

SERODIAGNOSTICO Y EPIDEMIOLOGIA DE LA ESTEFANURIASIS PORCINA*

Rocío M. Altuzarra B.**

Jimmy J. Vargas D.**

Luis C. Villamil J.***

Gloria Ramírez N.***

Víctor Vera A.***

RESUMEN

Con el objeto de contribuir en el diagnóstico de la estefanuriasis porcina, se realizó un estudio serológico, utilizando 30 sueros de animales infestados con *Stephanurus dentatus* a nivel renal y 30 sueros de animales libres de la enfermedad. Los sueros fueron enfrentados mediante las pruebas de doble inmunodifusión en agar (DD) y hemaglutinación pasiva (HAP) a un antígeno somático (S) y mediante DD a un antígeno metabólico (M); se encontró que la prueba más sensible fue la hemaglutinación pasiva con el antígeno somático (HAPS) y la más específica fue la doble inmunodifusión en agar con el antígeno somático (DDS).

Adicionalmente en el frigorífico Guadalupe ubicado en Santafé de Bogotá se efectuó una aproximación epidemiológica sobre la estefanuriasis porcina, determinando la frecuencia de presentación de la enfermedad en dicha planta de sacrificio y ubicando los municipios colombianos que enviaron cerdos infestados por *Stephanurus dentatus* a nivel renal, durante los meses de marzo, abril y mayo de 1995.

INTRODUCCION

La estefanuriasis es un padecimiento de los porcinos causado por el *Stephanurus dentatus* (parásito del riñón del cerdo) nemátodo que cumple un ciclo de vida complejo (Figura 1), afectando durante su migración órganos tales como hígado, ganglios linfáticos mesentéricos, cavidad perito-

neal, músculos sublumbar, mesenterio sublumbar, pulmones, bazo, páncreas, canal espinal, diafragma y cavidad pleural produciendo alteraciones en la forma, tamaño, y color de los órganos y causando reacciones de tipo granulomatoso con abundante exudado y presencia de leucocitos. En la fase final de la infestación el parásito se localiza en los riñones, curso de los uréteres y grasa perirenal formando nódulos (Figura 2) donde los parásitos se encuentran entremezclados con material purulento (Batte E., 1966; Dykova I., 1977; Jubb K., 1985; Shealy A., 1927).

Este parasitismo se distribuye mundialmente y en los últimos años se ha reportado en Estados Unidos, Brasil y Belice (Biehl L., 1982; Friendship R., 1990; Gibbens J., 1989; Zocoller M., 1987). En Colombia no existen reportes que describan la incidencia y distribución de la estefanuriasis por lo cual es necesario suministrar información que permita evaluar la enfermedad y aquellos factores que contribuyen a su presentación.

El diagnóstico en el animal vivo se realiza mediante técnicas de sedimentación que permiten la visualización de los huevos del parásito en la orina del animal afectado después de un período

prepatente de 270 días (Batte E., 1960; Friendship R., 1990). El diagnóstico definitivo se realiza mediante necropsia (Blood D., 1988; Soulsby E., 1987). Por lo anterior, los esfuerzos de investigación se deben encaminar a la evaluación de procedimientos que permitan detectar la posible respuesta serológica a los antígenos del parásito, para su utilización en posteriores estudios seroepidemiológicos sobre la enfermedad en el país.



FIGURA 2. Quiste urteral con parásitos.

* Proyecto financiado por el INCEC y reali
** Médicos Veterinarios.
*** Profesores de la Facultad de Medicina Veteri

