barrido de un parásito adulto de *G. binucleatum* obtenido de un perro infectado. a) bulbo cefálico con 8 hileras de ganchos, b) papila cervical localizada en la hilera número 23, c) espinas cuticulares con 2 a 3 puntas, d) extremo posterior del macho, se observan 4 pares de papilas laterales grandes, 3 pares de papilas ventrales mas pequeñas y un par de espículas desiguales.

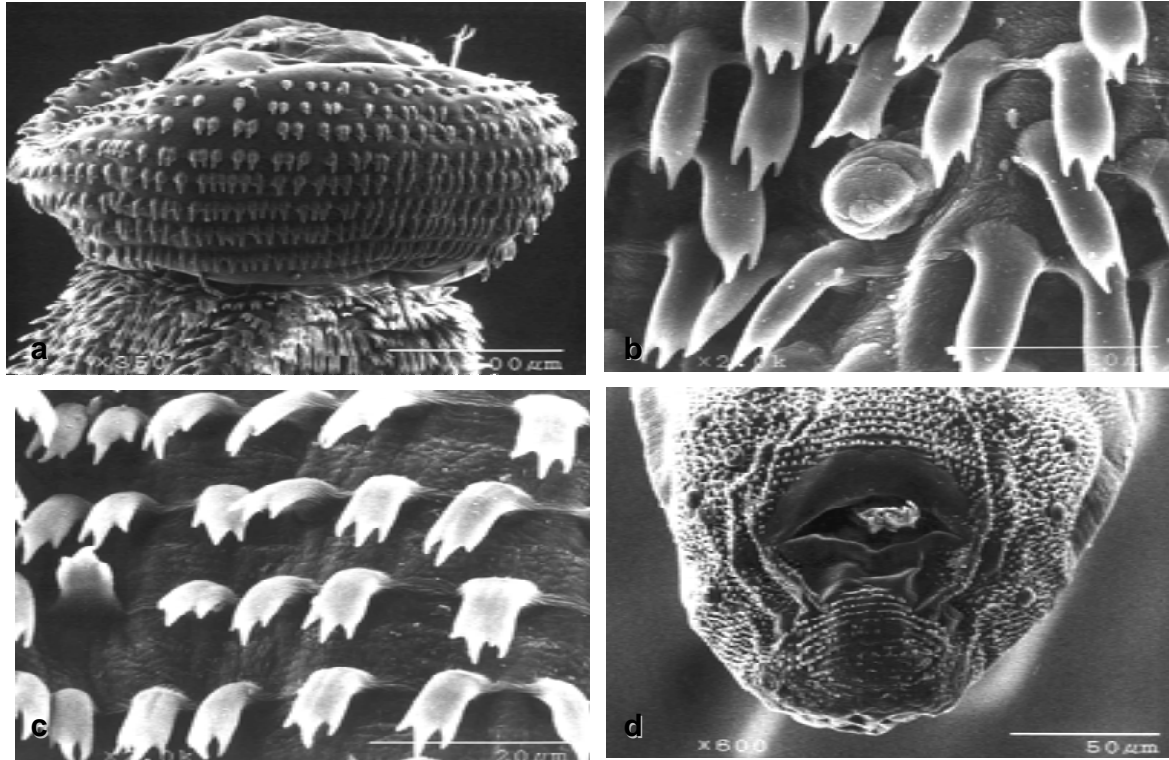


Figura 31. Microscopia electrónica de barrido de un parásito juvenil de *G. binucleatum* obtenido de un gato infectado. a) bulbo cefálico con 9 hileras de ganchos, b) papila cervical localizada en la hilera 19, c) espinas cercanas al bulbo con 2 a 3 puntas, d) extremo posterior con 4 pares de papilas laterales grandes, 3 pares de papilas ventrales mas pequeñas y ausencia de espículas.

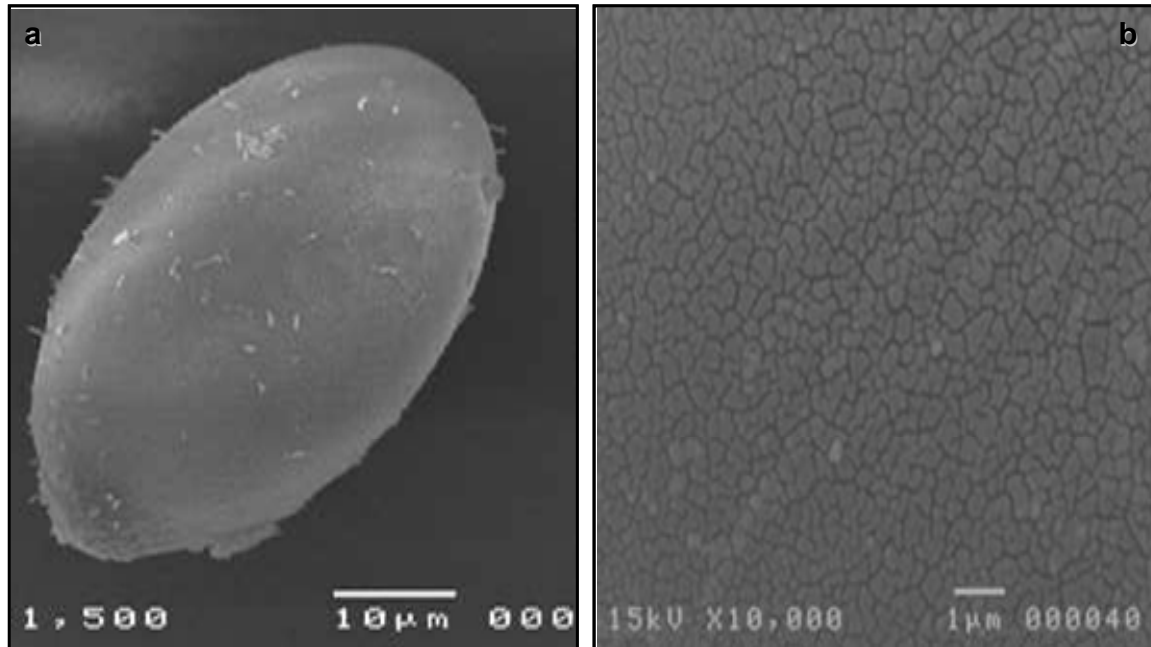


Figura 32. Microscopia electrónica de barrido. a) Huevo de forma ovalada y opérculado obtenido de un perro infectado con parásitos adultos de *G. binucleatum*, b) la superficie presenta agrietamientos que pueden ser característicos de esta especie ya que los huevos de *G. spinigerum* presentan puntillado fino.

DISCUSIÓN

En este trabajo se muestrearon seis de las especies de mayor importancia comercial de la zona. De estas, se detectaron L3A en las especies: *Cathorops fuerthi* (chihuil), *Pomadasys macracanthus* (burro), *Mugil curema* (liseta) y *Dormitator latifrons* (puyequé). Lo anterior, las hace las especies de mayor riesgo para la población humana en la región. Las especies *Oreochromys aureus* (tilapia) y *Chanos chanos* (sábalos) no se encontraron infectadas.

Este es el primer reporte mundial de *Mugil curema* y *Pomadasys macracanthus* como segundos hospederos intermediarios de *G. binucleatum* en aguas estuarinas. Las especies *Cathorops fuerthi* y *Dormitator latifrons* fueron registradas previamente como hospederos intermediarios del parásito en el estado de Nayarit (Alvarez-Guerrero & Lamothe-Argumedo, 2000 a).

Las especies *Cathorops fuerthi*, *Pomadasys macracanthus* y *Dormitator latifrons* tradicionalmente se extraen en la pesca comercial como fauna de acompañamiento o guano y se utilizaban para obtener harina de pescado. Debido al costo y a la mayor demanda de pescado, estas especies actualmente se usan para el consumo humano. Por el aspecto y tamaño, estas especies se venden como filetes para preparar platillos regionales como el cebiche y callos, que se elaboran con carne cruda. Esto hace que las especies sean especialmente riesgosas como fuente de infección en la población humana, no solo de la región, puesto que este producto se comercializa a los estados de Jalisco, Michoacán, Colima, Guerrero y el D.F. (Alvarez-Guerrero & Lamothe-Argumedo, 2002).

La alta cantidad de peces con larvas de *Gnathostoma sp.* en la región, sugiere que sus depredadores pueden actuar como hospederos del parásito. Por esta razón se muestrearon aves ictiófagas que se encuentran en la región. Se identificaron L3A únicamente en dos aves, *Ardea herodias* (garzón cenizo) y *Casmerodius albus* (garzón blanco), la presencia de larvas enquistadas en regiones musculares, indica que estas aves actúan como hospederos paraténicos del parásito. Las especies de aves que resultaron infectadas, son especies endémicas en las zonas de estudio y la base de su alimentación es el pescado, a través del cual consume larvas L3A que después se alojan en su organismo y permanecen sin evolucionar, jugando un papel como reservorios. Estos animales por su

hábitat natural, tienden a ser depredados por mamíferos silvestres (paraténisis) y las larvas podrían continuar su evolución como gusanos adultos cerrándose el ciclo en la naturaleza. Otros aspectos epidemiológicos relevantes que mencionar, es el hecho de que pueden ser cazadas furtivamente y ser consumidas por los humanos. Otras aves como el pelícano blanco *Pelecanus erythrorhynchus*, y el pato buzo *Phalacrocorax olivaceus*, fueron reportadas con larvas de *Gnathostoma sp.* en el estado de Nayarit por Alvarez-Guerrero (2000). La primera especie migra desde Canadá y llega en grandes parvadas a las lagunas y esteros de la región en donde permanece durante la época invernal. De acuerdo a comentarios personales recogidos de habitantes ribereños en las zonas de estudio, afirman que esta especie es consumida esporádicamente asada por algunos pescadores, este hábito de consumir especies no comunes, se puede convertir en un problema de salud pública en el estado.

Las tortugas son abundantes en la zona de estudio, por lo que se muestrearon las dos especies mas comunes en busca del parásito. La prevalencia en las tortugas (*Kinosternon integrum* y *Trachemys scripta*) fue del 79.1% y 52.1. Estas prevalencias son mas altas que las encontradas en peces (4.8%), lo que las podría hacer más importantes en el mantenimiento del parásito en el hábitat ecológico. Este es el primer trabajo sistemático de recolección y el primero en donde se identifica la especie por DNA ribosomal ITS2 de reptiles acuáticos como hospederos paraténicos de *G. binucleatum*.

El papel epidemiológico de las tortugas puede ser controversial, puesto que si bien la incidencia del parásito es alta y son consumidas por los humanos en las zonas donde son capturadas, el consumo generalmente implica la cocción de las mismas y por lo tanto una disminución en el riesgo hacia los humanos. Sin embargo, en su hábitat las tortugas son depredadas por otros animales como los cocodrilos, nutrias, mapaches, tlacuaches, zorrillos, felinos mayores, aves silvestres, cangrejos y peces, de ahí que las tortugas podrían jugar un papel importante en el mantenimiento del ciclo biológico de *Gnathostoma binucleatum* al formar parte de la cadena alimenticia de estos animales (Bonin, *et al.* 2006; Vetter, *et al.* 2005; Harding, 1997). Por lo anterior, se muestreo a los depredadores naturales mas comunes en la zona (mapaches y tlacuaches), pero en ellos no se detectaron parásitos adultos de *Gnathostoma binucleatum*, por lo que hasta hoy no existen indicios que participen en el ciclo biológico en condiciones naturales.

