

Parásitos protozoarios en la almeja *Polymesoda solida* (Bivalvia: Corbiculidae) presente en el Lago de Maracaibo, Venezuela

Suhail Díaz¹, Lilibeth Cabrera¹, Yajaira García de Severeyn^{2*} y Jesús Estéves³

¹Laboratorio de Zoología de Invertebrados, ²Laboratorio de Cultivo de Invertebrados Acuáticos, Departamento de Biología. Facultad de Experimental de Ciencias. ³Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina. Universidad del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias, Departamento de Biología, Bloque A2, P.O. Box. 526, Maracaibo 4011, Edo. Zulia, Venezuela.

Recibido: 23-01-07 Aceptado: 10-04-07

Resumen

Los moluscos bivalvos son un grupo de organismos importantes desde el punto de vista pesquero, ya que por ser altamente comercializados, ofrecen amplias perspectivas para la distribución mundial, como alimento de alto valor nutritivo para el hombre. Por otro lado, se reconoce en ellos su característica de ser hospedadores importantes de una gran variedad de especies parasitarias pertenecientes a los Protozoarios y Helmintos. El objetivo de esta investigación fue la detección de parásitos protozoarios en la almeja *Polymesoda solida*, presente en el sector de Nazarét, del Municipio Mara, estado Zulia, Venezuela, durante dos épocas del año (seca y lluviosa). Los organismos fueron colectados vivos durante los meses de junio-octubre 2002 y enero-mayo 2003. El estudio parasitológico se basó en observaciones al fresco de muestras intestinales del molusco, utilizando la coloración temporal de Lugol y permanente de Hematoxilina Férrica. Para la identificación de coccidios intestinales emergentes se empleó la coloración permanente de Kinyoun. Además se realizaron estudios histológicos de gónadas, sifones y branquias, utilizando la coloración de Hematoxilina-Eosina. Los resultados revelaron la presencia de siete especies parasitarias de interés clínico (43%), en el contenido intestinal de *Polymesoda solida*. Hubo mayor número de almejas parasitadas durante la época seca (49%) en comparación con la época lluviosa (37%). Las formas evolutivas que predominaron fueron las quísticas del complejo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanii*, *Giardia* sp., *Iodamoeba* sp., *Blastocystis* sp. y ooquistes de *Cryptosporidium* sp. La presencia de especies de importancia clínica para el hombre, revela condiciones de contaminación y saneamiento inadecuado en la zona de colecta del bivalvo lo que representa un alerta a su explotación y comercialización, sin ningún tipo de control sanitario.

Palabras clave: Almeja; *Polymesoda*; parásitos; protozoarios; Venezuela.

* Autor para la correspondencia. E-mail: ygsevereyn@yahoo.com

Protozoan parasites of *Polymesoda solida* (Bivalvia: Corbiculidae), estuarine clam in Lake Maracaibo, Venezuela

Abstract

The bivalve mollusks are important organisms from the fishery point of view, since they are highly marketed and offer worldwide perspectives as a high nutritious food of big value for the mankind. But, on the other hand, it is also recognized their importance as host of parasitic species, mainly protozoa and helminths. The objective of this investigation was the detection of protozoa parasites in the clam *Polymesoda solida*, present in Nazarét, Mara district, Zulia state, Venezuela, during the two seasons (rain and dry). Organisms were collected alive between June-October 2002 and January-May 2003. The parasitological study was based on observation of fresh gut, gonads, gills and siphons samples using the temporary coloration of Lugol, the permanent of Ferric Hematoxilin, Hematoxilin-Eosin and for identification of emergent intestinal coccidian, the permanent coloration of Kinyoun. The results revealed the presence of seven parasitic species of clinical interest in the gut content of 43% of the studied animal. There were a significant ($p=0.01$) bigger number of parasited clams during the dry season (49%) in comparison with the rainy season (37%). The parasitic forms that prevailed were the cyst of the complex *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, *E. coli*, *E. hartmanii*, *Giardia* sp., *Iodamoeba* sp., *Blastocystis* sp. and the oocyst of *Cryptosporidium* sp. None of parasites were found causing sickness to the clams. The presence of parasite of clinical importance for humans reveals conditions of contamination and inadequate treatment of water wastes, where the clams are fished. This represents a potential health risk and an alert to its exploitation and commercialization, without any type of sanitary control.

