

***Sarcocystis* sp. en zanates (*Quiscalus mexicanus*), tordos (*Molothrus aeneus*) y gorriones (*Aimophila ruficauda*) de México**

Félix Domingo Sánchez Godoy^{a*}
Fernando Chávez Maya^a
Adriana Méndez Bernal^c
Gary García Espinosa^a
Cristina Guerrero Molina^b
Néstor Ledesma Martínez^a
Elizabeth Morales Salinas^c

^a Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves

^b Departamento de Parasitología

^c Departamento de Patología

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
Universidad Nacional Autónoma de México.
Avenida Universidad 3000, 04510 México, D.F.,
México.

*** Autor para correspondencia:**
Tel: + 52 55 5622 5867 / 5616 6923
Correo electrónico:
spuma91@hotmail.com

Resumen

El objetivo es describir las características morfológicas, ultraestructurales, la reacción en cadena de la polimerasa, el patrón de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP), la secuencia y el análisis filogenético de un fragmento del espacio de transcripción interno (ITS-1). Para ello se usaron los iniciadores 25/396 de *Sarcocystis* sp. detectados en el músculo de zanates, tordos y gorriones de México. Se estudiaron 15 aves con sarcocistosis en el músculo esquelético: siete zanates (*Quiscalus mexicanus*), seis tordos (*Molothrus aeneus*) y dos gorriones (*Aimophila ruficauda*). En la histopatología se observaron quistes parasitarios maduros de pared delgada. Ultraestructuralmente la pared de los quistes consiste de una capa granular con protrusiones "vilares" con microtúbulos. Los bradizoitos miden 4.1 X 1.6 µm y los micronemas aparecieron en el tercio anterior del conoide. Para la identificación molecular, se realizó PCR-RFLP utilizando un fragmento específico del ITS-1 amplificado con los iniciadores 25/396 y digerido con la enzima *Hinf* I. El fragmento no presentó sitio de corte para *Hind* III. Las secuencias obtenidas de *Sarcocystis* de las tres diferentes especies de aves presentaron una similitud de 100% entre ellas; cuando estas secuencias se compararon con la base de datos (GenBank) se encontró 96% de similitud con secuencias de *S. neurona*. El análisis filogenético mostró que las secuencias en estudio presentaron una topología distinta a las secuencias consignadas para *S. neurona* en los Estados Unidos de América y en América del Sur, y no estaban relacionadas con ningún grupo previamente reportado. Aunque la morfología y el análisis molecular sugieren ampliamente, que se trata de *S. neurona* y que estas aves pueden ser huéspedes intermediarios de estos parásitos, es necesario llevar a cabo estudios moleculares con fragmentos de DNA adicionales, combinados con pruebas biológicas, para identificar por completo a este parásito. Este es el primer reporte de *Sarcocystis* sp. en aves silvestres en México y podría tratarse de *S. neurona*.

Palabras clave: *Sarcocystis*; *Sarcocystis neurona*; *Quiscalus mexicanus*; *Molothrus aeneus*; *Aimophila ruficauda*; Histopatología; Ultraestructura; PCR-RFLP; Análisis filogenético.

Recibido: 2014-06-08

Aceptado: 2014-11-21

Publicado: 2014-12-05

Información y declaraciones adicionales
en la página 11

© Derechos de autor:

Félix Domingo Sánchez Godoy et al. 2014

acceso abierto 



Distribuido bajo una Licencia Creative Commons
Atribución 4.0 Internacional (CC-BY 4.0)

Introducción

Los parásitos del género *Sarcocystis* son protozoarios del phylum Apicomplexa que afectan a mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces (Munday *et al.*, 1979; Bolon *et al.*, 1989; Hillyer *et al.*, 1991; Dubey *et al.*, 2001a; Dubey *et al.*, 2003).

Sarcocystis falcatula es la especie de mayor prevalencia en las aves, que actúa como huésped intermediario, mientras los huéspedes definitivos son los tlacuaches (*Didelphys virginiana* y *Didelphys albiventris*) (Box and Duszynski, 1978; Box and Smith, 1982; Dubey *et al.*, 2000; Dubey *et al.*, 2001b).

Hasta 1995 se pensaba que solo el tlacuache era el huésped definitivo de *S. falcatula*, pero ahora se sabe que es también huésped definitivo de *S. neurona*, *S. speeri* (Fenger *et al.*, 1997; Dubey *et al.*, 1998; Dubey *et al.*, 1999) y *S. lindsayi* (Dubey *et al.*, 2001c). Mansfield *et al.* (2008) hallaron *S. neurona* en tordos cabeza café. Dame *et al.* (1995) encontraron una similitud muy estrecha entre *S. neurona* y *S. falcatula* basados en el análisis del gen 18S del rRNA y sugirieron que se trataba de la misma especie. Sin embargo, estudios biológicos subsecuentes indican que se trata de dos especies diferentes (Marsh *et al.*, 1997a; Dubey and Lindsay, 1998). La tipificación genética mediante diversos métodos ha establecido que *S. neurona* y *S. falcatula* son especies distintas.

Para distinguir *S. neurona* de *Sarcocystis* encontrados en zorillos, mapaches, halcones, coyotes y gatos se utilizaron iniciadores contra el gen SSU rRNA en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (Fenger *et al.*, 1995). En otro estudio, la secuenciación del espacio de transcripción interno 1 (ITS-1) de la región del rRNA mostró que *S. falcatula* puede estar compuesto de una población heterogénea y que puede emplearse la región del ITS-1 para distinguir entre *S. neurona* y *S. falcatula* (Marsh *et al.*, 1999).

Tanhauser *et al.* (1999) aprovecharon el ITS-1 para diseñar iniciadores específicos (25/396) y enzimas de restricción (*Hinf I* y *Hind III*) para desarrollar PCR-polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y diferenciar *S. neurona* de *S. falcatula*. Por otro lado, Elsheikha *et al.* (2005) utilizaron los iniciadores 25/396 del ITS-1 para estudios filogenéticos de *S. neurona* en los Estados Unidos de América.

