

## **Determinación de *Helicobacter* spp. en mucosa gástrica glandular de mulas a través de la prueba de la actividad de la ureasa e histopatología**

*L. C. Calixto<sup>1,2</sup>, J. R. Martínez<sup>1</sup>*

*Recibido: 22/06/2021. Aprobado: 29/08/2021*

### **RESUMEN**

La información sobre la presentación y los factores predisponentes del síndrome de úlcera gástrica en mulas (SUGM) es escasa en comparación con el síndrome de úlcera gástrica en equinos (SUGE) y asnales. Debido a la naturaleza multifactorial de este síndrome, la helicobacteriosis ha sido estudiada en otras especies. El objetivo de este trabajo fue establecer la presencia de *Helicobacter* spp. en mucosa gástrica de mulas a través de la prueba rápida de la ureasa (PRU) y de análisis histopatológico. Menos del 27% de las muestras reaccionaron a la PRU, con tiempos prolongados de reacción, y al Agar Urea (prueba de oro), con menor porcentaje de positividad. La histopatología reveló procesos inflamatorios crónicos, sin presencia de bacterias curvoespiraladas. Las PRU no fueron concluyentes en la determinación de *Helicobacter* spp., comportamiento similar reportado en equinos. Se requieren exámenes diagnósticos más específicos y procedimientos complementarios orientados a explorar por regiones del estómago en la consideración del número de muestras representativas.

**Palabras clave:** *Helicobacter* spp., mular, úlcera, ureasa, histopatología.

## **Determination of *Helicobacter* spp. in glandular gastric mucosa of mules through the test of urease activity and histopathology**

### **ABSTRACT**

Information on the presentation and predisposing factors of Mule Gastric Ulcer Syndrome (MGUS) is scarce, compared to Equine Gastric Ulcer Syndrome (EGUS) and donkeys. Within the multifactorial nature of this syndrome, helicobacteriosis has been studied in other species. The objective of this work was to establish the presence of *Helicobacter* spp. in gastric mucosa of mules, through the rapid urease test (RUT) and histopathological analysis. Less than 27% of the samples reacted to RUTs, with prolonged reaction times, and Urea Agar (gold test), with a lower percentage of positivity. Histopathology revealed chronic inflammatory processes, without the presence of curved-spiral bacteria. The RUTs were not conclusive in the determination of *Helicobacter* spp., a similar behavior reported

<sup>1</sup> Línea de Investigación en Medicina y Cirugía Equina (Limce), Grupo de investigación Centauro, Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Calle 70 # 52-21, AA. 1226, Medellín, Colombia.

<sup>2</sup> Universidad de la Salle, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Programa de Medicina Veterinaria, Bogotá, Colombia.

\* Correo electrónico: lcalixto@unisalle.edu.co

in horses. More specific diagnostic tests and complementary procedures are required to explore the regions of the stomach in consideration of the number of representative samples.

**Keywords:** *Helicobacter* spp., mule, ulcer, ureasa, histopathology.

## INTRODUCCIÓN

El síndrome de úlcera gástrica en mulas (SUGM) ha sido poco estudiado, sin embargo, recientemente un estudio describió una frecuencia de presentación de 42,3% (Calixto 2020). Aunque se determinó la presencia de úlceras en ambas mucosas gástricas en las mulas, la presentación y el grado de severidad fue menor a lo reportado en equinos y asnales. Por el contrario, el síndrome de úlcera gástrica en equinos (SUGE) es ampliamente estudiado, con prevalencias que oscilan entre 60% y 100% y con la identificación de factores de riesgo en diferentes razas, grupos de edades y sistemas de manejo (Aranzales *et al.* 2012; Gómez *et al.* 2020; Jonsson y Egenval 2006; Sykes *et al.* 2015; Vatistas *et al.* 1999; Zuluaga y Martínez 2018).

Las ulceraciones gástricas se consideran de naturaleza multifactorial, donde factores inherentes al animal, como sexo, raza, edad, temperamento, al igual que factores extrínsecos, como manejo alimentario, estabulación, administración de antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tipo e intensidad del ejercicio y entrenamiento y eventos estresantes, se han implicado como factores predisponentes al generar desequilibrio entre los mecanismos de defensa de la mucosa gástrica y los agentes agresores tanto endógenos como exógenos (Banse y Andrews 2019; Martínez y Silveira 2014; Martínez *et al.* 2015; Murray y Eichorn 1996; Padalino *et al.* 2020; Pedersen *et al.* 2018). Adicionalmente, microbiota, bacterias ácido-resistentes, metabolitos bacterianos y parásitos (*Gasterophilus* spp., *Habronema* spp) también son señalados de occasionar lesiones en la mucosa gástrica

(Al-Mokadem *et al.* 2014; Andrews *et al.* 2006; Cardona *et al.* 2016).

En seres humanos, el *Helicobacter pylori* es bien descrito como agente causal de úlcera gástrica (Campuzano 2007; Scarano *et al.* 2005); sin embargo, en equinos es controversial en la etiología de SUGE, una vez que se ha detectado *H. pylori* y *H. equorum* en ambas mucosas, tanto en potros y adultos (Moyaert *et al.* 2007) como en sanos y enfermos (Zuluaga *et al.* 2018); si bien se ha descrito histológicamente la respuesta inflamatoria que induce en la mucosa glandular gástrica el *Helicobacter* spp. (Cardona *et al.* 2009b). Sin embargo, en mulas no existe literatura sobre la presencia o participación de esta familia de microorganismo en la génesis o perpetuación del SUGM. Por tanto, este trabajo tuvo como objetivo establecer la presencia de *Helicobacter* spp. en mucosa gástrica glandular de mulas a través de la prueba rápida de la ureasa (PRU) y el análisis histopatológico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Un total de 97 mulares (65 machos y 32 hembras), con promedio de edad de  $8,7 \pm 4,4$  años, peso promedio de 290,5  $\pm 37,6$  kg, condición corporal promedio de  $5 \pm 0,8$  (Henneke *et al.* 1983), manejados a pasto y supplementados con subproductos de la caña de azúcar y agua *ad libitum*, destinados a trabajos agropecuarios y clínicamente sanos, fueron incluidos en el estudio. Animales menores de dos años y con historial de tratamientos gástricos, administración de antibióticos y/o AINE

durante los últimos seis meses fueron excluidos.

### Comité de ética

Este trabajo se realizó con la aprobación del Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Universidad de Antioquia, Protocolo n°. 1222019.

### Toma de biopsias gástricas a través del gastroscopio

Previo periodo de ayuno de sólidos y líquidos de 12 y 4 horas, respectivamente, y sedación con xilacina al 10% (1,3 mg/kg/iv), se procedió a la introducción del gastroscopio (PortaScope®, 1800PVS, Bradenton, FL, EUA) vía nasoesofágica, para luego introducir la pinza de biopsia transendoscópica flexible a través del canal del trabajo del endoscopio (Murray *et al.* 1989). Se tomaron tres (3) muestras de aproximadamente 3x3 mm de la mucosa gástrica glandular, se usaron dos en las pruebas de actividad de la ureasa (PRU) y una fue conservada en solución de formol al 10% para análisis por histopatología (Zuluaga y Martínez 2018).

### Prueba rápida de ureasa (PRU)

Las muestras de mucosa gástrica fueron sumergidas inmediatamente en dos medios (caldo y Agar Urea) para la identificación de *Helicobacter* spp. El caldo urea modificado fue preparado con 10 g de úrea al 100% (Merck, Darmstadt, Alemania), diluido en 500 ml de agua destilada, más 0,005 g de rojo fenol y 0,2 ml de HCl al 97%, con pH de 7 y alicuotado en tubos Eppendorf de 1,5 ml (Zuluaga y Martínez 2018). Para la preparación del Agar Urea (prueba de oro), se diluyó 2 g de base Agar Urea (Urea Agar Base Christensen® para microbiología, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en 100 ml de agua destilada, y alicuotado en tubos Eppendorf de 1,5 ml (Zuluaga y Martínez 2018).

Ambos medios fueron transportados en condiciones de refrigeración y se estableció un periodo de reacción a temperatura ambiente de 48 horas, subdividido en tiempos de 6 a 12 horas (T1), 12 a 24 horas (T2), 24 a 48 horas y no reacción (NR); tiempos utilizados para la observación y el análisis colorimétrico (Zuluaga y Martínez 2018).

### Análisis histopatológico

Las muestras tomadas durante las gástroscopias fueron seleccionadas de acuerdo con el grado de ulceración ( $> 2^{\circ}$ ) según Andrews *et al.* (1999); se analizaron con técnicas convencionales y de rutina de inclusión en parafina, cortadas a 5  $\mu\text{m}$  y sometidas a las tinciones de H&E y Giemsa, para la descripción de hallazgos anormales del tejido e identificar la presencia de bacterias curvoespiraladas compatibles con *Helicobacter* spp., respectivamente.

### Análisis estadístico

La información obtenida fue recolectada y analizada usando los programas SPSS® y Microsoft Office Excel® (Microsoft Office 2013®, Microsoft Corporation, WA, USA), se implementó estadística descriptiva, análisis de frecuencia absoluta y relativa. Estos datos fueron representados en gráficos de distribución de barras.

