

Diagnóstico de *Entamoeba polecki* y su potencial impacto en las condiciones sanitarias de la producción porcina

LÓPEZ ARIAS, L.S.^{1,2,3}; GUILLEMI, E.C.³; BORDONI, N.²; FARBER, M.³; GARBOSSA, G.^{1,2}

RESUMEN

En Argentina, la producción porcina constituye una actividad en constante aumento, en particular, para la pequeña agricultura familiar. No obstante, este tipo de producción posee ciertas limitaciones (estructurales y ambientales) que, entre otras consecuencias, propician la transmisión enzoótica y zoonótica de diversas infecciones. En este sentido, *Entamoeba polecki* pertenece al grupo de amebas intestinales que tiene como principal hospedero al cerdo y que con base en diferencias nucleotídicas presentes en una pequeña región del gen ARN ribosomal 18S se distinguen cuatro subtipos (ST1, ST2, ST3 y ST4) que estarían relacionados con el hospedero que parasitan. Se especula que la infección por esta ameba contribuiría al agravamiento de cuadros digestivos producidos por otros patógenos. Por lo expuesto, el objetivo de este trabajo fue determinar si distintos sistemas de producción porcina constituyen un factor de riesgo para la adquisición de *E. polecki*. Con este propósito, se colectaron y procesaron heces de cerdos procedentes de pequeñas producciones rurales de Misión Nueva Pompeya (provincia de Chaco) y de cerdos procedentes de una estación productiva de Marcos Juárez (provincia de Córdoba). Las heces procesadas fueron inspeccionadas por microscopía óptica y utilizadas para el diagnóstico molecular por PCR. Para lo cual un par de cebadores específicos de *E. polecki*, que amplifica un fragmento del gen ARN ribosomal 18S, fue diseñado. Los fragmentos amplificados y secuenciados del gen ARN ribosomal 18S confirmaron la presencia de *E. polecki* en las muestras.

Además, el análisis filogenético permitió establecer los subtipos circulantes en los cerdos, los cuales correspondieron a ST1 y ST3. A nuestro entender, este es el primer reporte de diagnóstico y caracterización de *E. polecki* en Argentina, asociado a la producción porcina.

Palabras clave: *Entamoeba polecki*, cerdos, PCR, diagnóstico molecular.

ABSTRACT

In Argentina, pig production on family farms is increasing. The lack of veterinary animal health planning there as well as inefficient facilities may cause environmental risks that conducive to enzootic and zoonotic transmission of various infections. Entamoeba polecki is a uninucleate-cyst producing intestinal parasite and

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química Biológica, Laboratorio de Parasitología Clínica y Ambiental, IQUBICEN-CONICET. Intendente Güiraldes 2160, Piso 4, Ciudad Universitaria, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Correo electrónico: garbossa@qb.fcen.uba.ar

²Universidad de Buenos Aires, Instituto de Investigaciones en Salud Pública, Presidente José Evaristo Urriburu 950, Piso 1, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Instituto de Biotecnología INTA. Los Reseros S/N, Castelar, provincia de Buenos Aires, Argentina. Correos electrónicos: lud.lopez.arias@gmail.com, guillemi.eliana@inta.gov.ar; farber.marisa@inta.gov.ar

its main host is the pig. Based on the intra-specific variation of small sequence of 18S rRNA gene, the isolates of *E. polecki* appeared to be divided into four subtypes (ST1, ST2, ST3 y ST4), which would be related to their hosts. It is speculate that this amoeba would have the ability to increase damage brought about by other intestinal pathogens. For this reason, the aim of this work was to determine whether or not different swine production systems constitute a risk factor for acquiring *E. polecki*. To achieve this goal, pig feces were collected from family farms in Misión Nueva Pompeya (Province of Chaco) and from an experimental station in Marcos Juárez (Province of Córdoba). Microscopic diagnosis of stool samples was performed in order to detect the presence of *E. polecki*-like cysts. To molecular diagnosis a set of *E. polecki*-specific primers based on 18S ribosomal RNA gene was designed and used to PCR assay. Results shown that the particular sanitary conditions of production systems studied, would not be a risk factor for acquiring *E. polecki*. PCR assays and subsequent sequencing of amplified fragments of 18S rRNA gene confirmed the presence of *E. polecki* in the samples. Moreover, phylogenetic analysis showed that subtypes 1 and 3 of the parasite are circulating in pigs. In particular, ST3 is the most relevant due to its impact on the health of pigs infected with more than one intestinal pathogen. To our knowledge, this is the first diagnostic and characterization report of *E. polecki* associated with porcine production in Argentina.

