

Primera comprobación de *Sarcocystis* spp. en *Didelphis albiventris* (“comadreja mora”) en Uruguay. (*)

Noya, F.^{1A}; Delucchi, L.²; Castro Janer, E.¹

RESUMEN

La “comadreja mora” (*Didelphis albiventris*) es el huésped definitivo, para América del Sur, de *Sarcocystis neurona*, agente etiológico de la mieloencefalitis equina por protozoarios. Esta enfermedad ha sido diagnosticada en varios países de la región, sospechándose su presencia en el Uruguay, a raíz de la ocurrencia de varios cuadros neurológicos en equinos, desde el año 2002 a la fecha. El objetivo del presente trabajo es determinar la presencia de esporocistos de *Sarcocystis* spp. en la «comadreja mora», en la zona de influencia de los brotes. Se realizan necropsias parasitarias a 3 comadrijas recogidas muertas, en abril y junio de 2005. En el intestino delgado se realizan raspajes de mucosa, que luego se homogenizan en una licuadora con 100 ml de agua destilada. Se examina el homogeneizado en el microscopio óptico (400X). En 1 de las 3 comadrijas, se observan algunos ooquistes conteniendo 2 esporocistos y abundante cantidad de esporocistos libres que se miden con un micrómetro ocular. La media para el diámetro mayor es de $14,67\mu \pm 1,35\mu$ ($10,52-15,78\mu$) y para el diámetro menor de $9,88\mu \pm 0,97\mu$ ($7,89-12,62\mu$). Se concluye que estas estructuras corresponden a esporocistos de *Sarcocystis* spp., siendo ésta su primera comprobación en *Didelphis albiventris* en Uruguay. Para determinar la especie actuante, se sugiere su aislamiento e identificación, a través de técnicas moleculares.

Palabras clave: *Sarcocystis*, “comadreja mora” (*Didelphis albiventris*), mieloencefalitis equina por protozoarios.

SUMMARY

The «comadreja mora» (*Didelphis albiventris*) is the definitive host, for South America, of *Sarcocystis neurona*, causative agent of the equine protozoal myeloencephalitis. This disease has been diagnosed in several countries of the region, suspecting its presence in Uruguay, due to the occurrence of several neurological episodes in horses, from the 2002 to the date. The objective of the present study is to determine the presence of *Sarcocystis* spp. sporocysts in the «comadreja mora». A parasitary necropsy is practiced to 3 picked dead opossums, in April and June 2005. Mucose scrapings are practiced in the small intestine, which are, afterwards, homogenized in a blender with 100 ml of distilled water. The homogenate is examined under the optical microscope (400X). In one of the three opossum some oocysts are observed containing 2 sporocysts, and a large number of free sporocysts, which are measured with an ocular micrometer. The mean for the greater diameter is $14,67\mu \pm 1,35\mu$ ($10,52-15,78\mu$), and for the minor diameter is $9,88\mu \pm 0,97\mu$ ($7,89-12,62\mu$). It is concluded that these structures belong to *Sarcocystis* spp. sporocysts, being this, its first verification in *Didelphis albiventris* in Uruguay. To determine the acting specie, is suggested its isolation and identification, through molecular techniques.

Key words: *Sarcocystis*, “comadreja mora” (*Didelphis albiventris*), equine protozoal myeloencephalitis.

INTRODUCCIÓN

Las comadrijas, *Didelphis virginiana* para América del Norte y *Didelphis albiventris* (“comadreja mora”) para América del Sur, son huéspedes definitivos de más de una especie de *Sarcocystis*, incluyendo *Sarcocystis neurona* (2).