El hallazgo de L3A en peces y tortugas llevo a tratar de identificar la especie de *Gnathostoma* que se estaba observando. Los criterios que tradicionalmente se han utilizado para este fin son evaluaciones morfométricas como: longitud total, numero de ganchos en el bulbo cefálico, localización de la papila cervical, número de estrías transversales, número de células intestinales y número promedio de núcleos por célula intestinal. Los valores encontrados corresponden a los reportados para L3A de *G. binucleatum* (Lamothe-argumedo et al., 1989; Díaz-camacho et al 2002; Almeyda et al., 1991; Akahane et al 1994; Koga et al. 1999; 2000). No se encontraron diferencias en los valores morfométricos entre larvas encontradas en peces y tortugas. Tomando en cuenta lo anterior y si se considera que todos los ejemplares fueron colectados simultáneamente en el mismo hábitat, se puede concluir que se trata de la misma especie.

Algunos autores consideran que la descripción morfológica y morfométrica tanto de los parásitos adultos como de larvas, no es suficiente para diferenciar entre especies de *Gnathostoma*, aunque las primeras especies encontradas fueron descritas bajo estos criterios. Por lo anterior, se ha propuesto que la secuenciación del DNA es mucho más confiable para la identificación de especies. En el presente estudio se secuenció el DNA, ITS2 ribosomal de un parásito adulto recuperado de un perro infectado experimentalmente con L3A obtenidas de tortugas. Las secuencias de 410 pares de bases del segmento amplificado fueron alineadas con las secuencias del genbank para *Gnathostoma binucleatum*, estas tuvieron una variación del 0.48%, lo que permite afirmar que se trata de *G. binucleatum*. Si se toma en cuenta que *G. binucleatum* ha sido reportado como el agente etiológico de la gnathostomosis humana en Nayarit y Sinaloa (León-Règagnon et al., 2002) se puede concluir que la ingestión de estos hospederos es la forma en que los humanos adquieren la infección en el estado de Nayarit. Estudios similares con peces dulceacuícolas *Petenia splendida*, *Cichlasoma managiense* y *Gobiomorus dormitor*, del estado de Tabasco, presentaron una variación de 0.24% y 0.475%, en relación con las secuencias de bases del Genbank para *G. binucleatum*, por lo que concluyeron que se trataba de la misma especie y que esta es la forma de infección para humanos en el estado de Tabasco (Kifune et al., 2004).

En la actualidad, no existe literatura sobre la forma de disminuir el riesgo de adquirir la gnathostomosis humana por ingerir pescado en platillos que tradicionalmente se elaboran con carne cruda, como el cebiche, sushi o callos. Con el objeto de proponer

alternativas de prevención para el control de la enfermedad y teniendo una gran cantidad de larvas disponibles se evaluó el efecto de algunos factores físicos sobre la viabilidad de las L3A. La congelación a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por al menos 48 horas mató al total de L3A de *G. binucleatum* que fueron colocadas en la carne de pescado. Este dato puede ser útil a nivel casero para prevenir la infección, se puede utilizar la nevera de un refrigerador doméstico para congelar por 48 horas la carne de pescado que se desea preparar en cebiche crudo, garantizando así la salud familiar. La congelación a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ tuvo el mismo efecto que en el caso anterior, sin embargo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, las larvas murieron a las 24 horas de exposición, por lo que esta medida puede ser usada por empresas que almacenen grandes volúmenes de pescado (centros de acopio, pescaderías, restaurantes, supermercados, empacadoras), las cuales al almacenar por 24 a 48 horas el producto antes de comercializarlo, garantizarán la salud del público consumidor.

La refrigeración a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ tradicionalmente se ha usado para la conservación de productos perecederos por cortos periodos. El mantenimiento de la carne de pescado a esta temperatura por 10 y 20 días no mató el total de las larvas (26 % de mortalidad). La conservación por 30 días mató el total de larvas, pero esto probablemente no es el efecto de la temperatura sino tal vez fue provocado por la auto digestión del tejido en donde aumenta el proceso de descomposición y proliferación de microorganismos. Como el pescado conservado por 30 días en refrigeración definitivamente no es apto para el consumo humano, este proceso si bien conserva el producto por un corto tiempo, no puede ser recomendado como una medida preventiva de la gnathostomosis.

El precocimiento de la carne molida de pescado por 4 minutos mato el total de larvas. La utilización de este procedimiento puede ser útil cuando la carne de pescado se desea consumir en cebiche, pues durante este tiempo conserva el sabor característico, tiempos superiores a 5 minutos alteran la palatabilidad del pescado de ahí que el consumidor prefiera recurrir al cebiche crudo.

El tratamiento de larvas con calor seco (tatemado en leña) resultó eficaz para destrucción de larvas, pues aunque se encontraron 2 larvas vivas a los 40 minutos de exposición, el pescado aún en ese momento se encuentra semicocido, su total cocimiento se obtiene aproximadamente a los 90 minutos de exposición al calor, lo que elimina el riesgo de infección.

Todas las larvas (15) tratadas en jugo de limón resistieron el efecto del ácido al primer día. A los tres días se observaron 5 larvas vivas y 10 muertas. A los cinco días todas las larvas (15) murieron, cabe señalar que las larvas se evaluaron enquistadas y el tiempo que tardaron en morir, supera el tiempo en que un producto perecedero como el cebiche tarda en comercializarse en su totalidad. De ahí el peligro para los humanos de adquirir la infección por ingerir cebiche.

Las larvas tratadas bajo condiciones de congelación y refrigeración, se observaron deshidratadas, cristalizadas, quebradizas y rotas. Las que se evaluaron con calor seco y húmedo (ebullición, asado) se observaron parcialmente cocidas, reblandecidas y con desprendimiento parcial de su cutícula. Las larvas que fueron tratadas con limón cambiaron su color rojo sangre a color blanco opaco.

Tomando en cuenta que el ciclo biológico de *G. binucleatum* no se encuentra claramente definido, se evaluó la infección experimental con larvas L3A en perros y gatos domésticos, para determinar su participación como hospederos definitivos en el ciclo. Cuatro de los ocho perros inoculados con larvas L3A de *G. binucleatum*, desarrollaron formas adultas y juveniles en su estómago, el resto resultaron negativos. De los perros positivos solo uno desarrollo parásitos adultos y eliminó huevos en heces, del resto solo se encontraron fases juveniles. Estudios realizados en Asia, han demostrado que los gusanos de *Gnathostoma spp*, tienen esa característica de ser poco prolíferos y de tener un ciclo biológico complejo que los hace diferentes a otros nematodos. El periodo de prepatencia observado fue de 5.5 meses y el de patencia de 3.5 meses. Este tiempo es mayor al reportado por Miyazaki, (1954) para *Gnathostoma spinigerum* que fue de 100 días.

Las lesiones desarrolladas en los perros infectados, fueron la presencia nódulos de diferente tamaño en la pared gástrica, estas lesiones han sido reportadas en la mayoría de los hospederos definitivos de las catorce especies de *Gnathostoma spp*, identificadas en el mundo, excepto *G. nipponicum* que se localiza en esófago, *G. miyazakii* y *G. vietnamicum* en riñón, *G. didelphis* y *G. brasiliense* en hígado (Miyazaki, 1954; 1960; 1991; Daengsvang, 1982). Resulta importante mencionar que en el perro que eliminó huevos al terminar el período de patencia, se observó la eliminación de las hembras en materia fecal y a la necropsia solo se encontraron machos incrustados en la pared del nódulo. La razón de esto no es clara, pero probablemente se debe a que las hembras que

terminaron de producir huevos agotan sus reservas metabólicas y mueren. La observación del útero totalmente vacío en las hembras eliminadas y pérdida de coloración del pseudoceloma parecen confirmar el agotamiento biológico.

Microscópicamente el nódulo que tenía gusanos adultos, presentó gran cantidad de huevos atrapados dentro del tejido y una fuerte reacción de macrófagos y eosinófilos alrededor. La capa externa de los huevos estaba íntegra, por lo que el interior con embriones en diferente estadio de desarrollo estaban aparentemente protegidos. Sin embargo, los huevos estaban atrapado dentro del tejido, probablemente fueron ovipositados en la luz de las cavernas del nódulo y después arrastrados a la lesiones por el mismo desplazamiento de los parásitos. La presencia de gran cantidad de células inflamatorias cercanas o pegadas al huevo es probablemente el resultado de la gran antigenicidad de los mismos y contribuye al crecimiento del nódulo. Por lo que si bien los huevos probablemente participan en la patogenia y estimulación para la formación del nódulo por el hospedador, su papel en la epidemiología es nulo pues están atrapados sin poder salir del mismo.

En dos de trece gatos inoculados se recolectaron gusanos, sin embargo no se detectaron huevos eliminados en heces. En la necropsia practicada en un gato se observó un nódulo de 1 a 2 cm de diámetro, localizado en la curvatura mayor del estómago del cual se recuperó un gusano macho en fase juvenil. La necropsia practicada en el segundo gato, no reveló la presencia de nódulos, solo se recuperó una larva L3A en proceso de muda localizada en la región muscular del diafragma. La dificultad de lograr la infección en los gatos inoculados puede ser debida a varios factores, uno de ellos es probablemente la falta de tiempo para madurar pues el sacrificio se realizó a los 6 y 10 meses p.i, Almeyda-Artigas, (1991); Alvarez-Guerrero, (2002) y Díaz-Camacho, (2000), infectaron gatos y al igual que en el presente trabajo, sólo pudieron obtener fases sexualmente inmaduras, el sacrificio de estos animales se realizó entre 8 y 9 meses p.i., por lo que el tiempo del sacrificio fue muy corto o el gato no es el principal hospedero natural.

Se ha propuesto que los gatos son el hospedador definitivo de *G binucleatum*, esto debido a que Almeyda-Artigas (1991) encontró gusanos adultos en dos de nueve gatos ferales y en un ocelote (*Felis pardalis*). Sin embargo, en este proyecto se infectaron más fácilmente los perros que los gatos. Lo anterior sugiere que

probablemente los perros jueguen un papel más importante en la epidemiología de la enfermedad o que incluso exista algún otro hospedero definitivo no identificado.

Con el objeto de completar el estudio en los perros y gatos infectados experimentalmente se midió la cantidad de anticuerpos séricos anti AgL3A y AgGA de *G. binucleatum* por la prueba de ELISA. La prueba de ELISA estandarizada para este trabajo se realizó utilizando una concentración de antígeno constante de 10 µg/ml y optimizando los porcentajes de absorbancia mediante la utilización de diluciones de suero de 1:320 para AgL3A y de 1: 80 para AgGA. La menor sensibilidad de la prueba para AgGA pudo ser debido a que tiene una menor concentración antigénica que el AgL3A o posiblemente a una menor producción de anticuerpos por parte del hospedero a estos antígenos; además, trabajos como el de Caballero-García *et al.* (2005), reportan que los antígenos del tercer estadio larvario de *G. binucleatum* son más específicos que los de la fase adulta. Estos datos sugieren que los antígenos presentes en las fases larvarias son diferentes a los de la fase adulta y que pueden ser más eficientes en el inmunodiagnóstico para la gnathostomosis.