## RESULTADOS

Los resultados de reacción de la PRU se muestran en la figura 1. El caldo urea presentó un mayor porcentaje de reacción de positividad (4,1%) al compararse con el medio Agar Urea. Por otro lado, el 9,27% de las muestras reaccionó en ambos medios.

Las reacciones de las muestras en los tiempos establecidos para ambos medios se presentan en la figura 2. En T1 y T2, el caldo urea mostró mayor reacción, mientras

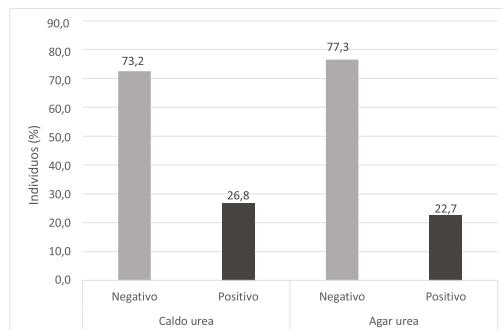
que el Agar Urea reveló mayor reacción en T3. Adicionalmente, ambos medios presentaron elevados porcentajes de NR.

Se analizó por histopatología 19/97 muestras de mucosa glandular gástrica, correspondientes a las de mayor grado de ulceración (3º y 4º). La tinción H&E reveló mucosa con erosión, hemorragia subepitelial, focos de ulceración y procesos inflamatorios crónicos (figura 3a) que se clasificaron como: gastritis crónica activa hemorrágica (33,4%) (figura 3b), gastritis crónica fibrosante (33,3%), gastritis crónica fibrosante y atrófica (16,5%), gastritis crónica activa (5,6%), gastritis crónica fibrosante y

proliferativa (5,6%) y gastritis crónica activa eosinofílica con parásitos intraleisionales (5,6%) (figuras 3c y 3d). Para la tinción Giemsa, ninguna de las muestras fue positiva a la presencia de bacterias curvoespiraladas compatibles con *Helicobacter* spp.

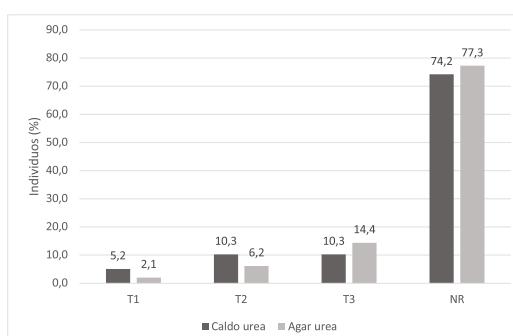
## DISCUSIÓN

El diagnóstico de *Helicobacter* spp. ha sido indicado cuando dos pruebas son positivas (Cardona *et al.* 2009b), esto para que haya una menor brecha entre falsos positivos y negativos. No obstante, este principio fue evidente en una proporción menor al 10%



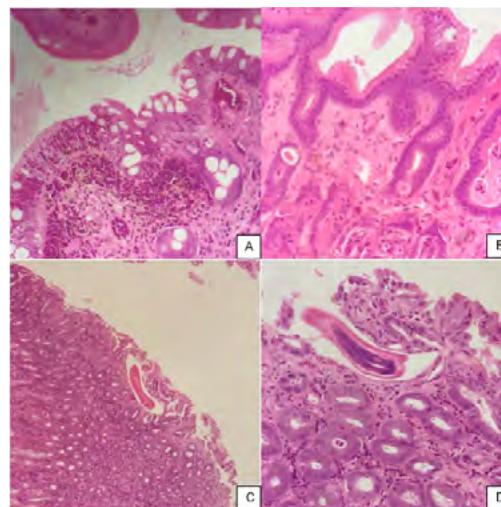
**FIGURA 1.** Resultados de reacción de la prueba rápida de la ureasa (PRU), utilizada para la determinación de *Helicobacter* spp. en muestras de mucosa gástrica glandular de mulares.

Fuente: Elaboración propia.



**FIGURA 2.** Distribución de las reacciones en los períodos de tiempo establecidos para la PRU, utilizada para la determinación de *Helicobacter* spp. en muestras de mucosa gástrica glandular de mulares.

Fuente: Elaboración propia.



**FIGURA 3.** Lesiones histopatológicas en la mucosa glandular gástrica de los mulares estudiados. Tinción Hematoxilina-Eosina (H&E). A. Mucosa con erosión, hemorragia subepitelial y focos de ulceración (20x). B. Gastritis crónica hemorrágica con depósitos de colágeno (10x). C. Gastritis crónica activa con parásitos intralesionales (4x). D. Forma parasitaria compatible con nematodo en mucosa gástrica (40x).

Fuente: Elaboración propia.

de las muestras de este estudio, cuando se presentó reactividad para ambas pruebas PRU. Sin embargo, este resultado no es concluyente, una vez que el caldo urea superó la reactividad del Agar Urea, considerada la prueba de oro para estos tipos de test, en los menores tiempos de reacción, mientras que el Agar Urea mostró mayor positividad en el periodo de tiempo más prolongado, hecho que afecta los aspectos de sensibilidad y especificidad de las PRU.

Las especies del género *Helicobacter* spp. exigen condiciones de incubación adecuadas que incluyen un medio microaerofílico y una temperatura entre 35°C y 37°C (López-Brea *et al.* 2004), lo cual no se logró cumplir en el presente trabajo, ya que las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente alrededor de los 21°C, lo que explica la amplitud de tiempo que se dio para el cambio de coloración,

situación que pone en duda su validez. Adicionalmente, se debe tener en cuenta que una baja población bacteriana puede inducir falsos negativos en la PRU, al no haber la suficiente producción de ureasa que induzca el cambio de coloración por parte del indicador de pH del medio.

El análisis histopatológico (H&E) de las muestras seleccionadas reportó en su totalidad gastritis crónica de varios tipos (hemorrágica, fibrosante, proliferativa y eosinofílica), en concordancia con los hallazgos gastroscópicos relacionados con SUGM y diferentes a las lesiones ulcerativas. Lo anterior reflejó la aplicación del criterio de inclusión, una vez que se analizaron muestras de mucosas con grados 3 y 4 de severidad, lo que también influyó en la ausencia de gastritis aguda. Sin embargo, la histopatología permitió clasificar los cuadros inflamatorios observados en la endoscopia.

En adición a los hallazgos histopatológicos descritos, se identificaron procesos inflamatorios crónicos, con presencia de parásitos intralesionales, acompañados de infiltrado eosinofílico, similar a lo reportado por Al-Mokaddem *et al.* (2014) en burros de Egipto. En equinos también se ha reportado infiltrados inflamatorios crónicos, pero sin presencia de formas parasitarias (Zuluaga *et al.* 2018), lo que podría indicar diferencias en la aplicación de estrategias antiparasitarias en los protocolos sanitarios de estas especies.

Las PRU (caldo y Agar Urea) no se asociaron con el análisis histopatológico con tinción Giemsa, al no reportar presencia de bacterias curvoespiraladas compatibles con *Helicobacter* spp., aunque algunos individuos mostraron reacciones positivas a las dos PRU. Lo anterior concuerda con estudios realizados en equinos, que las consideraron ambiguas y no encontraron asociación entre el *Helicobacter* spp. y el SUGE (Zuluaga y Martínez 2018). Adicionalmente, los resultados falsos positivos pueden obedecer a la presencia de otras bacterias productoras de ureasa (*Proteus mirribialis*, *Pseudomonas aureginosa*, *Klebsiella* spp., *Yersinia* spp.) sobre las superficies gástricas de equinos descritas previamente (Belli *et al.* 2003; Cardona *et al.* 2009a).

Sin embargo, es pertinente mencionar que, a pesar de la ausencia de bacterias curvoespiraladas por histopatología, se reportó gastritis crónica en la totalidad de muestras de las mulas; este mismo hallazgo se describió en estómagos de equinos de planta de beneficio, positivos a la actividad de la ureasa y con presencia de bacterias compatibles con *Helicobacter* spp. (Cardona *et al.* 2009a; Cardona *et al.* 2009b), varios aspectos hicieron diferencias en los resultados de esos estudios, como el uso de la tinción Whartin Starry reportada como más eficiente, el lugar de toma y el número de muestras,

siendo no representativa una sola muestra de toda la superficie gástrica; y el uso de la PRU en otras investigaciones ha mostrado positividad en ambas mucosas (escamosa y glandular) (Zuluaga y Martínez 2018).

Recientemente, la técnica de cromoendoscopia gástrica simple se implementó en un grupo de caballos, lo que reveló lesiones prematuras que no fueron identificadas con la endoscopia convencional (Mira *et al.* 2020). Al utilizar el rojo fenol como revelador en la cromoendoscopia, se demostró gastritis crónica como hallazgo histopatológico en los sitios de reacción; sin embargo, no se identificaron bacterias curvoespiraladas con tinción Giemsa. Por tanto, la cromoendoscopia es una técnica con potencial para orientar la identificación de bacterias ureasa positivas o de lesiones asociadas en la superficie gástrica de équidos, sin necesidad de obtener un número elevado de muestras para que sea representativo de la superficie gástrica.

