

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Identificación molecular de los estadios de plerocercarioide y adulto de *Diphyllbothrium* sp. obtenidos de humanos, lobos marinos y peces**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en  
Biología

Bachiller Aarón Maguín Mondragón Martínez

Lima, Perú

2017

## *DEDICATORIA*

A mis abuelitos Pedro y Lola  
por el cariño y amor que me dan.

A mis padres Maguín, Rosa y a  
mi hermano Zamir por el  
apoyo incondicional.

# AGRADECIMIENTOS

A la persona más importante de mi vida a mi mamá la Dra. Rosa Martínez Rojas un gran profesional ejemplo de biólogo investigador que quiero llegar a ser algún día.

Al Dr. Manuel Tantaleán por ser un gran maestro y guía desde que empezó este estudio, ejemplo a seguir.

A mi Director de Tesis Pablo Londoño Bailon por su paciencia, instrucción y depositar su confianza para la realización de este trabajo.

A mi asesora interna, profesora Dra. Lidia Cruz Neyra por aceptarme como tesista.

A los profesionales del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP) del área de investigación DIDITT (Dirección de Investigación, Desarrollo, Innovación Y Tránsito Tecnológico) por permitirme desarrollar el proyecto en las instalaciones y por las facilidades brindadas.

A los co-investigadores y amigos, Roxana, Enrique y Katherine parte del proyecto titulado "Identificación molecular de especies de *Diphyllbothrium* en peces de mayor índice de consumo en el Perú" Convenio N° 215-2015-FONDECYT, por el apoyo en todo el trayecto de mi tesis.

## RESUMEN

La difilobotriosis es una zoonosis causada por la ingestión accidental de la larva pleroceroide de *Diphyllobothrium*, familia Diphylobothridae, que se encuentra enquistada o libre en la superficie visceral de los peces teleósteos marinos, considerados hospederos paraténicos o intermediarios. El presente trabajo tuvo como objetivo identificar molecularmente los estadios de pleroceroide y adulto de *Diphyllobothrium* sp. obtenidos de humanos, lobos marinos y peces en el Perú. Se muestrearon 3668 ejemplares de *Engraulis ringens* "anchoveta", 22 de *Sciaena deliciosa* "lorna", 6 de *Sciaena callaensis* "lorna grande", 6 de *Trachurus symmetricus murphyi* "jurel" frescas y congeladas en diferentes periodos estacionales, adquiridos de diferentes Puertos del Norte (Chiclayo), Centro (Lima) y Sur (Ica) de la costa peruana. Los especímenes adultos de *Otaria byronia* se obtuvieron de Barranca y Huacho (Lima) y tres aislados de humanos. Para la extracción del ADN genómico de los estadios larvario y adulto, se utilizó el Kit de extracción de ADN de tejidos siguiendo el protocolo del fabricante. La calidad de las muestras de ADN se evaluó por electroforesis; la concentración y pureza por espectrofotometría utilizando un Nanodrop 2000. Se amplificó el ADNmt parasitario mediante PCR utilizando el gen *cox1* de las larvas plerocercoides y adultos. Las pruebas moleculares revelaron la presencia de *Adenocephalus pacificus* (= *Diphyllobothrium pacificum*) en las muestras de adultos (3 de humanos y 2 de *O. byronia*) y cinco plerocercoides. Se reporta por primera vez la presencia de la larva pleroceroide de *A. pacificus* en *Engraulis ringens* "anchoveta", siendo un probable 2° hospedero intermediario. Se demuestra que los proglótidos grávidos del estadio adulto y el escólex de la larva pleroceroide presentan una alta plasticidad morfológica. Por vez primera se identifica mediante el marcador molecular *cox1* a dos aislados de *O. byronia* como *A. pacificus*. De acuerdo a las inferencias filogenéticas basadas en el gen *cox1*, se determinó que los adultos y cinco larvas plerocercoides

corresponden a *A. pacificus*. Dos larvas plerocercoides se ubicaron en un clado hermano de *Diphyllbothrium*.

Palabras clave: Diphyllbothriidae, *Adenocephalus pacificus*, larva plerocercoides, gen *cox1*, PCR, Perú.

## ABSTRACT

Diphyllobothriasis is a zoonosis caused by the accidental ingestion of *Diphyllobothrium* plerocercoid larvae, Diphylobothridae family, which is found to be cystic or free in the visceral surface of marine teleost fish, considered as paratenic hosts or intermediates. The aim of the present work was to identify molecularly the stages of plerocercoid larvae and adult *Diphyllobothrium* sp. obtained from humans, sea lions and fish in Peru. Twenty-two specimens of *Sciaena deliciosa* "lorna", 6 of *Sciaena callaensis* "big lorna", 6 of *Trachurus symmetricus murphyi* "mackerel" and 3668 of *Engraulis ringens* "anchoveta" were sampled fresh and frozen in different seasonal periods acquired from different Northern Ports (Chiclayo), Centro (Lima) and South (Ica) of the Peruvian coast. The adult specimens of *Otaria byronia* were obtained from Barranca and Huacho (Lima) and three human isolates. For the extraction of genomic DNA from the larvae and adult stages, the tissue DNA extraction kit was used following the manufacturer's protocol. The quality of the DNA samples was evaluated by electrophoresis; Concentration and purity by spectrophotometry using a Nanodrop 2000. Parasitic mtDNA was amplified by PCR using the *cox1* gene of the stages of larvae and adults. Molecular tests revealed the presence of *Adenocephalus pacificus* (= *Diphyllobothrium pacificum*) in adult samples (3 human and 2 *O. byronia*) and five plerocercoids. The presence of *A. pacificus* plerocercoid larvae in *Engraulis ringens* "anchoveta" is reported for the first time, being a probable 2<sup>nd</sup> intermediate host. It is demonstrated that the pregnant proglottids of the adult stage and the scolex of the plerocercoid larva have a high morphological plasticity. For the first time, the molecular marker *cox1* is identified as two isolates of *O. byronia* as *A. pacificus*. According to phylogenetic inferences based on the *cox1* gene, it was determined that adults and five plerocercoid larvae correspond to *A. pacificus*. Two plerocercoid larvae were located in a sister clade of *Diphyllobothrium*.

Key words: Diphyllbothriidae, *Adenocephalus pacificus*, plerocercoid larvae, *cox1* gene, PCR, Peru.

# INDICE

AGRADECIMIENTOS .....	3
RESUMEN .....	4
ABSTRACT .....	6
INDICE .....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
ÍNDICE DE TABLAS .....	12
I. INTRODUCCIÓN .....	13
1.1. Planteamiento del problema.....	14
1.2. Formulación del problema .....	15
1.3. Justificación .....	16
1.4. OBJETIVOS .....	17
1.4.1. OBJETIVO GENERAL.....	17
1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
II. MARCO TEÓRICO .....	19
2.1. Difilobotriosis.....	19
2.2. Agente etiológico.....	20
2.2.1. Características morfológicas básicas .....	20
2.2.2. Ciclo de vida .....	21
2.2.3. Distribución geográfica.....	22
2.2.4. Prevalencia .....	23
2.3. Clasificación taxonómica.....	24
2.4. Diagnóstico.....	25
2.4.1. Importancia de un diagnóstico específico.....	25
2.4.2. Diagnóstico morfológico.....	26
2.4.3. Diagnóstico molecular .....	26
2.5. Importancia clínica.....	27
2.6. Control y prevención .....	28
2.7. Hospederos .....	29
2.7.1. <i>Engraulis ringens</i> “Anchoveta peruana o anchoveta” .....	29



2.7.2.	Sciaena deliciosa "lorna" y Sciaena callaensis "lorna grande"	31
2.7.3.	Trachurus symmetricus murphyi "juel"	32
2.7.4.	Otaria byronia (=Otaria flavescens) "lobo chusco" o "león marino de Sudamérica"	33
III.	ANTECEDENTES	35
IV.	HIPÓTESIS	38
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	39
5.1.	Lugar de ejecución	39
5.2.	Tipo y diseño metodológico	39
5.3.	Variables	39
5.4.	Operacionalización de las variables	40
5.5.	Muestreo	40
5.6.	Procedimiento y análisis de datos	41
5.6.1.	Obtención de la larva y adulto	41
5.6.2.	Preservación y fijación del parásito	42
5.6.3.	Estudio a microscopio de luz y microscopia electrónica de barrido	42
5.6.4.	Preparación de las muestras para el análisis molecular	44
5.6.5.	Extracción del ADN	44
5.6.6.	Amplificación del ADN mediante PCR convencional	45
5.6.7.	Electroforesis	46
5.6.8.	Secuenciamiento del gen <i>cox1</i>	47
5.6.9.	Identificación molecular	47
5.6.10.	Análisis bioinformático	47
5.7.	Aspecto ético	48
VI.	RESULTADOS	49
6.1.	Muestreo	49
6.2.	Identificación morfológica de la larva plerocercarioide	49
6.3.	Identificación morfo-anatómica del estadio adulto	53
6.4.	Espectrofotometría y Electroforesis	55
6.5.	Amplificación del ADN mediante PCR convencional	57

6.6.	Identificación molecular de los estadios larvario y adulto .....	59
6.6.1.	Secuenciamiento de la larva pleroceroide y adulto .....	59
6.6.2.	Análisis Filogenético.....	60
VII.	DISCUSIÓN .....	61
VIII.	CONCLUSIONES .....	66
IX.	RECOMENDACIONES .....	67
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68
XI.	ANEXOS .....	78

# ÍNDICE DE FIGURAS

- Fig. 1. Ciclo de vida de probables hospederos de *Adenocephalus pacificus* en el Perú. 22
- Fig. 2. Plerocercoides de *Diphyllobothrium*. (A) Escólex de forma lanceolada, superficie del cuerpo distendido. (B) acorazonada, cuerpo retraído y (C) esférica, parcialmente retraído. \_\_\_\_\_ 50
- Fig. 3. Plerocercoides de *Diphyllobothrium*. (A) Escólex de forma esférica, (B) lanceolada corta, (C) acorazonada y (D) lanceolada larga. Vistas con microscopio electrónico de barrido (MEB). \_\_\_\_\_ 51
- Fig. 4. Escólex de *Diphyllobothrium* sp. en *O. byronia* (A, B) y de humano (C). \_\_\_\_\_ 53
- Fig. 5. Proglótidos grávidos de *Diphyllobothrium* sp. (A) varón, (B) mujer, (C) *O. byronia* y (D) niño. \_\_\_\_\_ 54
- Fig. 6. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % del ADN extraído de las larvas plerocercoides y adultos de *Diphyllobothrium*. Se aprecian bandas intensas de smear. (A) Pocillos con ADN (1-11) y el control (12). (B) Con ADN (1-12) y control (13). Ladder en los extremos (100 – 5 000 pb). \_\_\_\_\_ 56
- Fig. 7. Electroforesis del amplificado en gel de agarosa al 2 %. Carril del 1-8 con productos de 1500 pb aprox. del gen *Cox-1* del ADN de larvas plerocercoides de *Diphyllobothrium*. Carril 9 control negativo. Carril M MassRuler DNA Ladder Mix (#SM 0403). \_\_\_\_\_ 57
- Fig. 8. Electroforesis del amplificado en gel de agarosa al 2 % Carril del 1-6 con productos de 1500 pb aprox. del gen *Cox-1* del ADN de adultos de *Diphyllobothrium*. Carril 7 control negativo. Carril M a los extremos GeneRuler Express DNA Ladder (#SM 1553). \_\_\_\_\_ 58
- Fig. 9. Electroforesis del amplificado en gel de agarosa al 2 % Carril del 1-6 con productos de 750 pb aprox. del gen *Cox-1* del ADN de larvas plerocercoides de *Diphyllobothrium*. Carril M a los extremos GeneRuler Express DNA Ladder (#SM 1553). \_\_\_\_\_ 58
- Fig. 10. Construcción de árbol filogenético a partir de secuencias de nucleótido parciales de *cox1* usando Neighbor joining modelo Kimura 2 parámetros. Valores de Bootstrap (10 000 repeticiones) se muestran en las ramas. *Spirometra mansonoides* es usado como grupo externo. Se indican todos los números de acceso al GenBank de las secuencias utilizadas para construir el árbol. \_\_\_\_\_ 60

# ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Relación de larvas plerocercoides y adultos de Diphylobothridae, según el hospedero, forma del escólex, origen y año.</i>	42
<i>Tabla 5. Número y formas de larvas plerocercoides de Diphylobothrium sp., hospederos, su localización y zonas de adquisición.</i>	52
<i>Tabla 6. Promedio de la concentración de ácidos nucleicos y rango de medidas de absorbancias.</i>	55
<i>Tabla 2. Secuencia de los cebadores</i>	79
<i>Tabla 3. Concentraciones del Mix de PCR.</i>	79
<i>Tabla 4. Condiciones de ciclamiento de la PCR</i>	79

# I. INTRODUCCIÓN

La difilobotriosis es una zoonosis causada por la ingestión accidental de la larva plerocercoides de *Diphyllobothrium*, familia Diphyllobothridae, que se encuentra enquistada en la superficie visceral o peritoneo parietal de peces teleosteos marinos, considerados como hospederos paraténicos o intermediarios.

Desde la antigüedad los habitantes de Sudamérica sufrieron de difilobotriosis observándose huevos de *Diphyllobothrium pacificum* (Nybelin, 1931) en muchos sitios arqueológicos precolombinos e inclusive pre-incas de Perú y Chile. En la actualidad Perú y Chile son países reconocidos como áreas endémicas de la enfermedad.

A lo largo del océano Pacífico el cestodo *Diphyllobothrium pacificum* representa uno de los más importantes agentes causantes de difilobotriosis en el hombre por la ingestión de peces en forma de ceviche. El primer caso diagnosticado de difilobotriosis humana en el Perú fue por *D. pacificum* realizado por Baer (1967). Desde que se describió el primer caso de infección humana en el Perú, se han reportado nuevos casos humanos con una prevalencia del 2%, especialmente en los pobladores de la costa y de 0.02 y 0.09 % en las localidades de Arequipa y en la costa sur del Perú; respectivamente.

Así mismo, se ha reportado infección natural con *D. pacificum* en *Canis lupus familiaris* “perro” en la ciudad de Chincha, Ica (costa sur del Perú). La presencia de perros en los lugares de expendio de pescado, ocasiona la infección al ingerir las vísceras con la forma larvaria.

Las especies de *Diphyllobothrium* se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo (Norteamérica, Europa, Asia, Oceanía, Antártida). Hasta

el presente, se han descrito 50 especies del género *Diphyllobothrium*, pero sólo 14 se han reportado como patógenas para el hombre.

*D. pacificum* por más que ha sido reconocido como un parásito humano, sigue siendo su morfología poco conocida y su taxonomía complicada, por lo que varias especies de este cestodo son considerados como sus sinónimos.

En el Perú se ha descrito a *D. pacificum* en lobos marinos como *Otaria* y *Arctocephalus* y humanos, y *D. arctocephalinum* también en *Otaria* y *Arctocephalus*.

La identificación de las especies se ha realizado con pocos especímenes y usando criterios morfoanatómicos que, por lo general, no toman en cuenta las variaciones intraespecíficas, creando así duda si se trata de una sola especie o son en realidad varias.

## **1.1. Planteamiento del problema**

La difilobotriosis es una parasitosis humana producida por cestodos del género *Diphyllobothrium*, esta enfermedad puede pasar desapercibida o provocar en la persona que la presenta síntomas inespecíficos; en algunos casos se presentan síntomas como dolor abdominal, flatulencia, náuseas y diarrea. En algunas ocasiones, puede desarrollarse una anemia megaloblástica como resultado de la falta de asimilación de la vitamina B12, ya que el parásito compite con el hospedero por la absorción de esta vitamina (Vuylsteke *et al.*, 2004; Jiménez *et al.*, 2012).

Se ha reportado aproximadamente 20 millones de casos de difilobotriosis a nivel global y en algunos países hay una reaparición de esta enfermedad como en Rusia, Corea del Sur, Japón, y América del Sur (Brasil). Estudios recientes indican un aumento en algunos países desarrollados. (Chai *et al.*, 2005; Mezzari *et al.*, 2008; Wicht, 2009).

Desde que se describió (1967) el primer caso de infección humana en el Perú, se han reportado nuevos casos humanos con una prevalencia del 2%, especialmente en los pobladores de la costa y de 0.02 y 0.09 % en las localidades de Arequipa y en la costa sur del Perú, respectivamente (Tantaleán, 1993). *Diphyllbothrium pacificum*, es reportado por primera vez como parásito humano en el Perú por Baer *et al.* 1967, y al mismo tiempo como una difilobotriasis humana en el hemisferio sur distinta a la causada por *D. latum*.

En el Perú la incidencia de difilobotriosis en humanos ha sufrido variaciones debido a las alteraciones en la ecología marina ocasionadas por el fenómeno El Niño (Tantaleán, 1993; Terashima, 2000; Sagua *et al.*, 2001), por ello, se considera un incremento constante; si esta predisposición se prolongara, esta zoonosis debería considerarse como una cestodosis emergente (Cabrera *et al.*, 2003).

Por lo antes mencionado, no existen referencias relacionadas a la identificación específica de *Diphyllbothrium* procedentes de humanos y animales utilizando técnicas moleculares que son necesarias para la determinación adecuada de la(s) especie(s) que se presentan en el Perú y su relación con los plerocercoides presentes en los peces marinos, por lo que esta investigación plantea identificar la(s) especie(s) presente(s) en el litoral peruano utilizando el marcador molecular Citocromo C oxidasa subunidad 1 (*cox1*) presente en el ADN mitocondrial (Wicht *et al.*, 2010; Mercado *et al.*, 2010).