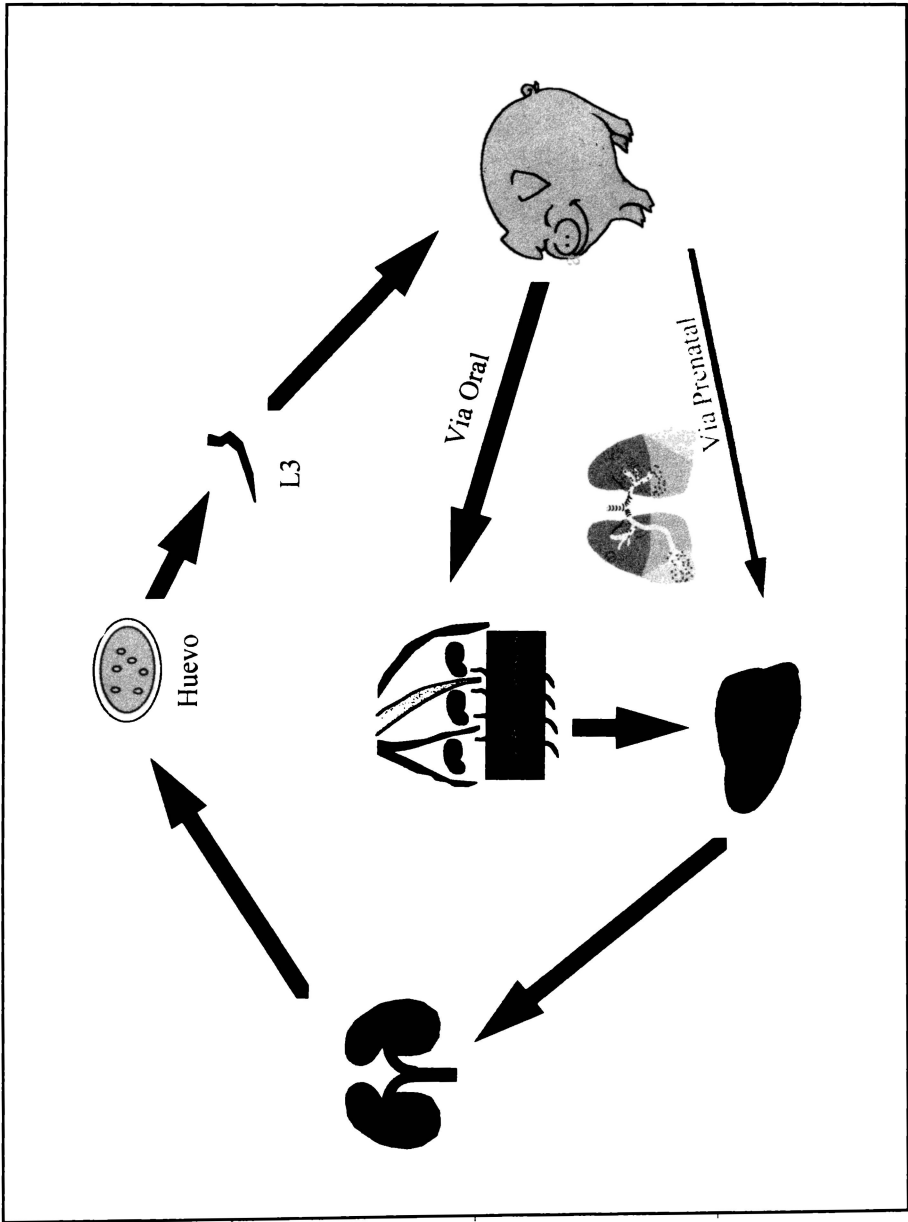


FIGURA 1. Ciclo de vida del *Stephanurus dentatus*.

MATERIALES Y METODOS

1. Diagnóstico serológico

Se obtuvieron los riñones y muestras de sangre sin anticoagulante de 30 porcinos infestados con *Stephanurus dentatus*. Además se recolectó sangre de 30 porcinos negativos al parásito como controles. Los riñones, ureteres y grasa perirrenal fueron examinados cuidadosamente, procediendo a contar los parásitos presentes.

Los preparados antigénicos (S y M) fueron obtenidos a partir de *Stephanurus dentatus* adultos machos y hembras, vivos e intactos.

El antígeno metabólico (M) se preparó siguiendo la metodología descrita para la preparación de antígenos secretorios y excretorios de Fasciola hepática (Morilla A., 1986; Santiago N., 1986). Se extrajeron parásitos de riñones de animales infestados, previo lavado, 80 parásitos fueron colocados en 60 mililitros de solución antibiótica (SSAF pH 7,2, Penicilina G sódica, Streptomycina y Anfotericina B) e incubados en baño de maría a 37 grados centígrados durante 6 horas, posteriormente se removieron los parásitos y la suspensión fue centrifugada a 10.000 g. durante 30 min. a 4 grados centígrados, el sobrenadante obtenido fue liofilizado y resuspendido en 10 mililitros de PBS 7,2 estéril y almacenado en alícuotas a -20 grados centígrados. Se obtuvo una concentración de proteína para M de 1,5 mg/ml por el método de Lowry (Crosby R., 1990).