La “comadreja mora” ha sido identificada como huésped definitivo de *Sarco-*

cystis speeri (5) y de *Sarcocystis falcatula* (7). Ambas especies fueron aisladas, en ratones y en aves respectivamente, a partir de esporocistos provenientes de comadrijas en Argentina (5, 7). Posteriormente, también fue reconocida como huésped definitivo de *Sarcocystis neurona*, luego de su aislamiento en ratones, a partir de esporocistos obtenidos de comadrijas en Brasil (3). Cabe

destacar que *Didelphis albiventris* se distribuye por todo el territorio uruguayo, siendo considerada como una especie «no amenazada» (14) y que puede desplazarse de un país a otro, pudiendo diseminarse diferentes agentes parasitarios.

El ciclo biológico de *Sarcocystis neurona* es indirecto, siendo sus huéspedes intermediarios naturales diversos herbívoros, que se infectan al ingerir alimen-

¹Departamento de Parasitología, Facultad de Veterinaria, Alberto Lasplacas 1550, Montevideo, Uruguay, tel.: 598(2) 622.16.96, e-mail florencianoya@adinet.com.uy

^ABecaria de la CIDEAC

²Departamento de Pequeños Animales, Facultad de Veterinaria, UDELAR.

(*) Trabajo publicado en el libro de resúmenes del 12° Simposio Internacional de la Asociación Mundial de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario (WAVLD), 7° Seminario de la OIE en Biotecnología, VIII Congreso Nacional de Medicina Veterinaria «Dr. Luis Queirolo Monteverde», V Congreso Nacional de Veterinarios Especialistas en Pequeños Animales (SUVÉPA-filial SMVU) 5tas. Jornadas de la Asociación Uruguaya de Veterinaria Equina, 5° Taller Panamericano de Laboratorios Lácteos, eventos realizados del 16 al 19 de Noviembre de 2005, Radisson Victoria Plaza Hotel, Montevideo, Uruguay.

tos contaminados con esporocistos. Estos esporocistos son eliminados en la materia fecal de la comadreja (transmisión feco-oral). El ciclo se cierra cuando la comadreja ingiere a un huésped intermediario con sarcocistes. El equino participa como huésped aberrante, ya que sólo se encuentran en él esquizontes y merozoitos, no sarcocistes. Adquiere la enfermedad cuando, accidentalmente, ingiere alimento o agua contaminada con esporocistos (18).

La mieloencefalitis equina por protozoos (MEP), es una enfermedad neurológica importante que afecta a equinos de toda América cuyo agente etiológico es, entre otros, *Sarcocystis neurona* (16, 12). Tanto las células nerviosas como las células inflamatorias del sistema nervioso central (S.N.C.) pueden ser parasitadas (2). El pronóstico depende del grado de infestación y duración del compromiso del S.N.C. pero un diagnóstico temprano y un pronto tratamiento aumentan las chances de una resolución clínica favorable, si bien pueden ocurrir recaídas (15).

Existen relatos de casos de MEP en equinos de Estados Unidos, Panamá, Canadá, Venezuela, Argentina, México y Brasil (18, 19). En países de la región como Brasil y Argentina existe una alta prevalencia de anticuerpos contra *S. neurona* en los caballos, lo cual indica la exposición de los mismos al agente etiológico de MEP y que por lo tanto existe una alta contaminación con *S. neurona* en estos países. En Argentina fueron detectados anticuerpos contra *S. neurona* en un 35,5% de 76 caballos (9) y en Brasil en un 36% de 101 caballos (10). En el Uruguay se sospecha su presencia a raíz de la ocurrencia de tres casos clínicos con sintomatología nerviosa ocurridos durante el 2002 y 2003, en equinos mayores de 5 años, dos Pura Sangre de Carrera y uno cruzado, en los departamentos de San José (Rincón del Pino), Montevideo (Camino Cambay y Camino Carras-

co) y Canelones (proximidad de San Jacinto)*. A pesar de que no existían trabajos indicando su presencia en el país, la MEP fue incluida en el diagnóstico diferencial (a fines del 2004 y principios del 2005) en equinos con sintomatología nerviosa en la Facultad de Veterinaria (Montevideo). Estos equinos posteriormente murieron, no pudiéndose llegar al diagnóstico etiológico.