Key words: Clam; *Polymesoda*; parasites; protozoa; Venezuela.

Introducción

Los moluscos bivalvos son un grupo de organismos importante desde el punto de vista pesquero, ya que por ser altamente comercializados, nacional e internacionalmente, ofrecen amplias perspectivas como alimentos de alto valor nutritivo para el hombre (1).

Sin embargo, desde tiempos remotos a los bivalvos se les conoce como reservorios importantes de una gran variedad de especies parasitarias, entre los que se mencionan protozoarios (1), organismos de la clase Trematoda del filum Platyhelminthes (2) y Nematelminthes (3). En este sentido, se ha detectado la presencia de ooquistes de *Cryptos-*

poridium (4-8) y quistes de *Giardia* sp. (9-10) en el tubo digestivo y otros tejidos de bivalvos como ostras, mejillones y almejas. Por otro lado, los bivalvos han sido considerados como bioindicadores de contaminación acuática, no solo para metales y pesticidas, sino para agentes biológicos de origen fecal, como bacterias, virus y parásitos (11-12).

Polymesoda solida (Philippi, 1846), es un molusco bivalvo común en las costas orientales y occidentales del estrecho del Lago de Maracaibo (13-14). Al encontrarse en un sistema estuarino (Lago de Maracaibo) con grave deterioro de la calidad de sus aguas, producto de la recepción de los desechos domésticos, agrícolas e industriales provenientes de las actividades de la Cuenca,

resulta posible la presencia de agentes patógenos en ella. El hecho de que sea una almeja altamente comercializada por los pobladores de la zona, puede significar un riesgo de enfermedades para sus consumidores.

En efecto, se detectaron (15) la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* sp., *Cylospora* sp., *Microsporidia* sp. y quistes de *Giardia* sp en las aguas de cuatro playas ubicadas en los Municipios Maracaibo y Mara del estado Zulia, evaluadas durante un periodo de 8 meses. Este estudio señaló la necesidad de establecer un monitoreo que permita entender la dinámica de estos organismos en dichos ambientes y como ellos podrían afectar a la salud de los humanos.

Por lo dicho anteriormente se planteó como necesario el estudio parasitológico de *Polymesoda sólida*. Este organismo, podría revelar la calidad sanitaria de la misma y del ambiente acuático donde se encuentra. De modo tal que, el presente estudio se realizó con la finalidad de detectar parásitos protozoarios en dicha almeja durante las dos estaciones del año (seca y lluviosa), y además valorar la influencia de las condiciones ambientales (salinidad y temperatura) en su presencia.

Materiales y Métodos

Polymesoda solida fue colectada manualmente y al azar en la población de Nazaret (Figura 1), ubicada en la zona noroccidental del Lago de Maracaibo, al norte de San Rafael del Moján (10°55" N, 71°45" W). Esta área fue escogida debido a que se conoce que está afectada por descargas directas de aguas negras y todo tipo de desechos de origen humano. Se hicieron muestreos mensuales (40 org/mes) durante 10 meses (junio a octubre-época lluviosa y enero a mayo-época seca). En el sitio de colecta se midió temperatura y salinidad. Los animales fueron transportados en agua del lago hasta el laboratorio y una vez allí, las almejas se sometieron a un proceso de aclimatación. Los organismos se alimentaron con cultivos de la mi-



Figura 1. Ubicación geográfica de la estación de muestreo de *Polymesoda solida*.

croalga *Isochrysis galbana* y mantenidos de esta forma hasta su evaluación.

Para detectar los parásitos presentes, cada almeja fue abierta asépticamente a nivel de la bisagra con un escalpelo estéril. El músculo abductor fue cortado para remover una de las valvas y extraer el contenido intestinal. Este fue homogenizado y preparado un frotis el cual fue posteriormente sometido a un examen microscópico (4). El frotis del homogenizado se preparó al fresco con solución salina fisiológica al 0,85%, se tiñó con coloración temporal de Lugol y se observó al microscopio con el fin de detectar las formas evolutivas parasitarias (trofozoitos y quistes). Para la identificación se usó la tinción permanente de Hematoxilina férrica, y observación bajo objetivo de 100X (16). Los ooquistes de *Cryptosporidium* sp. fueron identificados a través de la coloración permanente de Kinyoun (17). Los montajes también se observaron con el objetivo de 100X.