El antígeno somático (S) se preparó siguiendo la metodología descrita por Morilla y Bautista (Morilla A., 1986) junto con algunas variaciones que buscaron mejorar la calidad del preparado antigénico (Carnevale S., 1995; Crosby R., 1990; Rivera C., 1988; Vera V., 1994). Se obtuvo a partir de un homogenizado de *Stephanurus dentatus* vivos e intactos sometidos a la acción de Fenilmetilulfofoni Fluoruro (PMSF), Aprotinin, Benzamidina HCl, Pepstatin y Leupeptin, todos ellos inhibidores de proteasas. La mezcla fue tratada con acetona y centrifugada a 10.000 g. durante 20 minutos a 4 grados centígrados. Se adicionó Ditiotretol (DTT) y Hepes pH 7,5 al sobrenadante y se centrifugó a 1.000 g. durante

1 hora a 4 grados centígrados. El antígeno fue almacenado en alícuotas a -20 grados centígrados. La concentración de proteína de S fue de 20,1 mg/ml.

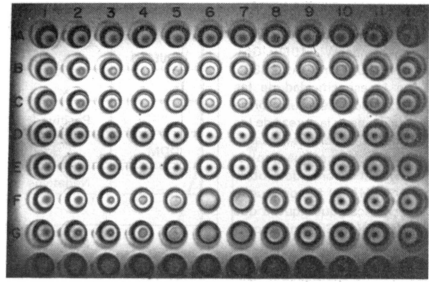
Los sueros obtenidos, fueron inactivados a 56 grados centígrados durante 30 minutos y se eliminaron hemaglutininas usando glóbulos rojos formulados de caprino. Posteriormente fueron sometidos a las pruebas de doble inmunodifusión en agar (DDS y DDM) y hemaglutinación pasiva (HAPS).

La DD se realizó utilizando 15 mililitros de agar purificado al 0,65 % teñido con azul tripan en cajas de petri. En cada caja se realizaron 8 rosetas y en cada roseta se colocó el respectivo antígeno en el pozuelo central y los sueros en estudio en los pozuelos periféricos junto con un control positivo (suero hiperinmune de conejo) y un control negativo (suero normal de conejo o solución salina). Las cajas de petri se incubaron en cámara húmeda realizándose lecturas a las 24, 48 y 72 horas.

La HAPS se estandarizó de acuerdo al procedimiento descrito por Morilla y Bautista (Morilla A., 1986) junto con las recomendaciones hechas por otros autores (Perry D., 1979; Crosby R., 1990). Se emplearon eritrocitos de caprino sensibilizados con una dilución 1:32 de S, previo tratamiento con formol, ácido tánico y maduración por 26 días. Para la realización de la prueba se utilizaron cajas de microtitulación fondo en U de 96 pozuelos, realizando diluciones dobles en base dos de los sueros problema a partir de una dilución 1:2 en solución suero normal de conejo al 1% y adicionando los eritrocitos sensibilizados con S a cada una de las diluciones de suero. Se empleó como control positivo suero hiperinmune de conejo y como control negativo suero normal de conejo. La lectura se realizó a las 2 horas de incubación y se consideró un título positivo a partir de la dilución 1:32 (Figura 3).

2. Inspección postmortem

Todas las canales de los cerdos sacrificados durante los meses de marzo, abril y mayo de 1995 en el frigorífico Guadalupe de Santafé de Bogotá, fueron valoradas diariamente para determinar la presencia de parásitos y le-



FI

siones características de la infestación por *Stephanurus dentatus*. Se registró el total de cerdos infestados y la procedencia de los mismos con el fin de calcular la frecuencia de presentación de la enfermedad y al mismo tiempo detectar los municipios colombianos afectados, para posteriormente ubicarlos en un mapa epidemiológico para la entidad.

