

María Dolores BARGUES¹
Roberto L. Mera y Sierra^{1,2}
Humberto Gustavo GÓMEZ¹
Patricio ARTIGAS¹
Santiago MAS-COMA¹

¹Departamento de Parasitología
Facultad de Farmacia
Universidad de Valencia. España
²Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Cuyo. Argentina

Correspondencia:
María Dolores BARGUES
Departamento de Parasitología
Facultad de Farmacia
Universidad de Valencia
Av. Vicent Andres Estelles s/n
46100 Burjassot. Valencia
E-mail: M.D. BARGUES@uv.es

Caracterización molecular de *Galba truncatula*, vector principal de la Fascioliasis, en Argentina. Implicaciones en salud pública

ORIGINAL

Resumen

Objetivo: La Fascioliasis humana ha pasado recientemente a engrosar la lista de las grandes enfermedades parasitarias de la humanidad. Las zonas de endemia humana presentando mayores prevalencias e intensidades se encuentran en Países Andinos como Bolivia y Perú, donde la enfermedad está transmitida por el molusco gasterópodo de la familia Lymnaeidae *Galba truncatula*. El hallazgo y determinación de esta misma especie de vector en Argentina, en 2001, fueron inicialmente realizados con base morfológica, siendo así que estudios posteriores han demostrado que la morfología no basta para la distinción entre especies del grupo Galba/Fossaria. El presente trabajo tiene por finalidad la confirmación de la existencia, en Argentina, del mejor vector de Fascioliasis conocido mediante secuenciación de un marcador específico del ADN.

Material y métodos: Los moluscos fueron recolectados en El Salto, en la zona andina de Mendoza, Argentina, y fijados en etanol al 70%. El ADN genómico fue extraído, amplificado y purificado siguiendo métodos estandarizados. La secuenciación del ITS-2 del ADN ribosomal nuclear fue obtenida mediante secuenciador automático utilizando cebadores específicos. El programa BLAST fue usado para comparación rápida con todas las secuencias de Lymnaeidos disponibles en el GenBank. El análisis comparado final se hizo mediante alineamiento utilizando Clustal W versión 1.8.

Resultados: La secuencia completa del ITS-2 del ADNr resultó ser de una longitud de 401 pares de bases y un contenido en GC del 58,6%. La secuencia obtenida demostró ser idéntica en longitud, contenido y composición de nucleótidos que el haplotipo H3 de *Galba truncatula*, anteriormente descrito en Bolivia.

Conclusiones: El hallazgo en Mendoza del mismo haplotipo de molusco vector responsable de la Fascioliasis humana y animal del Altiplano Norte Boliviano, la mayor zona de endemia humana conocida, constituye un hecho de un enorme potencial de impacto en salud pública dadas las connotaciones de gran capacidad de transmisión que confluyen en la zona andina de Mendoza. Todo indica la necesidad de efectuar un amplio estudio futuro con el fin de llegar a conocer la distribución geográfica de *G. truncatula* H3 en Argentina, para lo cual el ITS-2 se muestra como la herramienta molecular más útil, específica, sensible y práctica.

Palabras clave: Fascioliasis humana y animal. Vectores Lymnaeidae. *Galba truncatula*. Mendoza. Argentina. Transmisión. Epidemiología. Salud pública.

Summary

Objective: Human fascioliasis has recently entered in the list of the most important parasitic diseases of man. The human endemic areas presenting the highest prevalences and intensities are found in Andean countries as Bolivia and Peru, where the disease is transmitted by the molluscan gastropod of the Lymnaeidae family *Galba truncatula*. The finding and determination of this vector species in Argentina in 2001 were initially based on morphology. More recent studies have demonstrated that morphology does not enable to distinguish between species of the Galba/Fossaria group. The aim of this paper is to confirm the presence, in Argentina, of the best fascioliasis vector known by means of specific DNA marker sequencing.

Material and methods: Molluscs were collected in El Salto, on the Andean zone of Mendoza, Argentina, and fixed with ethanol 70%. Total DNA was extracted, amplified and purified following standard methods. The sequence of the nuclear ribosomal DNA ITS-2 was obtained by means of an automatic sequencer using specific primers. The BLAST programme was used for the fast comparison with all sequences of lymnaeids available at GenBank. The final comparison was made by alignment using Clustal W version 1.8.

Results: The complete sequence of the rDNA ITS-2 showed a length of 401 base pairs and a GC content of 58,6%. The sequence obtained was identical in length, contents and composition of nucleotides than the H3 haplotype of *Galba truncatula*, previously described in Bolivia.