Todos los animales (perros y gatos) infectados experimentalmente con *G. binucleatum* tuvieron un incremento en los niveles de anticuerpos contra AgL3A cercanos al 100% a partir del primer mes pos-infección, posteriormente en los gatos el nivel de anticuerpos se mantiene constantes y se forma una meseta en la gráfica que se conserva hasta el final del experimento.

La respuesta de anticuerpos en los gatos en un principio, se asemeja a una respuesta primaria clásica contra un antígeno (García-Tamayo, 1997). En esta, el periodo de latencia, que se define como el lapso de tiempo que transcurre desde que se introduce el antígeno hasta la detección de los primeros anticuerpos fue de 30 días (Mes 1), a partir de esta fecha, en vez de bajar los títulos de anticuerpos estos se mantienen hasta finalizar el experimento. Esta diferencia puede ser debida a que la respuesta primaria clásica es el resultado de una única estimulación y que lo observado en este experimento es el resultado de la estimulación inmunológica que el parásito hace en el organismo de forma constante. Comportamiento similar se ha observado en otros parásitos como *Toxocara canis* o *Haemonchus contortus* (Muñoz, 2007).

El comportamiento de la respuesta de anticuerpos en los perros es diferente. En estos, los títulos de anticuerpos mantienen el incremento a partir del primer mes pos-

infección hasta llegar a su punto mas alto en el mes 3 y paulatinamente bajan en meses posteriores. Esta disminución de la respuesta puede deberse a un fenómeno conocido como tolerancia inmunológica. Esta se ha definido como una disminución o ausencia específica de respuesta inmune frente a un antígeno, ya sea propio o extraño, inducida por el contacto previo de dicho antígeno, se trata de un estado activo, no es una simple ausencia de respuesta. El parásito en los perros produce en forma constante antígenos similar a lo que ocurre en gatos, pero estos aparentemente reaccionan diferente, mientras en gatos la respuesta se mantiene constante, en los perros aparentemente tiende a disminuir lo que le daría al parásito mejores condiciones en su microhábitat para vivir y esto podría ser la razón por la que fue mas fácil infectar perros que gatos.

En cuanto al AgGA, los niveles de anticuerpos en los gatos tuvieron un incremento lento y constante durante todo el periodo de muestreo, alcanzando el 100% hasta el cuarto mes p.i. En los perros hubo un comportamiento similar pero los niveles alcanzaron un máximo del 46% en el cuarto mes p.i. La respuesta es mayor en los gatos que en los perros lo que confirma observado con AgL3A. El aumento constante de anticuerpos anti-AgGA probablemente es el resultado de una producción secuencial de los antígenos que seria el resultado de una continua maduración del parásito.

Una vez estandarizada la prueba y sabiendo los niveles de anticuerpos en perros, se examinaron los niveles de anticuerpos en perros de 2 zonas: una zona endémica (Laguna de Agua Brava, Nayarit) en la cual se examinaron 40 perros aledaños a la Laguna los cuales se alimentan de desperdicios de peces y 62 perros de una zona no endémica, donde no se han reportado casos de de gnathostomosis pero que tenían otros tipos de parásitos como *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum*, *Dipylidium caninum* y *Taenia spp.*

Los perros de la zona endémica presentaron mayor cantidad de anticuerpos anti-AgL3A ($P < 0.05$) que los perros de la zona no endémica. No se observaron diferencias ($P > 0.05$) en la producción de anticuerpos Anti-AgGA entre los perros de las dos zonas. Lo anterior, sugiere que los antígenos de las larvas tienen una mayor especificidad que los de adultos, sin embargo, esta propuesta no se puede confirmar porque no se realizó la necropsia en los perros de la zona endémica.

La gran cantidad de anticuerpos anti AgGA en los perros de la zona no endémica probablemente se deba a reacción cruzada con antígenos producidos por otros parásitos,

pues en la necropsia muchos de ellos estaba parasitados. Otros autores como Miyazaki, (1960); Nopparatana, *et al* (1991), Villar de Cipriani, (2004), Vázquez-Tsuji (2006) y Caballero-García *et al.* (2007) sugieren que *Gnathostoma* puede cruzar antigénicamente con otros helmintos como *Echinococcus granulosus*, *Trichinella spiralis*, *Dipylidium caninum*, *Ancylostoma caninum*, *Ascaris lumbricoides* y *Toxocara canis*.

Este es el primer trabajo sobre la respuesta inmune en los hospederos definitivos de *G. binucleatum*, los datos obtenidos servirán como base para estudios posteriores. En estos, el uso de antígenos purificados como los de secreción-excreción probablemente disminuyan las reacciones cruzadas con otros parásitos y serán de gran ayuda para estudios epidemiológicos.

El ciclo biológico de *Gnathostoma spinigerum* establecido por Prommas y Daengsvang en (1933), determinaron que los copépodos *Cyclops* participan como primeros hospederos intermediarios en condiciones experimentales, sin embargo, en el presente estudio se determinó que los copépodos *Mesocyclops longisetus* y larvas de dípteros pertenecientes a la familia *Chironominae*, fueron infectadas experimentalmente con larvas de primer estadio (L1) obtenidas por incubación experimental de huevos de *G. binucleatum*. Los organismos consumieron larvas (L1) y evolucionaron en su organismo como larvas de segundo estadio (L2) en un término de 6 a 9 días, lo que las ubica como primeros hospederos intermediarios de *G. binucleatum* en el estado de Nayarit. Siempre se ha referido en la literatura mundial a los crustáceos (copépodos), como los únicos hospederos intermediarios de *Gnathostoma sp.*, sin considerar que algunos otros organismos pueden estar incluidos en ese tenor, las larvas de dípteros fueron infectadas experimentalmente, este hecho modifica el esquema tradicional considerado para *G. spinigerum* y es el primer reporte internacional de larvas de dípteros como primeros hospederos intermediarios de alguna especie de género *Gnathostoma*.

El desarrollo de larvas de *G. binucleatum* en dípteros de la laguna de Agua Brava puede ser una de las razones por las que se encontró una prevaencia tan grande en las tortugas, pues estos forman parte de su alimentación (Aguirre- León y Aquino-Cruz, 2004). En este trabajo se analizó el contenido intestinal de tortugas del genero *Kinosternon*. Se encontró que su alimentación es muy variada, pues en el intestino se encontraron dípteros, caracoles, lombrices, camarones, almejas, forraje y en menor

proporción peces. Por esto, si bien la fuente de contaminación de las tortugas pudiera ser la ingestión de peces con L3A, la ingestión de larvas de dípteros podría ser otra opción.

Este trabajo aporta datos importantes sobre el ciclo biológico de *Gnathostoma binucleatum* en el estado de Nayarit y además ofrece alternativas para el control de la transmisión a los humanos. Futuros estudios servirán para completar los datos obtenidos, por ejemplo se requiere hacer un monitoreo y estudio de animales silvestres que pudieran estar involucrados en el ciclo biológico del parásito en la región de estudio, se requiere realizar estudios epidemiológicos, clínicos e inmunológicos en perros y gatos aledaños a la laguna de Agua Brava para determinar su papel epidemiológico en la enfermedad.

Para finalizar, es importante recalcar que la información generada en esta investigación debe ser difundida en los sectores productivos relacionados con la industria pesquera (captura, almacenamiento, transporte, procesamiento y comercialización de pescados), de tal manera que esta tenga un impacto social para el mejoramiento de la economía y salud de la población del estado de Nayarit.

CONCLUSIONES

Las especies de peces *Cathorops fuerthi*, *Pomadasys macracanthus*, *Mugil curema* y *Dormitator latifrons*, se identificaron como segundos hospederos intermediarios de *G. binucleatum* en el estado de Nayarit.

Las especies de peces *Oreochromys aureus* y *Chanos chanos* no resultaron infectadas con larvas L3A de *G. binucleatum*.

Se identificaron L3A en las aves ictiófagas *Ardea herodias* y *Casmerodius albus*, que posiblemente participan como hospederos paraténicos dentro del ciclo biológico.

Dos especies de tortugas *Kinosternun integrum* y *Trachemys scripta*, se detectaron infectadas con L3A de *G. binucleatum*, que probablemente participan como hospederos paraténicos dentro del ciclo biológico.

Los valores morfométricos e histológicos entre las larvas L3A de peces y tortugas no presentaron diferencias entre ellas, por lo cual se determinó que pertenecen a la misma especie.

Las alteraciones histopatológicas provocadas por las larvas en el músculo de pescado y tortugas, fueron encapsulamiento fibroso y un muy ligero infiltrado celular.

La congelación de carne de pescado con L3A de *G. binucleatum* incluidas, mató al total de larvas a partir de las 48 horas.

La refrigeración a 5 °C de larvas de *G. binucleatum*, eliminó el total de larvas hasta los 30 días.

La ebullición de carne de pescado con L3A de *G. binucleatum* incluidas, mató el total de las larvas en 4 minutos.

El asado (tatemado) de pescado con L3A de *G. binucleatum* incluidas en el músculo, mató el total de larvas a los 40 minutos de exposición al calor.

La exposición de larvas enquistadas de *G. binucleatum* en jugo de limón, en la forma similar como en el cebiche; mató el total de larvas hasta los cinco días.

La exposición de larvas desenquistadas de *G. binucleatum* en jugo de limón, mató el total de larvas hasta las 7 horas.

Cuatro de ocho perros (*Canis familiaris*) inoculados con larvas de *G. binucleatum* desarrollaron lesiones asociadas a gusanos adultos o juveniles, por lo que probablemente participan como hospederos definitivos en el ciclo biológico.

Dos de trece gatos (*Felis catus*) inoculados con L3A de *G. binucleatum*, desarrollaron lesiones asociadas a fases juveniles, por lo que probablemente participan como hospederos definitivos en el ciclo biológico.

La secuenciación del DNA ITS2 ribosomal de un parásito adulto obtenido de perros infectados, determino que pertenece a la especie *G. binucleatum*.

La inoculación de perros y gatos con L3A de *G. binucleatum*, indujo la producción de anticuerpos.

Los anticuerpos contra AgL3A en los gatos infectados aumentaron de manera significativa a partir del primer mes p.i., de aquí el promedio se mantuvo hasta el octavo mes sin diferencias estadísticas ($P > 0.05$).

Los anticuerpos IgG contra AgGA en los gatos infectados se incrementaron paulatinamente, este incremento fue significativo ($P < 0.05$) con respecto al cero a partir del tercer mes y se mantuvo sin diferencias ($p > 0.05$) hasta el octavo mes pi.

Los anticuerpos IgG contra AgL3A en cuatro perros infectados se incrementaron de manera significativa ($P < 0.05$) a partir del segundo mes p.i., a partir de aquí el promedio se mantuvo hasta el quinto mes sin diferencias estadísticas significativas.