3. Análisis estadístico

Los datos serológicos fueron comparados con el examen postmortem mediante tablas de contingencia de 2 x 2, estableciendo sensibilidad, especificidad y valores predictivos. Las pruebas fueron comparadas entre sí mediante tablas de contingencia de 2 x 2, estableciendo el grado de acuerdo entre ellas. La relación entre el recuento parasitario con los datos serológicos se analizó mediante la prueba de Tukey para comparaciones múltiples; también se empleó Chi cuadrado, análisis de varianza y estadística descriptiva. Se utilizó el programa estadístico SAS (Steel R., 1985).

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Diagnóstico serológico

La DDS mostró una especificidad del 100%, mientras que su sensibilidad fue del 20 %, ya que solo detectó 6 de 30 animales positivos. En el caso de la DDM la sensibilidad fue del 73,33% y la especificidad fue del 90% ya que detectó 3 falsos positivos. La prueba de HAPS fue la que presentó los mejores resultados, ya que su sensibilidad fue del 76,67% y su especificidad fue del 96,67%. Los valores predictivos para los porcinos infestados fueron altos para todas las pruebas (Tabla 1).

La DDS mostró baja sensibilidad debido a la baja concentración de anticuerpos precipitantes presentes en los sueros de los cerdos infestados, esta situación se puede observar en los casos de infestaciones muy tempranas o crónicas (Gorman T., 1990; Morilla A., 1986; Tromba F., 1963). Por otra parte la HAPS fue la técnica que detectó el mayor número de animales realmente infesta-

TABLE 1
PARAMETROS PARA DDS, HAPS Y DDM

PRUEBAS SEROLOGICAS	VALOR PREDICTIVO	
	POSITIVO	NEGATIVO
	%	%
DDS	20	100
DDM	73.33	90
HAPS	76.67	96.67

dos, mostrando una gran capacidad de la prueba para detectar concentraciones bajas de anticuerpos (Amos W., 1986; Gorman T., 1990; Morilla A., 1986). Ya que la especificidad de las pruebas serológicas es una forma indirecta de medir la pureza de los antígenos, es importante resaltar que aquellas técnicas que emplearon S con inhibidores de proteasas (DDS y HAPS) fueron mucho más específicas que aquella que utilizó M (DDM). Sin embargo algunos autores afirman que los preparados metabólicos son más específicos ya que tienen la ventaja sobre los antígenos somáticos de ser independientes al ciclo de vida (Carnevalle S., 1995). En este estudio la especificidad de DDM pudo verse afectada por la falta de inhibidores de proteasas en la obtención de M. Lo anterior permite afirmar que el uso de inhibidores de proteasas incrementa la calidad de los preparados antígenicos, ya que no permiten la degradación de polipéptidos antigénicamente importantes por parte de proteasas liberadas durante el proceso de preparación del antígeno (Rivera C., 1988).

El grado de acuerdo entre DDS y DDM fue del 11,54% y únicamente 4 de los 30 sueros fueron positivos a las dos pruebas; así mismo el acuerdo entre DDS y HAPS fue del 20,54% y solamente 5 de 30 sueros fueron positivos a las dos pruebas. Estos porcentajes indican un grado de acuerdo deficiente entre las pruebas serológicas (Tabla 2).

De los 30 animales positivos evaluados, el 60% presentaron recuentos entre 1 y 20 parásitos, el 26,67% entre 21 y 50, el 10% entre 51 y 80 parásitos y sólo 1 porcino mostró un recuento mayor a 80 parásitos. De acuerdo con lo anterior se establecieron 4 niveles de infestación (Tabla 3).

No existió asociación estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos en las pruebas serológicas con los niveles de infestación ($p > 0,10$). Los títulos obtenidos mediante HAPS fueron muy variados (Figura 4) y no se observó diferencia estadísticamente significativa entre el promedio de los recuentos para cada título ($p > 0,05$), por lo tanto el número de *Stephanurus dentatus* a nivel renal no afectó los títulos de HAPS.