Keywords: *Entamoeba polecki*, pigs, PCR, molecular diagnosis.

INTRODUCCIÓN

En Argentina, la producción porcina constituye una actividad en constante aumento, en particular, para la pequeña agricultura familiar que representa más del 66% de las explotaciones agropecuarias (SENASA, 2014). No obstante, este tipo de producción posee ciertas limitaciones de índole comercial, tecnológica, productiva, social y ambiental (INTA, 2011) que, entre otras consecuencias, propician la transmisión enzoótica y zoonótica de diversas infecciones.

Entamoeba polecki (Von Prowazek, 1912) pertenece al grupo de amebas intestinales, de transmisión fecal-oral, cuyo quiste maduro posee un único núcleo. Su principal reservorio u hospedero es el cerdo (*Sus scrofa domestica*) aunque también puede infectar a otros animales; entre ellos al hombre (Levin y Armstrong, 1969). Hasta el momento, y con base en diferencias nucleotídicas halladas en una región del gen ARN ribosomal 18S, se han identificado cuatro subtipos (ST1, ST2, ST3 y ST4) de esta especie que tendrían relación con el hospedero que parasitan (Stensvold *et al.*, 2011). Si bien la patogenicidad potencial de esta ameba no está suficientemente comprobada (Salaki *et al.*, 1979; Gay *et al.*, 1985) actualmente se especula que la infección por este parásito contribuiría al agravamiento de cuadros digestivos en el cerdo, lo que estaría relacionado con la composición de su flora intestinal (Matsubayashi *et al.*, 2015a). Particularmente, se observó que cerdos coinfectados con *E. polecki* (específicamente el subtipo ST3) y la bacteria *Lawsonia intracellularis* (agente etiológico de la enteropatía proliferativa porcina o ileítis (McOrist *et al.*, 1995)) presentaron cuadros severos de colitis ulcerativa,

mientras que cerdos infectados solo con *L. intracellularis* presentaron una sintomatología menos severa. Este hallazgo condujo a la conclusión de que gran cantidad de trofozoitos presentes en lesiones y sitios ulcerados del intestino sería la mayor causa del agravamiento del cuadro y no la infección por la bacteria (Matsubayashi *et al.*, 2015b), mostrando con esto el efecto amplificador de daño que podría tener este parásito en presencia de otros patógenos.

Frente a lo expuesto y debido a que a) *E. polecki* tiene la capacidad potencial de agravar cuadros intestinales producidos por otros microorganismos en porcinos; b) no hay reportes en el país sobre esta parasitosis; c) la producción porcina es una actividad que se encuentra en creciente aumento en el país (SENASA, 2014); y a efectos de determinar si las condiciones de cría constituyen un factor de riesgo para la transmisión de *E. polecki*, se estudiaron dos poblaciones de cerdos procedentes de sistemas productivos diferentes. A nuestro entender, este es el primer reporte de diagnóstico y caracterización de *E. polecki* en Argentina, en particular asociado a la producción porcina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Por un lado, en 2011, se recolectaron heces de cerdos (n=18) a través de un muestreo por conveniencia, en la zona periurbana y en parajes aledaños al municipio de Misión Nueva Pompeya (MNP, 24°55'36"S 61°28'48"O; departamento General Güemes), provincia de Chaco. Los animales no estaban confinados en corrales y circulaban libremente por el peridomicilio y por el monte para procurar su alimento,

tanto a partir de los desechos orgánicos familiares como de frutos silvestres de leguminosas y raíces del monte.

Por otro lado, en 2012 se recolectaron heces de cerdos ($n=10$) de la estación experimental del INTA de Marcos Juárez (EEA-Marcos Juárez, $32^{\circ}42'00''S$ $62^{\circ}06'00''O$), provincia de Córdoba. En este sistema productivo los animales se encontraban confinados, generalmente en corrales, disponían de controles sanitarios y eran alimentados con dieta balanceada. Las muestras procedentes de ambas regiones fueron conservadas en recipientes plásticos a $-20^{\circ}C$ hasta su procesamiento.