La evaluación parasitológica de los tejidos de las almejas se efectuó utilizando las

técnicas histológicas estándar (18). Para ello, se tomaron al azar 10 animales por mes a los cuales se les realizó una disección para extraer las branquias, gónadas y sifones. Estos tejidos fueron previamente fijados en una solución Bouin por 72 horas para evitar los cambios post mortem de los tejidos. Deshidrataciones de las muestras fueron realizadas en alcohol etílico a concentraciones de 70°, 90°, 96° y 100° por seis horas cada uno. El siguiente paso fue la aclaración en Xilol, renovando dos veces el baño, por periodos de duración de tres horas cada uno.

Las muestras de tejido fueron pasados por dos baños de parafina (punto de fusión de 52-55°), para la posterior formación del bloque en un molde hasta su solidificación. Se realizaron cortes de 5-7 micras con un microtomo, los cuales fueron coloreadas con Hematoxilina Férrica por 7 min, enjuagadas y coloreadas con Eosina durante 3 min. Después de un enjuague fueron deshidratadas en alcohol al 10% por 5 min. Por último se colocaron durante 5 min en Xilol, para su posterior montaje permanente, utilizando bálsamo de Canadá. Observaciones microscópicas de dichas láminas se realizaron, utilizando un aumento de 100 X, con el fin de identificar y contar parásitos presentes.

Para la identificación de los parásitos se utilizó el criterio morfológico, su tamaño y número de núcleos (en quistes), usando la escala micrométrica dependientes de los grupos taxonómicos (19-20). El conteo de los parásitos intestinales se hizo utilizando un extendido de 0,01 ml del contenido intestinal de cada almeja (por muestreo), sobre un área de 1 cm² de una lámina portaobjeto y coloreada por los métodos antes indicados. El número de parásitos fue calculado por mililitro de muestra.

Resultados y Discusión

Los resultados arrojaron 129 almejas parasitadas (43%) de un total de 300 analizadas. En relación a la época del año, se observó que hubo mayor número de almejas parasitadas en aquellas colectadas durante la época seca, con 49% vs. 37%, correspondiente a la época lluviosa.

La Tabla 1 muestra la distribución temporal de los parásitos detectados en el 43% de las almejas parasitadas. En la Figura 2 se presenta el número y especie de parásitos encontrados en cada época. En relación a las especies parasitarias, se observa que en la época seca hubo mayor número de especies (siete) que en la lluviosa (cinco). Quistes de

Tabla 1
Distribución temporal de parásitos en almejas infectadas durante las épocas seca y lluviosa.

Época	Época seca					Época de lluvias				
	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT
Especies										
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Entamoeba coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Giardia</i> sp.	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
<i>Entamoeba hartmanii</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Blastocystis</i> sp.	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>Iodamoeba</i> sp.	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptosporidium</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

las especies de protozoarios como las correspondientes al complejo *Entamoeba histolytica/dispar* y *Entamoeba coli* se presentaron en mayor número, con valores de 75 (época seca) contra 43% (época de lluvia) y 57 (época seca) contra 43% (época de lluvia), respectivamente. Se registraron bajos niveles de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (especialmente en la época seca) a pesar de encontrarse presente en todos los muestreos. Los quistes de *Giardia* sp fueron los de menor abundancia en la época lluviosa. La prueba de Chi-cuadrado y el Test de Fisher demostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las dos épocas.

En las Tablas 2 y 3 se presentan el número de almejas parasitadas en relación al sexo y a la época del año. Las hembras estuvieron siempre más parasitadas ($\chi^2 = 18$, $p = 0,0352$, $gl = 9$), independientemente de la época del año. En la Figura 3 se muestran los resultados del porcentaje de almejas parasitadas en relación a la temperatura y la salinidad medida en el sitio de colecta. En ésta se puede observar que estos factores no tuvieron influencia en el porcentaje de almejas parasitadas (salinidad, $r^2 = 0,29$, $p = 0,4230$, ns; temperatura, $r^2 = 0,18$, $p = 0,6155$, ns).

Los estudios histológicos con Hematoxilina-Eosina no evidenciaron formas parasitarias ni daño aparente en ninguno de los cortes de los tejidos analizados.