Los anticuerpos IgG contra AgGA en cuatro perros infectados no mostraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre los diferentes meses de muestreo.

Los perros de una zona no endémica presentaron menores ($P > 0.05$) niveles de anticuerpos IgG contra AgL3A que perros de la zona endémica de Nayarit

No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) de los niveles de anticuerpos IgG contra AgGA entre los perros de la zona endémica y los perros de una zona no endémica

No se encontraron fases de *G. binucleatum* en los mapaches y tlacuaches muestreados.

Los copépodos *Mesocyclops longicetus* y las larvas de dípteros de la familia *Chironominae*, se infectaron con larvas de primer estadio (L1) de *G. binucleatum* por lo que probablemente participan como primeros hospederos intermediarios en el ciclo biológico.

La morfología de larvas y parásitos adultos observada a la microscopia electrónica de barrido, fue similar a la descrita por otros autores para *G. binucleatum*.

Los datos obtenidos en este trabajo nos permiten afirmar que el ciclo biológico de *Gnathostoma binucleatum* se encuentra totalmente establecido en los municipios aledaños a la laguna de Agua Brava en el estado de Nayarit.

LITERATURA CITADA

- Acevedo, H.A.; Quintero, M. T. y Pérez, X. (1988). Hallazgo de huevos de *Gnathostoma sp.* en heces de perros y cerdos de Temascal Oaxaca, México. Rev. Mex. parasitol. 1 (1): 35.
- Africa, M.C.; Refuerzo, G.P. and Y. García, P. (1936 a). Observations on the life cycle of *Gnathostoma spinigerum*. Philip. J. Sci. 59 (4): 513-529.
- Africa, M.C.; Refuerzo, G.P. and Y. García, P. (1936 b). Further observations on the life cycle of *Gnathostoma spinigerum*. Philip. J. Sci. 61 (2): 221-225.
- Aguirre-León, G. y Aquino-Cruz, Otto. (2004). Hábitos alimentarios de *Kinosternon herrerae* Stejneger 1925 (Testudines: kinosternidae) en el centro de Veracruz, México. Instituto de Ecología, Departamento de Biodiversidad y Ecología animal. Acta Zoológica mexicana (n.s.) 20(3). 83-98.
- Akahane, H.; Lamothe, A.R.; Martínez, C.J.M.; Osorio, S.D. and García, P.L. (1994). A morfological observation of the advanced third-stage larvae of Mexican *Gnathostoma*. Jpn. J. Parasitol. 43 (1): 19-22.
- Alba-Hurtado, F. (2007). Manual de parasitología veterinaria. Facultad de Estudios superiores Cuautitlán, Univ. Nac. Autón. Méx. pp, 1-127.
- Alderton, D. (1994). Turtles and tortoises of the World. Edit Omega, Barcelona.
- Almeyda-Artigas, R.J. (1991). Hallazgo de *Gnathostoma binucleatum* en felinos silvestres y el papel de peces dulceacuícolas y oligohalinos como vectores de la gnatostomiasis humana en la cuenca baja del río Papaloapan, Oaxaca-Veracruz, México. An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nac. Autón. Méx. 18 (2): 137-155.

Almeyda-Artigas R.J.; Acosta, H.L.; Alonso, D.M.; Castañeda, S.; Zarate, R.V.R. (1994). First record of *Gnathostoma procyonis* in México and a note on larval *G. binucleatum*. Res. Rev. parasitol. 54 (2): 93-98.

Almeyda-Artigas R.J.; Bargues, M.D.; Mass, C.S. (2000). ITS2 rDNA secuencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Américas. J. Parasitol. 86: 537-544.

Alexander, A. (1981). Técnicas quirúrgicas en animales. Ed. Interamericana, 169-172.

Alvarez-Guerrero, C y Lamothe-Argumedo, R. (2000 a). Larvas de *Gnathostoma* sp. en peces estuarinos de Nayarit, México. An. Inst. Biol. Ser. Zool. Univ. Nac. Autón. Méx. 71 (2): 179-184.

Alvarez-Guerrero, C. (2000 b). Estudio de la gnathostomiasis en el estado de Nayarit, México. Tesis de maestría. Postgrado interinstitucional en Ciencias Pecuarias (PICP) Universidad de Colima, pp, 1-74

Alvarez-Guerrero, C. y Lamothe-Argumedo, R. (2002). Estudio integral de la gnathostomiasis en el estado de Nayarit, México. The First Internacional Meeting on Gnathostomosis. Culiacán Sinaloa, México, pp, 34-40

Alvarez-Guerrero, C. y Alba-Hurtado, F. (2007). Estuarine fish and turtles as intermediate and paratenic hosts of *Gnathostoma binucleatum* in Nayarit, México. Parasitol. Res. 102: 117-122.

Amezcuca, L.F. y Castillo, R.Z. (1992). Alimentación y reproducción del solachirus mazatlanus (steindachnerm 1869) en el sistema lagunar costero de Agua Brava, pacífico de México. An. Inst. Cien. Del Mar y Limnol. Univ. Nac. Autón Méx.

- Ando, K.; Tanaka, H.; Taniguchi, Y.; Shimizu, M. and Kondo, K. (1988). Two human cases of Gnathostomiasis and discovery of a second intermediate host of *Gnathostoma nipponicum* in Japan. *J. Parasitol.* 74 (4): 623-627.
- Ando, K.; Tokura, H.; Matsuoka, H.; Taylor, D. and Chinzei. (1992). Life cycle of *Gnathostoma nipponicum* Yamaguti, (1941). *J. Helminthol.* 66: 53-61.
- Anantaphruti, M.; Setasubun, M.P.; Daengsvang, S. and Vajasthira, S. (1982). Electron microscopy of the advanced third stage of *Gnathostoma spinigerum*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health.* 13 (4): 531-540.
- Babero, B.B.; and Shepersen, R.J. (1958). Some helminths raccoons in Georgia U.S.A. *J. Parasitol.* 44 (5): 319.
- Babero, B.B. and Shepersen, R.J. (1959). On the occurrence of Gnathostomes in Georgia U.S.A. *Helminthol. Soc.* 26 (1): 53-54.
- Barcelata, V.F. (1988). Gnathostomiasis ocular subretiniana. *Bol. Oftal.* 40: 61-69.
- Bashirullah, A.K.M. (1972). Occurrence of *Gnathostoma spinigerum* Owen, 1836, in Dacca, Bangladesh. *J. Parasitol.* 58 (1): 187-188.
- Baquera-Heredia, J.; Cruz-Reyes, A.; Flores-Gaxiola, A.; López-Pulido, G.; Díaz-Simental, E. and Valderrama-Valenzuela, L. (2002). Case report: Ocular gnathostomiasis in northwestern México. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 66(5): 572-574.
- Bertoni-Ruiz, F.; García-Prieto, L.; Osorio-Zarabia, D.; León-Régagnon, V.; (2005). A new species of *Gnathostoma* (Nematoda: Gnathostomidae) in *Procyon lotor hermandezii* from México. *J. Parasitol.* 91: 1143-1149.
- Beveridge, I.; Presidente, P.J.A. and Arundel, J.H. (1978). *Gnathostoma spinigerum* infection in a feral cat from new South Wales. *Austr. Vet. J.* 54 (1): 46.

Bonin, F.; Devaux, B.; Dupré, A. (2006). Tortugas del mundo. Lynx Edicions, Barcelona.

Boongird, P.; Phuapradit, P.; Siridej, N.; Chirachariyavej, T.; Chuahirun, S. and Vejjajiva, A. (1977). Neurological manifestations of gnathostomiasis. J. Neurol. Sci, 31: 279-291.

Boo, L.L. (1976). *Gnathostoma spinigerum* Owen, 1836 (Nematoda: Gnathostomidae) from a civet cat, Prionodon Linsang Hardwick, with reference to its dietary habits. Southeast. Asian. J. Trop. Med. Pub. Heal. 7 (4): 530-533.

Bozzola, J. J. and L. D. Russell. (1992). Electrón microscopy. Principles and Techniques for biologists. Jones and Bartlett publishers. 542 p.

Bunnag, T.; Comer, D.S. and Punyagupta. (1970). Eosinophilic myeloencephalitis caused by *Gnathostoma spinigerum*, neuropathology of nine cases. J. Neurol. Sci. 10: 419-434.

Caballero, E. (1958). Estudios helmintológicos de la región oncocercosa de México y la República de Guatemala. An. Esc. Nal. Cienc. Biol. Inst. Polit. Nal. Méx. 9: 61-76.

Caballero-Garcia M.L, Almeyda-Artigas R.J, Mosqueda-Cabrera M.A., Jimenez-Cardoso E. 2005. *Gnathostoma binucleatum*: Excretion-secretion antigen analysis obtained from advanced third-stage larvae in in vitro culture. Exp. Parasitol. 110-117.

Castro-Aguirre, J.L.; Espinosa-Pérez, H.S.; Schmitter-Soto, J.J. (1999). Ictiofauna estuarino-lagunar y vicaria de México. Edit. Limusa, pp, 711.

Camargo E., Nakamura P., Vaz A., Silva M., Chieffi P., Melo E. (1992). Standarization of dot-ELISA for the serological diagnosis of toxocariasis and comparison of the assay with ELISA. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 34 (1): 55-60.

Caumes, E.; Carriere, J.; Datry, A.; Gaxotte, P.; Danis, M. and Gentiline, M. (1993). A randomized Trial of Ivermectin versus Albendazole for the treatment of cutaneous larva migrans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49 (5): 641-644.

Cochram, W.G. (1982). *Técnicas de Muestreo*, (3° reim.). Edit. Cont., pp, 107-108.

Conant, R.J.C. (1991). *Reptilians and amphibians of eastern central north America*. Peterson field guides. Boston Houghton Mifflinco.

Chandler, S. Robbins, Bertel Brunn, and Herbert S. Zim. (1966). *A guide to field identification birds of north America*. Golden press New York. Western publishing Company, Inc Racine, Wisconsin. 31-93.

Chellapa, J.D. (1970). The development of *Gnathostoma spinigerum* Owen, 1836 in its first intermediate host, *MESOCYCLOPS leucarti* Claus, 1857 in India with remarks on its zoonotic importance. *Curr. Sci.* 39 (9): 199-201.

Chellapa, J.D. (1978). An interesting observation on *Gnathostoma spinigerum* infestation in a domestic cat. *Curr. Sci.* 47 (21): 828-829.

Chen, H.T. (1949). A human ocular infection by *Gnathostoma* in China. *J. Parasitol.* 35 (3): 431-433.

Cheng, C.T.(1973). *General parasitology*. Academic press new York and London, 659-686

Chester, B.P.; Clifyon, J.R.; Wayne, C.E. (1994). *Parasitología clínica*. (2° edit.). Edit. Salvat, pp, 368-372.

Chitanondh, H. and Rosen, L. (1967). Fatal eosinophilic encephalomyelitis caused by the nematode *Gnathostoma spinigerum*. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.* 638-643.

Daengsvang, S.; Sangsingkeo, P. and Senivong, N.A.B. (1973). A case of Gnathostomiasis of a finger. Southeast. Asian. J. Trop. Med. Pub. Hlth. 4 (2): 260-262.