Se han reportado infecciones por *S. neurona* en una variedad de especies como: gatos (Butcher *et al.*, 2002), mapaches (Dubey *et al.*, 2001d), armadillos (Cheadle *et al.*, 2001a), zorillos (Cheadle *et al.*, 2001b), focas (Miller *et al.*, 2001) y nutrias de mar (Dubey *et al.*, 2003). *Sarcocystis neurona* es causa importante de problemas neurológicos en caballos de Estados Unidos de América (Dubey *et al.*, 1991; MacKay *et al.*, 2000), los cuales se consideran huéspedes aberrantes (Dubey, 2001b); sin embargo, se han observado esquizontes en el cerebro y en la médula espinal y quistes maduros en el músculo esquelético de una yegua de cuatro semanas de edad, por lo que se sugiere que los caballos son huéspedes intermediarios (Mullaney, 2005).

En el 2008 se documentó la presencia de quistes parasitarios de *S. neurona* en el músculo esquelético de tordos (*Molothrus ater*), lo cual sugiere que estas aves pueden ser huéspedes intermediarios (Mansfield *et al.*, 2008). En México no se encontraron datos sobre la presencia de *S. neurona* en aves, pero Yeargan *et al.* (2013) encontraron una seroprevalencia de 48.5% a *S. neurona* en caballos del norte de México.

El objetivo de este trabajo fue describir las características morfológicas, ultraestructurales, de PCR-RFLP, su secuenciación y el análisis filogenético de un fragmento específico del espacio de transcripción interno 1 (ITS-1), el cual se amplificó utilizando los iniciadores 25/396 de *Sarcocystis* sp. encontrados en el músculo de zanates, tordos y gorriones de México y que podrían ser *S. neurona*.

Material y métodos

Quince aves silvestres (siete zanates [*Quiscalus mexicanus*], seis tordos [*Molothrus aeneus*] y dos gorriones [*Aimophila ruficauda*]) se encontraron muertas con sospecha de intoxicación, en el estado de Morelos, México, y se remitieron al Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en enfermedades de las aves del Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de la Facultad de Medicina y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Durante la necropsia se hallaron quistes parasitarios en las masas musculares.

Necropsia e histopatología

A todas las aves se les realizó la necropsia y se tomaron muestras de músculo que se fijaron en formalina buferada al 10%. Las muestras se procesaron por la técnica histológica de rutina, se cortaron a 4 µm de grosor, se metieron en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E).

Microscopía electrónica

Secciones de 3 mm² de músculo estriado esquelético de zanate con quistes parasitarios se fijaron en glutaraldehído al 2.5%, se fijaron posteriormente con tetraóxido de osmio al 1% por 2 horas y se lavaron con solución amortiguada de cacodilatos (pH de 7.2, 0.1 M). Después se deshidrataron con concentraciones ascendentes de acetona, se incluyeron en resinas epóxicas (Epón 812, Electron Microscopy Sciences, Industry Road Hatfield, PA) y se polimerizaron a 60°C por 24 horas.

Entonces se obtuvieron cortes semifinos de 200 µm de grosor con un ultramicrotomo y se montaron en laminillas, las cuales se contrastaron con azul de toluidina (Hayat, 2000). En seguida se realizaron cortes finos de 60 µm, los cuales se montaron en rejillas de cobre y finalmente se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, los cuales se observaron en un microscopio electrónico (Zeiss EM-900, Zeiss, Oberkochen, Germany) a 80 kV.

Extracción del ADN

Para la extracción del ADN de los parásitos, las muestras de músculo con quistes parasitarios se maceraron y se preparó una suspensión con PBS al 20%. De esta suspensión se tomaron 250 µl, se mezclaron con 250 µl de solución de lisis (EDTA-SDS-Tris HCL; GibcoBRL Grand Island NY, USA) y 25 µl de proteinasa K (20 mg/ml; Fermentas Inc., Glen Burnie, MD, USA).

Las muestras se incubaron en baño húmedo a 37 °C por 2 horas; a continuación, el ADN se purificó por medio de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico y después se precipitó con etanol y se hidrató.

Reacción en cadena de la polimerasa, PCR

Para la detección de *S. falcatula* o *S. neurona* se utilizaron los iniciadores: 25 5'-CAC ACA AAA CAC CTG AAA GTC ACG TAC TT-3' y 396 5'-CCT GCC TCA CTT CGA CAC AT 3' (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA), que amplifican un fragmento de 334 pares de bases (pb) del gen del espacio de transcripción interno del ADN ribosomal.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 2 µl de buffer Taq (1X), 0.4 µl de dNTP's (0.2 mM), 1 µl de primer (0.5 mM), 1.2 µl de MgCl₂ (1.5 mM), 1 µl de Triton (0.10 %), 1 µl de Albúmina Sérica Bovina (BSA) (0.015 mg/ml), 0.5 µl de Taq polimerasa (2.5 U/µl; Fermentas Inc. Glen, Burnie, MD, USA), 7.9 µl de agua DEPC y 5 µl de ADN. Las muestras se amplificaron con un termociclador (PCR Sprint Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA). Se inició con un ciclo a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, a 62°C por 30 segundos y a 72°C por 40 segundos, y 1 ciclo a 72°C por 5 minutos. Se tomaron 5 µl del producto de la PCR y se cargaron en un gel de agarosa al 2%. Se analizaron por electroforesis horizontal, teñidos con bromuro de etidio, y se observaron bajo luz ultravioleta.

Secuenciación

El fragmento de aproximadamente 334 pb, amplificado mediante PCR, se visualizó en un gel de agarosa, se recortó y se purificó con el QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones del proveedor. El fragmento purificado se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio; se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler (Fermentas Inc., MD, USA).

La PCR de secuenciación se realizó con el Kit BigDye® Terminator Cycle Sequencing versión 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de secuenciación se purificaron con columnas CENTRI-SEP™ Spin Columns (CS-901, Princeton Separations, Adelphia, NJ, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se leyeron en un 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Foster City, CA, USA). Se utilizaron iniciadores específicos para secuenciar el marcador genético 25/396.

Los electroferogramas (sentido y antisentido) se editaron con el programa MEGA versión 4 (Tamura *et al*, 2007). Se construyó la secuencia consenso para cada una de las muestras y se alinearon las tres secuencias obtenidas: *Aimophila ruficauda* (G1), *Molothrus aeneus* (T1) y *Quiscalus mexicanus* (Z5).