Conclusions: The finding in Mendoza of the same haplotype of the molluscan vector responsible of the human and animal fascioliasis on the Northern Bolivian Altiplano, the most important human endemic area, is a fact of great interest because of its large potential impact on public health, owing to the aspects of great transmission capacity which are present on the Andean zone of Mendoza. All suggests the need to perform a large future study to establish the geographical distribution of *G. truncatula* H3 in Argentina. The ITS-2 appears to be the most useful, specific, sensible and practical molecular tool for such future studies.

Key words: Human and animal fascioliasis. lymnaeid vectors. *Galba truncatula*. Mendoza. Argentina. Transmission. Epidemiology. Public health.

Introducción

La Fascioliasis es una enfermedad parasitaria causada por trematodos digénidos pertenecientes al género *Fasciola* (Fasciolidae): *F. hepatica* se encuentra distribuida por todos los continentes y *F. gigantica* se restringe a África y Asia^{1,2}. Los estadios adultos de estos fasciolídeos son parásitos de los conductos hepáticos y vesícula biliar. Ponen huevos que salen al exterior vía biliar e intestinal con las heces. Aquellos huevos que llegan al agua dulce se embrionan y el miracidio eclosiona, para nadar en busca de un molusco de la familia Lymnaeidae (Gastropoda) en el cual penetra activamente para metamorfosear en estadios larvarios de multiplicación asexual. Dentro del molusco se originan una generación de esporocisto y de 1 a 4 generaciones de redias, las cuales dan lugar al siguiente estadio larvario de cercaria que es el que abandona al gasterópodo para, gracias a una cola natatoria, nadar hasta encontrar un soporte inerte, esencialmente vegetación dulceacuícola, sobre el cual adherirse y enquistarse. Así se origina el último estadio larvario de metacercaria enquistada que constituye la forma metacíclica infestante para el mamífero hospedador definitivo, el cual adquiere la enfermedad al ingerirla conjuntamente con los vegetales que la transportan³. Siempre se había creído que estos trematodos eran parásitos propios del hígado de animales herbívoros, esencialmente ganado doméstico como ovinos, bovinos y caprinos, y que únicamente infectaban a humanos esporádicamente. Así fue como la revisión realizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1990 solamente citaba un total de alrededor de 2000 casos humanos diagnosticados en los 20 años previos⁴.

Sin embargo, en la segunda mitad de la década de los 90, una serie de investigaciones pasan a mostrar que en realidad esta distomatosis es mucho más frecuente en humanos de lo que se pensaba. Es entonces cuando se empiezan a describir zonas de verdadera endemia humana^{5,6}. Las encuestas realizadas vinieron a demostrar, además, que esta parasitosis afectaba a todas las edades pero esencialmente a niños, con un pico alrededor de los 9-11 años, y con mayor afección en hembras⁷. Los estudios dirigidos al análisis de los efectos de la parasitación por fasciolídeos en los humanos demostraron que es causante de serios cuadros patológicos con extensa problemática clínica^{3,8}. Más recientemente se ha visto incluso como, en las zonas de endemia humana, en las que los afectados se encuentran mayoritariamente en fase de cronicidad (fase obstructiva en la que el parásito ya ha alcanzado su microhábitat hepático definitivo y ha empezado a producir huevos que salen al exterior con las heces) o de cronicidad avanzada (fase subsiguiente en la que colelitiasis y bacteriobilia son características y los parásitos viejos agotan su capacidad de producir huevos), los cuadros patológicos y clínicos antedichos pueden llegar a complicarse aún mucho más⁹.

A principios de los 90 las estimaciones oscilaban ya entre 2,4 millones y 17 millones de afectados en el mundo^{10,11}. Ante toda esta situación, la Sede Central de la OMS incluyó la Fascioliasis dentro de la lista de las grandes enfermedades parasitarias de la humanidad y, consecuentemente, decidió lanzar una iniciativa mundial contra la Fascioliasis humana a finales de los 90, en la cual se incluyeron dos ejes fundamentales:

- Estudios epidemiológicos y de transmisión.
- Tratamientos de afectados en zonas de endemia mediante triclabendazol, una droga de muy alta efectividad. En la actualidad, y como consecuencia de los numerosos estudios epidemiológicos realizados en diferentes países de Latinoamérica, África y Asia, se empieza a considerar que las cifras disponibles muy probablemente subestimen la realidad a nivel mundial¹.

Las áreas de endemia humana de Fascioliasis mostrando mayores prevalencias e intensidades se encuentran en zonas de gran altitud de los Países Andinos. En el Altiplano Norte de Bolivia, las prevalencias llegan a ser elevadísimas, de hasta incluso más del 72% por coprología y del 100% por serología y con intensidades de hasta más de 5000 huevos por g de heces, en determinadas localidades^{12,13}. El solapamiento e incluso las asociaciones positivas estadísticamente significativas que la Fascioliasis muestra con otras parasitosis, varias de ellas de reconocida alta patogenicidad tanto protozoosis (por ejemplo *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium sp.* y *Balantidium coli*) como helmintiasis (por ejemplo *Taenia solium*, *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiura*), están en la base de una muy elevada mortalidad en niños de corta edad en el Altiplano Norte Boliviano¹⁴. En el Perú se han detectado situaciones epidemiológicas similares^{15,16}.