Como paso previo a la detección de quistes parasitarios, una porción de las muestras fue concentrada por un método de centrifugación que habitualmente se emplea en el laboratorio (Duré *et al.*, 2013). Al menos dos alícuotas, una de ellas coloreada con solución de Lugol, fueron inspeccionadas por microscopía óptica utilizando un objetivo de 40X. Para la extracción de ácidos nucleicos, una alícuota de las heces fue congelada con nitrógeno líquido y molida en mortero (tres veces). El ADN fue extraído utilizando un equipo comercial (QIAmp DNA stool de Qiagen), según las instrucciones del fabricante y conservado a $-20^{\circ}C$ hasta su utilización como templado para las reacciones de amplificación por PCR.

Además y debido a que existen especies del mismo género que poseen quistes idénticos al de esta ameba, se propuso realizar el diagnóstico molecular de *E. polecki*. Para lo cual se diseñó un par de cebadores específicos de especie que hacen blanco en el gen ARN ribosomal 18S y que contiene la región informativa que permite discriminar entre diferentes subtipos de *E. polecki* (Stensvold *et al.*, 2011): PoI_F AGAAAGAGGAGGAAGCATG y PoI_R CC-CAGTCATGTACACCTTTT.

El ensayo de PCR fue realizado en un volumen final de 50 μ l conteniendo buffer 1X (Qiagen®), 15 mM de $MgCl_2$, 2 mM de dNTPs (Promega), 0,4 μ M de cada cebador (Biodynamics) y 0,5 U de Taq polimerasa (Qiagen®). Como templado se utilizaron entre 250-300 ng de ADN genómico. Las condiciones de ciclado para la reacción de amplificación fueron: 3 min a $94^{\circ}C$, seguido de 35 ciclos a $94^{\circ}C$ por 30 seg; $51^{\circ}C$ por 30 seg y $72^{\circ}C$ por 1 min, más una extensión final a $72^{\circ}C$ por 7 min. Los amplicones obtenidos

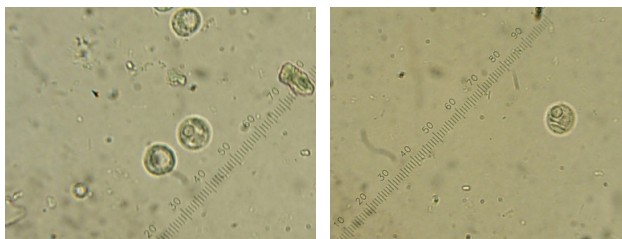


Figura 1. Quistes uninucleados similares *E. polecki* hallados en las heces de los cerdos. Se observa la presencia de un solo núcleo con cromatina periférica y cariósoma central. A 400X. (Elaboración para la presente edición).

fueron extraídos de la mix utilizando un equipo comercial (QIAquick PCR Purification Kit) según las instrucciones del fabricante y secuenciados en ambas direcciones en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología (CICVyA, INTA) por el método Sanger, utilizando BidDye Terminator v3 y secuenciadores automáticos Genetic Analyzer 3500 xl (Applied Biosystems). La edición de las secuencias y el ensamblado de los contigs se realizó con el Software Vector NTI®. Para realizar la reconstrucción filogenética de los aislamientos se utilizó el Software MEGA 5.05 (Kumar *et al.*, 2004; Tamura *et al.*, 2004).

Se calcularon intervalos de confianza binomiales Agresti-Coull 95% (IC) para las proporciones de heces infectadas con *E. polecki* (Brown *et al.*, 2001).

RESULTADOS

En el 60,7% (17/28) de las heces colectadas se detectaron quistes uninucleados con características morfológicas compatibles con *E. polecki*: tamaños de los quistes comprendidos entre 8-15 μ m, presencia de un solo núcleo con cromatina periférica y nucléolo central (figura 1).

El porcentaje de positividad fue mayor en las heces procedentes de Marcos Juárez [70% (64%; IC 39-90)] que en las de Misión Nueva Pompeya [55,5% (55%; IC 34-75)], aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

A partir de los fragmentos secuenciados pertenecientes al gen 18S del ARN ribosomal se determinó la identidad a través de la comparación contra la base de datos de GenBank usando BLASTn, de manera que se confirmó la presencia de *E. polecki* en 13 de las 17 muestras donde los quistes fueron identificados.

A su vez, las secuencias nucleotídicas fueron utilizadas para analizar los polimorfismos entre las muestras y establecer las relaciones filogenéticas que permiten clasificar los diferentes subtipos de *E. polecki*, para lo cual se utilizó el método de distancias *Neighbor-joining* disponible en el paquete MEGA 5.05. Se incorporaron al análisis otros aislamientos obtenidos de distintos hospederos donde fueron identificados los distintos subtipos de esta ameba (GenBank): cerdo (AF149913.1), humano (FR686394.1, FR686392.1, FR686398.1, FR686400.1, FR686357.1, FR686393.1, FR686395.1 y FR686397.1), avestruz (*E. struthionis*; AJ566411.2) y primate (*E. chattoni*; AF149912.1) (figura 2).