Análisis filogenético

En el análisis filogenético se utilizaron las secuencias del marcador genético 25/396, obtenidas de las muestras G1, T1 y Z5, además de las secuencias obtenidas del GenBank. Las secuencias se alinearon y se obtuvieron las distancias genéticas mediante el método Kimura 2, parámetros (K-2P). A partir de estas distancias

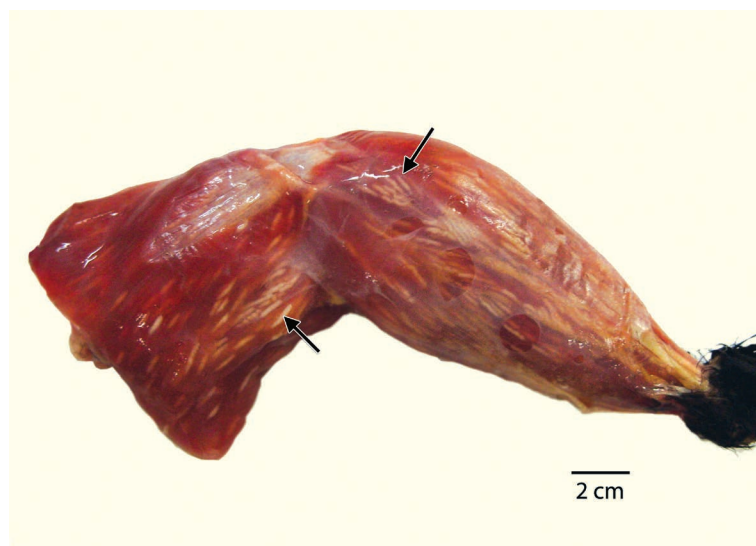


Figura 1. Músculo esquelético de muslo y pierna con abundante cantidad de estructuras parasitarias de *Sarcocystis* (flechas). Los quistes son de color blanco, ondulados y están orientados sobre el eje longitudinal del músculo.

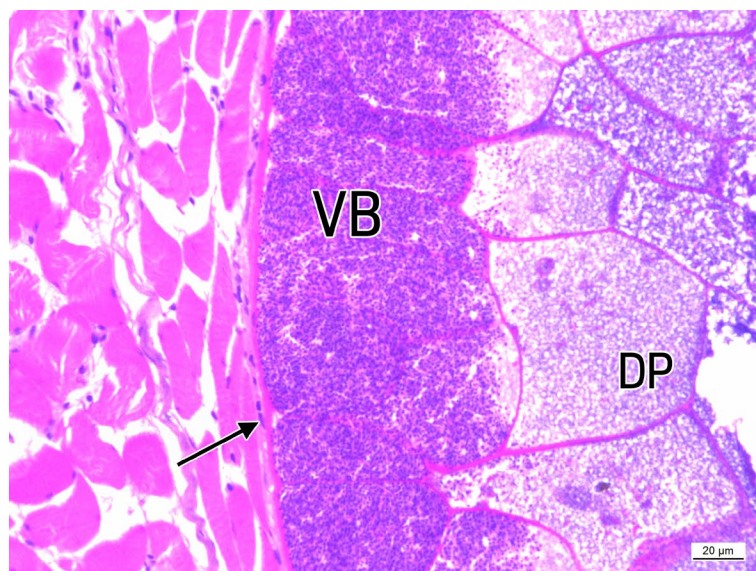


Figura 2. Corte histológico (tinción de H&E) de músculo esquelético de un zanate con un quiste maduro de *Sarcocystis* dentro de las miofibrillas y sin reacción inflamatoria. Los quistes tienen una pared eosinofílica (flecha) y contienen gran cantidad de bradizoítos viables (VB) y en su parte central se observan protozoarios degenerados (DP).

se construyó un árbol filogenético con el método de Neighbor-Joining (NJ). Se empleó un soporte Bootstrap (1,000 replicas) para los resultados del análisis NJ de los datos generados a partir de la alineación de múltiples secuencias.

RFLP

El fragmento de aproximadamente 334 pb que se observó en el gel de agarosa, se incubó con las enzimas de restricción *Hinf I* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y *Hind III* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) bajo las siguientes condiciones: 10 µl del producto de PCR, 3 µl de buffer, 1 µl de enzima (*Hinf I* o *Hind III*) y 16 µl de agua DEPC. Las muestras se incubaron por 12 horas en baño húmedo a 37 °C. Posteriormente, 15 µl de la reacción teñida con bromuro de etidio se procesaron por electroforesis en gel de agarosa al 3% y se observó bajo luz ultravioleta.

Resultados

En la necropsia todas las aves mostraron buena condición corporal y quistes parasitarios intramusculares en el músculo estriado de la pechuga, alas y piernas. Los quistes eran de color blanco, alargados, ligeramente ondulados y sus dimensiones oscilaban entre 0.3 y 0.5 cm de largo (Figura 1). El resto de los órganos examinados no mostró cambios patológicos aparentes.

Al examen microscópico, las secciones de tejido muscular de las 15 aves presentaron múltiples estructuras quísticas de forma redonda (20 a 200 µm), alargada (100 a 4000 µm), de pared delgada continua (menos de 2 µm), provocando la compresión excéntrica de las miofibrillas. En su interior, los *Sarcocystis* contenían una abundante cantidad de bradizoítos, que en algunas zonas se encontraban separados por septos.

En la parte central de los quistes de mayor tamaño se advirtió la presencia de material amorfo acelular, eosinofílico, pálido, que correspondía a protozoarios degenerados (Figura 2). En tres zanates, de manera multifocal, alrededor de algunos quistes se encontraron agregados discretos de células inflamatorias compuestas por linfocitos y células plasmáticas.