## **1.2. Formulación del problema**

En nuestro país, no existen estudios moleculares para la identificación tanto del estadio de plerocercoides como del adulto que permitan dilucidar si, tanto los plerocercoides presentes en peces de consumo comercial como los adultos en mamíferos, corresponden a una misma especie o son especies diferentes.

Por este motivo, proponemos realizar la identificación de estos estadios aplicando técnicas moleculares, utilizando estadios de larva pleroceroide y adulto de *Diphyllbothrium* sp. de humanos, lobos marinos y peces, naturalmente infectados.

### **1.3. Justificación**

En nuestro país, la difilobotriasis es una zoonosis producida por *D. pacificum* (s.l.) cuya infección tiene relevancia por la costumbre de nuestros pobladores de consumir pescado crudo o semicrudo principalmente en forma de “ceviche”. Así mismo, los perros también son afectados, mayormente aquellos que se ubican por los alrededores de la venta de pescado, pudiendo ser un problema en el campo veterinario.

Rausch *et al.* (2010), aplicando criterios morfoanatómicos, mencionan la existencia de dos especies diferentes, *D. pacificum* y *D. arctocephalinum* en la costa Sudamericana; del mismo modo, Tantaleán y Huiza (2012) describen a *D. arctocephalinum* en *Otaria flavescens* y humanos, respectivamente; sin embargo, en algunos especímenes adultos se han observado algunas características que podrían indicar la existencia de otras especies o ser variaciones intraespecíficas de una misma especie, por lo que es necesario estudiarlas con ayuda de las técnicas moleculares.

Por otro lado, la mayoría de los peces teleósteos marinos con importancia comercial en nuestra costa son portadoras de plerocercoides identificadas como *Diphyllbothrium* sp., pero que presentan características morfológicas diferentes. Podrían tratarse de variaciones intraespecíficas o de especies diferentes; este problema se podría dilucidar solo con la aplicación de técnicas moleculares, las que permitirían, además, conocer qué especie sería la patógena para el hombre.



La presente investigación permitirá por primera vez en el Perú, identificar específicamente la(s) especie(s) del parásito utilizando técnicas moleculares, en especímenes adultos provenientes de humanos, lobos marinos y plerocercoides de peces teleósteos.

Los resultados de este estudio serán de gran importancia como herramienta para estudios posteriores en epidemiología y nuevos programas de control de la enfermedad.

## **1.4. OBJETIVOS**

### **1.4.1.OBJETIVO GENERAL**

Identificar molecularmente los estadios de plerocercoides y adulto de *Diphyllobothrium* sp. obtenidos de humanos, lobos marinos y peces del Perú.

### **1.4.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Comparar desde el punto de vista morfológico los plerocercoides de las especies de *Diphyllobothrium* sp. en 4 especies de peces teleósteos de la costa peruana: *Engraulis ringens* “anchoveta”, *Sciaena callaensis* “lorna grande”, *Sciaena deliciosa* “lorna”, *Trachurus symmetricus murphyi* “jurel” para establecer las características morfológicas diferenciales.

Comparar, desde el punto de vista morfoanatómico, los estadios adultos de las especies de *Diphyllobothrium* identificadas como *D. pacificum* y *D. arctocephalinum* procedentes de humanos y lobos marinos (*Otaria byronia*) para establecer los detalles que permitan su identificación.

Identificar a los especímenes adultos y larvas plerocercoides seleccionados utilizando pruebas moleculares, mediante la extracción del

ADN y amplificar por PCR utilizando el marcador molecular Citocromo C oxidasa subunidad 1 (*cox1*) presente en el ADN mitocondrial (ADNmt).

Realizar un árbol filogenético de las secuencias de *cox1* del estadio adulto y larvario de la(s) especie(s) de *Diphyllobothrium* aisladas en este estudio.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Difilobotriosis

La difilobotriosis humana es una infección intestinal causada por el estadio adulto de *Diphyllobothrium* spp. Es una zoonosis contraída por consumo de pescados de agua dulce o marinos, estos cestodos son llamados “tenias de peces” y tienen una distribución mundial (Chai *et al.*, 2005). *Diphyllobothrium* es uno de los parásitos más grandes de seres humanos pudiendo medir de 2 a 15 m de longitud, en estado adulto en el intestino.

Según Kuchta *et al.* (2013), en Europa occidental, Norteamérica y Asia el principal agente etiológico causante de la difilobotriosis en humanos es *D. latum*; mientras que, para Suiza, Países Bajos y República Checa identificaron *D. dendriticum* como parásito para el hombre con el gen mitocondrial *cox1*. Por análisis molecular de casos clínicos aislados en Finlandia, Francia, Suiza, China, Japón Korea y Norteamérica se ha identificado a *D. nihonkaiense* (Wicht *et al.*, 2008; Scholz *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). La difilobotriosis en Asia es causada mayormente por *D. nihonkaiense* a lo largo de la costa de Japón y Korea del Sur; en Rusia, esta especie es considerada de importancia zoonótica siendo una infección común.

En Norteamérica se han descrito casos humanos de difilobotriosis por diferentes agentes infecciosos como: *D. latum*, *D. dendriticum*, *D. dalliae*, *D. lanceolatum*, *D. ursi*, *D. alascense* y *D. nihonkaiense* (Scholz *et al.*, 2009).

El primer caso humano de difilobotriosis en Sudamérica fue reportado en Argentina en 1911, y el segundo fue en Chile en 1950, estos casos causados por *D. latum* están atribuidos a inmigrantes que arribaron a

estos países. La difilobotriosis por *D. latum* y *D. dendriticum* se suponen que fueron introducidos a América del Sur a través de inmigrantes europeos.

El único agente etiológico comprobado de la difilobotriosis humana en el Perú es hasta ahora *Diphyllobothrium pacificum* (Nybelin, 1931) Margolis, 1956, cestodo de ciclo de vida marina, que en su fase adulta es un parásito natural de los pinnípedos *Otaria byronia* "lobo chusco" y *Arctocephalus australis* "lobo fino" (Miranda *et al.*, 1968; Tantaleán, 1993; Cabrera *et al.*, 1994), mientras que la larva plerocercoides que es la forma infectante para el hombre y otros mamíferos se ha aislado de 16 especies de peces marinos de importancia comercial, los que se comportarían como hospederos paraténicos (Tantaleán & Huiza, 1984; Escalante & Miranda, 1986; Escalante *et al.*, 1988; Tantaleán & Huiza, 1994).

## **2.2. Agente etiológico**

### **2.2.1. Características morfológicas básicas**

Este cestodo está entre los parásitos más grandes de los humanos, pudiéndose desarrollar en el intestino, llegando a medir de 2 a 15 m de largo según la especie. La característica del orden Diphylobothriidea (Kuchta *et al.*, 2008) es la presencia de escolex con botrias (surcos), poros genitales que se abren independientemente en la cara ventral de los proglótidos, huevos operculados y sin embrionar en el momento de la puesta. La familia Diphylobothriidae se caracteriza por presentar proglótidos con numerosos testículos y folículos vitelógenos situados lateralmente sin converger en la región anterior del saco del cirro y vesícula seminal en posición dorso-caudal. El útero en la posición central se abre ventralmente en el poro uterino.

El resto del cuerpo (estróbila) se compone de un gran número de segmentos (proglótidos) cada uno de los cuales contiene un conjunto (o,

en raras ocasiones, más de dos conjuntos) de órganos genitales de ambos sexos.

### **2.2.2. Ciclo de vida**

Los huevos que eliminan los hospederos definitivos caen al mar con la heces, estos huevos maduran y desarrollan en el medio acuático el estadio de coracidio, que luego es ingerido por el primer hospedero intermediario que sería un crustáceo de especie desconocida donde se desarrolla la larva procercoide, éste es ingerido por un pez planctónico que viene a ser el segundo hospedero intermediario, en él pasa a la forma plerocercoides o forma infectiva, que a su vez es ingerido por una variedad de peces teleósteos (carnívoros) que son los hospederos paraténicos en los que se enquistan en la superficie visceral. En el Perú se ha registrado la larva plerocercoides en más de 10 especies de peces teleósteos de consumo humano (Tantaleán, 1975; Tantaleán *et al.*, 1994).

Los plerocercoides se desarrollan rápidamente en adultos en el intestino de los hospederos definitivos, después de 2 a 6 semanas comienzan a producir sus primeros huevos. La mayoría de las especies de *Diphyllobothrium* se caracterizan por una especificidad relativamente baja en la etapa adulta, lo que implica que los seres humanos pueden infectarse accidentalmente con parásitos que maduran normalmente en mamíferos marinos o incluso en aves piscívoras.

Las especies marinas de *Diphyllobothrium* tienen como hospederos definitivos a Pinnípedos (Berta & Churchill, 2012) en la costa del Pacífico de Norteamérica, sub-Ártico, sub-Antártico, Australia, Nueva Zelandia y en la costa del Atlántico de Sudáfrica. *Diphyllobothrium* se encuentra en el Perú en *Otaria byronia* (= *O. flavescens*) (Miranda *et al.*, 1968; Tantaleán, 1993; Cabrera *et al.*, 1994).

## Ciclo de vida de *Adenocephalus pacificus*?

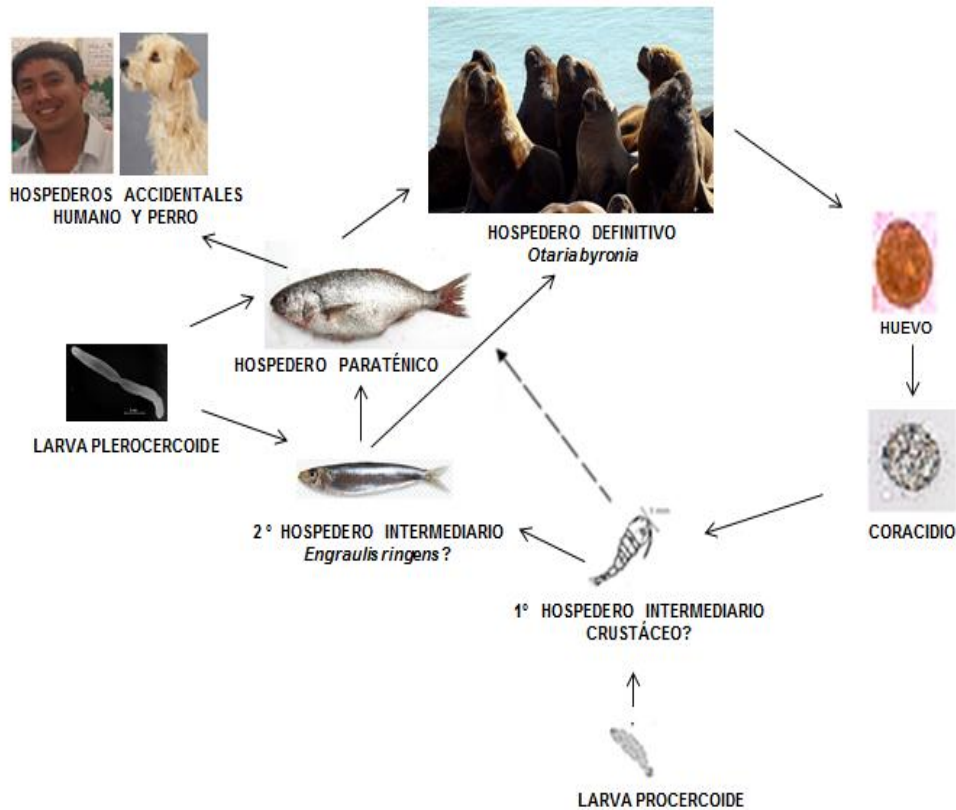


Fig. 1. Ciclo de vida de probables hospederos de *Adenocephalus pacificus* en el Perú.

### 2.2.3. Distribución geográfica

La distribución geográfica del cestodo *Diphyllobothrium* se asocia a aguas frías, ecosistemas boreales y templados, siendo la mayoría de casos reportados en la región Paleártica. Este género es cosmopolita y se encuentra en toda Europa principalmente en los países como Suiza, Alemania, los Estados Bálticos y Rumania; también se han reportado en los lagos subalpinos en Francia e Italia y esporádicamente en España, Grecia, Polonia y Noruega; en Asia está presente en los países de Rusia, Siberia, Palestina, Japón, China y Filipinas. (Dupouy-Camet & Peduzzi, 2004; Mezzari & Wiebbelling, 2008; Pastor-Valle *et al.* 2014).

En el Sur de Australia se detectó un caso de difilobotriosis humana; por los resultados de la secuenciación del cestodo se identificó como *Adenocephalus pacificus* (= *Diphyllobothrium pacificum*) (Moore *et al.*, 2016).

En Estados Unidos, Alaska y Canadá también se encuentran especies de *Diphyllobothrium*, tanto en mamíferos marinos como en humanos. En América del Sur el parásito y sus hospederos se extienden en toda la costa del Pacífico abarcando especialmente los países de Perú, Chile; y en la costa sur del Atlántico a Argentina y Uruguay. En el Sur de Brasil, también se han reportado casos de difilobotriosis (Mezzari & Wiebbelling, 2008; Kuchta *et al.*, 2015) (Anexo A).

#### **2.2.4. Prevalencia**

Las infecciones humanas por *D. pacificum*, han sido reportadas casi exclusivamente en la costa pacífica de Sudamérica, principalmente del Perú. En la costa del Perú, desde 1957 se han reportado  $\approx 1,000$  casos de infección por *A. pacificus* (inicialmente identificadas como *D. latum*). La prevalencia ha sido tan alta como 7,5% en algunas regiones, pero es  $\approx 2\%$  en la mayoría de las regiones (Baer *et al.* 1967; Miranda *et al.* 1967; Rêgo, 1967).

Se han reportado casos humanos con una prevalencia entre 0.02 y 0.09 en las localidades de Arequipa y en la costa sur del Perú, y el 2% en áreas urbanas de los diferentes pueblos jóvenes de Lima (Tantaleán, 1993). El pescado marino es llevado para su consumo hasta algunos lugares de la Sierra, también se ha encontrado este cestodo en una niña de una zona altoandina (Gárate *et al.*, 1999).

En un estudio prospectivo (1993-1994), en 21 niños con trastornos gastrointestinales de varios distritos de Lima, se encontraron 15 positivos a este parásito (Medina *et al.*, 2002). Cabrera (2003) describió la

prevalencia (1981- 2001) de la infección por *D. pacificum* de acuerdo a la región geográfica, anotando para la Costa o Chala un 2.09 % (36/ 34,897), Yunga 0.50 % (1/272), Quechua 0.35 % (4/ 7,236) y para la Puna 0.3 % (1/333).

### **2.3. Clasificación taxonómica**

Muchas especies del género *Diphyllobothrium* han sido descritas desde que Linnaeus, propuso *Taenia lata* como el primer representante de este grupo. La composición taxonómica del género ha cambiado muchas veces, al igual que las opiniones sobre la validez de las especies individuales. A pesar de la sistemática incierta de muchos taxa, es incuestionable que además de *D. latum*, otras especies están implicadas en las infecciones humanas de las regiones circumpolares y del área del Pacífico. Un total de 14 de las más de 50 especies de *Diphyllobothrium*, actualmente consideradas válidas, han sido reportadas para humanos (Scholz *et al.*, 2009; Wicht *et al.*, 2009).

Margolis (1956) hizo una redescrición de *D. pacificum* (Nybelin, 1931), mencionando que fue complicado considerar la especie por los numerosos sinónimos, tales como *Bothriocephalus* sp. Stiles y Hassall, 1899, *Adenocephalus pacificus* Nybelin, 1931 y *Adenocephalus septentrionalis* Nybelin, 1931, entre otros. La designación de Nybelin, 1931 es válida para *D. pacificum*. Johnston y Drummond (1937) describieron por separado, la presencia de dos cestodos coespecíficos en los leones de mar cerca de Australia, con los nombres de *D. arctocephalinum* y *D. arctocephalus*; sin embargo, ambos nombres fueron considerados como sinónimos de *D. pacificum*. Baer *et al.* (1967) describieron el primer caso de infección humana en el Perú por *D. pacificum*.



Estudios realizados por Rausch *et al.* (2010) mencionan la existencia de dos especies diferentes, *D. pacificum* y *D. arctocephalinum* Johnston, 1937 (= *D. pacificum* sensu Baer, 1967). En el Perú se ha descrito a *D. pacificum* en *Otaria*; *D. arctocephalinum* en *Otaria*, *Arctocephalus* y humano, y *Diphyllobothrium* sp. en humanos (Tantaleán & Huiza, 2012).

## **2.4. Diagnóstico**

### **2.4.1. Importancia de un diagnóstico específico**

La importancia de un diagnóstico específico de las especies de *Diphyllobothrium*, así como, el descubrimiento de las fuentes de infección humana está en aumento en algunas regiones; esto es de gran importancia en estudios epidemiológicos porque proporcionan datos fiables sobre la distribución real de la difilobotriosis dentro de la población (Scholz *et al.*, 2009).

La predisposición general de los hospitales o laboratorios médicos es identificar al parásito solo a nivel de género. Viéndolo desde este punto clínico, es una actitud correcta, porque la identificación de las especies puede ser difícil ya que los procedimientos que involucran técnicas moleculares requieren personal capacitado. Para reducir la probabilidad de la aparición de la enfermedad, o impedir o controlar su progresión, la identificación de hospederos y parásitos a nivel de especie contribuiría a una mejor comprensión de la distribución actual de diferentes taxones. Casos de informes recientes sobre infecciones humanas con *Diphyllobothrium* están presentes en varios países, asociados a migración o viajes dando lugar a la distribución del parásito en áreas fuera de las zonas endémicas.