Daengsvang, S. (1980). A monograf on the genus *Gnathostoma* and Gnathostomiasis in Thailand. Southeast Asian Medical Information Center Tokyo. 3-45.

Daengsvang, S. (1982). Gnathostomiasis. In: Steele, JH, (eds) Handbook Series in zoonose, section C: parasitic zoonoses. Vol. 2. CRC, Boca Ratón, FL, pp 147-180.

Díaz-Camacho, S.P.; Zazueta, R.M.; Ponce, T.E.; Osuna, R.I.; Castro, V.R.; Flores, G.A.; Baquera, H.J.; Willms, K.; Akahane, H.; Ogata, K. and Nawa, Y. (1998). Clinical manifestations and immunodiagnosis of Gnathostomiasis in Culiacan, México. Amer. J. Trop. Med. and Hyg. 59 (6): 908-915.

Díaz-Camacho, S.P.; de la Cruz-Otero, M.C.; Willms-manning, K. (2000). Monografía Gnathostomosis. Rev. Fac. Med. UNAM. 43(5): 192-201.

Díaz-Camacho, S.P.; Willms, K.; Zazueta, R.M.; Otero, C.M.C.; Nawa, Y. and Akahane, H. (2002). Morfology of *Gnathostoma* spp. Isolated from natural hosts in Sinaloa, México. Parasitol. Res. 88: 639-645.

Ernest, C. R. B. (1989). Turtles of the World. Smith Sonian Inst. Press. Washington D.C.

Fao. (1995). Guía para la identificación de especies para los fines de la pesca Pacífico Centro-Oriental. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Genova pp 216-223.

Faust. (1974). Parasitología clínica. Tercera reimpresión. Edit. Salvat Mex. pp, 353-355.

Flores Villela, O.A.; Mendoza, Q.F.; González, G.P. (1995). Recopilación de claves para la determinación de anfibios y reptiles de México. Fac. Cienc. Univ. Nac. Autón. Méx. Publ. Esp. Mus. Zool. 10: 1-285

García Márquez, L.J. (2005). Estudio de la gnathostomiasis en el estado de Colima, México. Tesis doctoral. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Postgrado Interinstitucional en Ciencias Pecuarias (PICP), Universidad de Colima, pp 1-101

Gómez, T.J.R.; Lamothe, A.R.; De León, G.A.H.; Herrera, S.; Silva, B.M.; Montañez, D.M.E. (2004). Registro de dos casos de gnathostomiasis intraocular humana. Rev. Mex. Patol. Clin. 51(4): 231-236.

Gutiérrez-Aguirre, M.A. and Suárez-Morales, E. (2001). Distribution and taxonomy of the tropical American *Mesocyclops* G. O. Sars 1914 (Copepoda: Cyclopoida). Crustaceana. 74(5): 477-487.

Gutiérrez-Aguirre, M.A. and Suárez-Morales, E. (2003). On the taxonomic status of two neotropical *Mesocyclops* (Copepoda: Cyclopoida): evidence from upgrader descriptions. Jour. Crustacean Biol. 23(3): 595-622.

Hadidjaja, P.; Margono, S.S. and Moeloek, F.A. (1979). *Gnathostoma spinigerum* from the cervix of a woman in Jakarta. Am. J. Trop. Med. and Hyg. 28 (1): 161-162.

Hanson, P.M. and Kruse, O.W.G. (1982). The collection and preservation of animal parasites. The Harold W. Wanter Laboratory. University Nebraska Press. pp, 16-21.

Harding, J. (1997). Amphibians and reptiles of the great lakes region. Michigan University, Michigan Press.

Kawamura, M.J.; Kohri. Y Oca, N. (1983). Eosinophilic meningoradiculomyelitis caused by *Gnathostoma spinigerum* a case report. Arch. Neurol. 40: 583-585.

Kraivichian, P.; kulkumthorn, M.; Yingyourd, P.; Akarabovorn, P.; and Chaun-Chuin Paireepai. (1992). Albendazole for the treatment of human gnathostomiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. and Hyg. 86: 418-421.

Kifune, T.; Lamothe, A.R.; Garcia, P.L.; Ocegüera, F.A.; León, R.V. (2004). *Gnathostoma binucleatum* (Spirurida: Gnathostomidae) en peces dulceacuícolas de Tabasco, México. Rev. Biol. Trop. 52 (2): 371-376.

Koga, M., Akahane, H.; Ogata, K.; Lamothe, A.R.; Osorio, S.D.; García-Prieto, L.; y Martínez-Cruz, J.M. (1999). Adult *Gnathostoma cf. binucleatum* obtained from dogs experimentally infected with larvae as an etiological agent in Mexican Gnathostomiasis: External morphology. J. Helminthol. 66 (1): 41-46.

Koga, M.; Akahane, H.; Lamothe-Argümedo, A.R.; Osorio-Sarabia, D.; García-Prieto, L.; Martínez, C.J.M.; Díaz-Camacho, S.P.; Noda, K.; (2000). Surface ultrastructure of larval *Gnathostoma cf. binucleatum* from México. Comp. Parasitol. 67: 244-249

Lamothe-Argümedo, R.; Akahane, H.; Osorio, S.D. y García, P.L. (1998). Hallazgo de *Gnathostoma turgidum* en *Didelphis virginiana* de Temascal, Oaxaca México. An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. Méx. Ser. Zool. 69 (2): 225-229.

Lamothe-Argümedo, R.; Medina, V.R.L. y López, J.S.; García, P.L. (1989). Hallazgo de la forma infectiva de *Gnathostoma sp*; en peces de Temascal, Oaxaca. An. Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. Méx. Ser. Zool. 60 (3): 311-320.

Lamothe, A.R. (1999). La gnatostomiasis. Breve revisión y recomendaciones. Rev. Mex. Patol. Clin. 46 (2): 86-87.

Lamothe, A.R.; Ocegüera, A.F.; y Sanchez, M.R.M. (2001). Gnathostomiasis ocular. Un caso más registrado en México. Rev. Méx. Patol. Clin. 48(4): 219-222.

Lamothe-Argumedo, R. (2003). Present knowledge of gnathostomosis in Mexico. International symposium on Tropical Infectious Diseases in Latin América. Bull. Cent. Res. Inst. Fukuoka University. Vol. (1): 199-205

Lamothe, A.R. (2006). Gnathostomiasis ocular humana. Casos registrados en todo el mundo entre 1937 y 2005. Rev. Méx. Oftalmol., 80(4):185-190.

Laurence, R.; Ash and Thomas, C. Orihel. (1987). PARASITES: A guide to laboratory procedures and identification. Amér. Soc. Clin. Pathol. pp, 1-328.

León-Régagnon, V.; Osorio-Zarabia, D.; García-Prieto, L.; Akahane, H.; Lamothe-Argumedo, R.; Koga, M.; Messina, R.M.; Álvarez-Guerrero, C. (2002). Study of the ethiological agent of gnathostomosis in Nayarit, México. Inter. Parasitol. 51: 201-204

Martínez-Cruz, J.M., Bravo, Z.R., Aranda, P.A., Martínez, M.R. (1989). La Gnathostomiasis en México. Rev. Sal. Pub. Méx. 31 (4): 541-549.

Martínez-Salazar, E. and León-Regagnón, V. (2005). Confirmation of *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991, advanced third-stage larvae in tres palos lagoon, México, by morphological and molecular data. J. Parasitol., 91(4): 962-965.

Margolis, L.; Esch, G.W.; Holmes, J.C.; Kuris, A.M. and Schad, G.A. (1982). The use ecological terms in parasitology (report of an ad hoc committee of the American Society of Parasitologists). Bull Parasitol. 68 (1): 131-133.

Margono, S.S.; Kabul, N.I.; and Soemantri, B.M. (1978). A anoter case of human gnathostomiasis in Indonesia. Southeast Asian. J. Trop. Med. Pub. Heal. 9 (3): 406-408.

Messina Robles, M. y Bustamante Martínez, F. (2002). Experiencia en el Hospital General de Tepic, en gnathostomosis sistémica. The first internacional meeting on gnathostomosis, Culiacán Sinaloa, México. pp, 24-25.

Miyazaki, I. (1954). Studies on *Gnathostoma* occurring in Japan (Nematoda: Gnathostomidae) II.- Life history of *Gnathostoma* and morfological comparison on its larval forms. Kyushu Mem. Med. Sci. 2: 122-143.

Miyazaki, I. (1960). On the genus *Gnathostoma* and human Gnathostomiasis, with special reference to Japón. Exp. Parasitol. 9: 338- 370.

Miyazaki, I. (1966). *Gnathostoma* and Gnathostomiasis in Japan. Progress of Medical Parasitology in Japan. Meguro Parasitological Museum Tokyo. 3: 531-586.

Miyazaki, I. (1991). An Illustrated Book of Helminthic Zoonoses. SEAMIC Publ 62: 368-408

Miyamoto, N.; Mishima, k.; Nagatoma, k.I.; Ishikawa, N.; Oashi, T.; Eto, T.; Kobayashi, T.; Maruyama, H.; and Nawa, Y. (1994). A case report of serologically diagnosed pulmonary Gnathostomiasis. Jpn. J. Parasitol. 43 (5): 397-400.

Muñoz-Guzman M.A. Evaluación comparativa de la respuesta inmune contra *Hemonchus contortus* en razas ovinas de alta y baja susceptibilidad. (Tesis de Doctorado). FES-Cuautitlán, UNAM. 2007

Nawa, Y.; Ichi, I.J.; Ogata, K. and Otzuka, K. (1989). The first record of a confirmed human case of *Gnathostoma doloresi* infection. Jpn. J. Parasitol. 75 (I): 166-169.

Nawa, Y.; Ichi, I.J.; Horii, Y.; Ogata, K. and Otzuka, K. (1993). *Gnathostoma doloresi* larvae found in *Lepomis macrochirus Rafinesque*, a fresh water fish (common name: blue-gill), captured in the central park of prefecture Miyazaki Japan. Jpn. J. Parasitol. 42 (I): 40-43.

Nopparatana C, Setasuban P, Chaicumpa W, Tapchaisri. (1991). Purification of *Gnathostoma spinigerum* specific antigen and immunodiagnosis of human gnathostomiasis. *International journal of parasitology*. 21, 6, 677-687.

Ollague, W.; Ollague, J.; Guevara, de V.A.; y Peña, H.S. (1984). Human Gnathostomiasis in Ecuador (nodular migratory eosinophilic panniculitis) first finding of the parasite in South América. *Int. J. Dermatol. Guayaquil Ecuador*. 23 (10): 647-651.

Ollague, W.M.D. (1985). Gnathostomiasis (nodular migratory eosinophilic panniculitis). Department of Dermatology, university of guayaquil Ecuador-Ecuador. *J. Amer. Academy Dermatol*. 13(5): 835-836.

Ollague, W.L.; Gómez, L.E. y Briones, M. (1988). Infección experimental de un gato doméstico adulto con el tercer estado larvario de *Gnathostoma spinigerum* procedente de un pez de agua dulce. *Med. Cut. Iber Lat. Amer*. 16: 295-297.