Si bien se sospecha la presencia de la enfermedad, aún no se han realizado estudios que confirmen su diagnóstico en los equinos del país, así como tampoco, estudios que determinen la presencia del parásito en el huésped definitivo, la "comadreja mora". Por dicha razón, el objetivo del presente trabajo es investigar la presencia de *Sarcocystis* spp. en *Didelphis albiventris* en la zona de influencia de los brotes.

MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia de investigación fue estudiar las comadrejas que se encontraran en la zona de influencia de los brotes antes mencionados. Se estudiaron 3 "comadrejas moras" recogidas muertas en abril y junio de 2005, en el límite norte entre los departamentos de Montevideo y Canelones. Cada comadreja fue remitida entera en una bolsa cerrada y refrigerada al Laboratorio de Parasitología de Facultad de Veterinaria (Montevideo), donde se identificaron y se mantuvieron a 4°C hasta la realización de la necropsia parasitaria. Como se describe en la técnica de Dubey *et al.* (4), los esporocistos resisten y son almacenados a esta

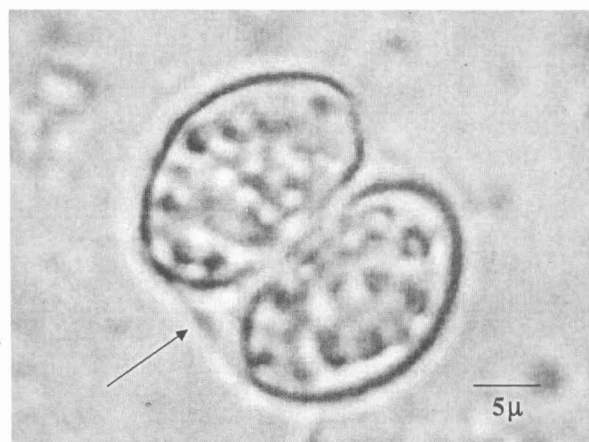
temperatura de 4°C, para posteriores estudios. Es una técnica sencilla, rápida y confiable, que no requiere materiales especiales.

Cada uno de los compartimentos digestivos fue ligado con doble ligadura, separado de los otros por incisión y extraído intacto. Luego se procedió a vaciar el contenido en recipientes individuales. En el intestino delgado, además, se realizó un raspaje de mucosa. Los raspajes intestinales fueron homogeneizados en una licuadora doméstica con 100 ml de agua destilada, durante 60 segundos, de acuerdo a la técnica de Dubey *et al.* (4). Posteriormente, se examinaron unas gotas del homogeneizado en el microscopio óptico (400X) para identificar esporocistos. Se utilizó un micrómetro ocular para la obtención de las medidas.

RESULTADOS

Sólo en el raspaje intestinal de 1 de las 3 comadrejas, se observaron algunos ooquistes de *Sarcocystis* spp. conteniendo 2 esporocistos (Figura 1) y abundante cantidad de esporocistos (Figura 2), algunos conteniendo 4 esporozoitos. Los esporocistos tenían en su interior un residuo de forma variable que, en algunos de ellos, se presentaba como gránulos dispersos y en otros como grandes glóbulos. La población de esporocistos estudiada (n=200) presentó una amplitud para el diámetro mayor de 10,52-15,78µ, con una media de 14,67µ y un desvío estándar de ± 1,35µ. Para el diámetro menor la amplitud fue de 7,89-12,62µ, la media de 9,88µ y el desvío estándar de ± 0,97µ.

Figura 1. Ooquiste de *Sarcocystis* spp. conteniendo 2 esporocistos. La flecha indica la pared del ooquiste.



* Perdomo E. (2004), comunicación personal.