El análisis filogenético permitió clasificar diferencialmente a los aislamientos estudiados, de manera que fue posible identificar dos grupos: *E. polecki* (ST1) y *E. struthionis* (ST3) de acuerdo a datos previos (Stensvold *et al.*, 2011). Ningún aislamiento obtenido en este trabajo agrupó con *E. chattoni* (ST2) o *E. polecki* (ST4).

DISCUSIÓN

Este trabajo describe por primera vez la presencia de *E. polecki* en cerdos procedentes de dos sistemas productivos de nuestro país. El diseño de un par de cebadores para

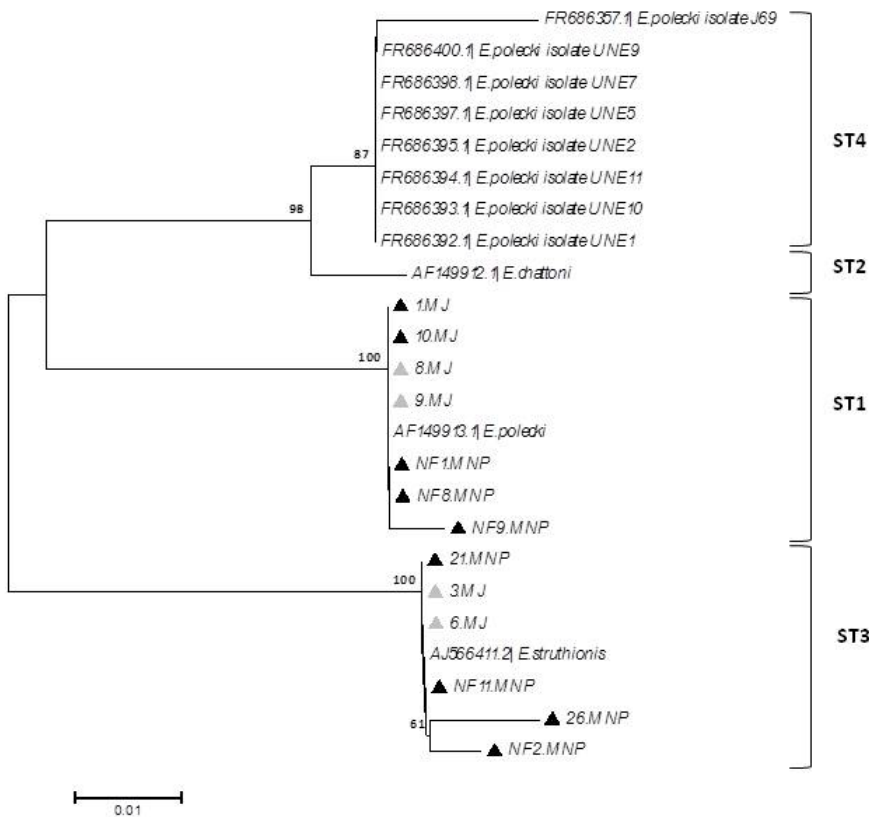


Figura 2. Reconstrucción filogenética inferida por el método Neighbor-Joining a partir de secuencias parciales del gen ARN ribosomal 18S de *E. polecki* identificadas a partir de las heces de cerdos oriundos de Chaco (MJ; ▲) y de Córdoba (MNP; ▲). Las secuencias restantes fueron obtenidas de la base de datos *GenBank*. Se utilizaron 199 posiciones informativas (Bootstrap 1000 réplicas). (Elaboración para la presente edición).

la amplificación de los ácidos nucleicos específicos de *E. polecki*, propuestos aquí, permitió confirmar la identidad de quistes detectados por microscopía óptica en las heces de los cerdos, como así también identificar los subtipos del parásito que se encuentran en circulación.

Por un lado, dado que no existieron diferencias significativas en el número de positividad de las heces infectadas de los animales procedentes de ambos sistemas productivos (MNP y MJ) inferimos que las condiciones sanitarias de cada región no serían determinantes para la adquisición de esta parasitosis. Se ha observado que animales criados en sistemas abiertos (sistema “*plein air*”) presentan menor frecuencia de infección debido a que el ambiente actuaría como factor de “dilución” de los protozoarios excretados (Giarratana *et al.*, 2012). Sin embargo, este estudio muestra que, aunque los animales de MNP son criados en un sistema abierto, las condiciones higiénico-sanitarias en esa región son deficientes y esto afectaría y contrarrestaría el efecto del ambiente.