Ogata, K.; Ichi, I.J.; and Nawa, Y. (1988). Three confirmed and five suspected human cases of *Gnathostoma doloresi* infection found in Miyazaki prefecture, Kyushu. *Jpn. J. Parasitol*. 37 (5): 90-96.

Ogata, K.; Nawa, Y.; Akahane, H.; Díaz, C.S.P.; Lamothe, A.R.; Cruz, R.A. (1998). Shorth report: Gnathostomiasis in México. *Am. J. Trop. Med. and Hyg*. 58 (3): 316-318.

Ortiz Villaseñor, A.L.; Sánchez-Albarrán, A. y Santillán-Alarcón, S. (1990). Helminthofauna del tlacuache *Didelphys virginiana* en los municipios de Cuernavaca y Tepoztlán Morelos. *Mem. III Congr. Latin. Amer. De Medicina Tropical, 9 Congr. Nal. Parasitol. Mex. D.F.*

Owen, R. (1836). Anatomical description of two species of entozoa from the stomach a tiger, one of wich forms a new genus of nematoidea. *Zool. Soc. London*. 4: 123-126.

Palumbi, S.R. (1996) Nucleic acids. II. The polymerase chain reaction. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK (eds) Molecular systematics. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, pp 205-247

Peláez, D. y Pérez, R.R. (1970). Gnathostomiasis humana en América. Rev. Latin. Amer. Microbiol. 12: 83-91.

Pérez, P. A.; Farías, M.L.; Chávez, L.G.; Estrada, C.R. (1995). Gnathostomiasis humana, informe de cuatro casos con confirmación histológica. Dermatol. Rev. Méx. 39(2): 77-80.

Pinkus, H.; Fan, J.; Degiusti, D. (1981). Creeping eruption due to *Gnathostoma spinigerum* in a Taiwanese patient. Inter. Jour. Dermatol. 20 (1): 46-49.

Programa Excel (2003). Microsoft Corporation

Prommas, C. and Daengsvang, S. (1933). Preliminary report of a study on the life-cycle of *Gnathostoma spinigerum*. J. Parasitol. 19: 287-292.

Prommas, C. and Daengsvang, S. (1936). Further report of a study on the life cycle of *Gnathostoma spinigerum*. J. Parasitol. 22: 180-186.

Prommas and Daengsvang, S. (1937). Feeding experiments on cats with *Gnathostoma spinigerum* larvae obtained from the second intermediate host. J. Parasitol. 23: 115-116.

Punyagupta, S.; Juttijudata, and Bunnag, T.; Comer, D. (1968). Two fatal cases of eosinophilic myeloencephalitis a newly recognized disease caused by *Gnathostoma spinigerum*. R. Soc. Trop. Med. and Hyg. 62 (6): 801-809.

Rojas, M.N.; Balfre, T.B. y Meza, M.H. (1994). Comunicación de un caso de Gnathostomiasis humana . Rev. Aler. Mex. 41: 1-7.

Rusnak, M.J. and Lucey, R.D.,(1992). Clinical gnathostomiasis: Case report and review of the English-languaje literature. Wilford Hall USAF Medical Center/SGMMI, Lackand Air Ford Base, pp, 33-50

Roger, T. P., and Edwar, L. Ch. (1994). Aves de México. Guía de campo para la identificación de todas las especies encontradas en México. Guatemala, Bélice y el Salvador, (2° imp.). Editorial Diana, México. pp, 18-27.

Salfelder, K. (1992). Gnathostomiasis. Atlas of parasitic patology. Volume twenty. Edit. Klumer Academic publishers. Dordrecht Boston London. 117-118.

Sato, H.K. and Hanada, K. (1992). Five confirmed human cases of Gnathostomiasis nipponica recently found in northern Japan. J. Parasitol. 78, (6), 1006-1010.

Secretaría de Salud de Nayarit (1995-2005). SUAVE, sistema único automatizado para la vigilancia epidemiológica. Secretaría de Salud de Nayarit, México.

Soulsby, E.J.L. (1987). Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos, (7° ed.). Edit. Interamericana, México. 304-306.

Suárez-Morales, E. J.W.Reid; T.M. LLiffe; y F. Fiers, (1996). Catalogo de los copépodos (Crustácea) continentales de la península de Yucatán, México. Primera Ed. ECOSUR-CONABIO, México.

Tapchaisri P, Nopparatana C, Chaicumpa W, Setasuban P. (1991). Specific antigen of *Gnathostoma spinigerum* for immunodiagnosis of human gnathostomiasis. Inter. Jour. parasitol. 21(3): 315-319.

Tarazona, V.J.M. (1971). Manual de Tecnicas de Parasitología Veterinaria. Laboratorio Central Veterinario Weibridge Gran Bretaña. Edit: Acribia, zaragoza España. 1-183

Tesjaroen, S.; Wongkongsawat, T. and Parichatikanond, P. (1990). A breast mass caused by Gnathostomiasis: brief report of a case. Outh. Asian. Jour. Trop. Med. Pub. Heal. 21 (1): 151-153.

Vazquez-Tsuji, O.; Campos-Rivera, T.; Rondán-Zárate, A. (2006). Gnathostomiasis humana, abordaje, diagnóstico y tratamiento. Universidad la Salle, Rev. del Cent. Invest. 7: 025 pp, 65-76.

Vetter Holger, (2005) Turtles of the world, Central and South America. Edit. Frankfurt Chimaira, vol. 3.

Villar, C.E. (2003). Reporte de casos. Paniculitis migratoria eosinofílica en el Perú. *Gnathostoma* como agente causal. Rev. Perú, Med. Exp. Sal. Públ., 20(4).

Wallace, P. and M. Guilles, H. (1989). Tropical medicine parasitology. Third Edition. Wolfe Medical Publications. LTD London. 150-153.

Winckley, W.L.; D.A. Hendrickson and C.E. Bond (1986). Geography of western north American freshwater fishes: Description and relation ships to intercontinental tectonism, In: C.H. Hocutt y E.O. Wiley (eds.). Zoogeography of north American freshwater fishes. New york. Academic Press. 711.

Estuarine fish and turtles as intermediate and paratenic hosts of *Gnathostoma binucleatum* in Nayarit, Mexico

Cesar Alvarez Guerrero · Fernando Alba-Hurtado

Received: 12 June 2007 / Accepted: 21 August 2007 / Published online: 9 October 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract Human gnathostomiasis is a severe public health problem in the State of Nayarit, Mexico. Between 1995 and 2005, the registration of human cases numbered 6,328, which makes it one of the largest focal points of the disease in the country. The present study determined the presence of natural hosts of *Gnathostoma binucleatum* larvae at the Laguna de Agua Brava in Nayarit, Mexico. A total of 5,450 fish and 247 turtles were sampled. Muscular tissue was ground and observed against the light using a 100-W lamp to identify advanced third-stage larvae. The estuarine species *Cathorops fuerthii*, *Pomadasys macracanthus*, *Mugil curema*, and *Dormitator latifrons* were found positive for presence of larvae, and annual prevalence was 4.8, 1.83, 2.16, and 4.0%, respectively. The species *Oreochromys aureus* and *Chanos chanos* were negative. The species of estuarine turtles *Kinosternon integrum* and *Trachemys scripta* were positive with annual prevalence of 79.1 and 52.5%, respectively. The criteria of identification of the *Gnathostoma* species were: mean number of nuclei in intestinal larval cells (2.3), larval morphometry with optic microscopy, larval morphometry with scanning electron microscopy, and number and sequence of ribosomal deoxyribonucleic acid of adult parasites obtained from experimental infection in dogs. The estuarine fish *Pomadasys macracanthus* and *Mugil curema* are reported

as intermediate hosts for the first time and likewise the estuarine turtle *Kinosternon integrum* as a paratenic host.

Introduction

Gnathostoma spinigerum is the most studied species of the genus. Copepods and freshwater fish are the first and second intermediate hosts, respectively; amphibians and reptiles act as paratenic hosts and mammals as definitive hosts. Humans are accidental hosts and develop the disease after consuming raw fish infested with advanced third-stage larvae (aL3) of *Gnathostoma* (Miyazaki 1991; Daengsvang 1980, 1982). Although all species of the genus *Gnathostoma* present the same behavior in general, each species has particular intermediate and definite hosts, which results in a particular epidemiology for each species.

The first clinical cases of human gnathostomiasis in the American Continent were reported in Mexico by Peláez and Pérez-Reyes in 1970. Currently, four species of this genus have been recorded in mammals in Mexico: *G. binucleatum* (Almeida-Artigas 1991), *G. procyonis* (Almeida-Artigas et al. 1994), *G. turgidum* (Lamothe-Argumedo et al. 1998), and *G. lamothei* (Bertoni-Ruiz et al. 2005). However, the only confirmed species that affects the human in America is *Gnathostoma binucleatum* (Almeida-Artigas et al. 2000), although the intermediate hosts and infection source have not been entirely identified.

Human gnathostomiasis is one of the most important public health issues in the state of Nayarit, Mexico, where 6,328 cases were recorded between 1995 and 2005, this being the highest record in the country and one of the highest worldwide (SUAVE: unique system automatized for the epidemiology vigilance, Secretaría de Salud de Nayarit 1995–2005). Therefore, the intermediate hosts that represent

C. Alvarez Guerrero
CEMIC, Universidad Autonoma de Nayarit,
Tepic, Nayarit, Mexico

F. Alba-Hurtado (✉)
Department of Biological Science,
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Mexico, DF, Mexico
e-mail: fealba@fesc.unam.mx

the infection source for humans in the region needed to be identified. In this context, common estuarine fish and turtles were collected in the largest water body, the Agua Brava lagoon, located in northern Nayarit, Mexico. Larvae were isolated from fish and turtle muscle. The average number of larval intestinal cell nuclei was determined using morphometry and scanning electron microscopy. The deoxyribonucleic acid (DNA) of the collected *Gnathostoma* species was sequenced.

Materials and methods

Collection of fish and turtles

Specimens were collected in fishing areas nearby the Agua Brava lagoon located in the northern region of the state of Nayarit, Mexico. The sampling produced 5,450 estuarine fish (3,000 *Cathorops fuerthii*, 600 *Pomadasys macracanthus*, 600 *Oreochromis aureus*, 600 *Mugil curema*, 600 *Chanos chanos*, and 50 *Dormitator latifrons*) and 247 turtles (207 *Kinosternon integrum* and 40 *Trachemys scripta*). The fish and turtle species were identified in the Ichthyology and Herpetology Departments of the Biology Institute in the National Autonomous University of Mexico based on Winckley et al. (1986); the FAO Guide (1995), Castro-Aguilar et al. (1999), Flores-Villela et al. (1995), and Alderton (1994).

Collection of larvae

Collected fish and turtles were dissected; the muscle tissue was chopped in a food processor (home appliance), compressed between two glasses (15 cm wide and 18 cm long), and observed against the light using a 100-W lamp to identify aL3 of *G. binucleatum*. The cyst wall was removed with insect pins, and larvae were fixed in 10% formaldehyde for analysis.