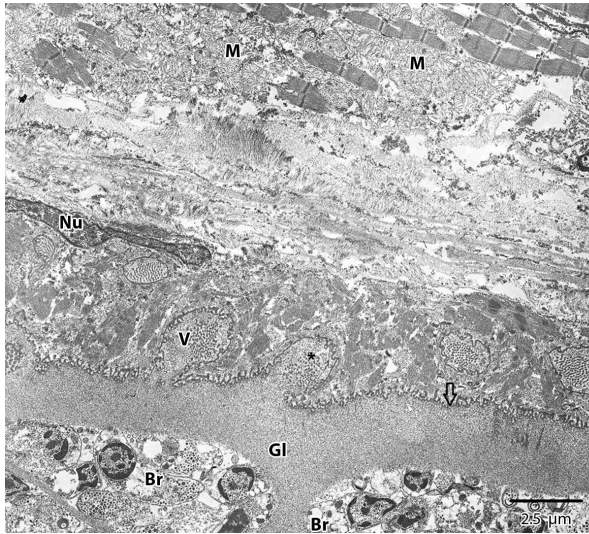


Figura 3. Fotografía electrónica de transmisión de un músculo estriado esquelético, cuyo sarcoplasma exhibe un quiste con gruesa pared moderadamente electrolúcida (sustancia basal electrolúcida, GI), con proyecciones irregulares (protusión vilares, V) que muestran microtúbulos (*) en el interior. En el interior del quiste se aprecian numerosos bradizoítos (Br). La membrana parasitaria exhibe múltiples protuberancias (flecha). Adyacente a la pared del quiste se observan los sarcómeros distorsionados, así como numerosas mitocondrias (M). Núcleo (Nu). Técnica de contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo. Aumento 7000x.

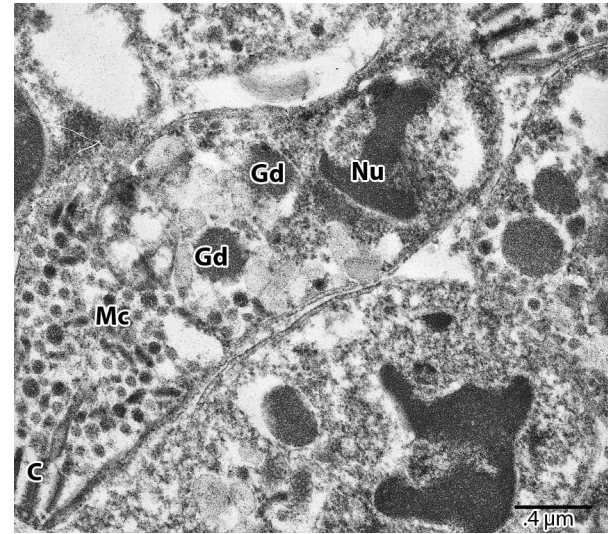


Figura 4. Fotografía electrónica de transmisión de un bradizoíto en corte longitudinal. Nótese el conoide (C) y numerosos micronemas (Mc). Anterior al núcleo se aprecian cuerpos redondos de moderada electrodensidad que corresponden a gránulos densos (Gd) entremezclados con gránulos electrolúcidos (cuerpos lipídicos, CI). El núcleo se ubica en la parte posterior del conoide y presenta abundante heterocromatina electrodensa (Nu). Técnica de contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo. Aumento 12,000x.

Microscopía electrónica

Las secciones de músculo estriado esquelético exhibían en el sarcoplasma quistes parasitarios de pared gruesa, consistente en una capa granular con protrusiones "vilares" que contenían numerosos microtúbulos electrodensos, extendidos desde la punta hasta la base y en la capa granular subyacente.

Los quistes parasitarios exhibían, por debajo de su pared, algunos merozoítos electrolúcidos, mientras que hacia la parte central, había numerosos bradizoítos maduros agrupados y separados por prolongaciones de la capa granular. Los bradizoítos medían 4.1 µm de largo por 1.6 µm de ancho y exhibían numerosos micronemas que ocupaban el tercio anterior de la parte final del conoide. Los núcleos eran en su mayoría redondos, con abundante heterocromatina electrodensa adosada a la envoltura nuclear interna y en ocasiones mostraban un nucléolo prominente (Figuras 3 y 4).

PCR y secuenciación

Mediante los iniciadores 25/396, 11 de las 15 muestras (73%) resultaron positivas: cinco *Quiscalus mexicanus*, cuatro *Molothrus aeneus* y dos *Aimophila ruficauda*.

Las secuencias sentido y antisentido de cada una de las muestras incluidas se editaron y emplearon para construir la secuencia consenso correspondiente y se obtuvieron: 338 pb para la muestra G1, 338 pb para la muestra T1 y 323 pb para la muestra Z5. Se alinearon las tres secuencias y se descubrió que tenían 100%

				111	111	111	122	222	222	223	333	333	333	444	444	444	455	555	555	556	666	666	666
	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789
G1	TCA	CAC	AAA	CAC	TGA	AAG	TCA	CGT	ACT	TAT	GAC	GGA	AAA	GCT	GCG	GTA	AGC	ACG	GGC	CAT	AAT	CAT	CAG
T1
Z5
											111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111
	777	777	777	788	888	888	889	999	999	999	000	000	000	011	111	111	111	112	222	222	222	333	333
	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678
G1	GAG	GAA	CTA	GTT	TGT	CAT	GTT	GTC	CCT	ACA	GAA	CCC	GAT	TCT	GCC	TAG	GCG	CCT	GAC	ACT	CTA	GCA	GAG
T1
Z5
	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	122	222	222
	344	444	444	445	555	555	555	666	666	666	677	777	777	778	888	888	888	999	999	999	900	000	000
	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567
G1	AGT	GAC	GGA	TGG	AGC	AAC	TAA	AAG	GAC	TAA	GAG	TCG	TGC	AAG	TTT	CAT	TCG	GAG	CCA	GGA	GTC	TCA	ATG
T1
Z5
	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222
	001	111	111	111	222	222	222	233	333	333	334	444	444	444	555	555	555	566	666	666	667	777	777
	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456
G1	GAC	ACC	GCT	GCG	ACT	TAA	GAC	CTA	AGT	AGA	GAA	GCT	GGC	GGA	GGT	GAA	ACA	GTA	GAT	TTC	CTC	TTT	GTC
T1
Z5
	222	222	222	222	222	222	222	223	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	33	
	777	888	888	888	899	999	999	990	000	000	000	111	111	111	122	222	222	223	333	333	33	33	
	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	78	78	
G1	GAT	AAC	ACA	GGC	AGC	AAT	CAC	AAG	TGT	AAC	CAT	CGA	ATA	AAT	GTG	TCG	AAG	TGA	GGC	AGG	AG	AG	
T1	
Z5	---	---	---	---	---	---	--	

Figura 5. Alineación de las secuencias obtenidas de un ejemplar de cada una de las especies incluidas en el estudio: *Aimophila ruficauda* (G1), *Molothrus aeneus* (T1) y *Quiscalus mexicanus* (Z5). Las secuencias se editaron y se obtuvieron: 338 pb para G1, 338 pb para T1 y 323 pb para Z5. En la alineación de las tres secuencias se descubrió que estas son 100% idénticas entre ellas.

de similitud (Figura 5). En el caso de la secuencia Z5 no se puede hacer la comparación de los últimos 15 nucleótidos debido a que el fragmento secuenciado tenía un tamaño de 323 pb.