Un limitante en este trabajo fue el uso de una sola muestra de mucosa glandular ulcerada, influyendo en el diagnóstico de helicobacteriosis el número de muestras tomadas, al igual que el aislamiento en ambas mucosas y que las úlceras no ofrecen condiciones favorables para la viabilidad del microorganismo (Contreras *et al.* 2007; Cardona *et al.* 2009b; Zuluaga y Martínez 2018; Zuluaga *et al.* 2021).

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo no se encontró asociación entre la presencia de helicobacteriosis y las lesiones gástricas, sin embargo, el uso de técnicas como la cromoendoscopia convencional y complementada por técnicas moleculares en superficie gástrica de mulas contribuiría a determinar o aclarar la participación o

presencia de *Helicobacter* spp. en el SUGM. Por tanto, en condiciones del presente trabajo y, teniendo en cuenta que solo se realizó histopatología en una muestra, no se puede descartar ni confirmar la participación de esta bacteria en SUGM, debido a las limitaciones de este estudio y por ser controversial aún en los equinos.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## FUENTES DE FINANCIACIÓN

Este trabajo fue financiado con recursos del CODI de la Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Antioquia, Centro de Investigación de la Facultad de Ciencias Agrarias (CIAG) y recursos de sostenibilidad del Grupo Centauro.

## REFERENCIAS

- Al-Mokaddem AK, Ahmed KA, Doghaim RE. 2014. Pathology of gastric lesions in donkeys: A preliminary study. Equine Vet J. 47(6): 684-688. <https://doi.org/10.1111/evj.12336>
- Andrews FM, Buchanan BR, Smith SH, Elliott SB, Saxton AM. 2006. In vitro effects of hydrochloric acid and various concentrations of acetic, propionic, butyric, or valeric acids on bioelectric properties of equine gastric squamous mucosa. Am J Vet Res. 67(11): 1873-1882. <https://doi.org/10.2460/ajvr.67.11.1873>
- Aranzales JRM, Cassou F, Andrade BSC, Alves GES. 2012. Presencia del síndrome de úlcera gástrica en equinos de la policía militar. Arch Med Vet. [online]. Vol. 44(2): 185-189. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2012000200013>
- Banse HE, Andrews FM. 2019. Equine glandular gastric disease: prevalence, impact and management strategies. Vet Med (Auckl). 10: 69. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S174427>
- Belli C, Fernandes W, Silva LCLC. 2003. Teste de urease positivo em equino adulto com úlcera gástrica-*Helicobacter* sp. Arq. Inst. Biol. São Paulo, 70: 17-20.
- Calixto LC. 2020. Caracterización del síndrome de úlcera gástrica en mulares (*Equus mulus*) de trabajo, del departamento de Antioquia, Colombia. Trabajo de grado, [Tesis de maestría]. [Medellín, Antioquia] Universidad de Antioquia.
- Campuzano G. 2007. An optimized 13C-urea breath test for the diagnosis of *H. pylori* infection. World J. Gastroenterol. 13(41): 5454-64. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i41.5454>
- Cardona J, Paredes E, Fernández H. 2009a. Caracterización histopatológica de gastritis asociada a la presencia de *Helicobacter* spp. en estómagos de caballos. Rev. MVZ Córdoba. 14(2): 1750-1755. <https://doi.org/10.21897/rmvz.359>
- Cardona J, Paredes E, Fernández H. 2009b2. Determinación de *Helicobacter* spp. en úlceras gástricas en caballos. Rev. MVZ Córdoba. 14(3): 1831-1839. <https://doi.org/10.21897/rmvz.343>
- Cardona J, Álvarez A, Paredes E. 2016. Ocurrencia de miasis cavitaria equina (*Gasterophilus* spp.). y su relación con las úlceras gástricas secundarias en la mucosa escamosa en Temuco, Chile. Ces. Med. Vet. Zootec. 11(1): 78-87. <http://dx.doi.org/10.21615/cesmvz.11.1.8>
- Contreras M, Morales A, García-Amado M, De Vera M, Bermúdez V, Gueneau P. 2007. Detection of Helicobacter like DNA in the gastric mucosa of thoroughbred horses. Lett. Appl. Microbiol. 45: 553-57. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02227.x>
- Gómez FA, Ruiz JD, Balvin DI. 2020. Evaluación de algunos factores de riesgo para la presentación de síndrome de úlceras gástricas (SUGE) en el Caballo Criollo Colombiano en el Valle de Aburrá, Antioquia (Colombia). Rev. Med. Vet. Zoot. 67(2): 123-135. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v67n2.90705>
- Henneke DR, Potter GD, Kreider JL, Yeates BF. 1983. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. Equine Vet J. 15(4): 371-2. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1983.tb01826.x>
- Jonsson H, Egenvall A. 2006. Prevalence of gastric ulceration in Swedish Standardbreds in race training. Equine Vet J. 38(3): 209-13. <https://doi.org/10.2746/042516406776866390>.
- López-Brea M, Alarcón T, Baquero M, Domingo D, Royo G. 2004. Diagnóstico de la infección

- por *Helicobacter pylori*. En: Cercenado E, Cantón R. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 17: 1-10.
- Martínez JR, Cándido BS, Silveira GE. 2015. Orally administered phenylbutazone causes oxidative stress in the equine gastric mucosa. *J Vet Pharmacol Ther.* 38(3): 257-64. <https://doi.org/10.1111/jvp.12168>
- Martínez JR, Silveira GE. 2014. Equine gastric ulcer syndrome: risk factors and therapeutic aspects. *Rev Colom Cienc Pecua.* 27(3): 157-169.
- Mira MA, Sánchez JL, Martínez JR. 2020. Evaluación por gastroscopia simple y cromoendoscopia convencional de la superficie gastroesofágica y duodenal proximal del equino. Estudio piloto. *Rev. Med. Vet. Zoot.* 67(2): 136-148. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v67n2.90709>
- Moyaert H, Decostere A, Vandamme P, Debruyne L, Mast J, Baele M, Ceelen L, Ducatelle R, Haesebrouck F. 2007. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57(2): 213-218. <https://doi.org/10.1099/ijss.0.6427>
- Murray MJ, Eichorn ES. 1996. Effects of intermittent feed deprivation, intermittent feed deprivation with ranitidine administration, and stall confinement with ad libitum access to hay on gastric ulceration in horses. *Am J Vet Res.* 57(11): 1599-603.
- Murray M J, Grodinsky C, Anderson CW, Radue PF, Schmidt GR. 1989. Gastric ulcers in horses: a comparison of endoscopic findings in horses with and without clinical signs. *Equine Vet J.* 21(S7): 68-72.
- Padalino B, Davis GL, Raidal SL. 2020. Effects of transportation on gastric pH and gastric ulceration in mares. *J Vet Intern Med.* 34(2): 922-932. <https://doi.org/10.1111/jvim.15698>
- Pedersen SK, Cribb AE, Read EK, French D, Banse HE. 2018. Phenylbutazone induces equine glandular gastric disease without decreasing prostaglandin E2 concentrations. *J Vet Pharmacol Ther.* 41(2): 239-245. <https://doi.org/10.1111/jvp.12464>
- Scarano GA, Correia-de-Medeiros A, Marques MS, Chimenos E, De Castro R, Perdomo M. 2005. Detección de *Helicobacter pylori* en placa dental y en mucosa gástrica de pacientes sometidos a endoscopia digestiva. *Acta odontol. Venez.* 43(2): 113-118
- Sykes BW, Hewetson M, Hepburn RJ, Luthersson N, Tamzali Y. 2015. European College of Equine Internal Medicine Consensus Statement-equine gastric ulcer syndrome in adult horses. *J Vet Intern Med.* 29(5): 1288-99. <https://doi.org/10.1111/jvim.13578>
- Vatistas NJ, Snyder JR, Carlson G, Johnson B, Arthur RM, Thurmond M, Zhou H, Lloyd K. 1999. Cross-sectional study of gastric ulcers of the squamous mucosa in Thoroughbred race-horses. *Equine Vet J Suppl.* (29): 34-9. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1997.tb01666.x>
- Zuluaga AM, Jaramillo MC, Martínez AJR. 2021. Presence of *Helicobacter* spp. in dental tartar and gastric mucosa, and its relationship with EGUS in horses from a public slaughterhouse. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.* (Manuscript accepted). <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v35n1a06>
- Zuluaga AM, Martínez JR. 2018. Diagnóstico de *Helicobacter* spp. en mucosa gástrica de equinos, mediante pruebas de actividad ureasa. *Rev Cient Fac Cien V.* 28(1): 19-24.
- Zuluaga AM, Ramírez NF, Martínez JR. 2018. Equine gastric ulcerative syndrome in Antioquia (Colombia): Frequency and risk factors. *Rev Colom Cienc Pecua.* 31(2): 139-149. <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v31n2a07>

### Forma de citación del artículo:

L. C. Calixto, J. R. Martínez. 2022. Determinación de *Helicobacter* spp. en mucosa gástrica glandular de mulas a través de la prueba de la actividad de la ureasa e histopatología. *Rev Med Vet Zoot.* 69(2): 121-128. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v69n2.103260>

## Prevalencia de *Dientamoeba fragilis* y otros protozoarios intestinales en porcinos de una granja en la región Andina de Colombia