Los alimentos con estos parásitos importados que no cuentan con los controles sanitarios correspondientes pueden aumentar la probabilidad de

aparición de brotes incluso en países con un alto nivel de atención médica (Scholz *et al.*, 2009; Kuchta *et al.*, 2015).

### **2.4.2. Diagnóstico morfológico**

El diagnóstico de *Diphyllbothrium* se basa principalmente en encontrar huevos de forma ovoide con un opérculo en el polo y un botón en el otro o proglótidos (segmentos) en las heces. Este diagnóstico basado en la morfología es relativamente fácil, pero en la mayoría de los casos no permiten la identificación a nivel de especie debido a que la morfología y las mediciones no son suficientes. Algunos taxones pueden ser diferenciados entre sí, si sólo se obtiene el escólex, que generalmente no está presente en muestras clínicas. Además, después del tratamiento, la mayoría de las muestras no son adecuadas para la evaluación e identificación morfológica debido al daño de los tejidos del parásito.

La identificación morfológica de las larvas plerocercoides en los peces marinos en el Perú es muy complicada. Estos difieren unos de otros en la superficie del cuerpo, la retracción o forma del escólex, en el número de músculos longitudinales subtegumentales y en el tamaño. Debido a lo antes mencionado, se hace necesario el diagnóstico basado en técnicas moleculares para confirmar la especie de la larva.

### **2.4.3. Diagnóstico molecular**

Los métodos moleculares han sido ampliamente utilizados en el diagnóstico debido a su especificidad y la posibilidad de evaluar un gran número de muestras en un corto tiempo. Es un método costoso y se necesita de profesionales capacitados, pero en la actualidad representa la herramienta más confiable para identificar muestras clínicas de *Diphyllbothrium* a nivel de especie. También, se pueden aplicar para

determinar los diferentes estadios de desarrollo del parásito esto nos permitiría rastrear los orígenes de las fuentes de infecciones humanas.

## 2.5. Importancia clínica

Los cestodos adultos se ubican en el intestino delgado de su hospedero vertebrado, principalmente adherido a las paredes intestinales a nivel del íleon y poco frecuente en el yeyuno u otros niveles, raramente se encuentra en el conducto biliar.

Muchos casos humanos se reportan como asintomáticos, alrededor de uno de cada cinco casos de infección pueden presentar malestar abdominal, diarrea y vómitos; otros síntomas de la difilobotriosis pueden incluir fatiga, estreñimiento, o anemia perniciosa, a veces, dolor de cabeza y reacciones alérgicas. Rara vez, pueden ocasionar una infección masiva donde obstruyen al intestino; esto se debe a una migración de proglótidos pudiendo causar colecistitis o colangitis.

En algunos casos puede darse una deficiencia en Vitamina B12 con una posterior anemia megaloblástica. La mayoría de casos de anemia megaloblástica es causada por *D. latum* (especie de agua dulce), esto es consecuencia a que el parásito se encuentra un tiempo prolongado en el intestino. Niveles bajos de vitamina B12 por periodos largos puede producir daño en el sistema nervioso. A diferencia de *D. latum*, la infección por *D. pacificum* rara vez se asocia con anemia megaloblástica o déficit de vitamina B12 (Jiménez *et al.*, 2012).

La anemia perniciosa asociada a *Diphyllobothrium* es reportada raramente en la actualidad. Después de un tratamiento exitoso, los niveles de vitamina B12 vuelven a los rangos normales en algunos meses.

Desvois *et al.*, 2001, realizaron un estudio a fondo de ocho casos clínicos, demostrando que los síntomas clínicos severos pueden llevar a consultas

especializadas y a costosos análisis para el tratamiento de un solo caso de difilobotriosis.

## **2.6. Control y prevención**

El objetivo del control y de las medidas preventivas es irrumpir el ciclo de vida del parásito. Supuestamente, cualquier punto del ciclo de vida puede ser atacado. En la práctica, las medidas deberían centrarse en los siguientes puntos principales: el tratamiento de las personas que albergan el parásito, la prevención de la contaminación del agua y la prevención de la transmisión de larvas infecciosas de los peces a los seres humanos.

Los cestodos adultos se tratan fácilmente con praziquantel, una sola dosis oral de 25 mg/kg es altamente eficaz contra las infecciones humanas por *D. latum*. Una dosis más baja de 10 mg/kg de praziquantel fue eficaz contra infecciones humanas con *D. pacificum* (Lumbreras *et al.*, 1982), pero mostró un pobre efecto en hámsters dorados infectados experimentalmente con *D. latum* (Bylund *et al.*, 1977). La niclosamida es un fármaco antihelmíntico alternativo eficaz para la difilobotriosis. Solo una dosis de 2 g en adultos y 1 g en niños mayores de 6 años bastaría. Los efectos secundarios son infrecuentes, porque no son absorbidos por el tracto gastrointestinal. Sin embargo, la disponibilidad de niclosamida es limitada en muchos países.

La mejor medida que se tomaría para protegerse de la difilobotriosis sería evitar el consumo de pescado crudo, ahumado o escabechado, pero esto sería algo utópico o irrealizable que no se daría. Para ello se ha elaborado una Guía de Peligros y Controles de Pescado y Productos Pesqueros donde las recomendaciones pueden parecer estrictas, pero es una forma de reducir la probabilidad de la aparición de la enfermedad, impedir o controlar su progresión.

Para una buena seguridad alimentaria el pescado debe estar bien cocido; alternativamente para prevenir la infección, tiene que estar congelado durante 24 a 48 h a -18°C. Recomendaciones rigurosas para matar los parásitos más resistentes a la congelación, nos indican que los productos pesqueros deben de estar a una temperatura por debajo de -20 °C por 7 días o a -35 °C por 15 h.

Las infecciones por larvas de *Diphyllbothrium* se pueden evitar fácilmente comiendo pescado bien cocido o congelado a -10 °C durante 24 h o poniendo el pescado en una concentración de salmuera a 12 % (NaCl) (Raether & Hänel, 2003). Cocinar el pescado a una temperatura de 55 °C mata a las larvas plerocercoides en 5 min (Dick *et al.*, 2001), mientras que la congelación a -10 °C las mata dentro de 8 a 72 h, dependiendo del espesor de la carne de pescado. Eguchi, 1973, observó que los plerocercoides sobrevivieron durante 4 h pero murieron después de 12 h a -8 °C; todos los plerocercoides murieron después de 6 horas a -10 °C.

## **2.7. Hospederos**

### **2.7.1. *Engraulis ringens* “Anchoveta peruana o anchoveta”**

*Engraulis ringens* (Jenyns, 1842) es la especie de pez pelágica más importante económicamente del Perú y ecológicamente del Sistema de Corriente de Humboldt (SCH). Se distribuye desde Punta Aguja (Perú), hasta Talcahuano (Chile). La explotación de este recurso hidrobiológico ha permitido al Perú posicionarse entre los países pesqueros del mundo. La anchoveta es la principal presa de los depredadores como mamíferos marinos, aves marinas, peces y pescadores. Desde los años cincuenta, más de 250 millones de toneladas de anchoveta han sido extraídas por la pesca de cerco. (Espinoza & Bertrand, 2008).

Posee un cuerpo alargado poco comprimido, un color que varía del azul oscuro a verdoso en el dorso en los ejemplares muertos, más claro y brillante en especímenes vivos, zona ventral plateada, aleta caudal negra y las otras aletas claras.

Los especímenes de la familia Engraulidae son de talla pequeña llegando en algunas especies a 25 cm. como máximo. La etapa juvenil termina alrededor de los 12 cm. y a partir de esta talla se les puede considerar como adultos, ya que están en condiciones de reproducirse.

Se ha estimado que la anchoveta peruana necesita un año y medio para alcanzar una longitud de 13 a 14 cm. Las anchovetas obtenidas por los pescadores oscilan en su mayoría entre 12 a 16 cm. de largo con pesos entre 14 a 26 gr.

La anchoveta es heterosexual sin caracteres secundarios externos, presenta reproducción ovípara. Los huevos son puestos en gran número para asegurar la supervivencia de la especie y quedan flotando en el mar, hasta dar lugar a las larvas. La anchoveta tiene un ciclo de vida de periodo corto, antes de llegar a un año de edad ya puede reproducirse y su longevidad parece no sobrepasar los 3 años (Jordán & Chirinos de Vildoso, 1965).

Las anchovetas son planctófagas por excelencia, es decir que se alimentan exclusivamente de plancton, para lo cual poseen adaptaciones anatómicas y fisiológicas. No se ha podido aclarar todavía si *E. ringens* tiene realmente una selectividad respecto al fito o al zooplancton o si se trata solamente de una diferencia de digestibilidad o de disponibilidad de los organismos de su dieta en un área dada (Jordán & Chirinos de Vildoso, 1965).

Konchina *et al.*, 1991, concluyeron que la anchoveta consume preferentemente zooplancton y que la mayoría de la biomasa está compuesta por copépodos y eufáusidos. Espinoza & Bertrand (2008),

obtuvieron resultados de la dieta alimenticia de la anchoveta en el Perú, demostrando que consta principalmente de zooplancton tales como eufáusidos y copépodos.

### **2.7.2. *Sciaena deliciosa* “lorna” y *Sciaena callaensis* “lorna grande”**

*Sciaena deliciosa* (Tschudi, 1846) “lorna” es un pez distribuido en toda la costa sur del Pacífico, desde Ecuador, Puerto Pizarro (Perú) a Corral, Chile. Es una especie importante para la pesquería artesanal peruana, es bentopelágica de la plataforma continental encontrándose sobre sustratos someros arenosos y areno-rocosos, común en el área de la Corriente Costera Peruana (Chirichigno & Cornejo, 2001).

La longitud promedio a la cual, por lo menos el 50% de los ejemplares alcanzan su primera madurez sexual es de aproximadamente 17.5 cm., siendo los meses de desove en las estaciones de otoño e invierno (Mejía *et al.*, 1970). La primera madurez la alcanza a los 20 cm. de longitud total, que equivale a la edad promedio de 1.5 años. La longitud de un adulto es de 40 cm. Del análisis de la mortalidad por grupos de edades se aprecia que la mayor tasa de explotación recae principalmente ente los grupos de edad de 2 y 3 años (Estrella, 1994).

Esta especie se alimenta principalmente de presas bentónicas como anfípodos, poliquetos, ofiuros y peces como *Sardinops sagax sagax* “Sardina” (Arrieta *et al.*, 2010; León, 2011) y además se alimenta de anchoveta (Duarte, 2001).

*Sciaena callaensis* está considerada en estado de peligro crítico (posiblemente extinta) por la lista roja de IUCN (International Union for Conservation of Nature- red list). Los únicos registros conocidos de *S. callaensis* son de la Bahía del Callao, Perú. Han transcurrido más de 40

años desde la última aparición registrada de esta especie, a pesar de los esfuerzos realizados para documentar la fauna de peces de la zona.

El único hábitat conocido de esta especie está muy contaminado. Los estudios de la bahía del Callao han resultado afectadas por altas cargas orgánicas y contaminación química y por tener una menor abundancia de especies macrobentónicas que las áreas no contaminadas.

### **2.7.3. *Trachurus symmetricus murphyi* “jurel”**

El género *Trachurus* comprende de 14 especies de peces marinos distribuidos en los océanos Atlántico, Índico, Mediterráneo y Pacífico. En aguas templadas del Pacífico se han registrado 5 especies: *Trachurus japonicus* (Temminck y Schlegel), *Trachurus Novaezelandiae* (Richardson) y *Trachurus declivis* (Jenyns) en el Pacífico occidental; y un par de especies antitrópicas, *Trachurus symmetricus* (Ayres) en el Pacífico nororiental y *Trachurus murphyi* (Nichols) en el Pacífico sudoriental (Cárdenas *et al.*, 2009).

Esta especie presenta un cuerpo alargado, y la cabeza grande, con la mandíbula superior llegando casi a la órbita ocular. Alcanza 70 cm, siendo el promedio 60 cm. El dorso es azul oscuro, mientras que el vientre es de color plateado; muestra una mancha negra junto a la parte posterior del opérculo. La aleta pectoral es característicamente larga y en forma de hoz.

El jurel es una especie epipelágica, se encuentra en zonas neríticas de estanterías costeras o de islas, bancos y montes marinos. Posee una alimentación principalmente en crustáceos (copépodos), camarones, pero también pequeños peces y calamares. Todos tienen huevos pelágicos y el desove generalmente ocurre durante el verano (Evseenko, 1987).

Perea *et al.* (2013), encuentran que la talla a la primera madurez del jurel en el Perú no ha cambiado en 45 años, manteniéndose entre los 25-27



cm de longitud total, esto a pesar de los grandes cambios ambientales y en su distribución y abundancia observados.

A fines de la década de los sesenta, el jurel pasa a ocupar lugares intermedios en las estadísticas de desembarques, con capturas anuales crecientes que pasan rápidamente de los cientos a los miles de toneladas por año, hasta que en 1974 se llegó a capturar 129 mil toneladas de esta especie. Con ello el jurel *T. murphyi* pasó a ocupar el segundo lugar en las estadísticas de desembarque nacionales, después de la anchoveta *E. ringens* (Csirke, 2013).

#### **2.7.4. *Otaria byronia* (= *Otaria flavescens*) "lobo chusco" o "león marino de Sudamérica"**

El lobo chusco ha sido referido por los nombres científicos *Otaria byronia* (de Blainville, 1820) y *O. flavescens* (Shaw, 1800). Rice, 1998, concluyó que *O. flavescens* tiene prioridad. Berta & Churchill (2012), señalaron que el nombre específico para este taxón es controvertido, pero concluyeron que *O. byronia* es el primer nombre disponible aplicable con certeza. *O. byronia* es el nombre aprobado por la Society for Marine Mammalogy (Comité de Taxonomía 2014) y se está utilizando en el presente trabajo. Sin embargo, *O. flavescens* todavía está en uso, particularmente por científicos sudamericanos.

*O. byronia* es un mamífero pinnípedo que se encuentra distribuido a lo largo de las costas e islas de América del Sur (Berta & Churchill, 2012). Su distribución en el Pacífico abarca desde el norte de Perú hasta el sur de Chile y para el Atlántico un área norte de dispersión próxima a Torres en Brasil, colonias reproductoras y de cría en islas de Uruguay, costas desde la Provincia de Buenos Aires hasta la Isla San Martín de Tours en Argentina, Islas Malvinas e Islas de los Estados (Campagna *et al.*, 2001, Berta & Churchill, 2012).

Ocasionalmente se le ha registrado en las Islas Galápagos en Ecuador; así como, en las costas de Colombia y Panamá (Campagna *et al.*, 2001, Felix 2002, Berta & Churchill, 2012). En el Perú su límite de distribución norte es en la Isla Foca en Paita (Majluf & Trillmich, 1981).

Comparado con otros Otariinae, el león marino sudamericano, *O. byronia*, es más pequeño que el león marino norteamericano, *Eumetopias jubatus* y en apariencia se asemeja bastante al león marino californiano, *Zalophus californianus*. Los ejemplares de *O. byronia* son difíciles de ser confundidos en nuestras aguas con otras especies de Pinnipedia, ya que son los únicos representantes de la sub familia Otariinae que en ellas se encuentran.

En ambos sexos, el hocico es aplanado, ancho, corto, obtuso y curvado hacia arriba; la mandíbula inferior es ancha y alta y se encuentra presente el proceso temporal. En los machos adultos, el cuello es muy grueso y posee fuertes músculos.

La dieta alimenticia de *O. byronia* está conformada principalmente de *Engraulis ringens* “anchoveta” y *Trachurus picturatus* “jurel” (Zavalaga *et al.*, 1998; Arias-Schreiber, 2000).

### III. ANTECEDENTES

Las especies del género *Diphyllobothrium* Cobbold, 1858, familia Diphyllbothridae Lühe, 1910, Orden Diphyllbothriidea Kuchta *et al.*, 2008 se encuentran ampliamente distribuidas en varios países de Norteamérica, Sudamérica, Europa y Asia donde la difilobotriosis es producida principalmente por *D. latum*, especie cuyo ciclo se realiza en animales terrestres y peces de agua dulce. En Sudamérica sólo se ha reportado en Chile, Uruguay y Argentina. En mamíferos marinos y ocasionalmente en humanos se han descrito varias especies: *D. cordatum* (Groenlandia), *D. hians*, *D. lanceolatum*, *D. scoticum* y *D. stanmacephalum* (Ártico), *D. cameroni*, *D. orcini* (Océano Pacífico); *D. alascense* (Alaska), *D. schistochilus* (Europa), *D. yonagoense* (Japón), *D. nihonkaiense* (Norteamérica) y *D. pacificum* (Norte y Sudamérica, Japón) (Hasegawa, 1980; Kamo *et al.*, 1981; Kifune *et al.*, 2000; Wicht *et al.*, 2007; Wicht *et al.*, 2008; Mercado *et al.*, 2010).

*Baer et al.* (1967) describieron el primer caso de infección humana en el Perú por *D. pacificum* (Nybelin, 1931), posteriormente, Margolis (1956) hizo una redescrición de la especie, mencionando que fue complicado considerar la especie por los numerosos sinónimos, tales como *Bothriocephalus* sp. Stiles y Hassall, 1899, *Adenocephalus pacificus* Nybelin, 1931 y *Adenocephalus septentrionalis* Nybelin, 1931, entre otros.