TABLA 2
GRADO DE ACUERDO ENTRE DDS CON DDM Y HAPS

PRUEBAS	DDS		TOTAL	
	POSITIVO	NEGATIVO		
DDM	Positivo	4	21	25
	Negativos	2	33	35
HAPS	Positivo	5	19	24
	Negativos	1	35	36
Total	6	54	N=60	

La no asociación entre los resultados de las pruebas con los niveles de infestación y la no relación entre los recuentos a nivel renal y los títulos obtenidos por HAPS se atribuyeron a factores

(Gorman T., 1990; Tromba F., 1963) mientras que los resultados falsos negativos se asociaron con animales inmunosuprimidos, con infestaciones tan crónicas que produjeron anergia o tolerancia

tamentos de Santander, Cesar, Córdoba, Arauca, Magdalena, Bolívar, Casanare, Norte de Santander, Boyacá, Antioquia, Cundinamarca y Meta (Figura 5).

Esta frecuencia de presentación fue baja, debido a que solamente se estudiaron animales infestados a nivel renal y a que sólo se trabajó en una planta de sacrificio que cuenta con adecuados controles sanitarios. Las poblaciones ubicadas en el mapa epidemiológico son un indicador de la distribución tan amplia del parasitismo en el país y de las condiciones sanitarias en que aún son explotados algunos porcinos en nuestro medio, ya que la estefanuriasis renal es un parasitismo frecuente en cerdos procedentes de explotaciones tradicionales, con un bajo nivel tecnológico y con planes sanitarios esporádicos o nulos (Actividad Porcina, 1985).

De acuerdo a lo anterior se puede concluir que la prueba de

TABLA 3
RESULTADOS POSITIVOS DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS EN CADA UNO DE LOS NIVELES DE INFESTACION

NUMERO DE STEPHANURUS DENTATUS	TOTAL DE MUESTRAS	DIAGNOSTICOS POSITIVOS					
		DDS		DDM		HAPS	
		No	%	No	%	No	%
0	30	0	0	3	10	1	3.33
1-20	18	4	22.22	12	66.67	13	72.22
21-50	8	2	25	7	87,5	6	75
51-80	3	0	0	2	66,67	3	100
>80	1	0	0	0	0	0	0

como: la edad de los cerdos al ser infestados, el volumen de huevos o parásitos infestantes que ingresan al huésped, la frecuencia de exposición al parásito (Tromba F., 1963), la presencia de diferentes estadios de vida del parásito en el huésped (Lloyd S., 1981, Soulsby E., 1961; Tromba F., 1963), la capacidad y tipo de respuesta inmune desarrollada por el huésped (Morilla A., 1986; Tizard I., 1990; Tromba F., 1963) y a la presencia de infestaciones concurrentes con otros parásitos (Tromba F., 1963). Los resultados falsos positivos se atribuyeron a reacciones cruzadas con otros helmintos

frente a la infestación con el parásito o con animales infestados con tal volumen de parásitos que agotaron las concentraciones de anticuerpos libres detectables en el suero (Morilla A., 1986).

2. Inspección postmortem

Se examinaron 61.195 canales porcinas, de las cuales 1.779 presentaron *Stephanurus dentatus* a nivel renal; esto determinó una frecuencia de presentación del 2,91%. Además se encontró que estos cerdos infestados provenían de 22 municipios colombianos distribuidos en los depar-

HAPS constituye una herramienta útil en el diagnóstico individual y poblacional de la estefanuriasis porcina y posiblemente de otras enfermedades parasitarias. Sin embargo se recomienda la evaluación de técnicas diagnósticas que utilicen preparados metabólicos con inhibidores de proteasas y además la realización de estudios tendientes a purificar los preparados antígenicos y seleccionar aquellas fracciones con alto valor diagnóstico en la detección de anticuerpos específicos contra el parásito. Adicionalmente se suministró por primera vez información sobre la distribución de la enfer-