K. J. Suárez<sup>1</sup>, M. J. García<sup>1</sup>, E. Y. Restrepo<sup>1</sup>, L. F. Campo<sup>1</sup>, A. L. Galván-Díaz<sup>2</sup>

Recibido: 08/09/2021. Aprobado: 22/11/2021

### RESUMEN

*Dientamoeba fragilis* es un protozoario que parasita el intestino grueso del hombre y animales domésticos. Hasta el momento, aún no son claros aspectos de su ciclo de vida, como el rango de hospedadores, reservorios, mecanismo de infección, entre otros. Se postula que el cerdo es un hospedador natural para este protozoario y que, debido a su cercanía con el humano, podría facilitar una transmisión zoonótica. En Colombia no existen a la fecha estudios sobre la presencia de *D. fragilis* en hospedadores animales, incluidos los cerdos, y los datos sobre la prevalencia de otros protozoarios intestinales en estos animales son escasos. El objetivo fue determinar la frecuencia de protozoarios intestinales, incluyendo *D. fragilis*, en cerdos de una granja tecnificada de una zona rural de Medellín (región Andina de Colombia). Se recolectaron muestras de materia fecal de 70 cerdos en etapa de preceba, que fueron evaluadas mediante examen directo, tinción tricrómica y Ziehl-Neelsen modificado. Se realizaron análisis univariados con medidas de frecuencia relativa y tendencia central y análisis bivariados para la exploración de factores de riesgo. Se detectó la presencia de *D. fragilis* en un 13% de las muestras y de otros parásitos como *Entamoeba* spp. (66%), *Blastocystis* spp. (64%), *Balantiooides coli* (36%), *Cryptosporidium* spp. (36%), *Iodamoeba butschlii* (17%), coccidias (4%) y *Giardia* spp. (1,4%). En este primer reporte de *D. fragilis* en cerdos en Colombia se observó la alta prevalencia de otros protozoarios patógenos, lo que corrobora el papel de los cerdos como importantes reservorios de infecciones humanas. Estudios sobre la presencia de este protozoario tanto en cerdos como en el personal encargado de su manejo contribuirían al conocimiento sobre su dinámica de transmisión.

**Palabras clave:** parásitos, zoonosis, *Dientamoeba*, animales domésticos, porcinos.

<sup>1</sup> Universidad de Antioquia. Escuela de Microbiología. Ciudad universitaria. Bloque 5 laboratorio 207. Calle 67 No. 53-108. Medellín. Colombia. Tel 0057 2198482.

<sup>2</sup> Universidad de Antioquia. Escuela de Microbiología. Grupo de Microbiología ambiental. Ciudad universitaria. Bloque 5 oficina 410. Calle 67 No. 53-108. Medellín. Colombia. Tel 0057 2195495.

\* Correspondencia: ana.galvan@udea.edu.co

## Prevalence of *Dientamoeba fragilis* and other intestinal protozoa from a swine farm at the Andean region of Colombia

### ABSTRACT

*Dientamoeba fragilis* is a protozoan that parasitizes the large intestine of humans and domestic animals. To date, some aspects regarding *D. fragilis* life cycle, including hosts, reservoirs, infection mechanism, among others, are not yet clear. Swine are considered natural hosts for this protozoan, therefore their close contact with humans promotes its zoonotic transmission. In Colombia there are no studies on the presence of *D. fragilis* in animal hosts, including pigs, and data about other intestinal protozoa are scarce. The objective was to determine the prevalence of intestinal protozoan, including *D. fragilis*, in pigs raised in a farm from a rural area of Medellin (Andean region of Colombia). Fecal samples from 70 pigs in prefattening stage were collected. Direct fecal smear examination, trichrome and modified Ziehl-Neelsen stain were used in the study. Univariate analysis (frequency distribution and central tendency measures) and bivariate analysis were used to explore risk factors. *Dientamoeba fragilis* was found in 13% of the evaluated fecal samples. Other parasites detected included: *Entamoeba* spp. (66%), *Blastocystis* spp. (64%), *Balantiooides coli* (36%), *Cryptosporidium* spp. (36%), *Iodamoeba butschlii* (17%), coccidias (4%), and *Giardia* spp. (1,4%). This is the first report of *D. fragilis* in swine in Colombia, and the high prevalence of other pathogen protozoa was also observed, which corroborates the role of pigs as important reservoirs for human infections. Studies focused on the evaluation of both swine and swine-exposed farm workers should be done in order to know the dynamics of transmission of this parasite.

**Keywords:** parasites, zoonoses, *Dientamoeba*, domestic animals, swine.

### INTRODUCCIÓN

*Dientamoeba fragilis* es un protozoario intestinal de distribución mundial y comúnmente identificado en el humano (Cacciò 2018; Stark *et al.* 2016). Se reportan prevalencias que varían entre 0,2% y 82%, con mayor frecuencia en países en desarrollo (Cacciò 2018). *Dientamoeba fragilis* fue descubierto en 1909 por Charles Wenyon, luego de examinar sus propias preparaciones de heces, pero solo hasta 1918, Jepps y Dobell realizaron su descripción morfológica, clasificándolo inicialmente como una ameba (Stark *et al.* 2016). Estudios posteriores tanto ultraestructurales, mediante microscopía electrónica, como inmunológicos y

filogenéticos acercaron a *Dientamoeba* a protozoarios flagelados del género *Histomonas* y *Trichomonas* (Stark *et al.* 2016). En la actualidad, *D. fragilis* se ubica taxonómicamente dentro del grupo Parabasalia (protozoarios flagelados sin mitocondrias, con hidrogenosomas y aparato parabasal), clase Tritrichomonadida, orden Trichomonadida (trofozoítos uninucleados o binucleados, con hasta 5 flagelos), familia Dientamoebidae (sin membrana ondulante y costa, ancestros con 4 flagelos), género *Dientamoeba*, y especie *fragilis* (Cepicka *et al.* 2010). La caracterización molecular de aislados humanos mediante el análisis del gen que codifica para la subunidad pequeña del

ARN ribosomal ha revelado la presencia de dos genotipos (1 y 2) de *D. fragilis*, en el que el genotipo 1 es el más frecuente en el ámbito mundial (Windsor *et al.* 2006).

*Dientamoeba fragilis* presenta un trofozoito pleomórfico, con un tamaño que oscila entre 4 a 20  $\mu\text{m}$  (con un rango promedio de 5 a 15  $\mu\text{m}$ ), generalmente binucleado, aunque en ocasiones puede presentar un solo núcleo, con un cariosoma que contiene entre 4 a 8 gránulos de cromatina y un flagelo intracitoplasmático (Stark *et al.* 2016). Aunque inicialmente muchos autores reportaron la ausencia del estadio de quiste en el ciclo de vida de *D. fragilis*, estudios recientes en un modelo animal murino describen la presencia de estos estadios parasitarios en la materia fecal de los animales infectados (Munasinghe *et al.* 2013). Otros investigadores han detectado estadios quísticos en muestras de humanos (Stark *et al.* 2014). Sin embargo, a pesar de estos hallazgos, la existencia de quistes en *D. fragilis* todavía es controversial.

El ciclo de vida de *D. fragilis* aún no se ha esclarecido, pues se desconocen aspectos relacionados con las rutas de transmisión, el rango de hospedadores naturales y el estadio parasitario infectante, entre otros (Barratt *et al.* 2011a). Se han postulado dos principales mecanismos de infección para este protozoario, sin embargo, no hay evidencias que soporten uno u otro (Barratt *et al.* 2011a; Stark *et al.* 2016). En el primero se considera la participación de un helminto (*Enterobius* o *Ascaris*) que actúa como vector de los trofozoítos de este parásito. El segundo implica la transmisión de *D. fragilis* a través de la ruta oro-fecal mediante el consumo de trofozoítos o quistes en agua o alimentos contaminados.

En cuanto a los hospedadores y posibles reservorios para *D. fragilis*, además de los

humanos, este parásito se ha identificado en otros animales que incluyen principalmente primates no humanos (gorilas, macacos, mandriles) y cerdos (Cacciò 2018). Los cerdos domésticos y salvajes (*Sus scrofa*) son susceptibles a una amplia gama de enfermedades infecciosas, incluidas las parasitarias (Solaymani-Mohammadi y Petri 2006), por lo que son considerados los reservorios más importantes de patógenos zoonóticos, debido al gran tamaño de su población a nivel mundial (más de mil millones), al contacto cercano con los humanos y al manejo inadecuado de sus heces fecales (Cacciò *et al.* 2012). Si bien la mayoría de animales domésticos no se infectan normalmente con *D. fragilis* (Roberts *et al.* 2012), los cerdos se consideran hospedadores naturales para este protozoario, y por tanto una importante fuente de infección (Cacciò *et al.* 2012).

Los estudios de prevalencia de *D. fragilis* en cerdos presentan resultados variables, desde su ausencia en porcinos en Australia (Chan *et al.* 2016), hasta datos entre un 43,8% (Crotti *et al.* 2007) a un 70% (Cacciò *et al.* 2012) en Italia. Adicionalmente, análisis moleculares han confirmado la circulación del genotipo 1 (predominante en humanos) en cerdos de diferentes granjas en Italia (Cacciò *et al.* 2012).