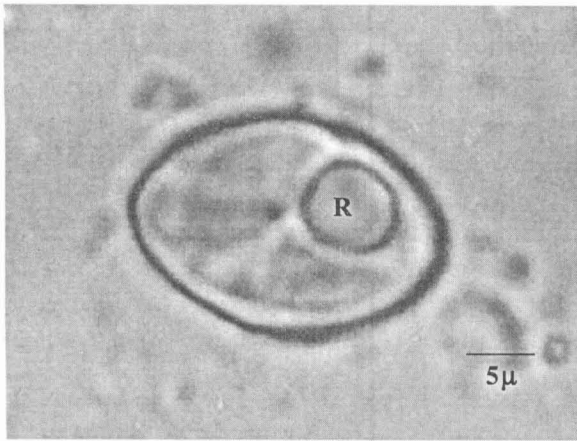


Figura 2. Esporocisto de *Sarcocystis* spp. conteniendo un residuo en forma de glóbulo grande y único (R) y esporozoitos.

DISCUSIÓN

El número de especies de *Sarcocystis* presentes en las comadrejas, es desconocido (6). Tanto las comadrejas de América del Norte (*Didelphis virginiana*), como las de América del Sur (*Didelphis albiventris*), actúan como huéspedes definitivos para tres especies identificadas de *Sarcocystis* (*S. neurona*, *S. falcatula* y *S. speeri*) y para otras especies todavía no identificadas (2).

Para la diferenciación entre especies de *Sarcocystis* se cuenta con bioensayos y técnicas moleculares. Dubey *et al.* (11) aislaron una especie de *Sarcocystis* distinta de *S. falcatula* y *S. neurona* en ratones inmunodeficientes, mediante la ingestión de esporocistos provenientes de comadrejas (*D. virginiana*). Posteriormente Dubey y Lindsay (8) nombraron a esta tercer especie de *Sarcocystis* como *S. speeri*. La base para la diferenciación de estas tres especies de *Sarcocystis* es su infectividad en aves y ratones inmunodeficientes, la tinción histoquímica con anticuerpos anti-*S. neurona* y la ultraestructura de los merozoitos (11). Por otro lado, Tanhauser *et al.* (20) desarrollaron marcadores moleculares para diferenciar *S. neurona* de *S. falcatula*. En dicho trabajo, de 9 inóculos de intestino, provenientes de comadrejas (*D. virginiana*), 5 se identificaron como *S. neurona*, 2 como *S. falcatula* y 2 resultaron ser organismos no identificados, distintos de *S. neurona* y *S. falcatula*.

Cheadle *et al.* (1), usando los análisis con enzimas de restricción desarrollados por Tanhauser *et al.* (20), determinaron las

especies de *Sarcocystis* presentes en comadrejas (*D. virginiana*) infectadas naturalmente. Con el objetivo de hacer un diagnóstico de las distintas especies de *Sarcocystis* por morfometría, midieron 20 esporocistos de cada aislamiento de las 3 especies caracterizadas (*S. neurona*, *S. falcatula* y *S. speeri*) y de 2 tipos de *Sarcocystis* no identificados, "tipo 1085" y "tipo 3344", (n=340). Para *S. neurona* la media fue de $10,7\mu(\pm 0,09) \times 7,0\mu(\pm 0,09)$ ($9,7-11,4\mu \times 6,2-8,4\mu$), para *S. falcatula* de $11,0\mu(\pm 0,13) \times 7,1\mu(\pm 0,10)$ ($8,8-11,9\mu \times 6,6-7,9\mu$), para *S. speeri* de $12,2\mu(\pm 0,14) \times 8,8\mu(\pm 0,09)$ ($11,0-13,2\mu \times 7,5-9,7\mu$), para el «tipo 1085» de $10,9\mu(\pm 0,07) \times 6,8\mu(\pm 0,07)$ ($9,7-11,9\mu \times 6,2-7,9\mu$) y para el "tipo 3344" de $19,4\mu(\pm 0,20) \times 10,5\mu(\pm 0,20)$ ($17,6-20,7\mu \times 9,2-11,9\mu$).