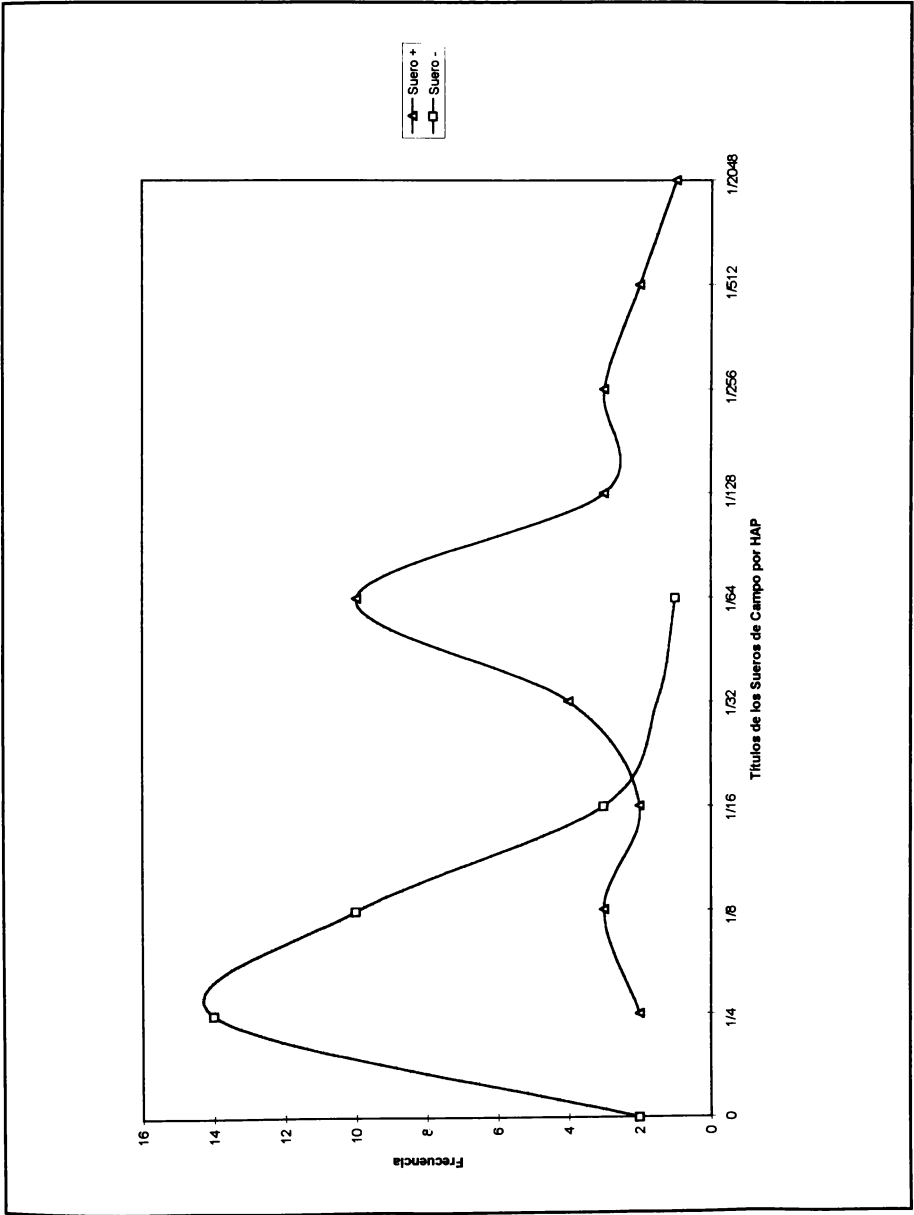


FIGURA 4. Distribución de los títulos obtenidos mediante HAPS.