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran la presencia de especies parasitarias de interés clínico para el hombre, en el tubo digestivo de *Polymesoda solida*, presente en el sector de Nazarét, estado Zulia. Los tejidos gonadal, sifonal y branquial no presentaron parásitos, hecho que sugiere que los parásitos encontrados no causan infecciones endógenas ni desarrollan su ciclo de vida en el bivalvo, tal como lo refieren algunos autores (4). Ellos simplemente entran vía oral o branquial al invertebrado y permanecen dentro de él sin causarle daño.

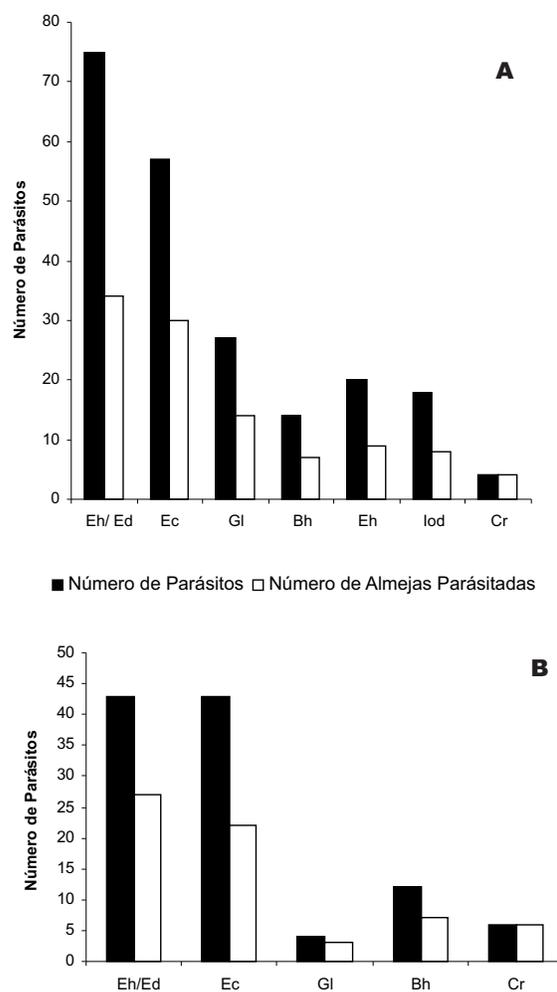


Figura 2. Número de parásitos y sus géneros encontrados durante las épocas seca y lluviosa en las almejas estudiadas. A= época seca, B= época lluviosa, Eh/Ed= complejo *Entamoeba histolytica-dispar*, Ec= *Entamoeba coli*, Gl= *Giardia lambi*, Bh= *Blastocystis* sp., Eh= *Entamoeba hartmanii*, Iod= *Iodamoeba* sp., Cr= *Cryptosporidium* sp.

Aunque nuestros resultados coinciden con lo reportado en la literatura (21) en la almeja *Mya arenaria*, la cual resultó histológicamente negativa a parásitos, otro estudio efectuado en la almeja *Tapes philippinarum* (22), presente en las costas de Corea, si indi-

Tabla 2.
Número de almejas parasitadas en relación al sexo, colectadas durante la época seca:
N= número de animales.

	Machos		Hembras		Total	
	N	%	N	%	N	%
Presencia	30	20	44	29	74	49
Ausencia	44	29	32	21	76	51

Tabla 3
Número de almejas parasitadas en relación al sexo, colectadas durante la época lluviosa: N= número.

	Machos		Hembras		Total	
	N	%	N	%	N	%
Presencia	18	12	37	25	55	37
Ausencia	63	42	32	21	95	63

N= Número de animales.

ca la presencia de especie parasitas (*Perkinsus* sp) encapsulada en varios tejidos y órganos, ocasionándole lesiones. Esta contradicción probablemente se deba al hecho de que los estudios de patología de moluscos bivalvos son relativamente recientes, y han estado centrados en la detección de parásitos que causan enfermedades a humanos y no a dichos animales (1). Se ha sugerido (23) que la histología no es suficiente para detectar una infección por parásito, mientras que las técnicas de cultivo de los tejidos de la almeja, sí permite la detección de profundas lesiones o infecciones.