Formando parte de la iniciativa de la OMS, en los últimos años se han intensificado las prospecciones en otros países latinoamericanos, esencialmente aquellos que presentan zonas andinas, con el fin de verificar si existen zonas epidemiológicamente similares a las descritas en Bolivia y Perú. Estos estudios incluyen no únicamente encuestas en humanos, sino también prospecciones a nivel de animales domésticos reservorios y sobre los moluscos Lymnaeidae hospedadores intermediarios o vectores que intervienen en la transmisión de la enfermedad. Así es como en el año 2001, Roberto L. Mera y Sierra detecta la presencia de lymnaeidos en el sistema hidrográfico andino de la provincia de Mendoza, Argentina, y adscribe determinadas poblaciones de los moluscos recolectados a la especie *Galba truncatula* en base a estudios morfológicos¹⁷, tras comparación con poblaciones de la misma especie en otros países¹⁸⁻²⁰. El lymnaeido *Galba truncatula* es la especie reconocida como transmisor por excelencia de *Fasciola hepatica*, por lo que el hallazgo representaba un importante aporte a los estudios en cuestión.

Sin embargo, en los años subsiguientes, diferentes estudios han venido a demostrar que la diferenciación morfológica y morfométrica de determinadas especies de Lymnaeidae ofrece en realidad una enorme problemática²¹. En varios casos de especies próximas como algunas que también transmiten la Fascioliasis en América del Sur, esta cuestión llega hasta el extremo de ser totalmente indiferenciables y, consecuentemente, a tener que hablar de especies gemelas^{22,23}.

Estudios morfológicos más amplios sobre variabilidad de los lymnaeidos de la zona argentina de Mendoza permitieron concluir que allí también se daba un fenómeno del mismo tipo²⁴⁻²⁶. Por consiguiente, dada la trascendencia de la cuestión, se impone la verificación de la clasificación sistemática de la especie de lymnaeido de Mendoza. El presente trabajo tiene esta finalidad. Para ello, se ha

procedido a la obtención de la secuencia nucleotídica completa del segundo espaciador transcrito interno ITS-2 del ADN ribosomal nuclear y a su oportuno análisis por comparación con otras secuencias ya conocidas de *Galba truncatula* y otras especies próximas de Lymnaeidae.

Material y métodos

Material de lymnaeidos y descripción del área de estudio

El material de moluscos dulceaquícolas lymnaeidos procedente de la provincia de Mendoza, Argentina, y utilizado para los estudios moleculares fue recolectado en la localidad de El Salto, en cursos de agua y fijados vivos directamente en etanol al 70%. La provincia de Mendoza presenta planicies en el sector oriental ligadas al área montañosa del oeste a través de la cuenca del río Desaguadero, formado por el aporte de los ríos Mendoza, Tunuyan, Diamante y Atuel. Al oeste se encuentran los cordones montañosos de los Andes con una altitud media de 4500 m. El clima cordillerano es frío con precipitaciones nivales durante el invierno, y las llanuras presentan un clima templado con escasas precipitaciones durante el verano (aproximadamente 250 mm anuales).

De acuerdo con los datos del Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas efectuado en 2001 por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos de la República Argentina (INDEC), El Salto es una localidad de únicamente 361 habitantes, pero con una importante población flotante debido a su interés turístico. Esta localidad ve ostensiblemente aumentado el número de personas especialmente en fines de semana y días feriados, así como también en periodos vacacionales. Esta localidad forma parte del Departamento de Luján de Cuyo, de una superficie de 4.847 km² y una población de 104.470 habitantes, con una densidad poblacional de 16,5 habitantes por km². Este Departamento forma parte, a su vez, de la provincia de Mendoza, de 148.827 km² y una población de 1.579.651 habitantes, con una densidad poblacional de 10,6 habitantes por km². Para la provincia de

Mendoza, el mismo INDEC, dentro de su Censo Nacional Agropecuario referente al año 2002, enumera las cifras siguientes sobre cabezas de ganado: 672.434 caprinos, 68.795 ovinos, 404.710 bovinos, 16.360 porcinos y 64.029 equinos.