La designación de Nybelin, 1931 es válida para *D. pacificum*. Johnston y Drummond (1937) han descrito por separado, 2 cestodos coespecíficos en los leones de mar cerca de Australia, con los nombres de *D. arctocephalinum* y *D. arctocephalus*; sin embargo, ambos nombres fueron considerados como sinónimos de *D. pacificum*. Estudios morfoanatómicos realizados por Rausch *et al.* (2010) mencionan la existencia de dos especies diferentes, *D. pacificum* y *D. arctocephalinum* Johnston, 1937 (=

*D. pacificum* sensu Baer, 1967). En el Perú se ha descrito a *D. pacificum* en *Otaria*; *D. arctocephalinum* en *Otaria*, *Arctocephalus* y humano, y *Diphyllobothrium* sp. en humanos (Tantaleán & Huiza, 2012).

Las especies marinas de *Diphyllobothrium* tienen como hospederos definitivos a Pinnípedos (Berta y Churchill, 2012) en la costa del Pacífico de Norteamérica, sub-Ártico, sub-Antártico, Australia, Nueva Zelandia y en la costa del Atlántico de Sudáfrica. *Diphyllobothrium* se encuentra en el Perú en *Otaria flavescens* (= *O. byronia*) (Miranda *et al.*, 1968; Tantaleán, 1993; Cabrera *et al.*, 1994). Los huevos que eliminan los hospederos definitivos caen al mar con la heces, estos huevos maduran y desarrollan en el medio acuático el estadio de coracidio, que luego es ingerido por el primer hospedero intermediario que sería un crustáceo de especie desconocida donde se desarrolla la larva procercoide, éste es ingerido por un pez planctónico que viene a ser el segundo hospedero intermediario, en él pasa a la forma plerocercóide o forma infectiva, que a su vez es ingerido por una variedad de peces teleósteos (carnívoros) que son los hospederos paraténicos en los que se enquista en la superficie visceral.

En nuestro país se ha registrado la larva plerocercóide en más de 10 especies de peces teleósteos de consumo humano (Tantaleán, 1975; Tantaleán *et al.*, 1994).

En el Perú, Cabrera y Tantaleán (2001) describieron la primera infección natural con adultos de *D. pacificum* en *Canis lupus familiaris* “perro” en la ciudad de Chincha, Ica (costa sur del Perú), como ocurre en perros en Groenlandia y Alaska con *D. cordatum*, *D. lanceolatum* y *D. alascense* (Rausch *et al.*, 1970).

*D. pacificum* es considerado como el causante de la difilobotriasis humana en el Perú (Tantaleán y Huiza, 1984).

Inicialmente, *Diphyllobothrium* fue considerado taxonómicamente dentro del Orden Pseudophyllidea van Beneden in Carus, 1863. Por medio de la

biología molecular, este género ha sido ubicado dentro de un nuevo Orden denominado Diphylobothriidea basado en el análisis de las secuencias 18S y 28S del gen ARNr (Kuchta *et al.*, 2008).

Los únicos trabajos relacionados a nivel molecular han sido realizados en el extranjero por Skerikova *et al.* (2006) y Wicht *et al.* (2010), quienes secuenciaron una muestra de *D. pacificum* procedente de la costa de Sudamérica, así como especímenes procedentes de Japón y de otros orígenes, utilizando el marcador molecular *cox1* presente en el ADN mitocondrial, 18S ARNr y regiones ITS1-ITS2 cuyos resultados mostraron marcadas diferencias con *D. latum* y otras especies (*D. cordatum*, *D. dendriticum* y *D. lanceolatum*).

## IV. HIPÓTESIS

La utilización de técnicas moleculares determinará la identificación específica de la larva pleroceroide y adulto de la(s) especie(s) de *Diphyllobothrium* que podrían existir en el Perú, procedentes de material codificado en humanos, lobos marinos y de muestras frescas obtenidas de peces.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en el área de biología molecular del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP) siendo auspiciada por la misma por convenio con la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Laboratorio de Parasitología en Fauna Silvestre y Zoonosis) en el marco del proyecto titulado “Identificación molecular de especies de *Diphyllobothrium* en peces de mayor índice de consumo en el Perú” con Convenio N° 215-2015-FONDECYT.

### 5.2. Tipo y diseño metodológico

La presente investigación es de tipo descriptivo longitudinal, ya que se determinaron las especies de *Diphyllobothrium* en muestras codificadas provenientes del Laboratorio de Parasitología en Fauna Silvestre y Zoonosis de la UNMSM, a la vez que se analizaron muestras actuales obtenidas de lobos marinos, humanos y peces (anchoveta, lorna y jurel).

### 5.3. Variables

Identificación morfoanatómico de los estadios adultos y larvas plerocercoides de las especies de *Diphyllobothrium* sp. procedentes de humanos, lobos marinos (*Otaria byronia*) y peces (anchoveta, lorna y jurel).

#### Indicadores:

- Tamaño

- Forma observadas en el microscopio estereoscópico y de microscopía electrónica de barrido
- Presencia del parásito en las diferentes zonas muestreadas.

Identificación de los especímenes adultos y larvas plerocercoides de *Diphyllbothrium* sp. seleccionados por amplificación del gen mitocondrial de Citocromo C oxidasa subunidad 1 (*cox1*)

#### **Indicadores:**

- Calidad de la extracción de ADN
- Primers
- Ciclo de amplificación
- Bandas de amplificación génica de 747 y 1730 pb.

### **5.4. Operacionalización de las variables**

Comparar desde el punto de vista morfológico los plerocercoides de las especies de *Diphyllbothrium* sp. en 4 especies de peces teleósteos de la costa peruana: *Sciaena callaensis* “lorna grande”, *Sciaena deliciosa* “lorna”, *Engraulis ringens* “anchoveta”, *Trachurus symmetricus murphyi* “jurel”; así mismo, comparar los estadios adultos de las especies de *Diphyllbothrium* sp. procedentes de humanos y lobos marinos (*Otaria byronia*) para establecer las características morfo-anatómicas diferenciales.

### **5.5. Muestreo**

Se muestrearon 3668 ejemplares de *Engraulis ringens* “anchoveta”, 22 de *Sciaena deliciosa* “lorna”, 6 de *Sciaena callaensis* “lorna grande”, 6 de *Trachurus symmetricus murphyi* “jurel” frescas y congeladas en diferentes periodos estacionales adquiridos durante los días 28 de marzo, 15 de abril, 5 de mayo, 2, 6, 24 de junio, 6 de julio, 5, 8, 9, 16 de agosto y 7, 8, 9 de



setiembre del 2016 del Puerto de Pimentel–Chiclayo (6° 49' 55" S 79° 55' 4" O), Puerto de Chimbote–Ancash (9° 07' 24" S 78° 33' 26" O), Puerto del Callao (12° 04' 19" S 77° 09' 41" O), Puerto de Pucusana-Lima (12° 28' 48" S 76° 47' 59" O), Puerto de Pisco-Ica (13° 42' 59" S 76° 13' 16" O) y del terminal pesquero de Villa María del Triunfo (12° 10' 22" S 76° 56' 51" O). Para la identificación de los peces marinos se utilizó la clave de Chirichigno (1998).

Se obtuvo una muestra de estadio adulto incompleto de humano (niño de 8 años de edad) procedente de una posta del distrito de San Juan de Lurigancho, Lima, el 9 de marzo del 2016. Se colectó *in situ* una muestra de estadio adulto de *O. byronia* "lobo chusco" de Barranca (10°45' S y 77°46' O) el 14 de setiembre y otro ejemplar de Huacho (11°06' S y 77°36' O) el 10 de octubre del 2015. Se trabajó con material codificado del Laboratorio de Parasitología en Fauna Silvestre y Zoonosis, una muestra de humano de género femenino del 2003. Así mismo, se estudió muestras con codificación proporcionadas por el Dr. Manuel Tantaleán de estadio adulto de humano masculino del 2005 procedente de Lima (Tabla 1).

## **5.6. Procedimiento y análisis de datos**

### **5.6.1. Obtención de la larva y adulto**

Para la extracción de la larva se realizó un corte longitudinal ventral en los pescados, luego se revisó minuciosamente, la cavidad visceral y la superficie visceral.

Para la obtención del cestodo adulto se realizó una disección en el área abdominal de los lobos chuscos que se encontraron varados en la playa y se revisó el intestino delgado.

Los cestodos adultos procedentes de humanos fueron obtenidos por expulsión natural en las heces.

Tabla 1. Relación de larvas plerocercoides y adultos de Diphyllbothridae, según el hospedero, forma del escólex, origen y año.

ID	Estadio	Forma del Escólex	Hospedero	Origen	Año
ITP-1A	Adulto	Incompleto	Humano (♂)	SJL**	2016
ITP-2A	Adulto	Incompleto	Humano (♂)	Lima	2005
ITP-3A	Adulto	Acorazonada	<i>Otaria byronia</i>	Barranca*	2015
ITP-4A	Adulto	Acorazonada	<i>Otaria byronia</i>	Huacho*	2015
ITP-5A	Adulto	Acorazonada	Humano (♀)	Lima	2003
ITP-1L	Plerocercoides	Esférica	<i>S. callaensis</i>	VMT**	2016
ITP-2L	Plerocercoides	Acorazonada	<i>S. callaensis</i>	VMT**	2016
ITP-3L	Plerocercoides	Lanceolada	<i>E. ringens</i>	Callao	2016
ITP-4L	Plerocercoides	Acorazonada	<i>E. ringens</i>	Callao	2016
ITP-5L	Plerocercoides	Lanceolada	<i>S. deliciosa</i>	Chiclayo	2016
ITP-6L	Plerocercoides	Lanceolada	<i>T. symmetricus murphyi</i>	Pisco- Ica	2016
ITP-7L	Plerocercoides	Lanceolada	<i>S. callaensis</i>	VMT**	2016

\*Provincias del Departamento de Lima.

\*\*Distritos de Lima, SJL= San Juan de Lurigancho, VMT= Villa María del Triunfo.

### 5.6.2. Preservación y fijación del parásito

Los especímenes colectados fueron seleccionados y codificados en el laboratorio, estos fueron separados en viales según sus características morfológicas y anatómicas, previamente lavados en solución salina y conservados en alcohol al 70 %. Se guardaron en refrigeración a 4 °C.

### 5.6.3. Estudio a microscopio de luz y microscopia electrónica de barrido

En el laboratorio, algunos proglótidos maduros de *Diphyllbothrium* sp. obtenidos de humanos y lobos marinos se prensaron entre dos láminas portaobjetos y las larvas plerocercoides obtenidos de peces ligeramente

entre una lámina portaobjetos y una laminilla; seguidamente, se colocaron en placas de Petri con alcohol al 70 % por 24 h.

Las larvas plerocercoides se colorearon con Carmín acético de Semichón dejándolos por 24 h, luego se lavaron en alcohol al 70 % y se decoloraron en alcohol-ácido al 70 % (HCl al 1 %) hasta que las estructuras internas se visualicen. Seguidamente, se lavaron con alcohol al 70 % y se colocaron en alcohol-alcálico al 70 % (NH<sub>4</sub>OH algunas gotas al 1 %) por 1 min, luego se volvió a lavar en alcohol al 70 %. A continuación se procedió a la deshidratación con una batería de alcoholes de 80 %, 90 % y 100 % (2 veces). Para la diafanización, se utilizó xilol-alcohol al 100 % en proporción 1:1 por 15 min y finalmente se sumergió en xilol puro por 15 min. Para el montaje permanente se utilizó Bálsamo de Canadá sintético.

Para el montaje de los proglótidos, se realizó los mismos pasos que para los plerocercoides con la diferencia que se hicieron cortes sagitales y transversales, a mano, cuando se encontraban en xilol para observar detalles morfo-anatómicos importantes, para ello, se utilizó un microscopio estereoscópico (Leica).

Algunos plerocercoides seleccionados por sus características se fijaron en glutaraldehído al 2 % en buffer fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M) para su estudio con Microscopio Electrónico de Barrido (MEB). Las muestras se lavaron con buffer fosfato 0,2 M y fueron deshidratados con una batería de alcoholes (etanol al 80 %, 90 %, dos de 100 % por 30 min en cada uno).

En el Laboratorio de MEB fueron desecados por punto crítico, montados en stabs de aluminio, metalizados en baño de oro, quedando listo para la toma fotográfica en el MEB, realizado en el Laboratorio de equipamiento especializado, Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM.

#### **5.6.4.Preparación de las muestras para el análisis molecular**

Para los plerocercoides y adultos se obtuvieron aprox. 25 mg de tejido y se lavaron tres veces con buffer fosfato salino (PBS), luego se colocaron en un mortero y se le adicionó Nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>) triturando con un pilón hasta obtener un polvo. El polvo obtenido se almacenó en tubos de plástico Eppendorf de 1.5 mL para la extracción del ADN.

#### **5.6.5.Extracción del ADN**

Para la extracción del ADN genómico de los estadios larvario y adulto, se utilizó el Kit de extracción de ADN DNeasy tissue Kit (Qiagen, USA) siguiendo el protocolo del fabricante.

1. Se cortó 25 mg de tejido (una larva entera o un proglótido) en trozos pequeños y se colocó en tubos de microcentrifuga de 1,5 mL añadiéndose 180 µL de buffer ATL.
2. Se añadió 20 µL de proteinasa K y se mezcló mediante agitación e incubó en baño María a 56 °C hasta que el tejido sea completamente lisada.
3. Se centrifugó el tubo de microcentrifuga de 1,5 ml en el minispin para retirar las gotas desde el interior de la tapa.
- 3<sup>a</sup>. Se añadió a la muestra 200 µL de tampón AL, se mezcló en un vórtex durante 15 s e incubó a 70°C durante 10 min. Se centrifugó brevemente el tubo para eliminar las gotas del interior de la tapa.
4. Seguidamente, se adicionó 200 µL de etanol de grado molecular y se mezcló en un vórtex durante 15 s. Después de mezclar, se centrifugó brevemente el tubo.

5. Se aplicó cuidadosamente la mezcla de la etapa 4 (incluyendo el precipitado) a la columna de centrifugación QIAamp (en un tubo de recogida de 2 mL) cuidadosamente. Se cerró el tapón y centrifugó a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min. Luego se desechó el tubo que contiene el filtrado y se puso en la columna de centrifugación QIAamp, tubo limpio de recogida de 2 mL.
6. Se abrió con cuidado el spin de la columna QIAamp y se añadió 500 µL de tampón AW1 y se centrifugó a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min. Enseguida, se colocó la columna de centrifugación QIAamp en un tubo limpio de recogida.
7. Luego, se añadió 500 µL de tampón AW2 y se centrifugó a 14.000 rpm durante 3 min. Se repitió la centrifugación por 1 min, para evitar que queden residuos.
8. Se añadió 100 µL de buffer AE y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, luego se centrifugó a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min, finalmente se pasó el ADN obtenido a un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 mL (no incluido en el Kit).

La calidad de las muestras de ADN se evaluó por electroforesis; la concentración y pureza por espectrofotometría utilizando un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific™).

#### **5.6.6. Amplificación del ADN mediante PCR convencional**

Para la identificación de las especies de *Diphyllbothrium* sp. se usó el marcador molecular citocromo c oxidasa subunidad 1 (*cox1*) presente en el ADN mitocondrial (ADNmt). Las muestras de ADN extraídas fueron amplificadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador Veriti™ 96-well (Applied Biosystems, USA), para esto se amplificó usando dos juegos de cebadores, un cebador completo de la

*cox1* que identifica el género *Diphyllbothrium* y un cebador parcial de la *cox1* que identifica la especie *A. pacificus*.

Para la amplificación por PCR del gen *cox1* completo se utilizó el primers DipCO1f (5'-ATCAAATTAAGTTAAGTAGACTA-3') y DipCO1r (5'-CAAATAGCATGATGCAAAAAG-3') de 1730 pb por Wicht *et al.* (2010), pero con ligeras modificaciones por los autores.

Para la amplificación por PCR del gen *cox1* completo se utilizó el primers DipPaCO1f (5'-ACATGTGTGTAGTAACCTTGGC-3') específico de 747 pb (Wicht *et al.* 2010) y DipPaCO1r (5'-ATGATAAGGGAYAGGRGCYCA-3') común para todas las especies de *Diphyllbothrium* (Wicht *et al.* 2010) (Anexo B, Tabla 2).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL, incluyendo 5 µL de ADN genómico. La mezcla de la reacción contenía 2.5 U/µL Taq polymerasa (kit HotStarTaq DNA Polymerase Qiagen, Alemania), y 0.5 µM de cada cebador (Macrogen, Korea) (Anexo B, Tabla 3).

Las condiciones estandarizadas de amplificación en el termociclador consistieron en 1 ciclo a 95 °C por 5 min; 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 90 s, y 72 °C por 2 min 30 s; y un ciclo final de 72 °C por 10 min y de 1 ciclo a 95 °C por 5 min; 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 90 s, y 72 °C por 90 s; y un ciclo final de 72 °C por 10 min. (Anexo B, Tabla 4).