*Dientamoeba fragilis* es un parásito intestinal que se detecta con frecuencia en humanos que presentan una variedad de síntomas clínicos, que incluyen principalmente dolor abdominal y diarrea, aunque se describen otras manifestaciones como pérdida de peso, anorexia, flatulencia, fatiga, náuseas, vómito y prurito anal (Barratt *et al.* 2011b; Van Gestel *et al.* 2019). En adición, también se ha asociado con enfermedades inflamatorias intestinales, como el síndrome del intestino irritable,

una enfermedad cada vez más común que afecta la calidad de vida de las personas, y con alteraciones cutáneas como la urticaria. Sin embargo, este protozoario también se ha encontrado comúnmente en sujetos asintomáticos, por lo que su relevancia clínica aún es controversial (Wong *et al.* 2018; Van Gestel *et al.* 2019).

Teniendo en cuenta la escasez de datos con respecto a la frecuencia de *D. fragilis* a nivel mundial, y la importancia de los cerdos como posibles reservorios de parásitos potencialmente patógenos, el presente estudio tuvo como objetivo determinar la presencia de *D. fragilis* y otros protozoarios intestinales en una población porcina en fase preceba de una granja tecnificada del corregimiento de San Antonio de Prado mediante examen microscópico de muestras fecales procesadas por coprológico directo y tinciones especiales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal con muestreo por conveniencia en una granja de porcicultura tecnificada, la cual alberga aproximadamente 1.200 porcinos en diferentes etapas de crecimiento. El sitio de muestreo se ubica en el corregimiento de San Antonio de Prado, municipio de Medellín, departamento de Antioquia, Colombia, a 6°10'60" Norte y 75°40'0" Oeste, a 2.440 msnm. La temperatura ambiente promedio es de 15,8 °C, presenta una humedad relativa entre 80,62% y 88,43% y una precipitación promedio anual de 2.919 mm (Climate-data.org). Los animales estaban sometidos a los cambios de temperatura y humedad propios del clima (el control de estas variables se realiza por medios físicos como paredes de concreto). La granja cuenta con iluminación natural y alrededor no

existen fuentes importantes de ruido. En cuanto a la infraestructura, los corrales se dividen por paredes de concreto, puertas y ventanas de barrotes; el suelo presenta una división (media placa y medio concreto), al cual se le realiza diariamente lavado y desinfección (Polybiocidex NF, BioAra SA veterinaria). Cada corral dispone de varios bebederos y comederos y contiene aproximadamente 90 animales. Los cerdos de la granja se alimentan a base de concentrado, cada animal consume aproximadamente 200 kg de alimento desde el destete hasta la salida a sacrificio. El agua proviene de un nacimiento, es tratada con pastillas de cloro y está libre de aguas negras y heces humanas. Se calcula que cada cerdo bebe aproximadamente 2 litros de agua al día. Para el ingreso de personal a la granja, se exige baño previo, al igual que uso de overol y botas.

## Población y muestra

La población estuvo constituida por 1.200 cerdos de las razas Pietran y Camburok en etapa preceba de una granja de la vereda Las Playas del corregimiento de San Antonio de Prado, Medellín, distribuidos en 6 corrales según la edad (30 a 65 días de nacidos) y el género (proporción machos y hembras 50/50), con un peso que oscilaba entre 8 kg y 16 kg. Se realizó un muestreo por conveniencia, tomando muestras al azar de 10 a 13 cerdos por corral para un total de 70 cerdos. Lo anterior teniendo en cuenta el periodo destinado para la recolección de las muestras y la financiación del proyecto. Adicionalmente, se aplicó un cuestionario que incluía datos sobre la granja y los animales, datos de contacto del administrador, el veterinario responsable y el estado de salud de los cerdos. Las muestras fueron recolectadas entre mayo y junio de 2018.

## Comité de ética

El manejo de los animales y la obtención de las muestras se realizó según las disposiciones descritas en las leyes colombianas (decreto 2257 de 1986, artículo 49 y resolución 8430 de 1993). La investigación contó con el aval del Comité de Ética de la Sede de Investigación Universitaria (SIU), acta n.º 117 del 25 de abril de 2018.

## Recolección de la muestra

Se recolectaron 2 g de materia fecal de forma manual directamente del recto de los animales. Inmediatamente se realizó un extendido delgado en lámina portaobjetos (García *et al.* 2018), el cual se mantuvo en solución fijadora de Shaudin hasta su procesamiento por tinción tricrómica en el laboratorio. El resto de la muestra se depositó en frascos de plástico tapa rosca. Cada muestra fue marcada con la identificación del animal, la fecha y el número del corral. El resto del material recolectado se conservó en solución preservante de SAF (acetato de sodio, ácido acético y formaldehído) para mantener la morfología de los estadios parasitarios. Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia para su procesamiento por coprológico directo y tinción de Ziehl Neelsen modificado y tricrómica.

## Coprológico

Se realizó examen macroscópico y microscópico de las muestras de materia fecal de cada cerdo. Se evaluaron aspectos macroscópicos como color, consistencia, presencia de moco y sangre. Se realizó evaluación microscópica con objetivo de 10X y 40X de montajes en solución salina y lugol. El reporte de los resultados se efectuó de forma cualitativa, anotando la presencia de parásitos en la muestra.

## Tinción tricrómica

Se siguió el protocolo de tinción descrito por el fabricante del colorante tricrómico (Para-Pak® Trichrome Stain, Meridian Bioscience, Inc. Cincinnati, OH, USA) con algunas modificaciones. En breve: los extendidos fueron fijados en Shaudin de 18 a 24 horas. Cada una de las placas fue sumergida de manera consecutiva en frascos coplin que contenían los siguientes reactivos: alcohol yodado durante 10 minutos, alcohol al 70% por 4 minutos (2 veces), colorante tricrómico por 8 minutos, etanol ácido por 15 segundos (sin enjuagar), alcohol al 95% por 2 segundos, alcohol al 95% por 5 minutos (2 veces), alcohol absoluto por 3 minutos y finalmente en xilol por 3 minutos. Los extendidos se analizaron por microscopía óptica de luz con objetivo de 100X. Se evaluó la presencia de trofozoítos de *D. fragilis*.

## Tinción de Ziehl Neelsen modificado

Se siguió el protocolo de tinción descrito por Magi *et al.* (2006) con algunas modificaciones. En breve: el extendido de materia fecal se fijó durante 5 minutos en metanol absoluto. Luego se sumergió por 20 minutos en fucsina fenicada, se realizó lavado y se continuó con el paso de decoloración en ácido sulfúrico al 7% durante 30 segundos. Posteriormente, se colorearon las placas con azul de metileno (colorante de contraste) durante 3 minutos y se realizaron lavados con agua. Se evaluó la presencia de coccidias y *Cryptosporidium* spp. mediante análisis microscópico con objetivo de 100X. El reporte de los resultados se efectuó de forma cualitativa, registrando la presencia de parásitos en cada muestra.

## Ánalisis estadístico

Los datos obtenidos en el cuestionario y los resultados de las diferentes técnicas de

laboratorio se ingresaron en una base de datos en SPSS, a partir de la cual se calculó la frecuencia para cada uno de los parásitos. Además, se aplicaron pruebas como Chi Cuadrado y la prueba U de Mann-Whitney con un nivel de confianza del 95% para la asociación de *D. fragilis* con los demás parásitos encontrados y variables como la edad, el sexo y la presencia de diarrea.

## RESULTADOS

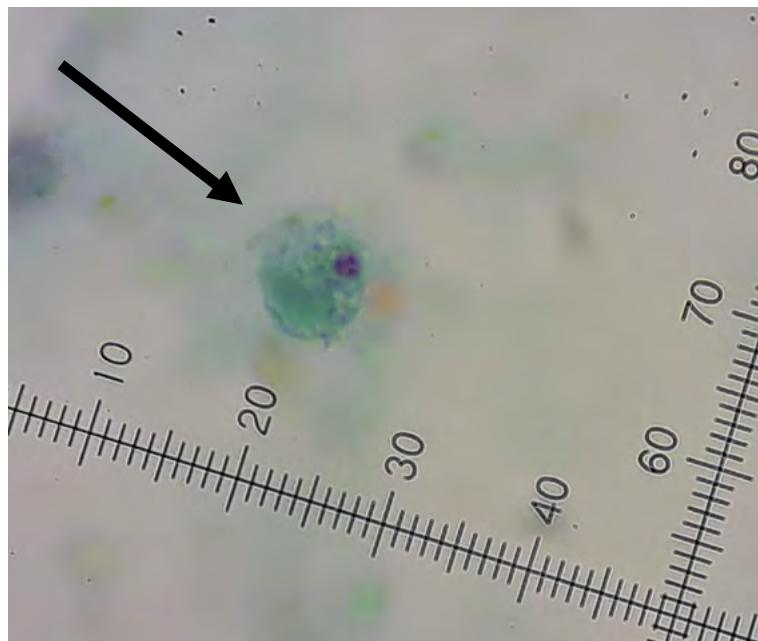
Se realizó un estudio descriptivo en el que se evaluaron muestras de materia fecal de cerdos en etapa preceba en una granja del corregimiento de San Antonio de Prado, Medellín, entre abril y octubre de 2018. Los cerdos estaban distribuidos en corrales de acuerdo con la edad y el sexo (tabla 1). Del total de muestras evaluadas, nueve (13%) tenían consistencia diarreica, las cuales provenían de cerdos de tres corrales (5, 6 y 8), siendo más frecuente esta característica en los animales del corral 6 (4 muestras), donde se albergaban solo hembras.