Infection in animals was characterized according to the definitions proposed by Margolis et al (1982), in which prevalence represents the percentage of hosts parasitized by one or more parasite species, mean intensity is the average number of one parasite species per parasitized host, abundance is the average number of a parasite species per analyzed host, and intensity interval is the minimum and maximum number of parasites found in a sample of hosts.

Larval morphology

Thirty larvae collected from fish and 30 from turtles were measured in a calibrated compound light microscope. Larvae were fixed in 10% formaldehyde for 24 h and stored at room temperature until analyzed. At measurement time, larvae were

cleared with Amann's lactophenol, and the variables recommended by Miyazaki (1954) were used to identify the species of *Gnathostoma* at larval stage. Variables were total length, maximum width, head-bulb length, head-bulb width, number of rows and hooklets in the head-bulb (1, 2, 3, 4), difference in number of hooklets between the first and fourth row in the head-bulb, position of the cervical papilla, distance from excretory pore to distal end, and number of transverse striations in larval bodies. To obtain a more accurate count of the head-bulb hooklets, they were separated with a surgical knife with a thin straight blade. The separated head-bulb was placed between a slide and a coverslip in frontal position, and micrographs were obtained with a 5-megapixel digital camera; images were amplified in the computer for hooklet count.

Scanning electron microscopy

Larvae were washed in distilled water for 30 min to eliminate formaldehyde residues and dehydrated in alcohol graded from 10 to 100%. Critical point drying was performed, and the sample was mounted in an aluminum sample holder with double-sided carbon adhesive and ionized with gold. Micrographs were obtained under high vacuum conditions using a JEOL SM 5410LV scanning electron microscope.

Intestinal sections of larvae

Larvae (aL3) recovered from fish and turtle muscle were embedded in 1 cm³ of flesh, fixed in 10% formaldehyde for 24 h, and then embedded in paraffin. Cross-sections of 4 µm thickness were obtained and stained with hematoxylin-eosin with conventional techniques. The number of intestinal epithelial cells was counted, and the average number of nuclei per cell was determined with a ×100 objective.

DNA sequencing

A segment of an adult worm was used, obtained from a dog that had been infected with larvae collected from turtle muscle. The sample was preserved in absolute alcohol, and DNA was extracted using the standard phenol-chloroform technique (Palumbi 1996), and the internal transcribed spacer 2 (ITS2) of ribosomal DNA was amplified by polymerase chain reaction with the technique described by León-Régagnon et al. (2002) and Martínez-Salazar and León-Régagnon (2005) using the primers NEWS2 (forward) 5'-TGTGTCGATGAAGAACGCAG and ITS2-RIXO (reverse) 5'-TTCTATGCTTAAATTCAGGGG. The obtained sequences were aligned with sequences AY734632, AY061740, and AB181159 obtained from GenBank and corresponded to *G. binucleatum*.

Table 1 Characterization of infection with *Gnathostoma binucleatum* larvae in fish and turtles in Nayarit, México

Species	AH	PH	FP	P	MI	A	II
Fish							
<i>Cathorops fuerthii</i>	3,000	154	183	4.8	1.25	0.061	1 to 3
<i>Pomadasys macracanthus</i>	600	11	11	1.83	1.0	0.018	1 to 1
<i>Mugil curema</i>	600	13	15	2.16	1.15	0.025	1 to 2
<i>Dormitator latifrons</i>	50	2	2	4	1.0	0.04	1 to 1
<i>Oreochromis aureus</i>	600	0	0	0	0	0	0
<i>Chanos chanos</i>	600	0	0	0	0	0	0
Total in fish	5,450	170	211	1.46%	0.73	0.024	1 to 3
Turtles							
<i>Kinosternon integrum</i>	207	163	1,070	79.1	6.28	4.91	1 to 65
<i>Trachemys scripta</i>	40	21	25	52.5	1.29	0.62	1 to 3
Total in turtles	247	184	1,095	65.8%	3.78	2.76	1 to 65

AH Analyzed hosts, PH parasitized hosts, FP found parasites, P prevalence, MI mean intensity, A abundance, II intensity interval

Statistical analysis

Significant differences of the studied variables between turtles and fish were tested with Student's *t* test using Statistica® (Copyright 1984–2000 by StatSoft).

Results

Infection in intermediate and paratenic hosts

Table 1 shows the infection variables in the two hosts. *Gnathostoma* larvae were detected in fish species *C. fuerthii*, *P. macracanthus*, *M. curema*, and *D. latifrons* (Fig. 1a–d) and in turtle species *K. integrum* and *T. scripta* (Fig. 2a,b). All infection variables were statistically higher ($p < 0.05$) in turtles than in fish (Table 1).

Morphology of larvae aL3

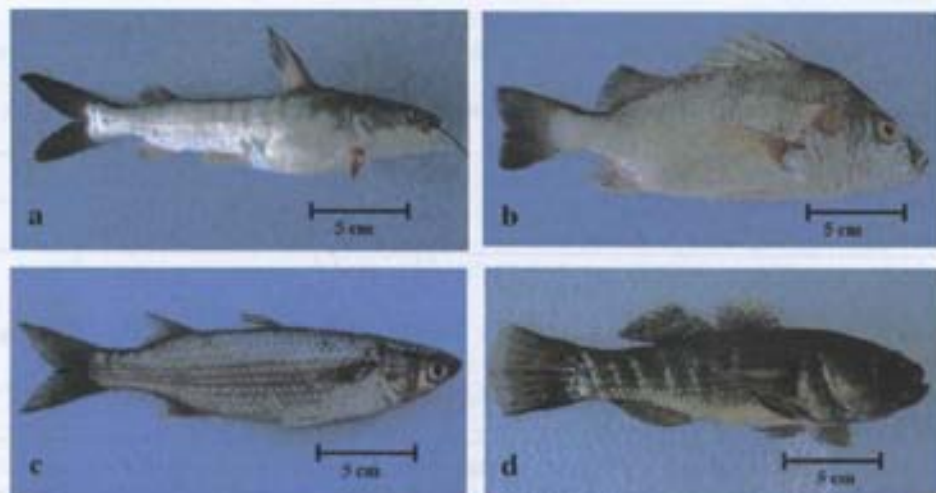
Recovered larvae were coiled inside a translucent fibrous cyst, through which the blood-red intestine could be seen. Mean size of the 20 measured cysts was 1.34 mm long and 1.14 mm wide. Table 2 shows the main morphometric variables of *G. binucleatum* larvae collected from fish and turtles. No statistical differences were found ($p < 0.05$) between larvae obtained from fish and larvae obtained from turtles in the studied variables.

Scanning electron microscopy

This technique was used to observe the larval morphology in detail. The head-bulb presented four concentric rows of hooklets with a single tip per hook and four sac-like openings that communicate with the cervical sacs, through

Fig. 1 Fish species infected with *Gnathostoma binucleatum* larvae in Nayarit state, México.

a *Cathorops fuerthii*, **b** *Pomadasys macracanthus*, **c** *Mugil curema*, **d** *Dormitator latifrons*



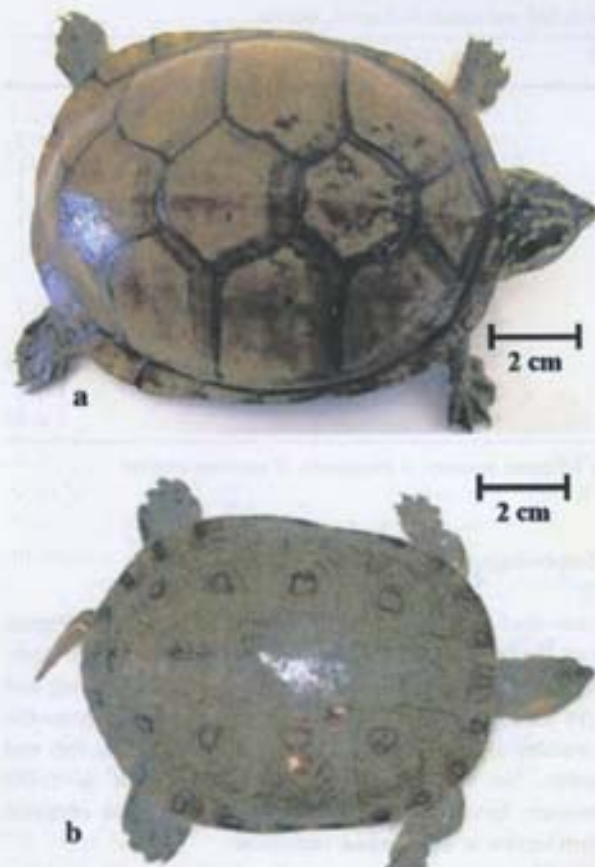


Fig. 2 Turtle species infected with *Gnathostoma binucleatum* larvae in Nayarit state, México. **a** *Kinosternon integrum*, **b** *Trachemys scripta*

which passes a fluid that causes head-bulb dilation or retraction. The mouth presented strong lips with a pair of papillae each with amphidia or sensory receptors between them (Fig. 3a). The cervical papilla was located in transversal row 14 (Fig. 3b). The cuticle presented 268 transverse striations in larvae obtained from fish and 276 in larvae obtained from turtles. Spines near the head-bulb were larger and densely abundant; in the middle third, they

were smaller, and nearing the distal end, they were even smaller and less abundant. The anus was subterminal, the caudal end was point shaped, and both sides had a pair of phasmidial pores (Fig. 3c).

Intestinal sections of larvae

In the present study, 101 larval intestinal epithelium cells were firstly obtained from fish larvae and analyzed; 25 cells presented a single nucleus, 35 presented two nuclei, 26 presented three nuclei, 11 presented four nuclei, and 4 presented five. The total number of nuclei was 227, and the average number of nuclei per cell was 2.24. Likewise, 84 larval intestinal epithelium cells obtained from turtle larvae were analyzed; 26 presented a single nucleus, 27 presented two nuclei, 23 presented three nuclei, 7 presented four nuclei, and 1 presented five. The total number of nuclei was 182, and the average number was 2.20.

DNA sequencing

The base sequence of the amplified segment presented a divergence lower than 0.48% (2 of 419 bp) with *G. binucleatum* sequences reported in GenBank. Therefore, we concluded that the studied species is in fact *G. binucleatum*.