Técnicas moleculares

La extracción del ADN genómico se realizó según protocolo y técnicas estandarizadas²⁷. Para ello se utilizó una parte de tejido de la zona cefalopédea del molusco. Se utilizó más de un individuo por motivos de confirmación nucleotídica en caso de posibles secuencias sucias. Este tejido se disgregó con la ayuda de unas tijeras estériles en un pequeño volumen de una solución tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH=8,0; EDTA 100 mM; NaCl 100 mM), para posteriormente añadir: solución tampón de lisis, hasta completar 340 μ l, 40 μ l de dodecil sulfato de sodio al 10 %, y 20 μ l de proteinasa K (500 μ g/ml) (Promega, Madison, WI, USA). Se agitó suavemente y se incubó a 55° C durante 2 h, con agitación cada 15 min. La purificación del ADN total se realizó mediante una extracción en tres etapas, por el método de fenol-cloroformo. En la primera se adicionan 400 μ l de fenol y se centrifuga durante 5 min a 13000 rpm. A continuación se recupera la fase acuosa que contiene el ADN. En la segunda etapa se utilizan 200 μ l de fenol y 200 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1), se mezcla suavemente, se vuelve a centrifugar y se recupera nuevamente la fase acuosa. En la tercera etapa se añaden 400 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1), se mezcla, se centrifuga y se recupera nuevamente el sobrenadante. La precipitación del ADN se realizó con acetato de amonio 4 M y etanol absoluto y el precipitado resultante se resuspendió en 30 μ l de tampón TE (Tris-HCl 10mM, pH=7,6; EDTA 0.1 mM, pH=8,0) y se conservó a -21° C hasta su uso.

La amplificación por PCR del fragmento correspondiente al segundo espaciador transcrito interno del ADN ribosomal (ITS-2) se realizó utilizando oligonucleótidos cebadores diseñados a partir de las regiones conservadas de los genes 5.8S y 28S que flanquean a este espaciador ribosomal^{21,28}. La reacción

de PCR se realizó en un termociclador MiniCycler™ PT-150 (MJ Research, Watertown, MA, USA) utilizando 4-6 μ l de ADN genómico de cada lymnaeido por cada 50 μ l de reacción de PCR y la siguiente programación: 94° C durante dos minutos; treinta ciclos repetitivos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos a 50° C y 30 segundos a 72° C, seguidos de 2 minutos a 72° C y de una fase final de enfriamiento a 4° C. Se analizó 10 microlitros del producto de amplificación en geles de electroforesis al 1%, previamente teñidos con bromuro de etidio. En cada reacción de amplificación se incluyó un control negativo y un control positivo, así como un marcador de peso molecular en la electroforesis en gel de agarosa con el fin de identificar las bandas del fragmento del ITS-2 amplificado, correspondientes a las muestras analizadas.

La purificación del producto amplificado correspondiente a cada muestra se realizó con el kit UltraClean (MoBio Laboratories, CA, USA), en el cual los ácidos nucleicos son retenidos por una membrana recubierta de sílice en presencia de una alta concentración de sal. Las impurezas son eliminadas mediante lavados con etanol. Finalmente el ADN es recuperado eluyéndolo con agua o tampón Tris 10 mM. La concentración del ADN en las muestras se midió a través de su absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Spectronic Genesis 5 (Spectronic, NY, USA).

La secuenciación de las regiones amplificadas por la reacción de PCR fue realizada utilizando el kit de secuenciación ABI Prism™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) en el secuenciador automático ABI Prism 377A (Perkin-Elmer) y con los mismos cebadores que para la PCR. El ADN marcado fue precipitado con acetato de sodio y etanol, y se analizó en un gel de poliacrilamida 5,25% y urea 6M.

Programas de software utilizados

Las secuencias directa e inversa correspondientes a cada muestra fueron alineadas entre sí utilizando el programa Clustal W versión 1.8²⁹. Los alineamien-

tos fueron realizados incluyendo los lymnaeidos argentinos analizados conjuntamente con las secuencias de otros haplotipos de *Galba truncatula* conocidos. Para el análisis comparado se utilizó las siguientes secuencias del ITS-2 del ADNr presentes en el GenBank: *Galba truncatula* H-1 de España, Portugal y Córcega (Accession No. AJ296271), *G. truncatula* H-2 de España, Portugal y Suiza (Accession No. AJ243017) y *G. truncatula* H-3 de Bolivia^{21,28} (= *L. viatrix sensu* Ueno, *et al*, 1975; = *L. cubensis sensu* Ueno, *et al*, 1975; = *Lymnaea sp.* morph I y morph II *sensu* Oviedo, *et al*, 1995)^{18,30} (Accession No. AJ272051). La homología de las secuencias obtenidas se verificó también con el programa BLAST del National Center for Biotechnology information web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Resultados

Las secuencias del ITS-2 pertenecientes a las muestras de los lymnaeidos argentinos de El Salto presentaron todas ellas una longitud de 401 pares de bases (pb) y un contenido en GC del 58,6%. La secuencia nucleotídica completa fue siempre la misma y se muestra en la Tabla 1. La comparación con todas las secuencias del mismo marcador ITS-2 de Lymnaeidae disponibles en el GenBank mediante el programa BLAST mostró de inmediato la gran similitud con las secuencias de *Galba truncatula*.