Mediante tinción tricrómica, se detectó la presencia de trofozoítos de *D. fragilis* en 9 de las 70 muestras evaluadas, con una prevalencia para este parásito del 13%. En la figura 1, se observa un trofozoito de *D. fragilis* encontrado en una de las muestras positivas para este protozoario. Este parásito se encontró en al menos un animal de los corrales que se eligieron para el estudio, independientemente del sexo y la edad. No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre *D. fragilis* y el resto de los parásitos observados, tampoco con variables como el sexo y la edad de los animales, ni con la presencia de diarrea ( $p > 0,05$ ). En 69 de las 70 muestras evaluadas (98%) se encontró al menos un parásito, con frecuencias variables, entre las cuales las más altas correspondieron a *Entamoeba* spp. (66%); *Blastocystis* spp. (64%), *Balantiooides coli* (36%) y *Cryptosporidium* spp. (36%) (tabla 2). No se observaron helmintos en las muestras analizadas.

**TABLA 1.** Población de estudio. Cerdos en fase preceba de una granja de la vereda Las Playas del corregimiento de San Antonio de Prado (Medellín)

Número de corral	Número de animales evaluados/número de animales por corral	Género	Edad promedio /días	Rango de peso / kg
5	10/78	Machos	65	14-16
6	10/72	Hembras	65	14-16
7	13/136	Machos	58	10-12
8	12/136	Hembras	58	10-12
9	13/62	Machos	30	8-10
10	12/53	Hembras	30	8-10

Fuente: Elaboración propia.



**FIGURA 1.** Trofozoítos de *Dientamoeba fragilis* en materia fecal de porcinos. Tinción tricrómica. Objetivo 100X.

Fuente: Grupo de Microbiología ambiental, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia.

**TABLA 2.** Prevalencia de *Dientamoeba fragilis* y otros protozoarios intestinales en cerdos en fase de preceba de una granja del corregimiento de San Antonio de Prado (Medellín)

Parásito	Número total de animales positivos	Prevalencia (%)
<i>Entamoeba</i> spp.	46	66
<i>Blastocystis</i> spp.	45	64
<i>Balantidium coli</i>	25	36
<i>Cryptosporidium</i> spp.	25	36
<i>Lodamoeba butschlii</i>	12	17
<i>Dientamoeba fragilis</i>	9	13
Coccidias	3	4
<i>Giardia</i> spp.	1	1,4

Fuente: Elaboración propia.

En 8 de las 9 muestras positivas para *D. fragilis* se encontraron otros parásitos intestinales (tabla 3), que incluyeron co-mensales como *Entamoeba* spp. y *Endolimax nana* y patógenos como *Balantiooides coli*, *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis* spp. La coinfección más frecuente fue la de este último parásito.

## DISCUSIÓN

Los animales son considerados hospedadores de una gran variedad de parásitos intestinales, lo que facilita su transmisión a los humanos, siendo los cerdos uno de los más importantes reservorios para agentes infecciosos de origen parasitario (Solaymani-Mohammadi y Petri 2006). Factores como el hacinamiento, la inmadurez inmunológica, el estrés y las condiciones sanitarias de manejo favorecen la infección de estos animales (Solaymani-Mohammadi y Petri 2006). Adicionalmente, el continuo crecimiento en el número y la distribución geográfica

de porcinos aumenta la probabilidad de exposición directa o indirecta de las personas a los parásitos que los infectan (VanderWaal y Deen 2018).

*Dientamoeba fragilis* es un protozoario intestinal que infecta con gran frecuencia humanos y del que se desconocen varios aspectos biológicos y epidemiológicos, como hospedadores naturales y reservorios (Barratt *et al.* 2011a). Hasta el momento, son escasos los datos que soportan la existencia de hospedadores diferentes al hombre y que sugieran un potencial zoonótico para este protozoario. En la literatura científica hay pocas investigaciones enfocadas en la búsqueda de *D. fragilis* en animales, incluyendo porcinos (Cacciò *et al.* 2012; Crotti *et al.* 2007; Stark *et al.* 2008), por lo que los datos de prevalencia obtenidos en este estudio son los primeros de su tipo en Colombia. En Australia, se evaluó la presencia del parásito en muestras de materia fecal de gorilas, aves, cerdos y una variedad de mamíferos tanto silvestres como domésticos (Stark *et al.* 2008). Los

**TABLA 3.** Prevalencia de coinfecciones entre *Dientamoeba fragilis* y otros parásitos intestinales en los cerdos evaluados en el estudio

Coinfecciones	n.º (%)
<i>D. fragilis</i> + <i>Entamoeba</i> spp. + <i>Endolimax nana</i> + <i>Blastocystis</i> spp. + <i>Cryptosporidium</i> spp.	1 (11,1%)
<i>D. fragilis</i> + <i>Entamoeba</i> spp. + <i>Blastocystis</i> spp. + <i>Cryptosporidium</i> spp.	1 (11,1%)
<i>D. fragilis</i> + <i>Entamoeba</i> spp. + <i>Blastocystis</i> spp. + <i>Balantiooides coli</i>	1 (11,1%)
<i>D. fragilis</i> + <i>Blastocystis</i> spp.	2 (22,2%)
<i>D. fragilis</i> + <i>Blastocystis</i> spp. + <i>Giardia</i> spp.	1 (11,1%)
<i>D. fragilis</i> + <i>Balantiooides coli</i>	1 (11,1%)
<i>D. fragilis</i> + <i>Cryptosporidium</i> spp.	1 (11,1%)

Fuente: Elaboración propia.

autores solo encontraron *D. fragilis* en las muestras procedentes de gorilas, lo que sugiere un rango estrecho de hospedadores para este protozoario. Sin embargo, las limitaciones del estudio, como el número reducido de muestras y el procesamiento mediante PCR de muestras fijadas con SAF, pudieron haber influido en la ausencia de muestras positivas procedentes de los otros animales evaluados en dicho trabajo. Por el contrario, dos investigaciones realizadas en población porcina en Italia reportaron prevalencias de *D. fragilis* del 43,8% (Crotti *et al.* 2007) y 70% (Cacciò *et al.* 2012) mediante análisis microscópico y PCR, respectivamente. En el presente estudio, se obtuvo una frecuencia de *D. fragilis* del 13%. La variabilidad observada en los datos reportados hasta el momento puede deberse a las diferencias en sensibilidad y especificidad de las técnicas utilizadas en cada investigación; las condiciones y la tecnología de manejo de los animales en las granjas evaluadas y el tamaño de la muestra, entre otros. En adición, en el presente estudio no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la presencia de *D. fragilis* y variables como la edad y el sexo de los cerdos evaluados y la presencia de otros parásitos; sin embargo, en la mayoría de las muestras (8 de las 9 positivas), se encontró coinfección con otros parásitos intestinales tanto comensales como patógenos. Crotti *et al.* (2007) hallaron una asociación entre *D. fragilis* y la edad de los cerdos evaluados y coinfecciones frecuentes con protozoarios comensales como *Iodamoeba bustschlii* y *Endolimax nana*. En otro estudio, estos mismos autores describieron la presencia de coinfecciones frecuentes entre *D. fragilis* y *Blastocystis* spp., *Balantiooides coli* y *Endolimax nana* (Crotti *et al.* 2011).

En el presente estudio, de los porcinos positivos para *D. fragilis* solo uno presentó síntomas intestinales, específicamente diarrea. Es probable que el comportamiento de esta parasitosis en cerdos sea similar a la descrita en humanos, en quienes la infección, aunque suele ser sobre todo asintomática (Cacciò 2018), también se ha asociado con una variedad de síntomas tanto intestinales como extraintestinales, lo que incluso sugiere su relación con enfermedades intestinales inflamatorias (Aykur *et al.* 2020), que pueden ser debilitantes y en algunos casos producir complicaciones que ponen en riesgo la vida. En otras investigaciones no se han descrito síntomas en los animales infectados con *D. fragilis*, y no se conocen hasta el momento los efectos negativos sobre la población porcina.