### **5.6.7. Electroforesis**

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa (Invitrogen) al 2 %, se corrió con buffer TBE al 0.5X a 100 V, 100 A por 45 min. Se utilizaron 5 µL del marcador GeneRuler Express DNA Ladder (#SM 1553) con bandas de tamaño: 5000, 3000, 2000,1500, 1000, 750, 500, 300 y 100 pb (Thermo Scientific) y 5 µL del marcador MassRuler DNA Ladder Mix (#SM0403) con bandas de tamaño: 10000, 8000,6000 5000, 4000

3000, 2500, 2000, 1500, 1031, 900, 800, 700, 600 500, 400, 300, 200 y 100 y 80 pb (Thermo Scientific). Para la tinción se usó bromuro de etidio durante 30 min. Los geles fueron visualizados con un sistema de fotodocumentación de geles (BIORAD, USA).

#### **5.6.8. Secuenciamiento del gen *cox1***

Se enviaron los productos de PCR para su secuenciamiento a MacroGen Inc., Korea. Las secuencias que se obtuvieron se compararon con las especies de *Diphyllbothrium* y *Adenocephalus pacificus* reportados y depositados en el DDJB/EMBL/GenBank hasta la fecha.

#### **5.6.9. Identificación molecular**

Para la identificación de las secuencias se buscaron y compararon con todas las secuencias disponibles en las bases de datos del NCBI GenBank/EMBL/DDBJ usando el programa de alineamiento local de secuencias BlastN versión 2.0 (Altschul *et al.*, 1997).

#### **5.6.10. Análisis bioinformático**

El alineamiento de las secuencias se realizó haciendo uso del Programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Para la edición de las secuencias obtenidas se utilizó el programa BioEdit (Hall. T. A., 1999). El análisis filogenético fue ejecutado con el programa MEGA versión 7.0 (Kumar *et al.*, 2013), usando Neighbor joining modelo Kimura 2 parámetros (Kimura, 1980; Saitou & Nei, 1987). Para la confiabilidad de las relaciones filogenéticas se evaluó utilizando análisis bootstrap no paramétrico.

## **5.7. Aspecto ético**

Algunas muestras de lobos marinos, humanos y perro se trabajaron de material codificado del Laboratorio de Parasitología de Fauna Silvestre y Zoonosis de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Otras muestras, fueron obtenidas de lobos marinos varados en las playas o recolectadas de las heces. Las muestras de humano para este estudio, fueron donadas por el Dr. Tantaleán de su colección. Los peces muestreados durante periodos estacionales del año 2016 fueron proporcionados por el Instituto Tecnológico de la Producción. Las muestras no son una amenaza a la biodiversidad ni para el hombre.



## VI. RESULTADOS

### 6.1. Muestreo

De los 22 ejemplares de *S. deliciosa* procedentes de muestras frescas de los diferentes puertos pesqueros se aislaron 40 plerocercoides, en 6 de *S. callaensis* 45, en 6 de *T. symmetricus murphyi* 1 y 40 en 3668 de *E. ringens* (Tabla 4). Las larvas se encontraron enquistadas y otras libres en la cavidad peritoneal, sobre la superficie visceral. Estas larvas son de color blanquecino, alargadas presentando un par de botrias características en la región cefálica y con estriaciones en el cuerpo; al colocarlas en solución salina se estiran y retraen presentando un tamaño entre 5-20 mm aproximadamente. (Tabla 5).

### 6.2. Identificación morfológica de la larva plerocercoides

La larva plerocercoides de *Diphyllobothrium* es una larva sólida caracterizada por presentar un escólex con botrias. En los ejemplares aislados de los diferentes hospederos (*E. ringens*, *T. symmetricus murphyi*, *S. deliciosa* y *S. callaensis*) se ha podido determinar tres formas variables del escólex: a) lanceolada, b) acorazonada y c) esférica a microscopía óptica (Leica DM750) (Fig. 2) y microscopía electrónica de barrido (Fig. 3).

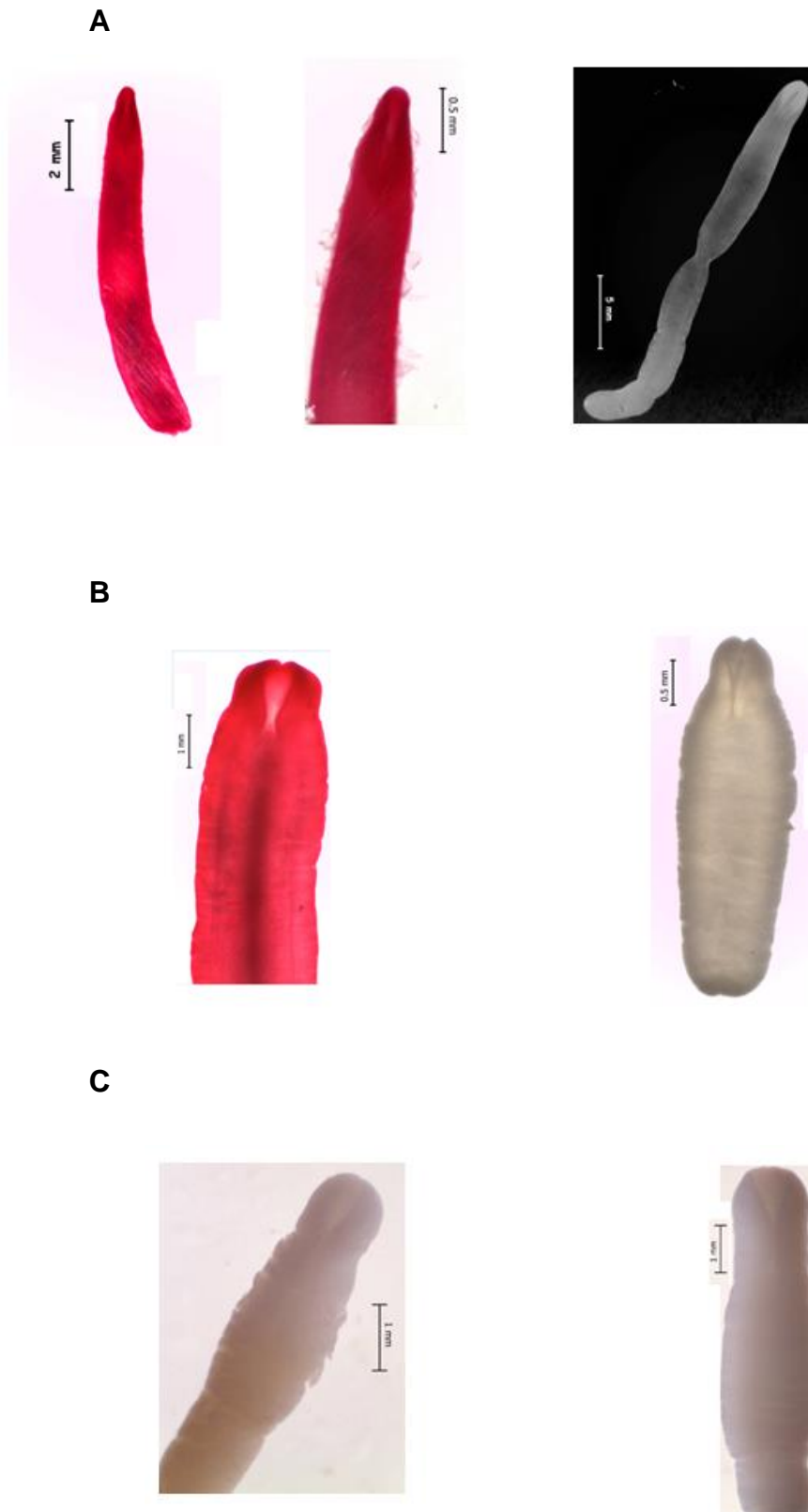


Fig. 2. Plerocercoides de *Diphyllobothrium*. (A) Escólex de forma lanceolada, superficie del cuerpo distendido. (B) acorazonada, cuerpo retraído y (C) esférica, parcialmente retraído.

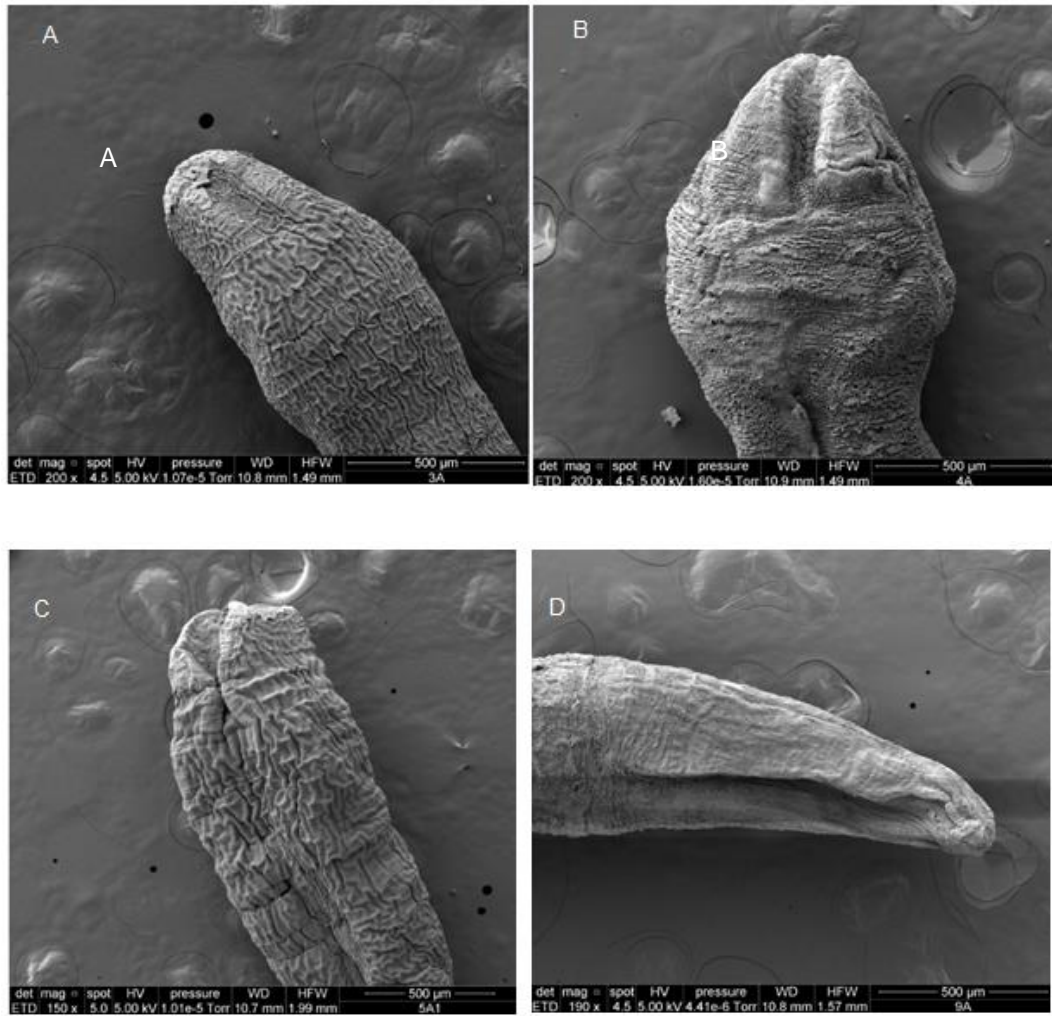


Fig. 3. Plerocercoides de *Diphyllobothrium*. (A) Escólex de forma esférica, (B) lanceolada corta, (C) acorazonada y (D) lanceolada larga. Vistas con microscopio electrónico de barrido (MEB).

Tabla 5. Número y formas de larvas plerocercoides de *Diphyllobothrium* sp., hospederos, su localización y zonas de adquisición.

HOSPEDEROS	LARVA PLEROCERCOIDE				ZONA	
	Nº	Positivos	Negativos	Forma	Nº	Localización
<i>E. ringens</i>	405	4	401	lanceolada	4	SV Callao (P)
<i>S. callaensis</i>	3	3	0	lanceolada	10	SE TVMT
<i>E. ringens</i>	500	3	497	lanceolada	3	SV Callao (P)
<i>E. ringens</i>	204	7	197	Lanceolada /esférica	7	SV Pisco (P)
<i>T. symmetricus murphyi</i>	6	1	5	lanceolada	1	SE Pisco (P)
<i>S. deliciosa</i>	22	9	0	lanceolada/acorazonada/ esférica	38	SE Chiclayo (P)
<i>E. ringens</i>	422	3	419	lanceolada/acorazonada	3	SV Callao (P)
<i>S.callaensis</i>	6	6	0	lanceolada/acorazonada/ esférica	44	SE TVMT
<i>E. ringens</i>	670	2	668	esférica	2	SV Callao (P)
<i>E. ringens</i>	767	1	766	lanceolada	1	SV Callao (P)
<i>E. ringens</i>	700	3	697	lanceolada/esférica	3	SV Callao (P)
<b>Total</b>	<b>3705</b>	<b>42</b>	<b>3650</b>		<b>116</b>	

SV= superficie visceral, SE= superficie del estómago. (P)= Puerto, TVMT= Terminal de Villa María del Triunfo.

### 6.3. Identificación morfo-anatómica del estadio adulto

El estadio adulto de *Diphyllobothrium* obtenido de *O. byronia* de Barranca, presentaba un escólex de forma acorazonada con una longitud de 4.46 mm y 2.46 mm de ancho, la estróbila con una longitud de 135 cm y 4 mm de ancho. El ejemplar de *O. byronia* de Huacho tiene un escólex de igual forma que la anterior, mide 3.1 mm de largo por 2.7 mm de ancho, la estróbila con 67 cm de largo y 3 mm de ancho. El espécimen obtenido de una mujer por expulsión natural tiene un escólex de forma acorazonada con medidas de 3.38 mm de longitud por 2.97 mm ancho, no se tiene una medida de la longitud total porque solo se obtuvo un segmento de la estróbila. La muestra de un niño (9 años aprox.) que ingresó al laboratorio proveniente de una posta médica se encuentra incompleta (sin escólex) y presentaba una medida de 46 cm de largo por 7 mm de ancho. El espécimen de hombre se encuentra sin escólex y se trabajó con un segmento de la estróbila (Fig. 4). Para la diferenciación de la morfo-anatomía del estadio adulto se utilizó proglótidos grávidos, observándose diferente número de hendiduras en cada ejemplar obtenido (Fig. 5).

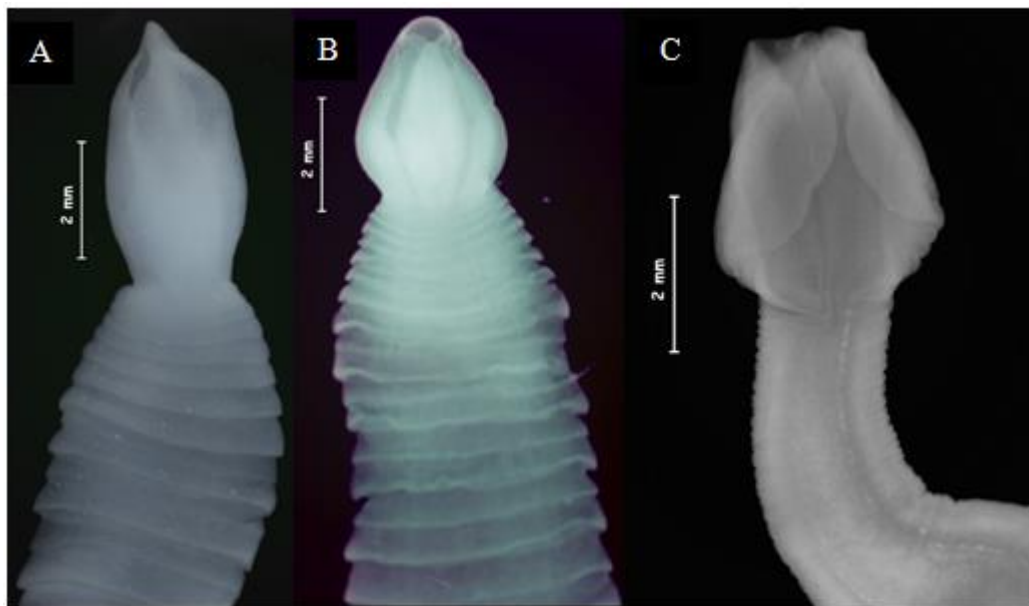
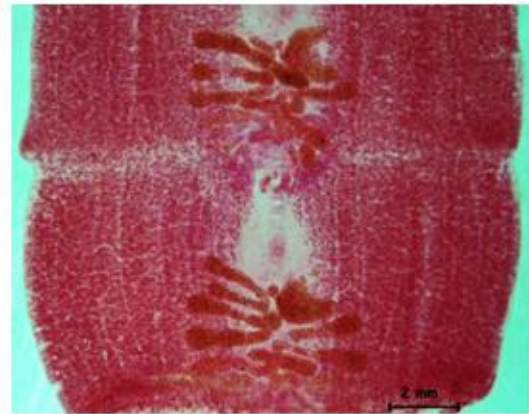


Fig. 4. Escólex de *Diphyllobothrium* sp. en *O. byronia* (A, B) y de humano (C).

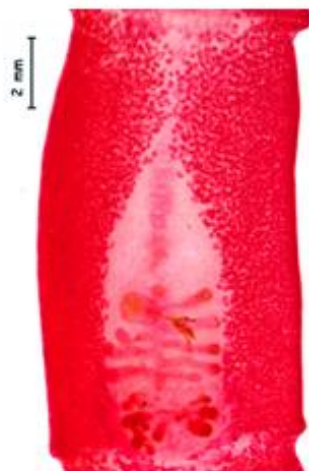
A



B



C



D



Fig. 5. Proglótidos grávidos de *Diphyllbothrium* sp. (A) varón, (B) mujer, (C) *O. byronia* y (D) niño.