Discussion

Most intermediate hosts of *Gnathostoma* spp. reported in the literature are freshwater fish (Daengsvang 1980). The state of Nayarit (Mexico) is of special epidemiological interest, as more than 6,000 human gnathostomiasis cases have been reported in 10 years (SUAVE: unique system automatized for the epidemiology vigilance, Secretaría de Salud de Nayarit 1995–2005). This high prevalence can only be explained by the huge quantity of intermediate hosts finding in the region. Most are marine and estuarine fish, and only few are freshwater fish. Estuarine fish are the

Table 2 Morphometry of 30 *Gnathostoma binucleatum* larvae obtained from estuarine fish and 30 larvae obtained from turtles in the state of Nayarit, México

	TL	MW	RB	HBL	HBW	HPR				IV-1	CP	ADE
						1	2	3	4			
Fishes												
MD	3.988	0.308	4.0	0.147	0.235	38.4	41.6	43.8	46.2	7.3	14.6	0.065
SD	0.586	0.054	0.0	0.020	0.042	3.1	3.1	3.1	3.2	3.5	1.4	0.018
Turtles												
MD	4.057	0.308	4	0.218	0.118	38.2	41.2	43.7	45.9	7.47	14.2	0.061
SD	0.522	0.069	0	0.023	0.025	2.80	2.7	3.1	3	1.3	1.4	0.028

TL Total length, MW maximum width, RB rings per head-bulb, HBL head-bulb length, HBW head-bulb width, HPR hooklets per ring, 1, 2, 3, 4. IV-1 difference between averages of fourth and first rows, CP location of cervical papilla, ADE distance from anus to distal end

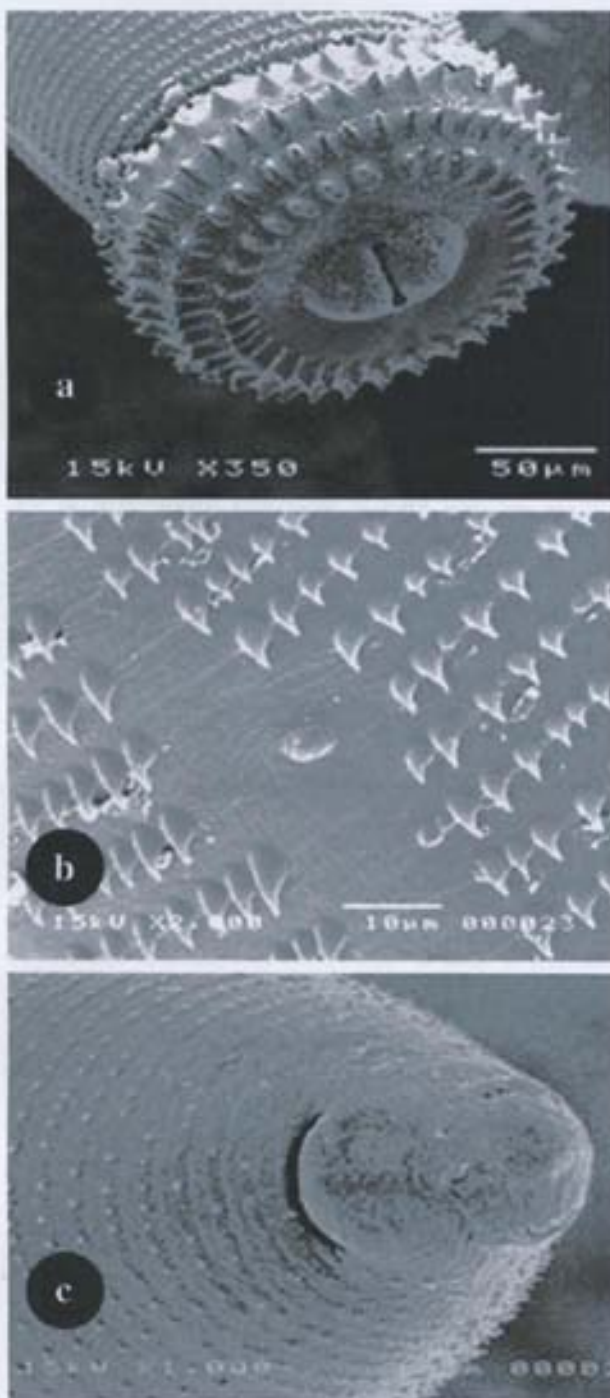


Fig. 3 Scanning electron micrographs of *Gnathostoma binucleatum* larvae obtained from turtles. **a** Lateral view of the head bulb. **b** Cervical papilla and transverse striations. **c** The terminal end where the anus and phasmidial pores are clearly visible

most consumed in the state and, thus, the first suspects of being the intermediate hosts.

Four fish species presented *G. binucleatum* larvae in the muscle. Among these species, *M. curema* and *P. macra-*

canthus are reported for the first time as intermediate hosts of *G. binucleatum*. The two species *C. fuerthii* and *D. latifrons* have been previously reported as intermediate hosts of the parasite (Alvarez-Guerrero and Lamothe-Argumedo 2000). These species are distributed in fish markets and restaurants in the state and are used to prepare a regional dish based on raw fish known as “cebiche”; therefore, this is a probable source of infection for humans and may account for the high prevalence of gnathostomiasis in the state.

The turtles *K. integrum* and *T. scripta* presented a prevalence of muscle-encysted larvae higher than that recorded for fish, and this is the first report of these species as hosts of *G. binucleatum*. From a cultural perspective, people attribute curative properties to the turtle, and given its alimentary properties as well, this finding is important, as these paratenic hosts may be directly involved with the disease in coastal populations and increase the incidence in the state of Nayarit.

In the present study, larvae from estuarine fish and turtles were compared, and no differences in morphology or in average number of intestinal epithelium cell nuclei were found between both groups of larvae, which suggests that they are the same species of *Gnathostoma*. The morphometric values (total length, number of head-bulb hooklets, position of the cervical papilla, number of transverse striae, number of intestinal cells, and average number of nuclei per intestinal cell) of these larvae corresponded to those reported for *G. binucleatum* (Almeida-Artigas 1991; Koga et al. 2000). However, several authors have considered that morphological features are not enough to differentiate *Gnathostoma* species; hence, in the present study, ribosomal DNA of an adult parasite obtained from a dog, experimentally infected with larvae collected from turtles, was sequenced. The base sequence of the amplified segment in the adult worm corresponded to *G. binucleatum* (León-Régagnon et al. 2002; Bertoni-Ruiz et al. 2005), which matched the species identity of the larvae found in turtles. The morphological similarities between larvae found in fish and larvae found in turtles, with the facts that both were simultaneously collected in the habitat and that this *Gnathostoma* species that infects had already been reported in the same region by León-Régagnon et al. in 2002, suggest that the species in both hosts is *G. binucleatum*.

The only species undisputably associated with human gnathostomiasis in America is *G. binucleatum* (Almeida-Artigas et al. 2000), and, especially in Mexico (León-Régagnon et al. 2002), humans become infected by consuming the intermediary host, either raw or partially cooked (“cebiche,” “callos,” or “sushi”). The four fish species and two turtle species reported in this study as *G. binucleatum* hosts are consumed by humans, which can be

the infection source for human gnathostomiasis in the state of Nayarit, Mexico.

Acknowledgments The authors would like to thank to Dra. Virginia León-Régagnon for DNA sequencing of *G. binucleatum*. This study was supported in part by a grant from the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM).

References

- Alderton D (1994) Turtles and tortoises of the world. Edit Omega, Barcelona
- Almeida-Artigas RJ (1991) Hallazgo de *Gnathostoma binucleatum* (Nematodo: Spirurida) en felinos silvestres y el papel de peces dulceacuicolas y oligohalinos como vectores de la gnathostomiasis humana en la cuenca baja del río Papaloapan, Oaxaca-Veracruz, México. An Inst Cienc Mar Limnol Univ Nac Autón Mex 18:137–155
- Almeida-Artigas RJ, Acosta HL, Alonso DM, Castañeda S, Zárate RVR (1994) First record of *Gnathostoma procyonis* in México and a note on larval *G. binucleatum*. Res Rev Parasitol 54:93–98
- Almeida-Artigas RJ, Bargas MD, Mass CS (2000) ITS2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas. J Parasitol 86:537–544
- Alvarez-Guerrero C, Lamothe-Argumedo R (2000) Larvas de *Gnathostoma* sp. en peces estuarinos de Nayarit. An Inst Biol Ser Zool Univ Nac Autón Mex 71:179–184
- Bertoni-Ruiz F, García-Prieto L, Osorio-Sarabia D, León-Régagnon V (2005) A new species of *Gnathostoma* (Nematoda: Gnathostomidae) in *Procyon lotor hernandezii* from México. J Parasitol 91:1143–1149
- Castro-Aguilar JL, Espinosa PHS, Schmitter SJJ (1999) Ictiofauna estuarino-lagunar y vicaria de México. Limusa, Mexico, p 711
- Daengsvang S (1980) A monograph on the genus *Gnathostoma* and Gnathostomiasis in Thailand. Southeast Asian Medical Information Center, Tokyo
- Daengsvang S (1982) Gnathostomiasis. In: Steele, JH (eds) Handbook series in zoonoses, section C: parasitic zoonoses, vol. 2. CRC, Boca Raton, FL, pp 147–180
- FAO (1995) Guía para la identificación de especies para los fines de la pesca Pacífico Centro-Oriental. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Geneva, pp 216–223
- Flores-Villela OA, Mendoza QF, González PG (1995) Recopilación de claves para la determinación de anfibios y reptiles de México. Fac Cienc Univ Nal Aut Mex. Publ Esp Mus Zool 10:1–285
- Koga M, Akahane H, Lamothe-Argumedo R, Osorio-Sarabia D, García-Prieto L, Martínez CJM, Díaz-Camacho SP, Noda K (2000) Surface ultrastructure of larval *Gnathostoma cf. binucleatum* from México. Comp Parasitol 67:244–249
- Lamothe-Argumedo R, Akahane H, Osorio-Sarabia D y García-Prieto L (1998) Hallazgo de *Gnathostoma torysidum* en *Didelphis virginiana* de Temascal, Oaxaca México. An Inst Biol Univ Nac Autón Mex Ser Zool 69:225–229
- León-Régagnon V, Osorio-Sarabia D, García-Prieto D, Akahane H, Lamothe-Argumedo R, Koga M, Messina RM, Álvarez-Guerrero C (2002) Study of the ethiological agent of gnathostomiasis in Nayarit, México. Inter Parasitol 51:201–204
- Margolis L, Esch GW, Holmes JC, Kuris AM, Schud GA (1982) The use ecological terms in parasitology (report of an ad hoc committee of the American Society of Parasitologists). Bull Parasitol 68:131–133
- Martínez-Salazar EA, León-Régagnon V (2005) Confirmation of *Gnathostoma binucleatum* Almeida-Artigas, 1991, Advanced third-stage larvae in Tres Palos lagoon, México, by morphological and molecular data. J Parasitol 91(4):962–965
- Miyazaki I (1954) Studies on *Gnathostoma* occurring in Japan (Nematoda: Gnathostomidae). II. Life history of *Gnathostoma* and morphological comparison on its larval forms. Kyushu Mem Med Sci 2:122–143
- Miyazaki I (1991) An Illustrated Book of Helminthic zoonoses. SEAMIC Publ 62:368–408
- Palumbi SR (1996) Nucleic acids. II. The polymerase chain reaction. In: Hillis DM, Moeitz C, Mable BK (eds) Molecular systematics. Ninaser, Sunderland, Massachusetts, pp 205–247
- Peláez D, Pérez-Reyes R (1970) Gnathostomiasis humana en América. Rev Latin Amer Microbiol 12:83–91
- Secretaría de Salud de Nayarit (1995–2005) SUAVE, sistema único automatizado para la vigilancia epidemiológica. Secretaría de Salud de Nayarit, Mexico
- Winckley WL, Hendrickson DA, Bond CE (1986) Geography of western North American freshwater fishes: zoogeography of north American freshwater fishes. Academic, New York, p 711