Se compararon las secuencias obtenidas con las secuencias contenidas en la base de datos "BLAST" del GenBank. Entonces, se verificó una similitud de 96% entre las secuencias obtenidas en este estudio y las secuencias correspondientes a los números de acceso del GenBank AY627839, AY627841, AY627842, AY627845, AY627848, AY 627850, AY627851, AY627859, AF093159 y AY627852. Todas las secuencias corresponden a un fragmento del genoma de *Sarcocystis neurona* con excepción de AY627852 (fragmento del genoma de *Toxoplasma gondii*) y AF093159 (fragmento del genoma de *S. falcatula*).

Análisis filogenético y de RFLP

Las secuencias obtenidas presentan 100% de similitud entre ellas. También se ve que las secuencias utilizadas para construir el árbol filogenético están topológicamente más distanciadas y no están relacionadas con ningún grupo previamente reportado. Las distancias filogenéticas entre las secuencias obtenidas en este trabajo, las secuencias reportadas previamente de *Sarcocystis neurona* y la secuencia proveniente de una muestra colectada en Brasil (*Sarcocystis spp.*) son similares (Figura 6).

El patrón de bandas después de la digestión del fragmento de 334 pb de todos los casos positivos con la enzima de restricción *Hinf I* consistió en tres frag-

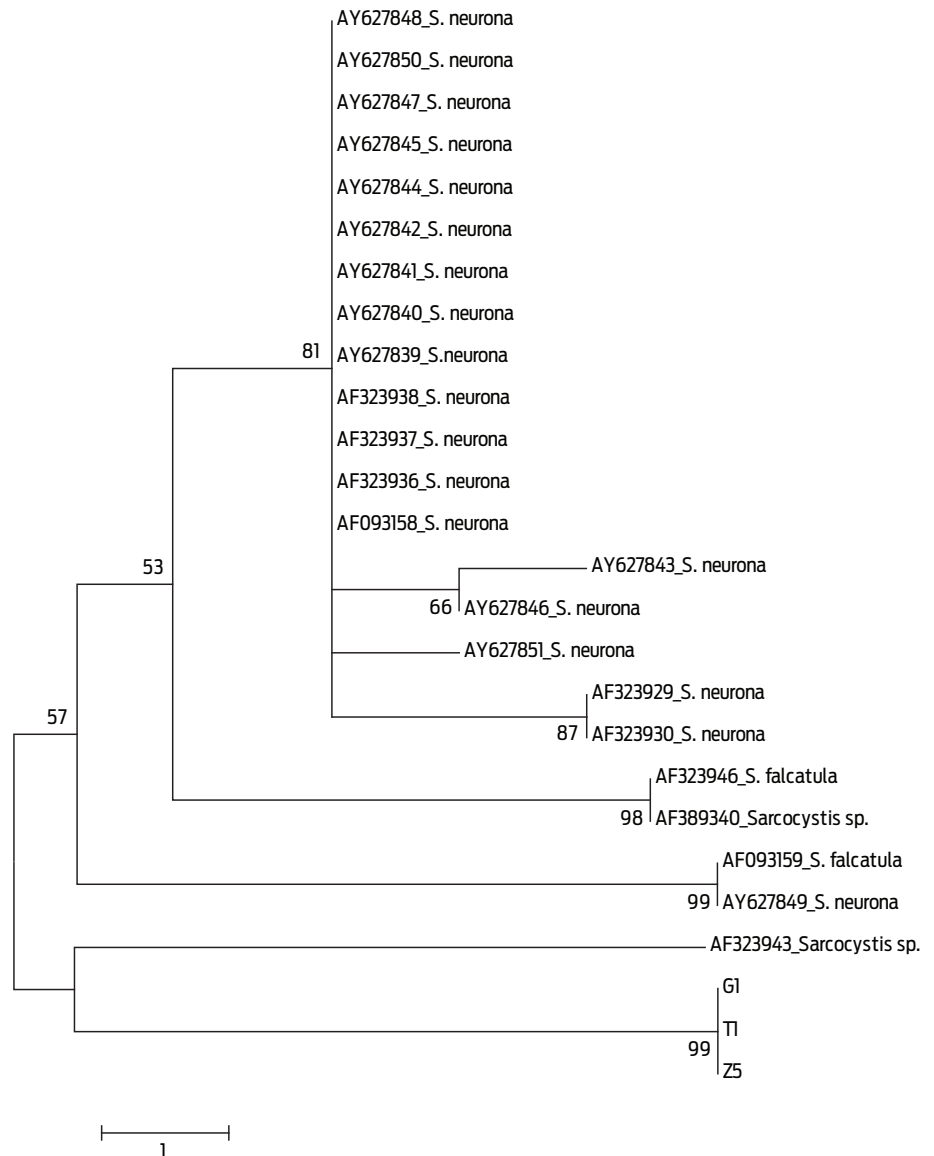


Figura 6. Árbol filogenético (Neighbor-Joining) construido a partir de una matriz de distancias genéticas según el método de Kimura 2 parámetros (1,000 réplicas de Bootstrap). Las secuencias obtenidas son idénticas y están filogenéticamente distanciadas de cualquier secuencia reportada con anterioridad.

mentos de 140, 108 y 62 pb. La digestión con la enzima *Hind III* no afectó el producto de 334 pb (Figura 7).