## 6.4. Espectrofotometría y Electroforesis

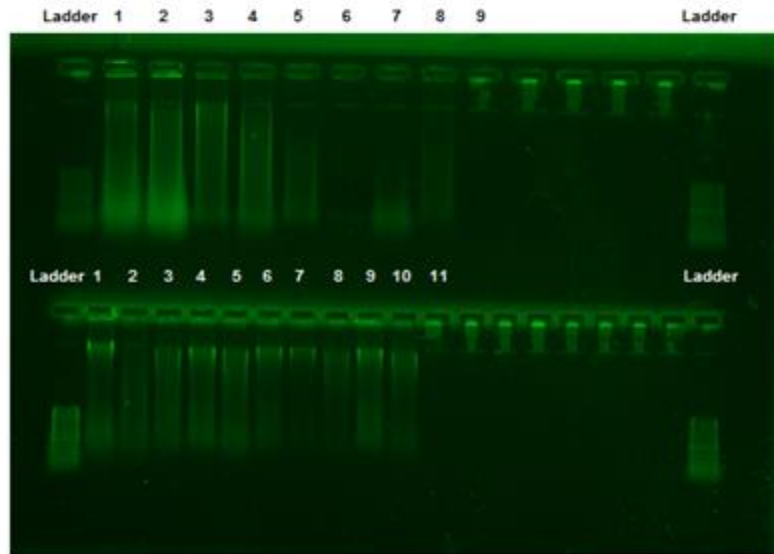
Para la cuantificación del ADN se utilizó un NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific™), obteniéndose una concentración de ácidos nucleicos en un rango de 29.3 a 1024.13 ng/ul adquiriendo valores indicativos de pureza óptima y aceptable ( $\leq 1.71$  a  $2.016 \text{ nm} \geq$ ). Se utilizó 2 ul de buffer AE para calibrar (blanqueo) y para la medición de las muestras. A continuación, se presenta el promedio de medida de 3 repeticiones de cada muestra de ADN extraída (Tabla 5).

Tabla 6. Promedio de la concentración de ácidos nucleicos y rango de medidas de absorbancias.

Muestra ID	Ácido nucleico	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230
Buffer AE	0.7	ng/μl	0.015	0	-52.6	0.96
ITP-1A	1024.13	ng/μl	20.483	10.148	2.016	1.473
ITP-2A	965.867	ng/μl	57.952	9.311	2.076	1.817
ITP-3A	145.3	ng/μl	2.906	1.567	1.853	1.583
ITP-4A	161.5	ng/μl	3.23	1.726	1.87	1.543
ITP-5A	29.3	ng/μl	0.586	0.332	1.767	1.437
ITP-1L	150.767	ng/μl	3.0157	1.71	1.763	0.82
ITP-2L	77.733	ng/μl	1.555	0.802	1.94	1.38
ITP-3L	121.7	ng/μl	2.427	1.422	1.71	0.74
ITP-4L	82.3	ng/μl	1.646	0.904	1.82	0.94
ITP-5L	99.1	ng/μl	1.982	1.128	1.757	0.81
ITP-6L	57.7	ng/μl	1.154	0.651	1.77	0.89
ITP-7L	29.8	ng/μl	0.596	0.333	1.777	1.027

La calidad de las muestras de ADN extraídas se realizó mediante pruebas de visualización en gel de agarosa al 0.8 % (Fig. 6).

A



B

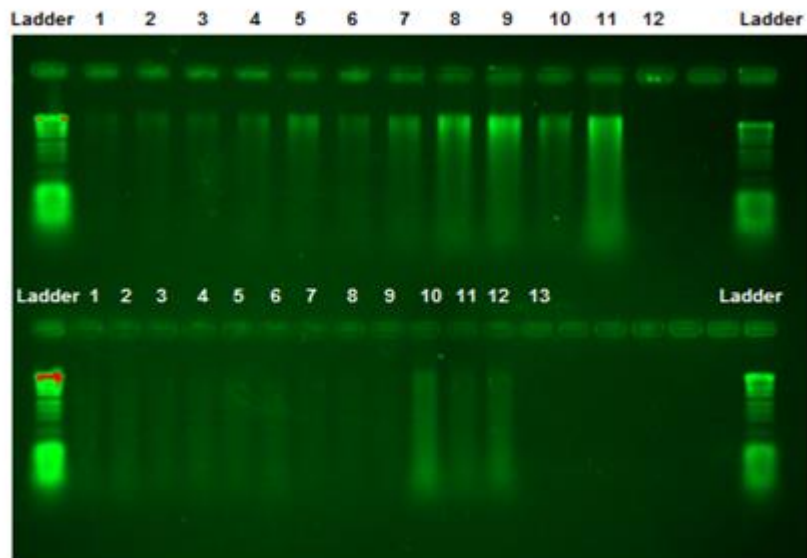


Fig. 6. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % del ADN extraído de las larvas plerocercoides y adultos de *Diphyllobothrium*. Se aprecian bandas intensas de smear. (A) Pocillos con ADN (1-11) y el control (12). (B) Con ADN (1-12) y control (13). Ladder en los extremos (100 – 5 000 pb).



## 6.5. Amplificación del ADN mediante PCR convencional

Para el cebador completo *cox1* se estandarizó la PCR modificando el tiempo a 2 min 30 s en el annealing (Anexo B, Tabla 4) obteniendo unas bandas intensas con smear de buena calidad para las larvas plerocercoides (Fig. 7). La PCR con el cebador completo para *Diphyllobothrium* mostró bandas intensas para el estadio adulto (Fig. 8). Para la amplificación de la PCR de los aislados de larvas plerocercoides, el tiempo programado en el annealing fue de 90 s (Figura 9) (Anexo B, Tabla 4).

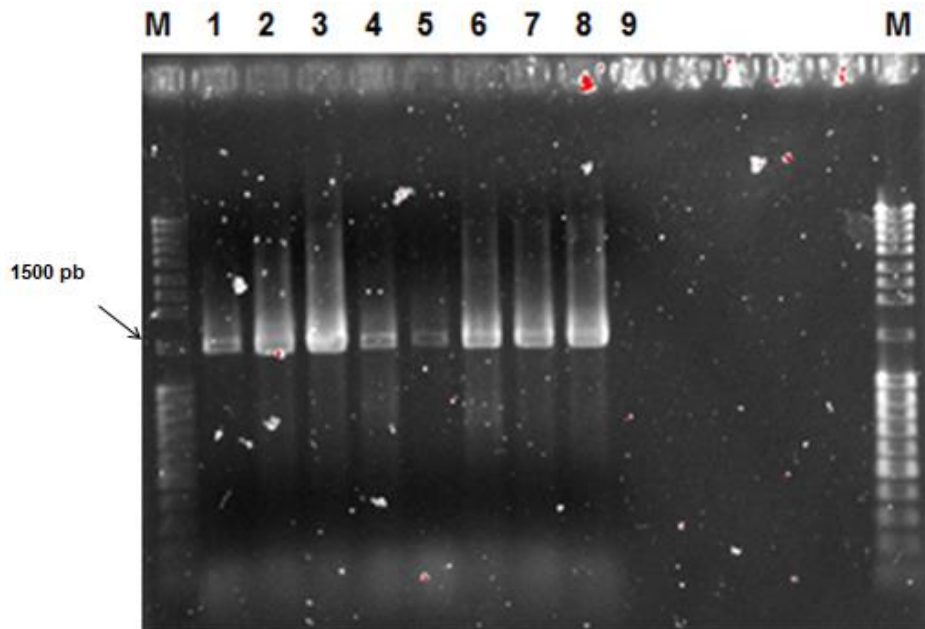


Fig. 7. Electroforesis del amplificado en gel de agarosa al 2 %. Carril del 1-8 con productos de 1500 pb aprox. del gen *Cox-1* del ADN de larvas plerocercoides de *Diphyllobothrium*. Carril 9 control negativo. Carril M MassRuler DNA Ladder Mix (#SM 0403).

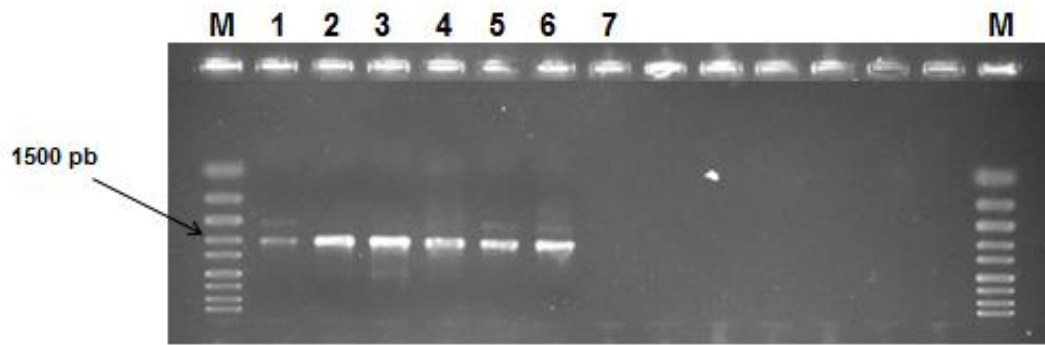


Fig. 8. Electroforesis del amplificado en gel de agarosa al 2 % Carril del 1-6 con productos de 1500 pb aprox. del gen *Cox-1* del ADN de adultos de *Diphyllbothrium*. Carril 7 control negativo. Carril M a los extremos GeneRuler Express DNA Ladder (#SM 1553).

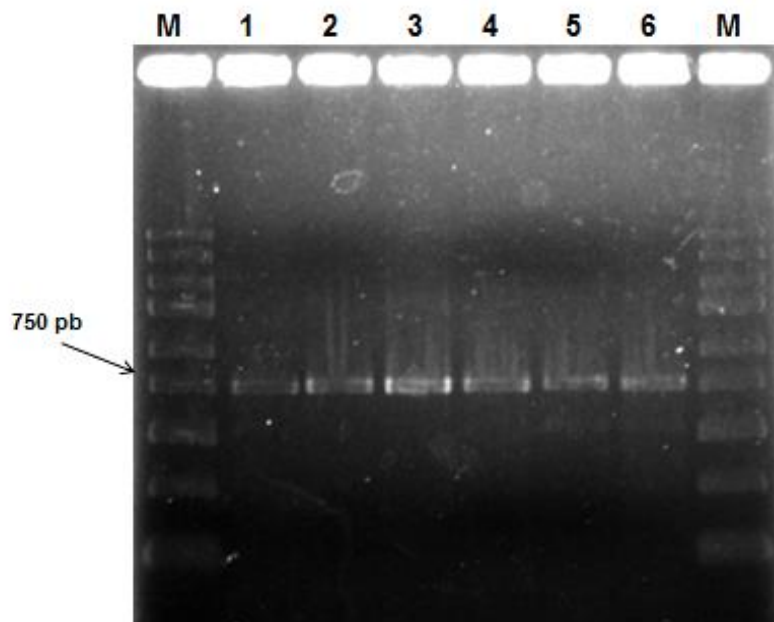


Fig. 9. Electroforesis del amplificado en gel de agarosa al 2 % Carril del 1-6 con productos de 750 pb aprox. del gen *Cox-1* del ADN de larvas plerocercoides de *Diphyllbothrium*. Carril M a los extremos GeneRuler Express DNA Ladder (#SM 1553).

## **6.6. Identificación molecular de los estadios larvario y adulto**

### **6.6.1. Secuenciamiento de la larva pleroceroide y adulto**

La amplificación por PCR del gen mitocondrial citocromo oxidasa 1 (*cox1*) a partir de las larvas pleroceroideas y adultos revelaron la presencia de *Adenocephalus pacificus* (= *Diphyllobothrium pacificum*) en 12 muestras, las secuencias fueron editadas en BioEdit obteniendo fragmentos de ADN de 358 pb, 457 pb, 660 pb, 696 pb en dos aislados y 565 pb en seis aislados.

En el alineamiento múltiple se comparó los 12 aislados de las secuencias del ADN mitocondrial *cox1* con códigos ITP-1A, ITP-2A, ITP-3A, ITP-4A, ITP-5A, ITP-1L, ITP-2L, ITP-3L, ITP-4L, ITP-5L, ITP-6L e ITP-7L con las secuencias parciales del GenBank de *D. pacificum* (= *A. pacificus*) (AB548651, AB548654), *A. pacificus* (KR269747 y KU519704), *Diphyllobothrium stemmacephalum* (LC090629), *Diphyllobothrium latum* (AY972073), *Diphyllobothrium nihonkaiense* (AB375004), *D. klebanovskii* (AB375673) y *D. dendriticum* (AM412738).

Por búsqueda en el BLAST se precisó según el porcentaje de identidad, que las secuencias nucleotídicas: ITP-1A, ITP-2A, ITP-3A, ITP-5A, ITP-2L, ITP-3L, ITP-5L e ITP-7L presentan un 99% de identidad a un aislado parcial del gen mitocondrial *cox1* de *A. pacificus* con número de acceso KU519704.1, mientras que los aislados ITP-4L, ITP-1L, ITP-4A e ITP-6L muestran con *A. pacificus* 91%, 93% y 96% de similitud respectivamente.

Para la determinación de las mutaciones se compararon con un gen completo del ADN mitocondrial *cox1* de *A. pacificus* con acceso en el GenBank (KR269744.1), encontrándose las siguientes variaciones: A por G en la posición 1039 y 1312 pb (ITP-1A), A por G en 1039 pb (ITP-2A), T por C en 1312 pb (ITP-3A), C por T en 987, 1019 y 1398 pb (ITP-5A), G

por T en 867, A por G en 883, C por T en 1017 y G por A en 1143 pb (ITP-5L) y C por T en 1017, G por A en 1143, G por T en 1164 pb (ITP-7L).

### 6.6.2. Análisis Filogenético

El árbol filogenético inferido de la secuencia *cox1* reveló que las muestras (ITP-1A, ITP-2A, ITP-3A, ITP-4A, ITP-5A, ITP-1L, ITP-2L, ITP-3L, ITP-5L, ITP-7L) están agrupadas en un mismo clado con *Adenocephalus pacificus* (= *Diphyllbothrium pacificum*) con valores altos de bootstrap. El análisis de los aislados ITP-4L, ITP-6L se encuentran agrupados en otro clado. Se utilizó como grupo externo a *Spirometra mansonioides* (AF096239) (Fig. 9).

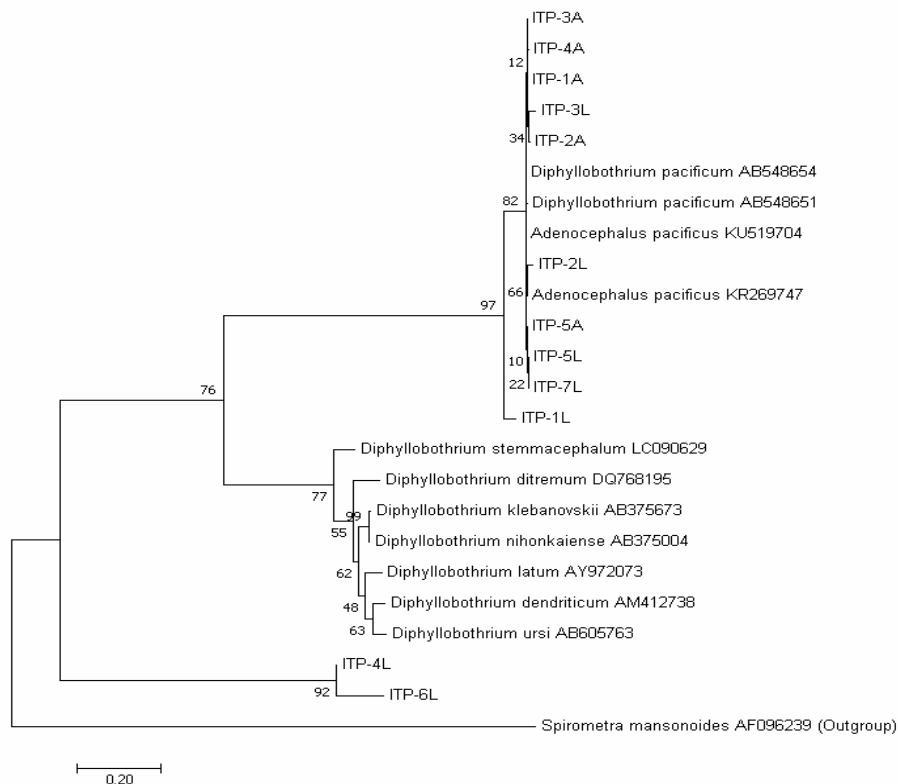


Fig. 10. Construcción de árbol filogenético a partir de secuencias de nucleótido parciales de *cox1* usando Neighbor joining modelo Kimura 2 parámetros. Valores de Bootstrap (10 000 repeticiones) se muestran en las ramas. *Spirometra mansonioides* es usado como grupo externo. Se indican todos los números de acceso al GenBank de las secuencias utilizadas para construir el árbol.

## VII. DISCUSIÓN

La identificación de las especies de *Diphyllobothrium* basada sólo en la morfología sigue siendo uno de los principales problemas de la sistemática debido a que no se logra dilucidar el rango de variabilidad de la mayoría de las especies. Este trabajo proporciona pruebas convincentes que *Adenocephalus pacificus* (= *Diphyllobothrium pacificum*) corresponde a otáridos y que el hombre es un hospedero accidental.