La explicación para el hecho de haber encontrado un número significativo más bajo de parásitos en las almejas colectadas durante la época de lluvia también es controversial. La presencia de parásitos en un ambiente acuático se ve disminuida por efecto de la estación lluviosa (24). Sin embargo, resultados contrarios han sido reportados (25) en relación a la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* sp. en la época lluviosa en California. Dos hipótesis han sido postuladas al

respecto: a) una mayor incorporación de parásitos del suelo a las aguas por efecto de la lluvia. b) Los ooquistes y quistes se forman más frecuentemente en los meses correspondientes a los meses de lluvia. En el presente estudio, creemos que una contaminación sostenida en la época seca y mayor resistencia por parte de las especies parasitarias en la zona de Nazaret pudieran ser la causa. No obstante, es claro que la variabilidad parasitaria viene influenciada por diversos factores ambientales y humanos no analizados en el presente estudio.

En cuanto a la presencia de mayor cantidad de parásitos en las hembras, tal proporción ha sido explicada como consecuencia de una mayor actividad filtradora o de retención de dichas células parasitarias por éstas. Coincidiendo con el presente estudio, en hembras de la ostra *Ostrea edulis* se presentaron mayor número del parásito protozooario *Bonamia ostreae*, causante de la enfermedad conocida como Bonamiasis (26).

En relación con la temperatura y la salinidad, estos factores no mostraron tener influencia alguna en el porcentaje de almejas

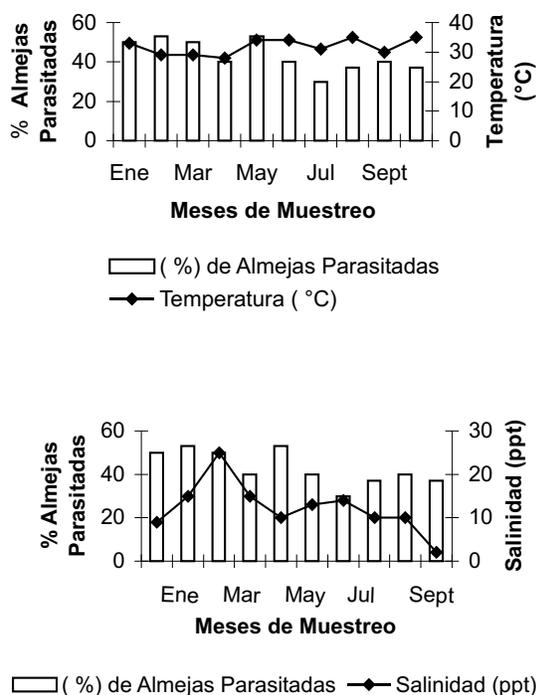


Figura 3. Porcentaje de almejas parasitadas en relación a la Temperatura y

parasitadas. En climas templados, temperaturas frías y /o baja salinidad, hacen que la prevalencia de enfermedades sea baja. Alta temperatura y salinidad están asociadas a la proliferación de brotes de enfermedades causadas por parásitos tanto en condiciones naturales como en el laboratorio (27-28). En el presente estudio, sin embargo, la escasa variación de los dos parámetros estudiados no permite una respuesta diferenciable.

Los moluscos bivalvos han servido como vehículo de organismos productores de enfermedades entéricas debido a su habilidad para concentrar en su cuerpo y tejidos, microorganismos fecales presentes en las aguas naturales contaminadas donde habitan. Poblaciones de áreas rurales, las cuales por lo general, no poseen sistemas de canalización de desechos domésticos y tratamiento del agua, vierten frecuentemente

sobre la superficie de las fuentes naturales de agua, dichos desechos con contaminantes fecales (29). En la zona de Nazarét donde se encuentra la almeja objeto de este estudio, los pobladores habitan sus orillas, en viviendas tipo "palafitos" sobre el agua. Por ser una región deprimida y despoblada, donde los servicios públicos son escasos, sus habitantes descargan sus desechos directamente al lago, y de allí llegan al tubo digestivo de los invertebrados. Si los animales no se enferman o intoxican, sobreviven, con lo que van acumulando microorganismos o tóxicos que son transmitidos a futuros consumidores. En zonas rurales, es común que las personas defecan a campo abierto, las escorrentías arrastran las heces de humanos y animales y las incorporan a los cursos de agua. Además, es común la construcción de letrinas mal diseñadas, donde los residuos fecales son vertidos a las acequias que, a su vez, desembocan en los cursos de agua. Los parásitos encontrados en el 43% de las almejas colectadas en Nazaret, son consecuencia de lo anteriormente expuesto.