Discusión

Los *Sarcocystis* se identificaron con facilidad en el músculo estriado. Tenían la pared delgada y medían entre 0.3 y 0.5 cm de largo. Estas observaciones difieren de los análisis realizados por Mansfield *et al.* (2008), en donde se examinaron 381 tordos (*Molothrus ater*) de Estados Unidos de América. Entonces, durante la inspección macroscópica, se encontraron *Sarcocystis* únicamente en las piernas y en el examen histopatológico se hallaron dos tipos de quistes: de pared del-

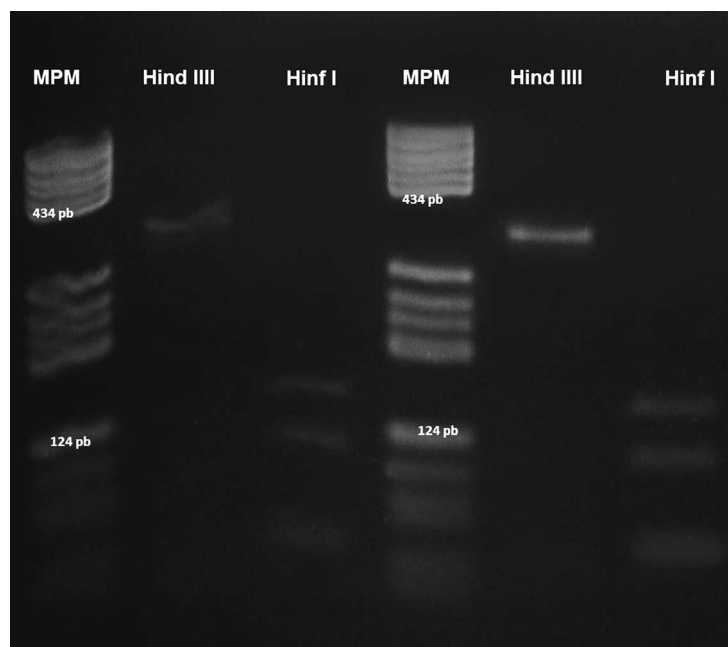


Figura 7. RFLP de *Sarcocystis* sp, fragmento de 334 pb amplificado con los iniciadores 25/396. Las líneas 1 y 4 identifican el marcador de peso molecular PBR322/DNA/BsuRI (HaeIII). Las líneas 2 y 5 representan las muestras de tordo y zanate tratadas con *Hind III* sin digerir y las líneas 3 y 6 corresponden a las muestras de tordo y zanate digeridas con *Hinf I*.

gada y de pared gruesa. Por microscopía electrónica se identificó que los quistes de pared gruesa eran *S. falcatula* y los de pared delgada, *S. neurona*. Esto fue confirmado por PCR-RFLP.

La detección macroscópica de *Sarcocystis* sp. en este estudio se facilitó, probablemente, porque la mayoría de las aves presentaban una infección parasitaria crónica con *Sarcocystis* maduros en las fibras musculares y con bradizoítos degenerados en su interior, como ocurre en las aves infectadas con *S. falcatula*. La presentación puede ser aguda o crónica, dependiendo del ave afectada. La presentación aguda generalmente se observa en psitácidos del viejo mundo y en palomas, lo cual causa alta mortalidad asociada a neumonía y encefalitis, sin que se desarrollen quistes parasitarios. La presentación crónica se observa en paseriformes de América, que son los huéspedes intermediarios; no hay mortalidad y la enfermedad se caracteriza por la formación de quistes parasitarios en los músculos esqueléticos, sin causar reacción inflamatoria (Villar, *et al*, 2008).

La identificación del tipo de *Sarcocystis* en las aves mediante histopatología es subjetiva, ya que en la literatura consultada no se informa sobre el grosor de la pared del quiste de *S. neurona*. Sin embargo,

Dubey *et al.* (2001e) reportan en un ibis (*Carphibis spinicollis*) la presencia de un quiste parasitario maduro en el cerebelo, cuya pared medía aproximadamente 1-1.5 μ m de grosor y que correspondía a *Sarcocystis neurona*-like, similar a los protozoarios descritos en este análisis.

La microscopía electrónica solo se aplicó a los *Sarcocystis* de los zanates, en los que las características ultraestructurales de la pared y de los bradizoítos concuerdan con las descripciones realizadas para *S. neurona* en tordos (Mansfield *et al*, 2008), caballos (Mullaney *et al*, 2005), ratones y cultivo celular (Speer y Dubey, 2001). En las descripciones de estos investigadores se menciona que la característica más importante para identificar ultraestructuralmente a *S. neurona* es la acumulación de micronemas en el tercio anterior del final del conoide y la capa granular con proyecciones "vilares" que contienen numerosos microtúbulos.

Todos estos estudios sugieren que los *Sarcocystis* examinados en los músculos pectorales, piernas y alas de las tres especies de aves (zanates, tordos y gorriónes) son similares a *S. neurona*.

En la identificación molecular de los *Sarcocystis* en los zanates, tordos y gorriónes en este artículo, por medio de la PCR-RFLP (Tanhauser *et al*, 1999) y utilizando los iniciadores 25/396 y las enzimas de restricción *Hinf I* y *Hind III*, se verificó una amplificación positiva de 334 pb. Los fragmentos amplificados presentaron dos sitios de corte con *Hinf I* en las mismas posiciones de las secuencias de *S. neurona*. Mientras que con *Hind III* no se confirmaron cortes sobre la banda de 334 pb. Estos hallazgos son consistentes con el patrón de bandeo de *S. neurona* reportado

en otras investigaciones (Tanhauser *et al.*, 1999; Mansfield *et al.*, 2008; Mullaney *et al.*, 2005 y Elsheikha *et al.*, 2005).

Al alinearse las tres secuencias obtenidas se obtuvo 100% de similitud entre ellas. La semejanza entre las secuencias estudiadas y *S. neurona* fue de 96%. En la secuencia, se detectó un sitio de corte adicional, que no reveló la PCR-RFLP. Los fragmentos generados fueron de aproximadamente 140, 108, 62 y 24 pb. El corte adicional generado por la enzima de restricción *Hinf I* podría deberse a una mutación o inserción de bases, por la evolución genética independiente durante el aislamiento geográfico, como se muestra en el árbol filogenético, en donde las secuencias analizadas se separan topológicamente entre los Estados Unidos de América y América del Sur.