Los lymnaeidos argentinos en cuestión presentan una secuencia del marcador ITS-2 similar en un 97% a la secuencia del ITS-2 perteneciente a *G. truncatula* del haplotipo H1 de Europa, respecto del cual se diferencia por presentar dos mutaciones: la transversión de T por G en la posición 55, y la transición de T por C en la posición 149. Respecto del haplotipo H2 de la misma especie, las diferencias nucleotídicas se restringen aún más, concretamente a una sola mutación: la transversión de T por G en la posición 55 (Tabla 2).

Tabla 1. **Secuencia nucleotídica completa del segundo espaciador transcrito interno ITS-2 del ADN ribosomal nuclear de los lymnaeidos de la población de El Salto, Mendoza, Argentina**

Secuencia Nucleotídica	
GCTAGTCACAAAGCATTGTCCTTGCAGCTCTCGCAAAAACCGAAGCC	50
TTGCTGCGTGAGCTCTCACGCTGCTCGGCGATGGTTGGATACGCCCTGGA	100
CCCTCGCGGCCAAAGCTGTCGTTGCCCTGCTCGGCGGCGACGGTGACGGTC	150
CCGTGGTCTTAAGCGCAAGCCGCGCGTTGTCCGTTTCATCTCGTAACGTC	200
TTGACGCTGCCCTGCTCTTGGCGGCTGTCCGTTTTCTCTACCGCCAGG	250
CAGGACCCGGCTCGCTTACTTTATTATTATCGTGGCGTTCTCGGGCCTG	300
CAGTCCATGGCATCGCAGCTCGTGGGTGGAGAACAAGGGGCTCTAAGACG	350
CTACGTGGTGGCGCCCGCTGTTGAATGAAACATTATTTGTTTCTTTCTC	401

Tabla 2. **Longitud, composición y diferencias nucleotídicas encontradas en la comparación de las secuencias del segundo espaciador transcrito interno ITS-2 del ADN ribosomal nuclear de los lymnaeidos argentinos y los haplotipos de *Galba truncatula* de Europa y del Altiplano Norte Boliviano**

<i>G. truncatula</i> Haplotipos	Origen	Longitud	% GC	posiciones		GenBank Accession No.
				55	149	
H1	España, Portugal, Córcega	401 pb	59,1	G	C	AJ296271
H2	España, Portugal, Suiza	401 pb	58,8	G	T	AJ243017
H3	Altiplano Norte Boliviano	401 pb	58,6	T	T	AJ272051
H3	El Salto, Mendoza, Argentina	401 pb	58,6	T	T	presente trabajo

Si se compara la secuencia del ITS-2 de estos mismos lymnaeidos argentinos con la del ITS-2 del haplotipo H3 de *G. truncatula* del Altiplano Norte Boliviano se obtuvo una similitud del 100%, no detectándose ni una sola diferencia nucleotídica entre ambas secuencias (Tabla 2).

Discusión

Los Lymnaeidae del denominado grupo Galba-Fossaria ostentan variabilidades intraespecíficas cuyas morfologías y morfometrías se solapan, dificultando cuando no impidiendo por completo la clasificación de los especímenes²¹. Son varias las técnicas de genotipaje y fenotipaje que se han propuesto para la clasificación definitiva de las especies en estos casos. De entre ellas, el ITS-2 ha demostrado ser el mejor marcador molecular, ya no únicamente a nivel de especie, sino incluso para la diferenciación de poblaciones mediante haplotipaje por SNPs (single nucleotide polymorphisms)³¹.

Un ejemplo lo encontramos en lo sucedido en el Altiplano Norte Boliviano. Esta zona fue ampliamente prospectada hace ya tiempo desde el punto de vista veterinario, mostrándose que la problemática de fascioliasis animal en esa zona era muy importante y que la enfermedad del ganado estaba transmitida por dos especies de lymnaeidos americanos: *Lymnaea viatrix* y *Lymnaea cubensis*³⁰. Sin embargo, los estudios sobre variabilidad intraespecífica demostraron que morfológicamente las poblaciones de ambas especies se solapaban ampliamente¹⁸, además de mostrar una idéntica capacidad de transmitir *Fasciola hepatica* experimentalmente en el laboratorio, fenómeno desconocido en enfermedades parasitarias de transmisión vectorial, ya que cuando hay más de una especie vectora en una misma zona, el parásito siempre está más adaptado a una especie dada y consecuentemente es transmitido más por una especie que por la(s) otra(s). Todo ello vino a poner en duda esas clasificaciones sistemáticas. Los marcadores moleculares vinieron luego a demostrar que en realidad en el Altiplano Norte Boliviano no habían dos especies

diferentes sino una sola que mostraba una amplia variabilidad morfológica intraespecífica y que la especie presente no era ni una ni la otra de las dos americanas citadas inicialmente³⁰, sino *Galba truncatula* importada desde Europa, lo que representó el primer hallazgo de esta importantísima especie de vector no sólo en América del Sur sino en toda América Latina. De los diferentes marcadores moleculares (18S, ITS-2 e ITS-1) aplicados para la clasificación definitiva de los lymnaeidos altioplánicos en Bolivia, el ITS-2 demostró con creces ser el más útil^{28,32,33}.