En el Perú uno de los primeros hallazgos de larvas plerocercoides de *Diphyllobothrium* en peces marinos (*Sciaena deliciosa* y *Paralonchurus peruanus*) de la costa peruana fue reportado por Tantaléan (1975) posteriormente describe en otras especies (*Trachinotus paitensis*, *Sarda sarda chilensis*, *Scomber japonicus peruanus*, *Scomberomorus maculatus sierra*, *Merluccius gayi peruanus*, *Galeichthys jordani* y *G. peruvianus*, *Genypterus maculatus* y *S. callaensis*) (Escalante, 1983; Tantaléan, 1984), llegando a incrementarse hasta 16 especies consideradas hospederos paraténicos (Tantaléan, 1994).

En el presente trabajo, en la especie *T. symmetricus murphyi* la prevalencia fue baja 16,6 % (1/6), en cambio, en *S. deliciosa* (22 individuos) se encontraron parasitados con las larvas plerocercoides, del mismo modo se encontró *S. callaensis* a diferencia de años anteriores donde la prevalencia era baja (Tantaléan, 1975; Escalante, 1983; Escalante y Miranda, 1986; Llerena *et al.*, 2001) o de lo reportado por Chero *et al.* (2014).

La fauna parasitaria de *Engraulis ringens* “anchoveta” no ha sido estudiada en la costa peruana. Para la costa norte y centro de Chile se mencionan los trabajos de Valdivia *et al.* (2007) y George-Nascimento &

Moscoso (2013) sobre la evaluación de metazoarios parásitos no reportándose la larva pleroceroide de *Diphyllobothrium*.

En otras especies de Engraulidae, como *E. anchoíta* procedente de Uruguay y Argentina (Timi *et al.*, 1999) y *Anchoa tricolor* de Brasil (Tavares *et al.*, 2005) igualmente no se reporta esta larva. Según, Kuchta *et al.* (2015) los segundos hospederos intermedios probablemente se traten de peces marinos como la anchoa japonesa, *Engraulis japonica* y la sardina japonesa, *Sardinops melanostictus* y otros.

En el presente trabajo se muestreo 3668 ejemplares de *E. ringens*, encontrándose parasitados con la larva pleroceroide de *Diphyllobothrium* libre localizándose sobre la superficie de las vísceras, no enquistado en el tejido muscular como se suponía encontrar en un pez planctónico (Tantaleán y Huiza, 1984); sin embargo, se hipotetiza que en el 2° hospedero intermedio la larva pleroceroide puede encontrarse libre. Aunque la prevalencia en *E. ringens* fue muy baja 1,09 % (40/3668) para la cantidad de ejemplares muestreados, es importante, ya que este es el primer reporte para el Perú y Sudamérica.

Además, se pensaba que el 2<sup>do</sup> hospedero intermedio en el ciclo de vida sería un pez planctónico como la anchoveta; sin embargo, de dos aislados, solo ITP-3L fue identificado como *Adenocephalus pacificus* con una similaridad de 99% con una secuencia de referencia con número de acceso KU519704.1 buscado en el BLAST y el aislado ITP-4L presentó una similitud del 91% con *A. pacificus*, pero este último se agrupó en un clado hermano de *Diphyllobothrium* según la inferencia filogenética, pero este resultado, supondría una especie diferente que no se podría afirmar todavía hasta realizar otros estudios.

Así mismo, los aislados de *S. deliciosa* y *S. callaensis* se ubican en el mismo clado con *A. pacificus*. Sólo el aislado ITP-6L que pertenece a *T. symmetricus murphyi* se agrupó en un clado hermano de los *Diphyllobothrium*, que permite cuestionarnos si se trata de otra especie de

*Diphyllobothrium* o se trata de *A. pacificus* con una alta variabilidad intraespecífica, esto solo se podría confirmar utilizando otros marcadores moleculares y compararlos para evaluar su especificidad, porque quizás el marcador *cox1* no sea el adecuado para esta especie en particular.

Los aislados de los estadios adultos obtenidos de humanos (ITP-1A, ITP-2A e ITP-5A) se ubicaron en un mismo clado con *A. pacificus* comparados con una secuencia de referencia (KU519704) de un caso raro de un niño de 3 años infectado en Australia (Moore *et al.*, 2016) y de dos aislados (AB548651 y AB548654) de humanos procedentes de Perú evaluados por Wicht *et al.* (2010) por presentar una alta identidad (99%).

Los aislados de los estadios adultos obtenidos de *Otaria byronia* (ITP-3A e ITP-4A) se encuentran en el mismo clado que los aislados de humanos anteriormente comparados (KR269747, KU519704, AB548651 y AB548654), no encontrándose ninguna secuencia de referencia de un aislado de *O. byronia* depositada en el Genbank.

Rausch *et al.* (2010), realizaron una redescrición morfológica y determinaron que existen dos especies de *Diphyllobothrium* en humanos y otáridos en la costa del Pacífico de Sudamérica (*D. pacificum* y *D. arctocephalinum*), basados en características de las hendiduras localizadas anterior al poro genital en los proglótidos grávidos y estudios en cortes sagitales de estos, pero en las muestras obtenidas en el presente estudio (fig.4. B y D) los proglótidos grávidos de humanos son muy parecidos en morfología al de humano residente en el norte de Perú que mencionan Raush *et al.* (2010) denominándolo *Diphyllobothrium arctocephalinum*; sin embargo, las pruebas moleculares arrojaron un 99% de identidad con *A. pacificus*. Estos datos apoyan fuertemente la validez de *A. pacificus* como una especie con alta variabilidad inter e intra-específica (Wicht *et al.*, 2010) y está marcadamente distante de especies de *Diphyllobothrium* reportadas infectando humanos en peces de agua dulce (*D. latum*, *D. nihonkaiense* y *D. dendriticum*) y de marinos (*D. cordatum* y *D. lanceolatum*). Los valores muy bajos de similitud de

secuencias de *A. pacificus* con otros taxones secuenciados incluso indican que *Adenocephalus*, que fue colocada originalmente, todavía debe ser retenido como un género válido.

Chero *et al.* (2014) mencionan una prevalencia de 17 % de larvas plerocercoides de *D. pacificum* y 3 % de *D. arctocephalinum* en *S. deliciosa*, basado en la morfología del escólex de las larvas, indicando la forma redondeada- elipsoidal para *D. pacificum* y elipsoidal para *D. arctocephalinum* en vista lateral, nosotros hemos encontrado tres formas de escólex en las larvas: lanceolada, acorazonada y redondeada, esto no es una característica específica para determinar la especie como lo afirman, siendo estas propuestas de formas de escólex no significativas, por lo tanto no válidas. Nosotros mediante una identificación molecular con el gen *cox1* obtuvimos como resultado que todos los aislados de lorna corresponden a *A. pacificus*. Wicht *et al.* (2010), también analizaron dos aislados de larvas plerocercoides de *S. deliciosa* con el gen *cox1*, ITS1 e ITS2 identificándolo como *D. pacificum*; sin embargo, estas secuencias hasta la fecha no se encuentran en el GenBank. La única secuencia encontrada en el Genbank es el aislado de una larva plerocercoides obtenida de *Sarda chilensis* “bonito” que corresponde a *A. pacificus* (Hernández-Orts *et al.*, 2015), además menciona que la forma del escólex de *A. pacificus* es bastante variable incluso entre especímenes de un mismo hospedero, lo que confirmamos en el presente estudio, observando estas características tanto en el estadio larvario como en el adulto.

Las inferencias filogenéticas moleculares basadas en diversos marcadores genéticos (Škeříková *et al.*, 2006; Wicht *et al.*, 2008; Kuchta *et al.*, 2014) han colocado a *A. pacificus* (= *D. pacificum*) aparte de las otras especies de *Diphyllbothrium*, hermana de un clado compuesto por *Diphyllbothrium* y varios otros géneros de los Diphyllbothriidae incluyendo *Diplogonoporus* Lönnberg, 1872, *Ligula* Bloch, 1782 y *Spirometra* Faust, Campbell et Kellogg, 1929.



Teniendo antecedentes que *A. pacificus* difiere morfológicamente de *D. latum*, *D. nihonkaiense* y *D. dendriticum*, muestreamos y caracterizamos 12 aislados supuestamente de *A. pacificus*, de los cuales 5 son adultos (humanos y de *O. byronia*) y 7 larvas plerocercoides (peces) del Perú, para probar el estatus sistemático y las relaciones filogenéticas de *A. pacificus* (= *D. pacificum*). Los resultados utilizando *cox1* permitieron en 10 aislados (5 adultos y 5 larvas plerocercoides) identificarlos indiscutiblemente como *A. pacificus*, mientras que los otros 2 aislados (larvas plerocercoides) pertenecen a la misma especie o a un clado hermano, esto nos indicaría que es necesario trabajar con otros marcadores moleculares como el ITS1 e ITS2; debido a que el ADN mitocondrial presenta un alto polimorfismo en los cestodos, mientras que los genes del ADN ribosomal son blancos más conservados (Okamoto *et al.*, 2007; Bouzid *et al.*, 2008; Yera *et al.*, 2008). Por lo tanto, los únicos dos aislados que se encuentran en otro clado hermano corresponderían tal vez, a una especie de *Diphyllobothrium*, ya que la alta variabilidad inter e intra-específica de los difilobotridos asociados con diferentes hospederos y áreas geográficas, que no se toman en cuenta, podrían estar influyendo.

*A. pacificus* parasitan desde tiempos ancestrales al hombre (Patrucco *et al.*, 1983; Le Bailly y Bouchet, 2013); sin embargo, hay desconocimiento de su biología, epidemiología y distribución, siendo obstáculos que complican un control efectivo de la enfermedad en el hombre. Se necesitan más investigaciones utilizando herramientas moleculares que facilitarían la comprensión de los ciclos de vida de los Diphyllbothridea.

## VIII. CONCLUSIONES

1. Se reporta por primera vez la presencia de la larva pleroceroide de *Adenocephalus pacificus* (= *Diphyllobothrium pacificum*) en *Engraulis ringens* “anchoveta”.
2. Por vez primera en el Perú se identifica como *Adenocephalus pacificus* con el gen *cox1* a 2 aislados de *Otaria byronia* “lobo chusco”.
3. Se identifica mediante el marcador molecular *cox1* a tres aislados de humanos como *A. pacificus*, verificando hasta la fecha como el único agente etiológico de la difilobotriasis en el Perú.
4. Proporcionamos la primera evidencia de *A. pacificus* por PCR con el gen *cox1* de los aislados de las larvas pleroceroideas de *E. ringes*, *S. callaensis* y *T. symmetricus murphy* como hospederos paraténicos (o intermediarios).
5. Se hipotetiza que *E. ringens* podría ser el 2° hospedero intermediario de *Adenocephalus pacificus*.
6. Se demuestra que los proglótidos grávidos del estadio adulto y el escólex de la larva pleroceroide presentan alta plasticidad morfológica y probablemente se trate de una sola especie.
7. De acuerdo a las inferencias filogenéticas basadas en el gen *cox1*, se determinó que los adultos y cinco larvas pleroceroideas se agrupan en un mismo clado con *A. pacificus*.

## IX. RECOMENDACIONES

Es inevitable el consumo de pescado crudo como ceviche, tiradito entre otras formas, por lo tanto, se recomienda consumir el pescado dentro de los parámetros de congelación por ser una manera de control para esta enfermedad parasitaria.

El cambio de temperatura superficial del mar, el fenómeno El Niño y otros cambios ambientales pueden tener efectos repentinos en la epidemiología de esta zoonosis, debido a esto se recomienda evaluar la fauna parasitaria de los peces y recursos hidrobiológicos durante las diferentes estaciones del año y cambios climáticos que ocurre en el litoral peruano.

La alta plasticidad morfológica que presenta *Adenocephalus pacificus* en los diferentes hospederos en las etapas de desarrollo y de sus orígenes geográficos no permite su fácil identificación, por lo que se requieren realizar estudios utilizando diferentes marcadores moleculares.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altschul, S.F, Madden, T.I., Schaffer, A.A, Zhanq, J., Zhanq, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped Blast and PSI\_Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*; 25 (17):3389-402.

Arrieta, S. B., Goicochea, C.E., Moquillaza, P.I. & Mostacero, J.A. 2010. Edad y crecimiento de la lorna *Sciaena deliciosa* (Tschudi) en el mar del Callao (12°S), Perú, 1996. Informe del Instituto del Mar del Perú, vol. 37, pp. 65-70.

Arias-Schreiber, M. 2000. Los lobos marinos y su relación con la abundancia de la anchoveta peruana durante 1979-2000.

<http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe:8080/handle/123456789/1005>

Baer J, G., Miranda, C., H., Fernandez, R., W., Medina, T., J., 1967. Human diphyllbothriasis in Peru. *Z Parasitenkd.*; 28:277–89.

<http://dx.doi.org/10.1007/BF00260267>

Berta A. & Churchill, M. 2012. Pinniped taxonomy: review of the evidence for description of currently recognized pinniped species and subspecies. *Mammal Review* 42: 207-234. DOI: 10.1111/j.1365-2907.2011.00193.x.

Bouزيد W., Stefka J., Hypsa V., Lek S., Scholz T., Legal L., *et al.* 2008. Geography and host specificity: two forces behind the genetic structure of the freshwater fish parasite *Ligula intestinalis* (Cestoda: Diphyllbothriidae). *Int J Parasitol*; 38: 1465-79.

Bylund, G., B. Bång, and K. Wikgren. 1977. Tests with a new compound (Praziquantel) against *Diphyllbothrium latum*. *J. Helminthol.* 51:115–119.

Cabrera, R. Coronado, C., Ampuero, S. 1994. Parásitos de Otáridos de la costa peruana y su importancia sanitaria. *Boletín de Lima.* 16 (91-96): 77-80.

Cabrera, R., Tantaleán, M., Rojas R. 2001. *Dipyllobothrium pacificum* (Nybelin, 1931) Margolis, 1956 en *Canis familiaris* de la ciudad de chincha, Perú. Bol. Chil. Parasitol. 56 (1-2). <http://dx.doi.org/10.4067/S0365-94022001000100007>

Cabrera, R., 2003. Helminfos intestinales en el Perú: Análisis de la prevalencia (1981-2001). OGE. Ministerio de Salud, Perú. 113 pg.

Cárdenas, L., Silva, A., Magoulas, A., Cabezas, J., Poulin, E., Ojeda, F. 2009. Genetic population structure in the Chilean jack mackerel, *Trachurus murphyi* (Nichols) across the South-eastern Pacific Ocean. Fisheries Research 100:109–115.

Chai, J.Y., Murrell D., Lymbery A.J., 2005. Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues. International Journal for Parasitology; 35: 1233–1254. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.07.013>

Chen, S., Ai, L., Zhang, Y., Chen, J., Zhang, W., Li, Y., Muto, M., Morishima, Y., Sugiyama, H., Xu, X., Zhou, X. and Yamasak, H. 2014. Molecular Detection of *Diphyllobothrium nihonkaiense* in Humans, China.

Chero, J., Sáez, G., Iannacone, J., Aquino, W. (2014). Aspectos ecológicos de los helminfos parásitos de lorna *Sciaena deliciosa* (Tschudi, 1846) (Perciformes:Sciaenidae) adquiridos del Terminal Pesquero de Ventanilla, Callao, Perú. Neotrop. Helminthol., 8(1):59-76. ISSN: 1995-1043 on line.

Chirichigno, N. & M. Vélez. 1998. Clave para identificar los peces marinos del Perú. Publicación Especial del Instituto del Mar. Instituto del Mar del Perú, Callao, 500 pp.

Chirichigno, F., N. & Cornejo, R., M. 2001. Catálogo comentado de los peces marinos del Perú. Instituto del Mar del Perú, IMARPE, Publicación especial. Callao, Perú. 314 p.

Csirke, J. 2013. El Jurel *Trachurus murphy* en el Perú. Rev. peru biol. vol.20 no.1. versión On-line ISSN 1727-9933

Desvois, L., A. Gregory, T. Ancelle, and J. Dupouy-Camet. 2001. Enquête sur l'incidence de la bothriocéphalose en Haute-Savoie (1993-2000). Bull. Epidem. Hebd. 45:211–213.

Dick, T. A., P. A. Nelson, and A. Choudhury. 2001. Diphyllobothriasis: update on human cases, foci, patterns and sources of human infections and future considerations. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 32:59–76.

Duarte, L.O. 2001. El Niño un experimento trófico global: ¿Dr. Jekyll o Mr. Hyde? Ensayos Oceanogr. Biol., 1: 15-23.

Dupouy-Camet J., & Peduzzi R., 2004. Current situation of human diphyllobothriasis in Europe. Euro Surveill; 9: 31–35.

Eguchi, S. 1973. *Diphyllobothrium latum* (Linnaeus, 1758). Proc. Med. Parasitol. Jpn. 5:127–144.

Escalante A. 1983. Larvas plerocercoides de Diphyllobothriidae Lühe, 1910: Hallazgo en peces marinos de consumo humano en la costa peruana.

Escalante, H. y Miranda, H. 1986. *Diphyllobothrium pacificum*: Hallazgo de larvas plerocercoides en peces marinos del Perú y desarrollo de formas adultas del parásito en *Canis familiaris*. Bol. Chil. Parasitol., 41: 7-13.