Elsheikha *et al.* (2005) detectaron un resultado similar. Estos estudiosos examinaron las secuencias de los fragmentos 25/396 de diez muestras de *Sarcocystis neurona* aislados y hallaron mutaciones e inserciones de bases, lo cual proporciona evidencia de la presencia de variantes genéticas en estrecha relación con *S. neurona* existentes dentro de los Estados Unidos de América y América del Sur. Monteiro *et al.* (2013) sugieren que es posible que los grupos genéticos de *S. neurona* y *S. falcatula* intercambien alelos altamente divergentes en la recombinación sexual.

Sin embargo, debido a que la secuencia del marcador 25/396 entre los protozoarios apicomplexa (*Sarcocystis neurona*, *S. falcatula*, *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*) se encuentra altamente conservada, es posible cometer errores en la interpretación de las relaciones filogenéticas. Este hallazgo enfatiza la importancia de la utilización de varios marcadores genéticos para un análisis filogenético preciso. Además, estos estudios de ADN deben completarse con estudios biológicos, porque, por ejemplo, los ratones son más susceptibles a *S. neurona*, pero son resistentes a *S. falcatula* (Dubey, Lindsay, 1998), mientras que los periquitos australianos son susceptibles a *S. falcatula* y no les afecta *S. neurona* (Marsh *et al.*, 1997b).

Conclusiones

La morfología, ultraestructura y características de la PCR-RFLP sugieren que los quistes parasitarios encontrados en las aves estudiadas son *S. neurona*. Sin embargo, en el árbol filogenético las secuencias se comportaron topológicamente distantes de las secuencias publicadas de *S. neurona* de los Estados Unidos de América y de América del Sur, lo cual sugiere que podría tratarse de una nueva subespecie de *S. neurona*.

Financiamiento

Los recursos económicos para esta investigación provinieron del Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Sr. Alfredo A. Díaz Estrada por su ayuda con la histología y a Emmanuel V. Ortega Martínez por el apoyo fotográfico.

Conflictos de interés

Gary García Espinosa es el jefe del Departamento de Medicina y Zootecnia, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Los demás autores declaran no tener conflictos de interés.

Contribución de los autores

Félix Domingo Sánchez Godoy: Diseño la investigación y escribió el artículo.

Fernando Chávez Maya y Adriana Méndez Bernal: Aportaron nuevos reactivos y técnicas analíticas.

Gary García Espinosa y Elizabeth Morales Salinas: Analizaron los datos y escribieron el artículo.

Cristina Guerrero Molina y Néstor Ledesma Martínez: Analizaron la información.

Referencias

- 1) Bolon B, Greiner EC, Mays MB. 1989. Microscopic features of *Sarcocystis falcatula* in skeletal muscle from a Patagonian conure. *Veterinary Pathology* 26:282-284.
- 2) Box ED, Duszynski DW. 1978. Experimental transmission of *Sarcocystis* from icterid birds to sparrows and canaries by sporocysts from the opossum. *Journal of Parasitology* 64:682-688.
- 3) Box ED, Smith JH. 1982. The intermediate host spectrum in a *Sarcocystis* species of birds. *Journal of Parasitology* 68:668-673.
- 4) Butcher M, Lakritz J, Halaney A, Branson K, Gupta GD, Kreeger J, Marsh AE. 2002. Experimental inoculation of domestic cats (*Felis domesticus*) with *Sarcocystis neurona* or *S. neurona*-like merozoites. *Veterinary Pathology* 107:1-14.
- 5) Cheadle MA, Tanhauser SM, Dame JB, Sellon DC, Hines M, Ginn PE, MacKay RJ, Greiner EC. 2001a. The nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) is an intermediate host for *Sarcocystis neurona*. *International Journal for Parasitology* 31:330-335.
- 6) Cheadle MA, Yowell CA, Sellon DC, Hines M, Ginn PE, Marsh AE, MacKay RJ, Dame JB, Greiner EC. 2001b. The striped skunk (*Mephitis mephitis*) is an intermediate host for *Sarcocystis neurona*. *International Journal for Parasitology* 31:843-849.
- 7) Dame JB, MacKay RJ, Yowell CA, Cutler TJ, Marsh A, Greiner EC. 1995. *Sarcocystis falcatula* from passerine and psittacine birds: Synonymy with *Sarcocystis neurona*, agent of equine protozoal myeloencephalitis. *Journal of Parasitology* 81:930-935.
- 8) Dubey JP, Lindsay DS. 1998. Isolation in immunodeficient mice of *Sarcocystis neurona* from opossum (*Didelphis virginiana*) faeces, and its differentiation from *Sarcocystis falcatula*. *International Journal for Parasitology* 28:1823-1828.
- 9) Dubey JP, Davis SW, Speer CA, Bowman DD, De Lahunta A, Granstrom DE, Topper MJ, Hamir AN, Cummings JF, Suter MM. 1991. *Sarcocystis neurona* n. sp. (Protozoa: Apicomplexan), the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. *Journal of Parasitology* 77:212-218.