Este marcador ITS-2 cuenta, además de (i) su característica de ser diferente según las diferentes especies (característica de especificidad), con las ventajas de que (ii) el operon del ADN ribosomal se encuentra altamente repetido y es, por tanto, de fácil detección y amplificación (característica de sensibilidad), y (iii) la evolución concertada de los genes y espaciadores del ADN ribosomal implica una tendencia a la uniformización de las secuencias dentro de una misma población, lo que permite la clasificación específica de una población simplemente con la secuenciación de un único individuo (característica de gran simplificación y reducción en tiempo y costes)³¹.

Galba truncatula es una especie de origen europeo que se muestra genéticamente muy uniforme. En Europa se conocen únicamente los 2 haplotipos H1 y H2 (según la nomenclatura propuesta con anterioridad^{31,34}), que se diferencian por solamente 1 mutación nucleotídica que está constituida por una transición en la posición 149: C en H1 y T en H2²⁸. Esta uniformidad genética parece estar relacionada con la capacidad de autofecundación de esta especie de lymnaeido, que le confiere la habilidad de originar poblaciones monomórficas o clónicas³⁵. Hasta la fecha se conoce únicamente un haplotipo del ITS-2 adicional a los dos europeos antes mencionados, que se designa con el código H3 y que fue hallado en el Altiplano Norte Boliviano. Este haplotipo H3 se caracteriza por presentar una transversión en la posición 55 (G en H1 y H2; T en H3), además de presentar una transición en la posición 149 que confiere un elemento diferencial adicional respecto del haplotipo europeo H1 (C en H1 y T en H3)²⁸.

La extracción y secuenciación del ITS-2 del ADN ribosomal del lymnaeido de Mendoza ha proporcionado una secuencia que se muestra idéntica, tanto en longitud (401 pb) como base a base (T en la posición 55 y T también en la posición 149), a la descrita para el mismo marcador en *Galba truncatula* procedente del Altiplano Norte Boliviano (Tabla 2) y adscrita al código AJ272051 en el GenBank²⁸. La especie de lymnaeido originalmente detectada en Mendoza, Argentina, en el año 2001¹⁷ es, pues, *Galba truncatula* H3.

Si se tiene en cuenta que el haplotipo H3 de *Galba truncatula* es precisamente el responsable de la zona de endemia humana con mayores prevalencias, intensidades y mortalidad infantil en el mundo, el resultado de la confirmación molecular de la clasificación del lymnaeido de la zona argentina de Mendoza viene a poner un punto serio de atención. En efecto, además de la gran capacidad de transmisión de *Fasciola hepatica* bien reconocida de esta especie de gasterópodo, hay otras cuatro características epidemiológicas muy importantes a considerar:

- *Galba truncatula* es una especie que va íntimamente ligada al ganado, con lo que su capacidad de ser trans-

portada pasivamente por los animales es pronunciada y consiguiendo siempre muestra una gran capacidad de expansión geográfica.

- El área de Mendoza se encuentra en zona andina de altitud, lo que sugiere una aún mayor capacidad de transmisión por la longevidad de los individuos de esta especie de gasterópodo en altitud, mayor que en zonas bajas²⁸.
- La peculiar ecología de esta especie de molusco la acerca con frecuencia a núcleos poblacionales humanos, cuando no se encuentra totalmente dentro de ellos, incluso en aguas altamente polucionadas por la acción humana¹².
- Las adaptaciones de *Fasciola hepatica* para su supervivencia en altitud, conducentes al incremento de la producción larvaria (mayor número de cercarias producidas por un individuo de molusco vector) y al aumento de la duración de la emisión cercariana en cada individuo de gasterópodo infectado pueden implicar una capacidad de transmisión en Mendoza semejante a la detectada en el Altiplano Norte Boliviano²⁸.

La presencia de un vector tan favorable para la transmisión puede muy probablemente estar relacionada con las elevadas prevalencias de Fascioliasis detectadas en ganado bovino en Mendoza. Así, estudios muy recientes han detectado una prevalencia del 34,0% en animales mendocinos abatidos en uno de los principales frigoríficos de la provincia³⁶ e incluso una altísima cifra de 67,5% en un frigorífico local que faena exclusivamente ganado del Departamento mendocino de Tupungato³⁷.