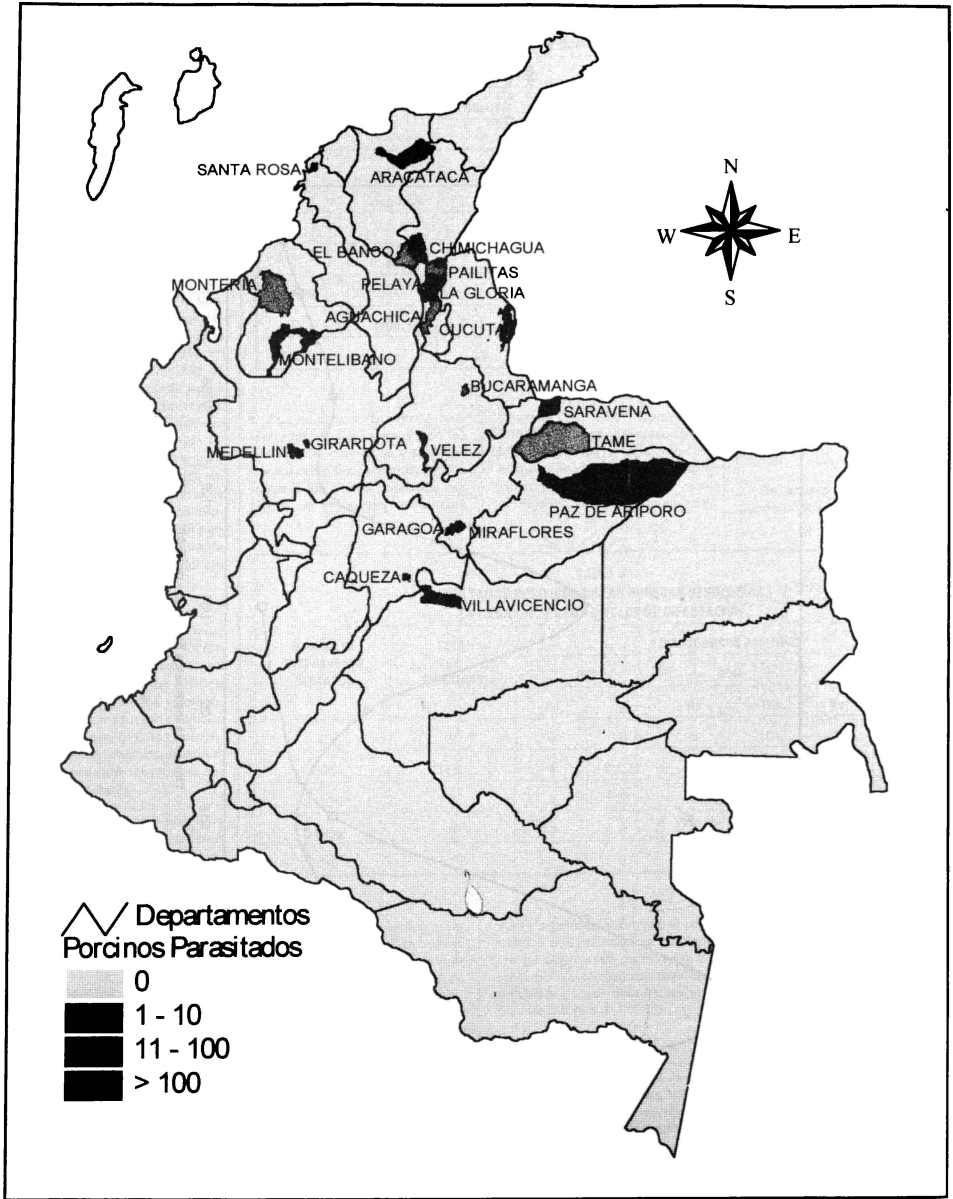


FIGURA 5. Mapa epidemiológico para la Estefanuriosis porcina.

medad en el país, por lo tanto se recomienda mayor control y mejor manejo de las explotaciones

porcinas tradicionales ubicadas en estas zonas. Finalmente, debido al complejo y prolongado ciclo