- 10) Dubey JP, Johnson GC, Bermudez A, Suedmeyer KW, Fritz DL. 2001e. Neural Sarcocystosis in a Straw-necked Ibis (*Carphibis spinicollis*) associated with a *Sarcocystis neurona*-like organism and description of muscular *Sarcocystis* of an unidentified *Sarcocystis* species. *Journal of Parasitology* 87:1317-1322.
- 11) Dubey JP, Lindsay DS. 1999. *Sarcocystis speeri* n. sp. (Protozoa: Sarcocystidae) from the opossum (*Didelphis virginiana*). *Journal of Parasitology* 85:903-909.
- 12) Dubey JP, Lindsay DS, Rosenthal BM, Kerber CE, Kasai N, Pena HF, Kwok OC, Shen SK, Gennari SM. 2001b. Isolates of *Sarcocystis falcatula*-like organisms from South American opossums *Didelphis marsupialis* and *Didelphis albiventris* from Sao Paulo, Brazil. *Journal of Parasitology* 87:1449-1453.
- 13) Dubey JP, Lindsay DS, Saville WJ, Reed SM, Granstrom DE, Speer CA. 2001a. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Veterinary Parasitology* 95:89-131.
- 14) Dubey JP, Lindsay DS, Venturini L, Venturini C. 2000. Characterization of *Sarcocystis falcatula* isolates from the Argentinian opossum, *Didelphis albiventris*. *Journal Eukaryotic Microbiology* 47:260-263.
- 15) Dubey JP, Rosenthal BM, Speer CA. 2001c. *Sarcocystis lindsayi* n. sp. (Protozoa: Sarcocystidae) from the South American opossum, *Didelphis albiventris* from Brazil. *Journal Eukaryotic Microbiology* 48:595-603.
- 16) Dubey JP, Saville WJ, Stanek JF, Lindsay DS, Rosenthal BM, Oglesbee MJ, Rosypal AC, Njoku CJ, Stich RW, Kwok OC, Shen SK, Hamir AN, Reed SM. 2001d. *Sarcocystis neurona* infections in raccoons (*Procyon lotor*): evidence for natural infection with sarcocysts, transmission of infection to opossums (*Didelphis virginiana*), and experimental induction of neurologic disease in raccoons. *Veterinary Parasitology* 100:117-129.
- 17) Dubey JP, Speer CA, Lindsay DS. 1998. Isolation of a third species of *Sarcocystis* in immunodeficient mice fed feces from opossums (*Didelphis virginiana*) and its differentiation from *Sarcocystis falcatula* and *Sarcocystis neurona*. *Journal of Parasitology* 84:1158-1164.
- 18) Dubey JP, Zarnke R, Thomas NJ, Wong SK, Van Bonn W, Briggs M, Davis JW, Ewing R, Mense M, Kwok OC, Romand S, Thulliez P. 2003. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Veterinary Parasitology* 116:275-296.
- 19) Elsheikha MH, Murphy JA, Mansfield SL. 2005. Phylogenetic congruence of *Sarcocystis neurona* Dubey et al, 1991 (Apicomplexa: Sarcocystidae) in the United States based on sequence analysis and restriction fragment length polymorphism (RFLP). *Systematic Parasitology* 61:191-202.
- 20) Fenger CK, Granstrom DE, Langemeier JL, Stamper S, Donahue JM, Patterson JS, Gajadhar AA, Marteniuk JV, Xiaomin Z, Dubey JP. 1995. Identification of opossums (*Didelphis virginiana*) as the putative host of *Sarcocystis neurona*. *Journal of Parasitology* 81:916-919.
- 21) Fenger CK, Granstrom DE, Gajadhar AA, Williams NM, McCrillis SA, Stamper S, Langemeier JL, Dubey JP. 1997. Experimental induction of equine protozoal myeloencephalitis in horses using *Sarcocystis* spp. from the opossum. *Veterinary Parasitology* 68:199-213.
- 22) Hayat M. 2000. *Principles and techniques of electron microscopy. biological applications*. 4th ed. Cambridge, USA: Cambridge University Press.

- 23) Hillyer EV, Anderson MP, Greiner EC, Atkinson CT, Frenkel JK. 1991. An outbreak of *Sarcocystis* in a collection of psittacines. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 22:434-445.
- 24) MacKay RJ, Granstrom DE, Saville WJ, Reed SM. 2000. Equine protozoal myeloencephalitis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 16:405-425.
- 25) Mansfield LS, Mehler S, Nelson K, Elsheikha HM, Murphy AJ, Knust B, Tanhauser SM, Gearhart PM, Rossano MG, Bowman DD, Schott HC, Patterson JS. 2008. Brown-headed cowbirds (*Molothrus ater*) harbor *Sarcocystis neurona* and act as intermediate host. *Veterinary Parasitology* 153:24-43.
- 26) Marsh AE, Barr BC, Lakritz J, Nordhausen R, Madigan JE, Conrad PA. 1997a. Experimental infection of nude mice as a model for *Sarcocystis neurona*-associated encephalitis. *Parasitology Research* 83:706-711.
- 27) Marsh AE, Barr BC, Tell L, Bowman DD, Conrad PA, Ketcherside C, Green T. 1999. Comparison of the internal transcribed spacer, ITS-1, from *Sarcocystis falcatula* isolates and *Sarcocystis neurona*. *Journal of Parasitology* 85:750-757.
- 28) Marsh AE, Barr BC, Tell L, Koski M, Greiner E, Dame J, Conrad PA. 1997b. *In vitro* cultivation and experimental inoculation of *Sarcocystis falcatula* and *Sarcocystis neurona* merozoites into budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Journal of Parasitology* 83:1189-1192.
- 29) Miller MA, Sverlow K, Crosbie PR, Barr BC, Lowenstine LJ, Gulland FM, Packham A, Conrad PA. 2001. Isolation and characterization of two parasitic protozoa from a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*) with meningoencephalomyelitis. *Journal of Parasitology* 87:816-822.
- 30) Monteiro RM, Keid LB, Richtzenhain LJ, Valadas SY, Muller G, Soares RM. 2013. Extensively variable surface antigens of *Sarcocystis* spp. infecting Brazilian marsupials in the genus *Didelphis* occur in myriad allelic combinations, suggesting sexual recombination has aided their diversification. *Veterinary Parasitology* 196:64-70.
- 31) Mullaney T, Murphy AJ, Kiupel M, Bell JA, Rossano MG, Mansfield LS. 2005. Evidence to support horses as natural intermediate hosts for *Sarcocystis neurona*. *Veterinary Parasitology* 133:27-36.
- 32) Munday BL, Hartley WJ, Harrigan KE, Presidente PJ, Obendorf DL. 1979. *Sarcocystis* and related organisms in Australian wildlife: II. Survey findings in birds, reptiles, amphibians and fish. *Journal of Wildlife Diseases* 15:57-73.
- 33) Speer CA, Dubey JP. 2001. Ultrastructure of schizonts and merozoites of *Sarcocystis neurona*. *Veterinary Parasitology* 95:263-271.
- 34) Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- 35) Tanhauser SM, Yowell CA, Cutler TM, Greiner EC, Mackay RJ, Dame JB. 1999. Multiple DNA markers differentiate *Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis falcatula*. *Journal of Parasitology* 85:221-228.
- 36) Villar D, Kramer M, Howard L, Hammond E, Cray C, Latimer K. 2008. Clinical presentation and pathology of *Sarcocystosis* in psittaciform birds: 11 cases. *Avian Diseases* 52:187-194.
- 37) Yeargan MR, Alvarado-Esquivel C, Dubey JP, Howe DK. 2013. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* and *Neospora hughesi* in horses from Mexico. *Parasite* 20, 29. <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2013029> [published: September 10th].