Dado el riesgo en salud pública de la existencia de *Galba truncatula* H3 y de su gran capacidad de transmisión de la Fascioliasis en Mendoza, es evidente que se impone un amplio estudio que permita establecer la distribución geográfica de esta especie ya no solamente en Mendoza, sino también en Argentina. El marcador molecular ITS-2 del ADNr se muestra como la mejor herramienta disponible hasta la fecha para poder efectuar dicho estudio. Los estudios posteriores habrán de dirigirse hacia el análisis de la Fascioliasis en humanos y animales y su paralelismo en distribución geográfica con *Galba truncatula*.

Agradecimientos

Investigaciones de laboratorio y secuenciación financiadas por los Proyectos No. BOS2002-01978 y No. SAF2006-09278 del Ministerio de Educación y Ciencia, Madrid, y por la Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales - RICET (Proyectos No. C03/04 y No. ISCI12005-PI050574 del Programa de Redes Temáticas de Investigación Cooperativa) del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid. Trabajos realizados en Argentina financiados por la Universidad Nacional de Cuyo. Soporte técnico para la secuenciación automática de los moluscos proporcionado por el Servicio Central de Secuenciación para la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia (Dra. A. Martínez).

Bibliografía

1. Mas-Coma S. Human fascioliasis. En: Cotruvo JA, Dufour A, Rees G, Bartram J, Carr R, Cliver DO, Craun GF, Fayer R, Gannon VPJ (ed). World Health Organization (WHO), *Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control*. London, UK: IWA Publishing, 2004:305-22.
2. Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int J Parasitol* 2005; 35:1255-78.
3. Mas-Coma S, Bargues MD. Human liver flukes: a review. *Res Rev Parasitol* 1997;57(3-4):145-218.
4. Chen MG, Mott KE. Progress in assessment of morbidity due to Fasciola hepatica infection: a review of recent literature. *Trop Dis Bull* 1990;87(4):R1-R38.
5. Mas-Coma S, Esteban JG, Bargues MD. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bull WHO* 1999;77(4):340-6.
6. Mas-Coma S, Bargues MD, Esteban JG. Human Fasciolosis. En: Dalton JP (ed). *Fasciolosis*. Wallingford, Oxon, UK: CAB International Publishing 1999:411-34.
7. Mas-Coma S. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *J Helminthol* 2005;79(3):207-16.
8. Mas-Coma S, Bargues MD, Marty AM, Neafie AM. Hepatic Trematodiasis. En: Meyers WM, Neafie RC, Marty AM, Wear DJ (ed). *Pathology of Infectious Diseases, Vol. 1 Helminthiasis*. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology and American Registry of Pathology 2000:69-92.
9. Valero MA, Santana M, Morales M, Hernández JL, Mas-Coma S. Risk of gallstone disease in advanced chronic phase of fascioliasis: an experimental study in a rat model. *J Inf Dis* 2003;188:787-93.
10. Hopkins DR. Homing in on helminths. *Amer J Trop Med Hyg* 1992;46:626-34.
11. Rim, HJ, Farag HF, Sornmani S, Cross JH. Food-borne trematodes: ignored or emerging? *Parasitol Today* 1994;10:207-9.
12. Mas-Coma S, Angles R, Esteban JG, Bargues MD, Buchon P, Franken M, Strauss W. The Northern Bolivian Altiplano: a region highly endemic for human fascioliasis. *Trop Med Int Health* 1999;4(6):454-67.
13. Esteban JG, Flores A, Angles R, Mas-Coma S. High endemicity of human fascioliasis between Lake Titicaca and La Paz valley, Bolivia. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1999;93(2):151-6.
14. Mas-Coma S, Angles R, Strauss W, Esteban JG, Oviedo JA, Buchon P. Human fascioliasis in Bolivia: a general analysis and a critical review of existing data. *Res Rev Parasitol* 1995;55(2):73-93.
15. Esteban JG, González C, Bargues MD, Angles R, Sánchez C, Naquira C, Mas-Coma S. High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation zone in Peru. *Trop Med Int Health* 2002;7(4):339-48.
16. Marcos Raymundo LA, Maco Flores V, Terashima A, Samalvides F, Miranda E, Tantalean M, Espinoza JR, Gotuzzo E. Hiperendemicidad de Fasciolosis humana en el Valle del Mantaro, Perú: factores de riesgo de la infección por Fasciola hepatica. *Rev Gastroenterol Perú* 2004;24:158-64.