de vida del *Stephanurus dentatus* este podría ser un modelo de es-

tudio importante en inmunología contra los helmintos

BIBLIOGRAFIA

- AMOS, W. M. Inmunología básica. Zaragoza, Ed. Acribia S. A., 1986. pp. 79-85.
- BATTE, E. G.; HARKEMA, R. and OSBORNE, G. C. Observations on the life cycle and pathogenicity of the Swine Kidney Worm. Journal of American Veterinary Medical Association. 136 (12): 622-625. Jun. 1960.
- MONCOL, D. J. and BARBER C. W. Prenatal infection with the Swine Kidney Worm (*Stephanurus dentatus*) and associated lesions. Journal of American Veterinary Medical Association. 149 (6): 758-765. Sep. 1966.
- BIELH, L. G. Symposium on Diagnosis and treatment of swine diseases: Common internal parasites of swine. Veterinary Clinics of North America: Large Animal Practice. 4 (2): 355-375. Nov. 1982.
- BLOOD D. C., RADOSTITS, O. M. and HENDERSON J. A. Medicina Veterinaria. 6ed. México, D. F., Interamericana, 1988. pp.1014-1016.
- CARNEVALE S. y LABBE J. Desarrollo de un método inmunoenzimático para el diagnóstico humano de Distomatosis por Fasciola hepática. Departamento de Parasitología, Instituto Nacional de Microbiología Dr. Carlos G. Malbran, 1995.
- CROSSBY R. A. Estudio Seroepiemiológico de la Fascioliasis Bovina en Explotaciones del Altiplano Frío. Tesis Médico Veterinario Universidad Nacional de Colombia. 1990.
- DYKOVA, I. The pathology of stephanuriasis (*Stephanurus dentatus* Diesing, 1893; Nematoda-Strongylidae) in the pig. Acta Vet. Brno. 46: 159-165, 1977.
- FRIENDSHIP, R. M.; HALL, W. F. and PRIMM, N. D. Deworming strategies for swine: Part I. Swine Endoparasites. Continuing Education. 12 (5): 755-766. May. 1990.
- GIBBENS, J. C.; GIBBENS N. P. and FIELDING, W. J. A abattoir survey of the prevalence of gastrointestinal helminths and *Stephanurus dentatus* in pigs in Belize. Tropical Animal Health and Production. 21 (3): 197-204, 1989.
- GORMAN, T.; WENZEL, J.; LORCA, M.; IBARRA, L.; SAN MARTIN, B. y ALCAINO, H. Pruebas de inmunoprecipitación y hemaglutinación indirecta en el diagnóstico de la fascioliasis ovina. Parasitología al día. 14: 51-56, 1990.
- JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C. and PALMER, N. Pathology of domestic animals. 3ed. Academic Press, Orlando, Florida, 1985, v. 2, pp. 282, 385.
- LLOYD S. Progress in immunization against parasitic helminths. Parasitology 83: 225-242, 1981.
- MORILLA, A. y BAUTISTA C. R. Manual de inmunología. Diana, México D. F., 1986, pp. 38-42, 52-62, 81-86.
- PERRY, D.; MOGOLLON, J.; GRIEVE, A. y GALVIS A. Manual de técnica para el diagnóstico de las enfermedades ovinas. ICA documento de trabajo No. 19, Bogotá, 1979.
- REVISTA ACTIVIDAD PORCINA. Sistemas de explotación porcina. Revista actividad porcina 1 (1): 22-25, 1985.
- RIVERA, C.; SANTIAGO, N. and HILLIER, G. Evaluation of immunodiagnostic antigens in the excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. Journal of parasitology 94: 646-652, 1988.
- SANTIAGO, N.; HILLIER, G.; GARCIA, M. and MORALES, M. Identification of functional *Fasciola hepatica* antigens in experimental infections in rabbits. American Journal of Tropical medicine. 35: 135-140, 1986.
- SHEALY, A. L. and SANDERS, D. A. Investigations of *Stephanurus dentatus* (Kidney Worm) of hogs. Journal of American Veterinary Medical Association 24: 361-367, 1927.
- SOULSBY, E. J. L. Immune mechanisms in helminth infections. The Veterinary Record. 43 (73): 1053-1058, 1961.
- _____. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7ed. Interamericana, México D. F., 1987, pp. 193-196
- STEEL, R. and TORRIE, J. Bioestadística principios y procedimientos. Mc Graw-Hill, Bogotá, 1985, pp. 179, 180, 328-334.
- TIZARD, I. Inmunología veterinaria. 3ed. Interamericana, México D. F., 1990, pp. 249-257.
- TROMBA, F. G. and BAISDEN, L. Precipitins in sera of swine infected with *Stephanurus dentatus*. The Journal of parasitology, 49 (4): 633-638, Aug., 1963.
- VERA, V. J. Documento interno. Posgrado Salud y Producción animal, 1994.
- ZOCOLLER, M. C.; STARKE, W. A.; TURCO, J. L.; ISEPON, J. S. and DOS SANTOS, I. J. Helminth fauna of swine from Selviria, Mato Grosso State, Brazil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia, 39 (3): 431-443, 1987.