Por otro lado, el hallazgo de ST1 y ST3 de *E. polecki* en estos animales es relevante, debido a que estos subtipos

poseen una baja especificidad de hospedero, habiéndose detectados ambos subtipos tanto en cerdos (*Sus scrofa domestica*) como en avestruces (*Rhea americana*) (Stensvold *et al.*, 2011). En relación con esto, en MNP se ha observado que tanto los cerdos como otros animales, entre los que se encuentra el ñandú (*Rhea americana*), circulan por los mismos sitios (monte y peridomicilio rurales) lo que conllevaría, dadas las condiciones sanitarias, a la adquisición y persistencia de esta parasitosis en animales susceptibles. En el caso particular del hallazgo de ST3, en ambas poblaciones de cerdos (MJ y MNP), pone en alerta sobre la posible afectación de la salud de estos animales debido a la potencialidad de esta ameba de magnificar el daño producido por otros patógenos. La detección de *E. polecki* como potencial amplificador de daño sería particularmente importante en el “síndrome de diarrea posdestete” que se manifiesta, en un principio, como un disturbio funcional del intestino y luego se transforma en un cuadro infeccioso. En tal sentido, se ha reportado recientemente el aislamiento de gran cantidad de trofozoítos de *E. polecki* ST3 de úlceras intestinales de cerdos infectados con *L. intracellularis* que padecían cuadros diarreicos agudos (Matsubayashi

et al., 2015b). Finalmente, los subtipos (ST4 y ST2) que han sido asociado a infecciones en humanos y primates (Stensvold *et al.*, 2011) no fueron detectados en las muestras analizadas.

En este contexto se desprende la necesidad de realizar un seguimiento o control de la microbiota intestinal de estos animales, dado que este tipo de ganado es susceptible a diversas enfermedades infecciosas y parasitarias (Lai *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2013; Schär *et al.*, 2014; Solaymani-Mohammadi y Petri, 2006), con el objetivo de advertir en los cerdos posibles cuadros intestinales severos en los que intervendría particularmente *E. polecki* ST3. Este trabajo propone una herramienta molecular confiable que no solo permite la detección e identificación de *E. polecki*, sino también permite identificar los subtipos de esta especie. Además, se describe por primera vez la presencia de este parásito en cerdos de establecimientos de producción diferencial en dos regiones argentinas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los miembros de las comunidades rurales y a las familias de MNP. También nos gustaría agradecer al Dr. H. Piscitelli y al Dr. F. Bessone de EEA-Marcos Juárez (INTA), quienes amablemente nos proporcionaron las muestras desde la provincia de Córdoba. Este trabajo fue financiado por la Universidad de Buenos Aires [Subsidio: R022 y S014 de NB y GG] y el INTA [PNBIO 1131032 y 1131043 de MF].

Las fuentes de financiación solo proporcionaron apoyo financiero para la realización de la investigación y no han participado en el diseño del estudio; en la recopilación, análisis e interpretación de datos; en la redacción del informe; y en la decisión de enviar el artículo para su publicación.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no haber conflictos de interés. Los autores también afirman que no tienen ningún interés financiero o personal que pueda afectar a su objetividad, o influir inapropiadamente en sus acciones mientras se estaban llevando a cabo esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

BEYLI, M.E.; BRUNORI, J.; CAMPAGNA, D.; COTTURA, G.; CRESPO, D.; DENEGRI, D.; DUCOMMUN, M.L.; FANER, C.; FIGUEROA, M.E.; FRANCO, R.; GIOVANNINI, F.; GOENAGA, P.; LOMELLO, V.; LLOVERAS, M.; MILLARES, P.; ODETTO, S.; PANICHELLI, D.; PIETRANTONIO, J.; RODRÍGUEZ FAZZONE, M.; SUÁREZ, R.; SPINER, N.; ZIELINSKY, G. 2011. Buenas Prácticas Pecuarias (BPP) para la producción y comercialización porcina familiar. INTA. Porcinos- Cría intensiva a campo. EEA-Pergamino. 283 p. (Disponible: www.inta.gov.ar verificado: julio de 2016).

BROWN, L.D.; CAI, T.T.; DASGUPTA, A. 2001. Interval Estimation for a Binomial Proportion. *Stat. Sci.* 16, 101-133.