17. Mera y Sierra RL. *Distribución de Lymnaeidos en el sistema hidrográfico andino de la provincia de Mendoza, Argentina*. Tesis de Maestría, Master Internacional en Enfermedades Parasitarias Tropicales (XIV Edición). Tutor: M.D. Bargues. Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, 22 Junio 2001:1-46.
18. Oviedo JA, Bargues MD, Mas-Coma S. Lymnaeid snails in the human fascioliasis high endemic zone of the Northern Bolivian Altiplano. *Res Rev Parasitol* 1995;55(1):35-43.
19. Oviedo JA, Bargues MD, Mas-Coma S. The intermediate snail host of Fasciola hepatica on the Mediterranean island of Corsica. *Res Rev Parasitol* 1996;56(4):217-20.
20. Samadi S, Roumegoux A, Bargues MD, Mas-Coma S, Yong M, Pointier JP. Morphological studies of lymnaeid snails from the human fascioliasis endemic zone of Bolivia. *J Moll Stud* 2000;66:31-44.
21. Bargues MD, Vigo M, Horak P, Dvorak J, Patzner RA, Pointier JP, Jackiewicz M, Meier-Brook C, Mas-Coma S. European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Inf Gen Evol* 2001;1(2):85-107.
22. Durand P, Pointier JP, Escoubeyrou K, Arenas JA, Yong M, Amarista M, Bargues MD, Mas-Coma S, Renaud F. Occurrence of a sibling species complex within Neotropical lymnaeids, snail intermediate hosts of fascioliasis. *Acta Trop* 2002;83(3):233-40.
23. Pointier JP, Cazzaniga NJ, González-Salas C, Gutiérrez A, Arenas JA, Bargues MD, Mas-Coma S. Anatomical studies of sibling species within Neotropical lymnaeids snail intermediate hosts of fascioliasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;101(4):431-35.
24. Mera y Sierra RL, Artigas P, Abraham C, Hynes V, González M, Jiménez M, Khoubbane M, Bargues MD, Mas-Coma S. Conchological morphology of lymnaeid molluscs in the endemic zones of fasciolosis in Mendoza province, Argentina. *Acta Parasitol Port* 2005;12(1-2):313-4.
25. Artigas P, Mera y Sierra RL, Correa AP, Morales JR, Zuriaga MA, Jiménez M, Khoubbane M, Bargues MD, Mas-Coma S. Comparison of the conchological morphology of lymnaeid molluscs from eastern and western Andean slopes of the endemic zones of fasciolosis in Argentina and Chile. *Acta Parasitol Port* 2005;12(1-2):243-4.
26. Mera y Sierra RL, Artigas P, Mas-Coma S. Lymnaeid vectors of fascioliasis in endemic areas of Mendoza, Argentina. En: XI International Congress of Parasitology - ICOPA XI, Glasgow, UK, 6-11 August 2006: CD-ROM.
27. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, Vols. I, II & III, 1989:1-1647.
28. Mas-Coma S, Funatsu IR, Bargues MD. Fasciola hepatica and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology* 2001;123:S115-S127.
29. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity and progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 1994;22:4673-80.
30. Ueno H, Arandia R, Morales G, Medina G. Fascioliasis of livestock and snail host for Fasciola in the Altiplano region of Bolivia. *Nat Inst Animal Health Quart* 1975;15:61-7.
31. Bargues MD, Mas-Coma S. Reviewing lymnaeid vectors of fascioliasis by ribosomal DNA sequence analyses. *J Helminthol* 2005;79(3):257-67.
32. Bargues MD, Mas-Coma S. Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. *Mol Biol Evol* 1997;14(5):569-77.
33. Bargues MD, Mangold AJ, Muñoz-Antoli C, Pointier JP, Mas-Coma S. SSU rDNA characterization of lymnaeid snails transmitting human fascioliasis in South and Central America. *J Parasitol* 1997;83(6):1086-92.
34. Bargues MD, Artigas P, Jackiewicz M, Pointier JP, Mas-Coma S. Ribosomal DNA ITS-1 sequence analysis of European stagnicoline Lymnaeidae (Gastropoda). En: Beiträge zur Süßwasser-Malakologie - Festschrift für Claus Meier-Brook und Hans D. Boeters (Glöer P, Falkner G edit.), Helda (Münchner Malakologische Mitteilungen), München 2006;6(1/2):29-40.
35. Meunier C, Tirard C, Hurtrez-Bousses S, Durand P, Bargues MD, Mas-Coma S, Pointier JP, Jourdan J, Renaud F. Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. *Mol Ecol* 2001;10:1333-40.
36. Gonzalez MS, Di Nucci D, Sidoti L, Mera y Sierra RL. Decomiso de hígados de bovinos provenientes de Mendoza en frigorífico debido a Fasciola hepatica. En: XII Jornadas Argentinas de Microbiología, Mendoza, Argentina, Junio 2006:102.
37. Mera y Sierra R, Scibilia C, Pabst A, Irrazabal G, Senar M. Abattoir condemnation of bovine livers due to Fasciola hepatica in Tupungato, Mendoza. En: XXIII Reunión Científica Anual, Sociedad Biológica de Cuyo. *Biocell* 2005;29(3):371.