Además de *D. fragilis*, se detectó un alto porcentaje de protistas intestinales en los porcinos evaluados, siendo los más frecuentes *Entamoeba* spp., *Blastocystis* spp., *Balantiooides coli* y *Cryptosporidium* spp. Varias especies del género *Entamoeba* pueden infectar un amplio rango de vertebrados, incluidos humanos y cerdos (Li *et al.* 2018). *Entamoeba suis* y *Entamoeba polecki* se han identificado como las principales especies asociadas a infección en porcinos (Hirashima *et al.* 2017; Li *et al.* 2018). Sin embargo, algunos autores postulan que estos animales también pueden actuar como potenciales reservorios para *Entamoeba histolytica* (Schuster y Visvesvara 2004), única ameba considerada como patógena para humanos hasta el momento. *Entamoeba suis* puede causar colitis hemorrágica a través de la invasión de la lámina propia y *E. polecki* se ha asociado con enteritis proliferativa porcina, por lo que ambas especies se han asociado con infecciones sintomáticas

en porcinos (Li *et al.* 2018). Teniendo en cuenta que en el presente estudio la detección de estos protozoarios se realizó mediante examen microscópico, y que las diferentes especies del género presentan características morfológicas similares, no fue posible definir las especies circulantes en la población porcina evaluada. Aunque se confirmó la alta frecuencia de *Entamoeba* spp. en cerdos, la aplicación de estudios moleculares mediante marcadores genéticos que incluyen el gen que codifica para la subunidad pequeña del ARN ribosomal (18S) y sus regiones interespaciadoras (ITS) permitiría establecer la prevalencia de amebas patógenas para los cerdos y su potencial de transmisión zoonótica (Ji *et al.* 2019). Otros estudios en Colombia han reportado la presencia de *Entamoeba coli* en cerdos de traspatio criados en el área metropolitana de Bucaramanga (Pinilla *et al.* 2020; Pinilla *et al.* 2021).

El segundo parásito más frecuente en los porcinos evaluados fue el cromista *Blastocystis* spp., el cual se ha descrito al infectar el tracto gastrointestinal de humanos, primates no humanos, cerdos, bovinos, aves, anfibios y, menos frecuentemente, roedores, reptiles e insectos (Stensvold y Clark 2016). Lo anterior indica la baja especificidad de hospedadores que presenta este protista, y por tanto su gran potencial zoonótico. Similar a lo descrito para *D. fragilis*, la patogenicidad de este parásito aún es controversial, pues se describen cohortes de humanos infectados tanto sintomáticos como asintomáticos (Wawrzyniak *et al.* 2013). *Blastocystis* spp. se ha reportado como un parásito intestinal frecuente en cerdos en diferentes regiones geográficas en el mundo (Fayer *et al.* 2014; Paik *et al.* 2019; Song *et al.* 2017; Süli *et al.* 2018; Thathaisong *et al.* 2003), lo cual sugiere un importante papel de estos animales como

reservorio para el parásito. Sin embargo, aún no es claro si el contacto estrecho entre cerdos y humanos representa un riesgo de transmisión. En Colombia, dos estudios realizados en población porcina de Cundinamarca encontraron prevalencias de *Blastocystis* spp. del 3% (Mendoza-Gómez *et al.* 2015) y 37,5% (Pulido Villamarín *et al.* 2013). En este estudio se obtuvo una prevalencia para *Blastocystis* del 86%, lo que sugiere la importancia de los cerdos como posibles fuentes de infección para este parásito.

Con respecto a *B. coli*, este es el único ciliado que infecta a los humanos, y para el cual se han descrito como principales reservorios los cerdos y primates no humanos (Schuster y Ramírez-Ávila 2008). En los hospedadores infectados, causa diversas manifestaciones gastrointestinales, entre las que se destaca la diarrea con moco y sangre (Barbosa *et al.* 2015). Sin embargo, la mayoría de las infecciones por *B. coli* en cerdos son subclínicas y generalmente se limitan a la luz intestinal. Este parásito se ha encontrado con prevalencias que varían entre 40,5% y 42% en población porcina de granjas tecnificadas en Cundinamarca, Colombia (Mendoza-Gómez *et al.* 2015; Pulido Villamarín *et al.* 2013), valor cercano al encontrado en este estudio, en el que se obtuvo una prevalencia del 36%; mientras que en cerdos de traspatio en el área metropolitana de Bucaramanga se reportó una del 52,7% (Pinilla *et al.* 2020; Pinilla *et al.* 2021).

En cuanto a *Cryptosporidium* spp., hasta el momento seis especies se han asociado a infección en cerdos, (*C. suis*, *C. scrofarum*, *C. parvum*, *C. muris*, *C. tyzzeri* y *C. andersoni*), con *C. suis* y *C. scrofarum* como las más frecuentes en esta población animal (Wang *et al.* 2018). Aunque la criptosporidiosis en porcinos

suele ser asintomática, incluso en animales jóvenes, tanto *C. suis* como *C. scrofarum* se han descrito como causantes de infección en humanos, por lo que se consideran potencialmente zoonóticas y pueden representar un problema grave de salud pública (Wang *et al.* 2018). Una limitante de este estudio fue la detección del parásito mediante examen microscópico de muestras procesadas por tinción, técnica que no permite la identificación de especies y, por tanto, la confirmación de los cerdos como reservorios para la transmisión de especies de *Cryptosporidium* infectantes para humanos en el área analizada. En Colombia, Mendoza-Gómez *et al.* (2015) encontraron una prevalencia de *Cryptosporidium* spp. del 5% en porcinos de granjas semitecnificadas de Cundinamarca y Pinilla *et al.* (2020) reportaron una prevalencia del 5,7% en cerdos de traspasio criados en el área metropolitana de Bucaramanga, datos menores a los obtenidos en este estudio, en el que el 36% de los cerdos fueron positivos para este apicomplexa. Teniendo en cuenta la alta resistencia que presenta *Cryptosporidium* a los métodos de desinfección comúnmente utilizados en el tratamiento del agua, incluyendo el cloro, es posible que la alta frecuencia de este parásito se relacione con el uso de agua no potable en la granja evaluada. Hasta la fecha, no se conocen otros estudios de *Cryptosporidium* en cerdos en Colombia. Los datos de prevalencia en el ámbito mundial son variables, con un rango entre 1,4% y 89% (Wang *et al.* 2018). Las discrepancias en los reportes probablemente se deban a las diferencias en la edad de los animales, los métodos de detección y los entornos ecológicos.

El alto porcentaje de cerdos parasitados por una variedad de protozoarios intestinales en la granja estudiada indica

la exposición de los animales a fuentes de infección que facilitan dicha transmisión, por lo que su identificación es esencial para establecer las medidas apropiadas de control y prevención. Teniendo en cuenta que el agua es una de las principales fuentes de infección para los parásitos, se debe hacer un control adecuado tanto fisicoquímico como microbiológico de esta por lo menos una vez al año para garantizar su calidad. Otras medidas importantes incluyen un correcto manejo de la higiene de las instalaciones, con protocolos de drenaje, desinfección y eliminación de las heces de los cerdos, disminuyendo la exposición a patógenos y el desarrollo de enfermedades; y extremar las medidas de control para el ingreso y salida de animales, personas y vehículos desde y hacia la granja. Adicionalmente, se debe establecer un protocolo de manejo ambiental de los desechos de los animales, los cuales también pueden ser una fuente de infección de parásitos para los humanos.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian el posible papel de los cerdos como reservorios de parásitos intestinales potencialmente patógenos para el hombre. Se requiere la realización de estudios moleculares que permitan la identificación de las especies de parásitos que circulan en estos animales y que representen un peligro de salud pública para el hombre, y de esta manera establecer las adecuadas medidas de prevención y control. Este es el primer reporte de *D. fragilis* en porcinos en Colombia y uno de los pocos a nivel mundial. Nuevas investigaciones enfocadas en la evaluación de los genotipos de *D. fragilis* circulantes tanto en cerdos como en los trabajadores de granjas porcinas

permitirán establecer el papel de estos animales en la transmisión de este protozoario a los humanos, para esclarecer a su vez aspectos del ciclo de vida.

## AGRADECIMIENTOS

A la granja porcina del corregimiento de San Antonio de Prado, por facilitar sus instalaciones para el estudio.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos que no tenemos conflicto de intereses en el marco de la investigación que condujo a la producción de este manuscrito sometido.

## FUENTES DE FINANCIACIÓN

Para este trabajo no se recibió apoyo financiero de ninguna entidad.