Lindsay *et al.* (17) realizaron un trabajo donde se describe por primera vez la estructura de los esporocistos de *S. neurona*, obtenidos de comadrejas (*D. virginiana*) infectadas experimentalmente. Para este ensayo fue utilizado el aislamiento SN-37R de esporocistos de *S. neurona*. Cuarenta esporocistos fueron medidos obteniendo una media de $11,3\mu(\pm 0,47) \times 8,2\mu(\pm 0,43)$ ($11-12\mu \times 7-9\mu$).

En un trabajo realizado por Fenger *et al.* (13) para determinar el huésped definitivo de *S. neurona* y para ver la relación entre *S. neurona* y *S. falcatula*, recuperaron esporocistos de *Sarcocystis* spp. a partir de comadrejas (*D. virginiana*) y midieron 50 de estos esporocistos. La media para el diámetro mayor fue de

$11,6\mu$ (amplitud de $10,0-12,0\mu$) y para el diámetro menor de $7,8\mu$ (amplitud de $7,0-8,0\mu$).

Las medidas de los esporocistos obtenidas en el presente trabajo no coinciden con ninguna de las medidas obtenidas por Cheadle *et al.* (1) para las diferentes especies de *Sarcocystis*, ni con las medidas obtenidas por Fenger *et al.* (13) para *Sarcocystis* spp., así como tampoco con las medidas obtenidas para *S. neurona* por Lindsay *et al.* (17). Se debe tener en cuenta que el número de esporocistos medidos en el presente trabajo es mayor que los n esporocistos estudiados por Lindsay *et al.* (17) y por Fenger *et al.* (13).

CONCLUSIONES

Si bien hasta el momento, no es posible diferenciar las distintas especies de *Sarcocystis* basados únicamente en las medidas de los esporocistos y en su morfología interna, podemos inferir que en la población de esporocistos estudiada en el presente trabajo hay más de una especie de *Sarcocystis*, debido a la gran dispersión que presentó dicha población.

Se concluye que las estructuras encontradas en el presente estudio corresponden a esporocistos de *Sarcocystis* spp., siendo ésta la primera comprobación de su presencia en *Didelphis albiventris* en Uruguay. Se sugiere para trabajos futuros, su aislamiento e identificación a través de técnicas moleculares, así como también la realización de un relevamiento serológico en los equinos del país para conocer si están o no expuestos a *S. neurona*.

Agradecimientos

Al Dr. Alfredo Oddo por el aporte de las comadrejas utilizadas en el presente trabajo.