Actualmente los moluscos bivalvos han sido reconocidos ampliamente como bioindicadores de contaminación fecal de ambientes acuáticos, por efecto de bacterias, virus y parásitos (12), y a su vez, son agentes causantes de una gran variedad de enfermedades. Por ejemplo, se ha señalado que especies de protozoarios parásitos como quistes del complejo *Entamoeba histolytica/dispar*, *Acanthamoeba sp.*, *Giardia sp* y ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, están asociadas a enfermedades transmitidas por el agua y pueden llegar a afectar al hombre (30). Sus quistes, esporas y ooquistes representan las formas transmisibles que pueden persistir y sobrevivir en el ambiente (agua, suelo y alimentos) por largos periodos de tiempo. Debido a que las almejas depuran muy lentamente los patógenos que filtran, su contenido a este respecto es un reflejo de la calidad del agua de su medio circundante (9).

La alta proporción de quistes del complejo *Entamoeba histolytica/dispar* y *Enta-*

moeba coli, (40,67% y 34,67%, respectivamente) encontradas en *P. solida*, para ambas épocas es un indicativo de la alta contaminación fecal de origen humano en la zona bajo estudio. El complejo *E. histolytica/dispar* está distribuida en todo el mundo y se transmite a través de alimentos y aguas contaminadas (31-34). En las poblaciones con carencias sociales y sanitarias, la prevalencia es aún mayor. Este parásito provoca infecciones del intestino grueso (amibiasis) y las manifestaciones clínicas consecuentes, tanto intestinales (disentería amibiana) como extraintestinales (abscesos hepáticos, amibiasis pulmonar, meningoencefalitis amibiana, etc.), son de prevalencia considerable en nuestro país, Venezuela (31). Sus quistes pueden sobrevivir en heces humanas defecadas por una semana y en el agua por dos semanas a temperatura ambiente. Los quistes de *E. coli*, el otro parásito identificado, suele encontrarse con frecuencia en suelos, aguas y hortalizas contaminadas por heces humanas y animales infectados, pero hasta ahora no está asociada como productora de enfermedades en el hombre.

Los quistes de *Giardia sp*, se encontraron ocupando un tercer lugar (9%) en las almejas colectadas durante la época seca (Figura 2). Es un protozoario entérico de humanos, el cual se adquiere por la ingesta accidental de quistes normalmente presentes en alimentos o en aguas contaminadas con heces (35). El género *Giardia* está ampliamente distribuido en la naturaleza, y se ha llegado a detectar en más de 40 especies de animales, que incluyen peces, anfibios, aves y mamíferos. Este protozoario es el parásito que se encuentra con más frecuencia en el agua. En Norte América, es un contaminante común de las aguas superficiales, en la que se han documentado epidemias causadas a través del agua en Estados Unidos, Canadá, Inglaterra y España (31).

Otro parásito de gran relevancia detectado en este estudio fueron los ooquistes de *Cryptosporidium sp.*, el cual a pesar de que estuvo en baja proporción durante las épocas

seca y lluviosa (2,67% y 4,00% respectivamente, Tabla 1), es un agente que ha sido considerado en el Reino Unido, Estados Unidos y España, como causante de recientes brotes por consumo de agua (36-38) y alimentos (39) contaminados. En este sentido se ha detectado la ocurrencia en un 4% de muestras de agua de superficies, con niveles entre 1 y 10.000 ooquistes, valores que dependen del impacto de animales y de aguas residuales (37). Este protozoario está ampliamente relacionado con los quistes de *Giardia sp* y los del complejo *Entamoeba histolytica/dispar*. Los tres organismos están asociados a contaminación de agua y alimentos, pero los ooquistes de *Cryptosporidium spp.* y los quistes de *Giardia sp.* son los protozoarios que más comúnmente contaminan alimentos y agua (40).