Espinoza, P., Bertrand, A. 2008. Revisiting Peruvian anchovy (*Engraulis ringens*) trophodynamics provides a new vision of the Humboldt Current system. Progress in Oceanography 79, 215–227. <http://doi.org/10.1016/j.pocean.2008.10.022>

Estrella, C. 1994. Análisis Poblacional de *Sciaena deliciosa* (Tschudi) "Iorna" en el litoral peruano entre 1984-1992. Tesis para optar Título Lic. En Biología. Univ. Ricardo Palma. Fac. Cc. Biológicas. Lima.

Evseenko, S.A. - 1987. Reproduction of Peruvian jack mackerel, *Trachurus symmetricus murphyi*, in the Southern Pacific. J. Ichthyol., 27 (3): 151-160.

Gárate, M., Naupay, A. 1999. Un caso de Diphyllobotriasis en zona altoandina. Rev Per Parasitol. 14: 84-86.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

Hasegawa, H., Hotta, T., Otsuru, M. 1980. Studies on the Diphyllobothriid Cestodes in Northern Japan (4) Plerocercoids recovered from the Alaskan Haddock, *Theragra chalcogramma*, and adults developed in the golden hamster. Jap. J. Parasit. 29 (6): 473-482.

Jiménez, J., Rodríguez, S., Gamboa, R., Rodríguez, L., García, H. and for the Cysticercosis Working Group in Peru. 2012. *Diphyllobothrium pacificum* Infection is Seldom Associated with Megaloblastic Anemia. Am J Trop Med Hyg.; 87(5): 897–901.

Jordan R, Chirinos de Vildoso A. 1965. La anchoveta (*Engraulis ringens* J.). Conocimiento actual sobre su biología ecología y pesquería. Inf. Inst. Mar Perú. 6: 3-52.

Kamo, H., Yamane, Y., Kawashima, K. 1981. The first record of human infection with *Diphyllobothrium cameroni* rausch, 1969. Japan. J. trop. Med. Hyg, 9 (3-4): 199-205.

Kifune, T., Hatsushika, R., Ushirogawa, H., Takeda, S., Kono, K., Shimizu, T. 2000. A case study of human with Diphyllibothriid tapeworm (Cestoda:

Pseudophyllidea) found from a man in Fukuoka Prefecture. Japan. Med, Bull. Fukuoka Univ.:27(2), 93-100.

Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16:111-120.

Konchina, Y.V., 1991. Trophic status of the Peruvian anchovy and sardine. Journal of Ichthyology 31, 59–72.

Kuchta R., Scholz T., Brabec J., Bray R.A., 2008. Suppression of the tapeworm order Pseudophyllidea (Platyhelminthes: Eucestoda) and the proposal of two new orders, Bothriocephalidea and Diphyllbothriidea. International Journal for Parasitology 38:49–55. doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.08.005

Kuchta R., Scholz T., Brabec J., Wich B. 2015. *Diphyllbothrium*, *Diplogonoporus* and *Spirometra*. In: Xiao L, Ryan U, Feng F, editors. Biology of foodborne parasites. Section III. Important foodborne helminthes. Boca Raton FL: CRC Press; p. 299-326.

Kuchta R., Serrano-Martínez M., Scholz T. 2015. Pacific Broad Taperworm *Adenocephalus pacificus* as a causative Agent of Globally Reemerging Diphyllbothriosis. Emerging Infectious Diseases. 21(10):1697-1703. [https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/10/15-0516\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/10/15-0516_article)

Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 33:1870-1874.

Le Bailly M. & Bouchet F. 2013. Diphyllbothrium in the past: review and new records. Int J Paleopath; 3: 182-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpp.2013.05.004>

León, C.E.C. 2011. Muestreo estacional del contenido graso en músculos de “Caballa” *Scomber japonicus*, Jurel *Trachurus picturatus murphy*,



“Lorna” *Sciaena deliciosa* y “Machete” *Ethmidium maculatum chilcae*.  
Ingeniería Pesquera y de Alimentos. Universidad Nacional del Callao.

Lumbreras, H., H. Terashima, H. Alveraz, R. Tello, and H. Guerra. 1982.  
Single dose treatment with praziquantel (Cesol R, Embay 8440) of human  
cestodiasis caused by *Diphyllobothrium pacificum*. Tropenmed.  
Parasitol.33:5–7.

Llerena C, Chávez, A y Casas AE. 2001. Frecuencia de larvas  
Diphyllobothriidae y larvas Anisakidae en peces marinos comerciales del  
terminal pesquero de Ventanilla – Callao. Revista de Investigaciones del  
Perú, vol.12, pp. 45-48.

Majluf P. y Trillmich, F. 1981. Distribution and abundance of Sea Lions  
(*Otaria byronia*) and Fur Seals (*Arctocephalus australis*) in Perú.Z.f.  
Säugetierkunde 4686) 384-393.

Medina J.F., Tantaleán V.M., León R.M., Cano, R.M. 2002.  
*Diphyllobothrium pacificum* en niños del Perú. Diagnóstico 41(4):161-164.  
(<http://www.fihu-diagnostico.org.pe/revista/números/2002/julago02/161-164.html>).

Mejía J., Samame, M. y Pastor, A. 1970. Información básica de los  
principales peces de consumo. Informes Especiales IMARPE, N° IM-62,  
Julio 1970. 20 pp.

Mercado R., Yamasaki, H., kato M., Muñoz, V., Sagua H., Torres P.,  
Castillo D. 2010. Molecular identification of the *Diphyllobothrium* species  
causing diphyllobothriasis in Chilean patients. Parasitol Res., 106 (4): 995-  
1000. doi: 10.1007/s00436-010-1765-6

Mezzari A., Wiebbelling A. 2008. Diphyllobothriasis in Southern Brazil.  
Clinical Microbiology Newsletter 30:4.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2008.01.007>

Miranda H, Fernandez W, Bocanegra R. 1967. Diphyllbothriasis, estado actual en el Perú. Descripción de nuevos casos. Arch Peru Patol Clin.; 21:53–70.

Moore C, Thompson RCA, Jabbar A, Williams J, Rasiyah K, Pallant L, Koehler AP, Graham C, Weldhagen GF. 2016. Rare human infection with Pacific broad tapeworm *Adenocephalus pacificus*, Australia. Emerging Infectious Diseases; 22(8): 1510-1512.

Okamoto M., Iseto C., Shibahara T., Wandra T., Craig PS., *et al.* 2007. Intraspecific variation of *Spirometra erinaceieuropaei* and phylogenetic relationship between *Spirometra* and *Diphyllbothrium* inferred from mitochondrial CO1 gene sequences. Parasitol Int; 56: 235-8.

Patrucco R., Tello R., Bonavia D. 1983. Parasitological studies of coprolites of pre-Hispanic Peruvian populations. Curr Anthropol. 24: 393-4. <http://dx.doi.org/10.1086/203016>

Perea A., J. Mori, B. Buitrón & J. Sánchez. 2013. Aspectos reproductivos del jurel *Trachurus murphyi* en el Perú. Rev. peru. biol. número especial 20(1): 029- 034.

Raether, W., and H. Hänel. 2003. Epidemiology, clinical manifestations and diagnosis of zoonotic cestode infections: an update. Parasitol. Res. 91:412–438. doi:10.1007/s00436-003-0903-9

Rausch, R., Hilliard, D. 1970. Studies on the helminth fauna of Alaska. XLIX. The occurrence of *Diphyllbothrium latum* (Linnaeus, 1758) (Cestode: Diphyllbothriidae) in Alaska, with notes on other species. Canadian Journal of Zoology, 48(6): 1 201-1 219.

Rausch, R., Adams, A., Margolis, L. 2010. Identity of *Diphyllbothrium* spp. (Cestoda: Diphyllbothriidae) from sea lions and people along the pacific coast of South America. J. Parasitol, 96(2): 359-365. doi: <http://dx.doi.org/10.1645/GE-2257.1>

Rêgo AA. Uma nova ocorrência de “Lüheella” (Diphyllobothriidae, Pseudophyllidea) em homem. Atas Soc Biol Rio de Janeiro. 10:161–2.

Rice DW (1998) Marine Mammals of the World. Society for Marine Mammalogy Special Publication 4, 1–231. Lawrence, Kansas, USA.

Sagua, H., Neira, I., Araya, J. y González. J. 2001. Nuevos casos de infección humana por *Diphyllobothrium pacificum* (Nybelin, 1931) Margolis, 1956 en Chile y su probable relación con el fenómeno de El Niño, 1975-2000. Bol. Chil. Parasitol. 56:22-25

Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4:406-425.

Scholz, T., Garcia H., Kuchta, R., Wicht B., 2009. Update on the Human Broad Tapeworm (Genus *Diphyllobothrium*), Including Clinical Relevance. Clinical Microbiology Reviews, p. 146–160 Vol. 22, No. 1. doi: 10.1128 / CMR.00033-08

Skerikova, A., Brabec, J., Kuchta, R., Jimenez, J., Garcia, H.H. & Scholz, T. 2006. Is the human-infecting *Diphyllobothrium pacificum* a valid species or just a South American population of the holarctic fish broad tapeworm, *D. latum*? Am. J. Trop. Med. Hyg., 75 (2), 307-310. PMID: 16896138 [Indexed for MEDLINE].

Tantaleán, V. M. 1975. Hallazgo de larvas plerocercoides de Diphyllobothriidae Lihe, 1910 (Cestoda) en peces del mar peruano. Bol. Chile Parasit, 30:18-20.

Tantaleán, M., Huiza, A. 1984. La Diphyllobothriasis y su epidemiología en el Perú. Los hospederos paraténicos de *Diphyllobothrium pacificum*. Bol Med Trop UNMSM (Lima) 3: 3-4.

Tantaleán, V. M. 1993. Nota sobre parasitismo intestinal diagnosticado en el IMT Daniel A. Carrión. Rev. Per. Med. Trop. UNMSM; 7(2): 99-103

Tantaleán, M., Huiza, A. 1994. Sinopsis de los parásitos de peces marinos de la costa del Perú. *Biotempo* 1:53-101.

Tantaleán, M. & Huiza, A. 2012. Las especies de *Diphyllbothrium* (Cestoda, Diphyllbothriidae) presentes en el Perú. Libro de resumen del XXI congreso reunión científica ICBAR, pp. 125.

Tavares, L. E. R., Luque, J. L.; Bicudo, A. J. A., *Braz. J.* 2005. Ecologia da comunidade de metazoários parasitos de manjuba *Anchoa tricolor* (Osteichthyes: Engraulidae) do litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Biol.* vol.65 no.3 São Carlos Aug. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842005000300019>

Terashima, I.A., 2000. Diphyllbothriasis. *Diagnóstico*, 39: 183-186.

Timi, J., Martorelli, S. & Sardella, N.1999. Digenetic trematodes parasitic on *Engraulis anchoita* (Pisces: Engraulidae) from Argentina and Uruguay. *Folia Parasitologica* 46[2] 132-138

Valdivia, I., Chávez, R. & Oliva, M. 2007. *Journal of Fish Biology* 70, 1504–1511 doi:10.1111/j.1095-8649.2007.01429.x

Vuylsteke P., Bertrand C., Verhoef G.E., Vandenberghe P., 2004. Case of megaloblastic anemia caused by intestinal taeniasis. *Ann Hamatolol* 83: 487-488. DOI: 10.1007/s00277-003-0839-2

Wicht, B., F. de Marval, and R. Peduzzi. 2007. *Diphyllbothrium nihonkaiense* (Yamane et al., 1986) in Switzerland: first molecular evidence and case reports. *Parasitol. Int.* 56:195-199.

Wicht, B., Scholz, T., Peduzzi, R., Kuchta, R. 2008. First record of human infection with the tapeworm *Diphyllbothrium nihonkaiense* in North America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78:235-238.

Wicht, B., 2009. Ecology, epidemiology and molecular identification of the genus *Diphyllobothrium* Cobbold, 1858 in the sub-alpine lakes region. Ph.D. thesis no. 4046. University of Geneva, Geneva, Switzerland.

Wicht, B., N. Ruggeri-Bernardi, T. Yanagida, M. Nakao, R. Peduzzi, and A. Ito. 2010. Inter- and intra-specific characterization of tapeworms of the genus *Diphyllobothrium* (Cestoda: Diphyllbothriidea) from Switzerland, using nuclear and mitochondrial DNA targets. *Parasitol. Int.* 59:35-39. DOI: 10.1016/j.parint.2009.09.002

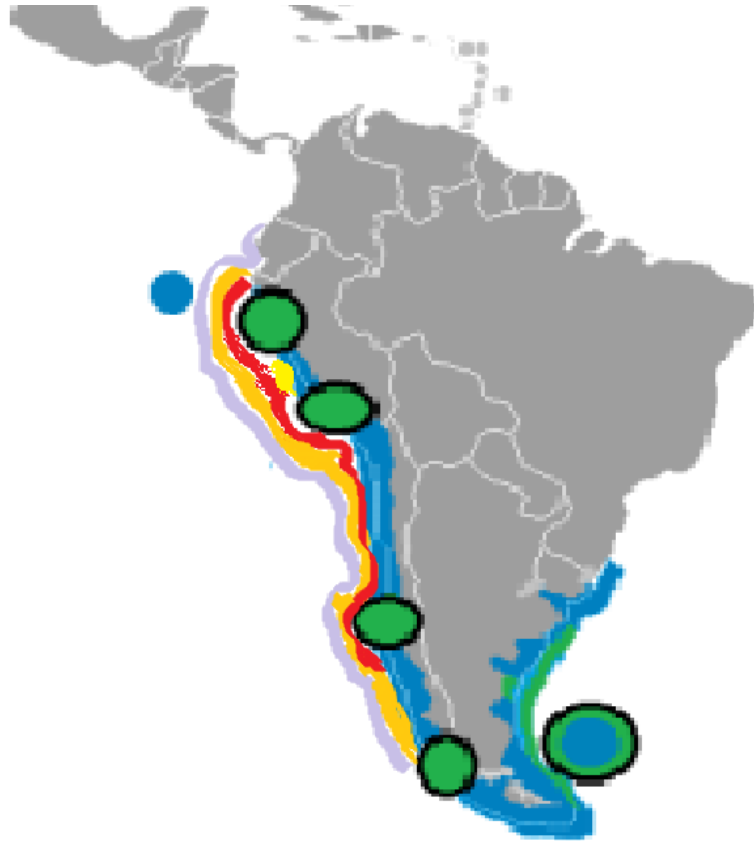
Yera, H., Nicoulaud, J., Dupouy-Camet, J. 2008. Use of nuclear and mitochondrial DNA PCR and sequencing for molecular identification of *Diphyllobothrium* isolates potentially infective for humans. *Parasite*, 15: 402-407.







Zavalaga, C., Paredes, R., Arias- Schreiber, M. 1998. Dieta del lobo fino *Arctocephalus australis* y el lobo chusco *Otaria byronia* en la costa sur del Perú en febrero de 1998. *Inf. Prog, inst. Mar Perú* 79:3-16.

Zhan, W., Che, F., Tian, S., Shu, J., Zhang, X. 2015. Molecular Identification of *Diphyllobothrium nihonkaiense* from 3 human cases in Heilongjiang Province with a Brief Literature Review in China. *Korean J Parasitol* 53(6); 683-688. <http://dx.doi.org/10.3347/kjp.2015.53.6.683>

## XI. ANEXOS

ANEXO A. Distribución geográfica según ocurrencia de *Adenocephalus pacificus*.



-  *Adenocephalus pacificus*
-  *Otaria byronia*
-  *Engraulis ringens*
-  *Sciaena deliciosa*
-  *Sciaena callaensis*
-  *Trachurus symmetricus murphyi*

ANEXO B. Condiciones de PCR convencional para la detección de *Diphyllbothrium* sp. (A) y *A. pacificus* (B).

Tabla 2. Secuencia de los cebadores

	Strand	Primer	Secuencia
A	FORWARD	DipCO1f	5'-ATCAAATTAAGTTAAGTAGACTA-3'
	REVERSE	DipCO1r	5'-CAAATAGCATGATGCAAAAG-3'
B	FORWARD	DipPaCO1f	5'-ACATGTGTGTAGTAACCTTGGC-3'
	REVERSE	DipPaCO1r	5'-ATGATAAGGGAYAGGRGCYCA-3'

Tabla 3. Concentraciones del Mix de PCR.

Componente	[ ] Final	Vol/Rx (ul)
5x PCR Buffer	1	10
Forward	0.5 uM	1.25
Reverse	0.5uM	1.25
HotStar Taq Plus DNA Polymerase(*)	2.5 U/ Rx	1
H <sub>2</sub> O- DEPC		31.5
Total		45

\*Contiene concentración optimizada de dNTPs y 7.5 nM MgSO<sub>4</sub>

Tabla 4. Condiciones de ciclamiento de la PCR

A	95°Cx 5 min / 40 (94°C X 30s / 50°C x 90s / 72°C x 2 min 30s) / 72°C x 10 min/ 4°C∞
B	95°Cx 5 min / 40 (94°C X 30s / 50°C x 90s / 72°C x 90s) / 72°C x 10 min/ 4°C∞

ANEXO C. FIGURAS



Puerto de Pucusana, Lima- Perú



*Engraulis ringens* "anchoveta"



*Sciaena deliciosa* "lorna"



Larvas plerocercoides enquistadas en la superficie visceral de la lorna.



Larva plerocercoides libre sobre la superficie visceral en la anchoveta



Estadio adulto aislado de humano



Muestreo en el laboratorio de Parasitología S-2 FCB, UNMSM.



Área de Biología Molecular, cabina para PCR, Instituto Tecnológico de la Producción (ITP).