## REFERENCIAS

- Aykur M, Armagan G, Vardar R, Dagci H. 2020. Fecal calprotectin as a factor that supports the pathogenicity of *Dientamoeba fragilis*. *Microb Pathog.* 139: 103-868. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103868>
- Barbosa A da S, Pereira Bastos OM, Uchôa CMA, Pissinatti A, Filho PRF, Dib LV, Azevedo EP, De Siqueira MP, Cardozo ML, Amendoeira MRR. 2015. Isolation and maintenance of *Balantidium coli* (Malmstein, 1857) cultured from fecal samples of pigs and non-human primates. *Vet Parasitol.* 210(3-4): 240-245. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.03.030>
- Barratt JN, Harkness J, Marriott D, Ellis JT, Stark D. 2011a. The ambiguous life of *Dientamoeba fragilis*: the need to investigate current hypotheses on transmission. *Parasitology.* 138(5): 557-572. <https://doi.org/10.1017/S0031182010001733>
- Barratt JN, Harkness J, Marriott D, Ellis JT, Stark D. 2011b. A review of *Dientamoeba fragilis* carriage in humans: Several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness. *Gut Microbes.* 2(1): 3-12. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.1.14755>
- Cacciò SM. 2018. Molecular epidemiology of *Dientamoeba fragilis*. *Acta Trop.* 184: 73-77. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.06.029>
- Cacciò SM, Sannella AR, Manuelli E, Tosini F, Sensi M, Crotti D, Pozio E. 2012. Pigs as natural hosts of *Dientamoeba fragilis* genotypes found in humans. *Emerg Infect Dis.* 18(5): 838-841. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1805.111093>
- Cepicka I, Hampl V, Kulda J. 2010. Critical taxonomic revision of parabasalids with description of one new genus and three new species. *Protist.* 161(3): 400-433. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2009.11.005>
- Chan D, Barratt J, Roberts T, Phillips O, Šlapeta J, Ryan U, Marriott D, Harkness J, Ellis J, Stark D. 2016. Detection of *Dientamoeba fragilis* in animal faeces using species specific real time PCR assay. *Vet Parasitol.* 227: 42-47. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.025>
- Crotti D, Sensi M, Crotti S, Grelloni V, Manuelli E. 2007. *Dientamoeba fragilis* in swine population: A preliminary investigation. *Vet Parasitol.* 145(3-4): 349-351. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.01.006>
- Crotti D, Sensi M, Salamida S, Crotti S, Manuelli E. 2011. Could be the swine responsible of transmission to the humans of *Dientamoeba fragilis* infection? *Microbiol Medica.* 26(1). <https://doi.org/10.4081/mm.2011.2389>
- Fayer R, Elsasser T, Gould R, Solano G, Urban J, Santini M. 2014. *Blastocystis* tropism in the pig intestine. *Parasitol Res.* 113(4): 1465-1472. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3787-y>
- Garcia LS, Arrowood M, Kokoskin E, Paltridge GP, Pillai DR, Procop GW, Ryan N, Shimizu RY, Visvesvara G. 2018. Practical guidance for clinical microbiology laboratories: laboratory diagnosis of parasites from the gastrointestinal tract. *Clin Microbiol Rev.* 31(1). <https://doi.org/10.1128/CMR.00025-17>
- Hirashima Y, Manchanayake T, Yano T, Kitahara S, Koreeda T, Kamimura S, Sasai K, Matsubayashi M, Shibahara T. 2017. Development of molecular diagnostic protocols for detecting three types of *Entamoeba* from diarrheal and

- asymptomatic pigs and environmental moist soils. *Parasitol Res.* 116(7): 2001-2007. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5483-1>
- Ji T, Cao H-X, Wu R, Cui L-L, Su G-M, Niu C, Zhang N, Wang S-K, Zhou D-H. 2019. Prevalence and genetic identification of three *Entamoeba* species in pigs in Southeastern China. *Biomed Res Int.* 2019: 1-8. <https://doi.org/10.1155/2019/2824017>
- Li W-C, Geng J, Chen C, Qian L, Zhang T, Liu J, Luo J, Gu Y. 2018. First report on the occurrence of intestinal *Entamoeba* spp. in pigs in China. *Acta Trop.* 185: 385-390. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.06.020>
- Magi B, Canocchi V, Tordini G, Cellesi C, Barberi A. 2006. *Cryptosporidium* infection: Diagnostic techniques. *Parasitol Res.* 98(2): 150-152. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-0050-6>
- Mendoza-Gómez MF, Pulido-Villamarín A, Barbosa-Buitrago A, Aranda-Silva M. 2015. Presence of gastrointestinal parasites in swine and human of four swine production farms in Cundinamarca, Colombia. *Rev MVZ Córdoba.* 20(1): 5014-5027. <https://doi.org/10.21897/rmvz.15>.
- Munasinghe VS, Vella NGF, Ellis JT, Windsor PA, Stark D. 2013. Cyst formation and faecal-oral transmission of *Dientamoeba fragilis*—the missing link in the life cycle of an emerging pathogen. *Int J Parasitol.* 43(11): 879-883. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.003>.
- Paik S, Jung BY, Lee H, Hwang MH, Han JE, Rhee MH, Kim TH, Kwon OD, Kwak D. 2019. Molecular detection and subtyping of *Blastocystis* in Korean pigs. *Korean J Parasitol.* 57(5): 525-529. <https://doi.org/10.3347/kjp.2019.57.5.525>.
- Pinilla JC, Morales E, Delgado NU, Flórez AA. 2020. Prevalence and risk factors of gastrointestinal parasites in backyard pigs reared in the Bucaramanga Metropolitan Area, Colombia. *Rev Bras Parasitol Veterinária.* 29(4): e015320. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612020094>.
- Pinilla JC, Morales E, Flórez Muñoz AA. 2021. A survey for potentially zoonotic parasites in backyard pigs in the Bucaramanga metropolitan area, Northeast Colombia. *Vet World.* 14(2): 372-379. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.372-379>.
- Pulido Villamarín A, Barbosa Buitrago A, Hernández Gallo N, Mendoza Gomez M, Ortiz Rincón I, García Fonseca S. 2013. Potencial zoonotic parasites found in six swine farms of Cundinamarca, Colombia. *Neotrop Helminthol.* 7(1): 51-63. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4435967>
- Roberts T, Marriott D, Harkness J, Stark D, Ellis JT. 2012. Detection and transmission of *Dientamoeba fragilis* from environmental and household samples. *Am J Trop Med Hyg.* 86(2): 233-236. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0526>.
- Schuster FL, Ramírez-Ávila L. 2008. Current World Status of *Balantidium coli*. *Clin Microbiol Rev.* 21(4): 626-638. <https://doi.org/10.1128/CMR.00021-08>.
- Schuster FL, Visvesvara GS. 2004. Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Vet Parasitol.* 126(1-2): 91-120. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.019>.
- Solaymani-Mohammadi S, Petri WA. 2006. Zoonotic implications of the swine-transmitted protozoal infections. *Vet Parasitol.* 140(3-4): 189-203. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.05.012>.
- Song JK, Hu RS, Fan XC, Wang SS, Zhang HJ, Zhao GH. 2017. Molecular characterization of *Blastocystis* from pigs in Shaanxi province of China. *Acta Trop.* 173: 130-135. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.06.014>.
- Stark D, Barratt J, Chan D, Ellis JT. 2016. *Dientamoeba fragilis*, the Neglected Trichomonad of the Human Bowel. *Clin Microbiol Rev.* 29(3): 553-580. <https://doi.org/10.1128/CMR.00076-15>.
- Stark D, Garcia LS, Barratt JLN, Phillips O, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis JT. 2014. Description of *Dientamoeba fragilis* cyst and precystic forms from human samples. *J Clin Microbiol.* 52(7): 2680-2683. <https://doi.org/10.1128/JCM.00813-14>.
- Stark D, Phillips O, Peckett D, Munro U, Marriott D, Harkness J, Ellis J. 2008. Gorillas are a host for *Dientamoeba fragilis*: An update on the life cycle and host distribution. *Vet Parasitol.* 151(1): 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.10.002>.

- Stensvold CR, Clark CG. 2016. Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitol Int.* 65(6): 763-771. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.015>.
- Süli T, Kozoderović G, Potkonjak A, Simin S, Simin V, Lalošević V. 2018. Comparison of conventional and molecular diagnostic techniques for detection of *Blastocystis* sp. in pig faeces. *Iran J Parasitol.* 13(4): 594-601. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6348225/pdf/IJPA-13-594.pdf>
- Thathaisong U, Worapong J, Mungthin M, Tan-Ariya P, Viputtigul K, Sudatis A, Noonai A, Leelayoova S. 2003. *Blastocystis* isolates from a pig and a horse are closely related to *Blastocystis hominis*. *J Clin Microbiol.* 41(3): 967-975. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.967-975.2003>.
- VanderWaal K, Deen J. 2018. Global trends in infectious diseases of swine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 115(45): 11495-11500. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806068115>.
- Van Gestel RS, Kusters JG, Monkelbaan JF. 2019. A clinical guideline on *Dientamoeba fragilis* infections. *Parasitology.* 146(9): 1131-1139. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001385>
- Wang H, Zhang Y, Wu Y, Li J, Qi M, Li T, Wang J, Wang R, Zhang S, Jian F et al. 2018. Occurrence, molecular characterization, and assessment of zoonotic risk of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* in pigs in Henan, Central China. *J Eukaryot Microbiol.* 65(6): 893-901. <https://doi.org/10.1111/jeu.12634>.
- Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, Dionigia M, Texier C, Delbac F, Alaoui H El. 2013. *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther Adv Infect Dis.* 1(5): 167-178. <https://doi.org/10.1177/2049936113504754>.
- Windsor JJ, Macfarlane L, Clark CG. 2006. Internal transcribed spacer dimorphism and diversity in *Dientamoeba fragilis*. *J Eukaryot Microbiol.* 53(3): 188-192. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2006.00092.x>.
- Wong ZW, Faulder K, Robinson JL. 2018. Does *Dientamoeba fragilis* cause diarrhea? A systematic review. *Parasitol Res.* 117(4): 971-980. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5771-4>.

### Forma de citación del artículo:

K. J. Suárez, M. J. García, E. Y. Restrepo, L. F. Campo, A. L. Galván-Díaz. 2022. Prevalencia de *Dientamoeba fragilis* y otros protozoarios intestinales en porcinos de una granja en la región Andina de Colombia. *Rev Med Vet Zoot.* 69(2): 129-142. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v69n2.103263>