Una gran variedad de especies del género de *Cryptosporidium* han sido detectadas en diversos moluscos (5, 11, 41-45). Altas cantidades de ooquistes de *Cryptosporidium sp* y quistes de *Giardia lamblia* han sido encontradas en tejidos de la ostra *Crassostrea virginica* (5), en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* y en berberecho *Cerastoderma edule* (4). Datos de otras investigaciones, indican que bivalvos como *Crassostrea virginica*, *Corbicula fluminea*, *Mytilus galloprovincialis* y *M. edulis* pueden remover ooquistes de *C. parvum* de agua y acumularla en sus branquias y hemolinfa (5, 11, 44). La presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en el ambiente es importante desde el punto de vista epidemiológico ya que el hombre se infecta al ingerir agua y alimentos contaminados (35, 46) con ooquistes provenientes de material fecal de animales herbívoros, carnívoros y del hombre mismo (47).

La presencia de siete especies parasitarias entéricas de origen humano, en la almeja *Polymesoda solida*, evidencia contaminación y falta de salubridad del ecosistema donde habita, y demuestra que dichos organismos tienen la habilidad de recuperar formas parasitarias de su entorno y constituirse en un buen bioindicador de contamina-

ción. Pero, por otro lado, representa un importante y peligroso reservorio de parásitos causantes de enfermedades en el hombre. A este respecto, el presente estudio provee los primeros datos acerca de la existencia de parásitos que causan enfermedades en el hombre en una de las especies de moluscos bivalvos comerciales más importantes de la Cuenca del Lago de Maracaibo. La presencia de especies de importancia clínica para el hombre, revela condiciones de contaminación y saneamiento inadecuado en la zona de colecta del bivalvo, lo que representa un alerta a su explotación y comercialización, sin ningún tipo de control sanitario.

Agradecimiento

Esta investigación fue financiada por el Consejo de desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia (Proyecto CC- 0718-02).

Referencias Bibliográficas

1. BAUTISTA C. *Tecnología de los Moluscos*. Mundi Prensa: Madrid (España), p. 248, 1989.
2. WEGEBERG A., MONTAUDOUIN X., JENSEN K. *J of Exp Mar Biol Ecol* 238: 259-269, 1999.
3. IÓVINE E., SELVA A. *El laboratorio en la clínica*. 3ra. Ed, Médica Panamericana, Buenos Aires (Argentina), p.148, 1985.
4. GÓMEZ-BAUTISTA M., ORTEGA-MORA L., TABARES E., LÓPEZ-RODAS V., COSTAS E. *Appl Env Micr* 66: 1866-1870, 2000.
5. GRACZYK T., FARLEY R., LEWIS E., TROUT J. *J of Parasitol* 84: 1039-1042, 1998.
6. GRACZYK T., FAYER R., TROUT J., FARLEY C. *Parasitol Res* 85:518-521, 1999.
7. GRACZTS T., CONN D., MARCOGLIESE D., GRACZTS H., LAFONTAINE Y. *Parasitol Res* 89: 107-112, 2003.
8. TAMBURRINI A., POZIO E. *Int J Parasitol* 29: 711-715, 1999.
9. MILLER W., ATWILL E., GARDNER I., MILLER M., FRITZ H., HEDRICK R., MELLI A., BARNES N., CONRAD P. *Int J Parasitol* 35: 673-684, 2005.
10. GRACZTS T., CONN D., LUCY F., MINCHIN D., TAMANG L., MOURA L., DASILVA A. *Parasitol Res* 93: 385-391, 2004.
11. FAYER R., GRACZYK T., LEWIS E., TROUT J., FARLEY C. *Appl Env Microb* 64: 1070-1074, 1998.
12. POMMEPUY M., DUMANS F., CAPRAIS M., CAMUS P., LEMENNEC C., PRNAUDEAU S., HAUGARREAU L., SARRETTE B., VILAGINES P., POTHIER P., KHOLI E., LEGUYADER F. *Water Sci Technol* 50: 117-124, 2004.
13. GARCÍA DE SEVEREYN Y., SEVEREYN H., EWALD J. *Bull Am Mal Un* 11(1): 56-62, 1994.
14. SEVEREYN H., GARCÍA DE SEVEREYN Y., EWALD J. *Ciencia* 2(2): 53-66, 1994.
15. MARTÍNEZ DE CHIRINOS N., CHIRINOS R., ARCA Y L., QUINTERO W., CASTELLANO A., HERNÁNDEZ Y., ROMERO E. *XV Congreso Venezolano de Microbiología* Coro (Venezuela), p. 85, 2000.
16. MELVIN D., BROOKE E. *Métodos de laboratorio para el diagnóstico de parásitos intestinales*. Interamericana, Ciudad de México (México), p. 349, 1971.
17. SCOTTS B., FORBES B., SAHM D., WEISSFEL A. *Diagnostic Microbiology*. Editorial Mosby, New York (USA), p. 689, 1998.
18. DIFIORE M. *Diagnóstico histológico*. Tomo I, 5ta. Ed, Editorial Ateneo, Buenos Aires (Argentina), p. 1379, 1963.
19. KUDO R. *Protozoología* Editorial Continental, Ciudad de México (México), p. 693, 1966.
20. GEORGI J. *Parasitología Animal* Interamericana, Ciudad de México (México), p. 945, 1972.
21. MCLAUGHLIN S., FAISAL M. *Aquaculture* 172: 197-204, 1999.
22. LEE M., BYONG-YOUL C., SOO-JEONG L., JAE-YOUN K., HYUN-DO J., SUNG-HOI H., MIN-DO H. *Aquaculture* 201: 199-209, 2001.
23. ALMEIDA M., BERTHE F., THÉBAULT A., DINIS M. *Aquaculture* 177: 325-332, 1998.