Referencias bibliográficas

1. Cheadle, M.A.; Dame, J.B.; Greiner, E.C. (2001). Sporocyst size of isolates of *Sarcocystis* shed by the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*). *Vet. Parasitol.* 95 (2-4): 305-311.
2. Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Saville, W.J.A.; Reed, S.M.; Granstrom, D.E.; Speer, C.A. (2001). A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Vet. Parasitol.* 95(2-4): 89-131
3. Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Kerber, C.E.; Kasai, N.; Pena, H.F.J.; Gennari, S.M.; Kwok, O.C.H.; Shen, S.K.; Rosenthal, B.M. (2001). First isolation of *Sarcocystis neurona* from the South American opossum, *Didelphis albiventris*, from Brazil. *Vet. Parasitol.* 95(2-4): 295-304.
4. Dubey, J.P.; Black, S.S.; Rickard, L.G.; Rosenthal, B.M.; Lindsay, D.S.; Shen, S.K.; Kwok, O.C.H.; Hurst, G.; Rashmir-Raven, A. (2001). Prevalence of *Sarcocystis neurona* sporocyst in opossums (*Didelphis virginiana*) from rural Mississippi. *Vet. Parasitol.* 95(2-4): 283-293.
5. Dubey, J.P.; Venturini, L.; Venturini, M.C.; Speer, C.A. (2000). Isolation of *Sarcocystis speeri* Dubey and Lindsay, 1999 Parasite from the South American Opossum (*Didelphis albiventris*) from Argentina. *J. Parasitol.* 86 (1): 160-163.
6. Dubey, J.P. (2000). Prevalence of *Sarcocystis* species sporocysts in wild-caught opossums (*Didelphis virginiana*). *J. Parasitol.* 86 (4): 705-710.
7. Dubey, J.P.; Venturini, L.; Venturini, C.; Basso, W.; Unzaga, J. (1999). Isolation of *Sarcocystis falcatula* from the South American opossum (*Didelphis albiventris*) from Argentina. *Vet. Parasitol.* 86(4): 239-244.
8. Dubey, J.P.; Lindsay, D.S. (1999). *Sarcocystis speeri* n. sp. (Protozoa: Sarcocystidae) from the opossums (*Didelphis virginiana*). *J. Parasitol.* 85(5): 903-909.
9. Dubey, J.P.; Venturini, M.C.; Venturini, L.; McKinney, J.; Pecoraro, M. (1999). Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina. *Vet. Parasitol.* 86(1): 59-62.
10. Dubey, J.P.; Kerber, C.E.; Granstrom, D.E. (1999). Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses in Brazil. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215(7): 970-972.
11. Dubey, J.P.; Speer, C.A.; Lindsay, D.S. (1998). Isolation of a third species of *Sarcocystis* in immunodeficient mice fed feces from opossums (*Didelphis virginiana*) and its differentiation from *Sarcocystis falcatula* and *Sarcocystis neurona*. *J. Parasitol.* 84(6): 1158-1164.
12. Dubey, J.P.; Davis, S.W.; Speer, C.A.; Bowman, D.D.; de Lahunta, A.; Granstrom, D.E.; Topper, M.J.; Hamir, A.N.; Cummings, J.F.; Suter, M.M. (1991). *Sarcocystis neurona* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa), the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. *J. Parasitol.* 77: 212-218.
13. Fenger, C.K.; Granstrom, D.E.; Gajadhar, A.A.; Williams, N.M.; McCrillis, S.A.; Stamper, S.; Langemeier, J.L.; Dubey, J.P. (1997). Experimental induction of equine protozoal myeloencephalitis in horses using *Sarcocystis* sp. Sporocysts from the opossum (*Didelphis virginiana*). *Vet. Parasitol.* 68(3):199-213.
14. González, E.M. (2001). Introducción al estudio de los mamíferos. En: González, E.M. Guía de campo de los mamíferos de Uruguay. Ed. VIDA SILVESTRE, Montevideo, pp. 48-49.
15. Gray, L.C.; Magdesian, K.G.; Sturges, B.K.; Madigan, J.E. (2001). Suspected protozoal myeloencephalitis in a tow-month-old colt. *Vet. Rec.* 149(9): 269-273.
16. Hamir, A.N.; Tornquist, S.J.; Gerros, T.C.; Topper, M.J.; Dubey, J.P. (1998). *Neospora caninum*-associated equine protozoal myeloencephalitis. *Vet. Parasitol.* 79(4): 269-274.
17. Lindsay, D.S.; Mitchell, S.M.; Vianna, M.C.; Dubey, J.P. (2004). *Sarcocystis neurona* (Protozoa: Apicomplexa): description of oocysts, sporocysts, sporozoites, excystation, and early development. *J. Parasitol.* 90 (3): 461-465.
18. MacKay, R.J. (1997). Equine protozoal myeloencephalitis. *The Veterinary Clinics of North America: Equine practice* 13(1): 79-96.
19. Masri, M.D.; Alda, J.L.; Dubey, J.P. (1992). *Sarcocystis neurona* - associated ataxia in horses in Brazil. *Vet. Parasitol.* 44(3-4): 311-314.
20. Tanhauser, S.M.; Yowell, C.A.; Cutler, T.J.; Greiner, E.C.; Mackay, R.J.; Dame, J.B. (1999). Multiple DNA markers differentiate *Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis falcatula*. *J. Parasitol.* 85(2): 221-228.