DURÉ, F.; FLAIBANI, N.; ROMERO, M.; GARBOSSA, G. 2013. The architectural design of urban space and its influence in the

communities of parasites in two areas of Buenos Aires city with different circulation dynamic of companion animals. *Revista Argentina de Parasitología*, 1(2):21-32.

GAY, J.D.; ABELL, T.L.; THOMPSON, J.H.; LOTH, V. 1985. *Entamoeba polecki* infection in Southeast Asian refugees: multiple cases of a rarely reported parasite. *Clin Proc.* 60:523-530.

GIARRATANA, F.; MUSCOLINO, D.; TAVIANO, G.; ZIINO, G. 2012. *Balantidium coli* in Pigs Regularly Slaughtered at Abattoirs of the Province of Messina: Hygienic Observations. *Open. J. Vet. Med.* 2, 77-80. Doi:10.4236/ojvm.2012.22013

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. 2004. MEGA3: An Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetic Analysis and Sequence Alignment. *Integrative and Comparative Biology* 43:947.

LAI, M.; ZHOU, R.Q.; HUANG, H.C.; HU, S.J. 2011. Prevalence and risk factors associated with intestinal parasites in pigs in Chongqing, China. *Res. Vet. Sci* 91, 121-4.

LEVIN, L.L.; ARMSTRONG, D.E. 1970. Human Infection with *Entamoeba polecki*. *American Journal of Clinical Pathology* 54(4): 611-614.

MATSUBAYASHI, M.; KANAMORI, K.; SADAHIRO, M.; TOKORO, M.; ABE, N.; HARITANI, M.; SHIBAHARA, T. 2015a. First molecular identification of *Entamoeba polecki* in a piglet in Japan and implications for aggravation of ileitis by coinfection with *Lawsonia intracellularis*. *Parasitol Res.* 114:3069-3073.

MATSUBAYASHI, M.; MURAKOSHI, N.; KOMATSU, T.; TOKORO, M.; HARITANI, M.; SHIBAHARA, T. 2015b. Genetic identification of *Entamoeba polecki* subtype 3 from pigs in Japan and characterisation of its pathogenic role in ulcerative colitis. *Infection, Genetics and Evolution* 36, 8-14.

MCORIST, S.; GEBHART, C.J.; BOID, R.; BARNES, S.M. 1995. Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov, sp nov, the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. *Int J Syst Bacteriol.* 45:520-525.

NGUYEN, S.T.; FUKUDA, Y.; TADA, C.; SATO, R.; HUYNH, V.V.; NGUYEN, D.T.; NAKAI, Y. 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* in pigs in central Vietnam. *Parasitol. Res.* 112, 187-192.

SALAKI, J.S.; SHIREY, J.L.; STRICKLAND, G.T. 1979. Successful treatment of symptomatic *Entamoeba polecki* infection. *Am J Trop Med Hyg.* Mar;28(2):190-3.

SCHÄR, F.; INPANKAEW, T.; TRAUB, R.J.; KHIEU, V.; DALSGAARD, A.; CHIMNOI, W.; CHHOUN, C.; SOK, D.; MARTI, H.; MUTH, S.; ODERMATT, P. 2014. The prevalence and diversity of intestinal parasitic infections in humans and domestic animals in a rural Cambodian village. *Parasitol. Int.* 63, 597-603.

SENASA. 2014. Informe estadístico de producción porcina. (Disponible: <http://www.senasa.gov.ar/cadena-animal/porcinos/informacion/informes-y-estadisticas> verificado: marzo de 2016).

SOLAYMANI-MOHAMMADI, S.; PETRI, W.A. 2006. Zoonotic implications of the swine-transmitted protozoal infections. *Vet. Parasitol.* 140, 189-203.

STENSVOLD, C.R.; LEBBAD, M.; VICTORY, E.L.; VERWEIJ, J.J.; TANNICH, E.; ALFELLANI, M.; LEGARRAGA, P.; GRAHAM CLARK, C. 2011. Increased Sampling Reveals Novel Lineages of *Entamoeba*: Consequences of Genetic Diversity and Host Specificity for Taxonomy and Molecular Detection. *Protist.* 162, 525-541.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. 2004. Prospects for Inferring Very Large Phylogenies by Using the Neighbor-Joining Method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:11030-11035.

VON PROWAZEK, S. 1912. *Entamoeba*. *Arch. Protistenk.* 25: 273-274.