24. ARCAY L., BRUZUAL E. *Parasitología al día* 17: 11-18, 1993.
25. MILLER W., ATWILL E., GARDNER I., MILLER M., FRITZ H., HEDRICK R., MELLI A., BARNES N., CONRAD P. *Internat J Parasitol* 35: 673-684, 2005.
26. VAN P. *Aquaculture* 84: 189-192, 1989.
27. BURRESON E., RAGONE-CALVO L. *J of Shellf Res* 15: 17-34, 1996.
28. CHU F., GREENE K. *J of Invert Patholog* 53: 260-268, 1989.
29. MOORE M., GOULD P., KEARY B. *Int J of Hyg Health* 206: 269-278, 2003.
30. SIŃSKI E. *Act Microb Polon* 52: 107-110, 2003.
31. SOLARTE Y., PEÑA M., MADERA C. *Colomb Méd* 37: 74-82, 2006.
32. LECLERC H., SCHWARTZBROD A., DEI-CAS E. *Clin Rev Microb* 28: 371-409, 2002.
33. MARSHALL M., NAUMOVITZ D., ORTEGA Y., STERLING C. *Clin Microb Rev* 10: 67-85, 1997.
34. WRIGHT M.S., COLLINS P.A. *Clin Lab Sci* 10: 287-290, 1997.
35. BUSH A., FERNÁNDEZ J., ESCH G., SEED R. *Parasitism* Cambridge University Press, Massachussetts (USA), p. 459, 2001.
36. ROSE J., GERBA C., JAKUBOWSKI W. *Env Sci Tech* 25:1393- 1399, 1991.
37. LISLE J.T., ROSE J.B. *J of Wat Supp Res* 44:103-117, 1995.
38. MONTEMAYOR M., VALERO F., JOFRE J., LUCENA F. *J of Appl Microbiol* 99: 1455-1462, 2005.
39. CASEMORE D. *Epidem Infect* 104:1-28, 1990.
40. SLIFKO T., SMITH H., ROSE J. *Int J of Parasitol* 30: 1379-1393, 2001.
41. GÓMEZ H., MÉNDEZ F., CASTRO J., ARES E. *J of Food Prot* 69: 185-190, 2006.
42. FREIRE F., OTEIZAA., VERGARA C., ARES E., ÁLVAREZ E., GARCÍA O. *J of Parasitol* 86: 853-854, 2000.
43. FAYED R., LEWIS E., TROUT J., GRACZYK T., JENKINS M., HIGGINS J., XIAO L., LAL A. *Emerg Infect Dis* 5: 706-710, 1999.
44. FAYER R., FARLEY C., LEWIS E., TROUT J., GRACZYK T. *Appl Env Microbiol* 63: 2086-2088, 1997.
45. AZEVEDO C. *J of Invert Pathol* 54: 23-27, 1989.
46. ACKERS J. *Gastroint Dis* 3: 33-44, 1997.
47. CORDERO DEL CAMPILLO M., ROJO F., MARTINEZ A., SÁNCHEZ M., HERNÁNDEZ S., NAVARRETE I., DIEZ I., QUIROZ R., CARVALHO M. *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana, Madrid (España), pp. 213- 221, 1999.