



## C. Parasitología

### C1 Detección de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* en vectores infectados experimentalmente mediante PCR.

Pavía, P, Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. Montilla, M, Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá. Nicholls, RS, Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá. Puerta, CJ, Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

**Objetivo:** dada la necesidad de evaluar otras pruebas que permitan la identificación específica de *T. cruzi* y *T. rangeli* en vectores, en este trabajo se detectó la presencia del parásito en vectores infectados experimentalmente, mediante los cebadores TcH2AF/R y TrF/R2. **Materiales y métodos:** se trabajó con tres grupos de *Rodnius prolixus*: 14 infectados con *T. cruzi*, 22 infectados con *T. rangeli* y 17 infectados con ambos parásitos. Cada uno de estos grupos tenía como control 5-10 insectos alimentados con ratones sanos. 15 y 30 días post-infección, los vectores fueron desinfectados, disectados y extraídas las muestras, las cuales fueron analizadas por observación directa, coloración de Giemsa y PCR TcH2AF/R, TrF/R2 y S35/S36. **Resultados y discusión:** en las infecciones individuales, *T. cruzi* fue detectado en las heces del 100% de los vectores con los cebadores TcH2AF/R y S35/S36, *T. rangeli* fue detectado en la hemolinfa del 100% de los insectos con los iniciadores TrF/R2 y S35/S36. En GS, se detectó el parásito en el 33% con TrF/R2 y en el 47,6% con S35/S36. En la infección mixta, *T. cruzi* fue detectado en el 100% de los vectores con ambos cebadores, *T. rangeli* fue detectado en el 70,5% con TrF/R2 y en el 5,8% con S35/S36. En los controles no se evidenciaron parásitos por ninguna de las técnicas empleadas. **Conclusiones:** las PCRs basadas en los genes de las histonas H2A y snoRNA permiten la identificación de *T. cruzi* y *T. rangeli* en vectores experimentalmente infectados, presentando una buena correlación con los resultados arrojados por la PCR basada en los cebadores S35/S36 en infecciones puras más no en infecciones mixtas.

### C2 Búsqueda de genes para óxido nítrico sintetasa y desarrollo de los perfiles de expresión con la técnica RT-PCR en el genoma de *Toxoplasma gondii*.

Gutiérrez Escobar, AJ, Gómez Marín, JE, Universidad del Quindío.

**Objetivo:** determinar la existencia de los genes para la enzima óxido nítrico sintetasa en el genoma de *Toxoplasma gondii*. Determinar la expresión del gen en los estadios parasitarios taquizoito y bradizoito de *Toxoplasma gondii*. **Materiales y métodos:** se realizó una búsqueda con secuencias proteicas para NOS en toxodb seleccionando los mejores candidatos por el método blast, interproscan y prosite para cubrir las posibilidades de homología simple y homología remota, se diseñaron primers en generuner para estos y se estandarizo la técnica RT-PCR para los genes en bradizoitos y taquizoitos de *Toxoplasma gondii*. **Resultados y discusión:** se encontró una secuencia denominada tgNOS que presentó grados de homología remota con secuencias de eNOS en el motivo propio de la familia NOS y el sitio de miristoilación, en la filogenia se observa una relación ancestral con eNOS donde la expresión del gen mostró tener niveles

mayores de expresión en taquizoitos indicando una posible función en la contracción parasitaria al transmigrar e invadir la célula hospedera, la presencia de NOS se ha verificado en bacterias y Entamoeba donde su actividad siempre se relacionó con movimiento parasitario. **Conclusiones:** la estrategia por homología remota demostró ser efectiva en la búsqueda de genes en *Toxoplasma gondii* y de mucha más profundidad que la homología simple. Los perfiles de expresión encontrados en *Toxoplasma* indican que posiblemente es funcional en taquizoitos relacionando la evidencia en otros protozoos con su movimiento.

### C3 Búsqueda de mutaciones puntuales del GEN PfCRT en pacientes con *P. falciparum* procedentes de dos regiones colombianas.

Restrepo, E, Maestre, A, Grupo Malaria. Universidad de Antioquia.

**Objetivo.** 1. Comparar el grado de variabilidad genética de aislados de *Plasmodium falciparum* en dos regiones Colombianas. 2. Determinar la presencia de mutaciones puntuales en los codones 76 y 72 del gen PfCRT en aislados de *P. falciparum* de pacientes Turbo y Tumaco. **Materiales y métodos.** Población de estudio: se analizaron 200 aislados de *P. falciparum* tomados de pacientes con malaria aguda no complicada. Extracción del ADN y genotipificación de parásitos por PCR: la extracción del ADN se realizó por la técnica de Chelex (Kain et al., 1991). La región 2 de MSP-1 y la región central de MSP-2 fueron amplificadas por una PCR anidada; la región RII de GLURP se amplificó por medio de una PCR semi-anidada (Snounou et al., 1999). Identificación de mutaciones puntuales en el gen pfcr: Se identificarán mediante PCR y análisis de restricción específica de alelo (PCR-RFLP) **Resultados y discusión:** observamos mayor variabilidad genética en la región de Tumaco lo que coincide con la alta endemicidad de esta zona comparada con Turbo. Este hecho puede originar un número mayor de poblaciones parasitarias circulantes, que pueden favorecer la recombinación genética y la aparición de cepas resistentes. Hasta el momento se ha encontrado en gen PfCRT la mutación en el codón 76 en el 99% de las muestras analizadas y la mutación en el codón 72 en el 94% de ellas. **Conclusiones:** se observa mayor variabilidad genética en Tumaco comparado con Turbo lo que puede favorecer la aparición de cepas resistentes. En la literatura se reporta que la presencia de estas mutaciones en el gen PfCRT se relaciona con resistencia a cloroquina. Hasta el momento la mayoría de muestras presentan estas las mutaciones pero se espera analizar otras mutaciones del gen para dar un resultado concluyente.



**C4 Caracterización clínica e inmunológica de la infección experimental de hámster dorados con cepas silvestres de *Leishmania (Viannia) panamensis*.**  
*Ochoa Galeano, LM, Robledo, SM, Vélez Bernal, ID, PECET, Universidad de Antioquia.*

**Objetivo:** caracterizar desde el punto de vista clínico e inmunológico la infección experimental de hámster dorados (*Mesocricetus auratus*) con cepas de *L. (V) panamensis* aisladas de pacientes con diferentes formas clínicas de leishmaniosis. **Materiales y métodos:** grupos de 10 hámster dorados fueron inoculados vía ID con diferentes cepas de *L. (V) panamensis* aisladas de pacientes con diferentes formas clínicas de la enfermedad. Periódicamente y hasta por sesenta días se hizo seguimiento clínico de los animales los cuales fueron sacrificados a los 20 y 60 días postinfección, tiempos en los cuales se midió la carga parasitaria y se evaluó la producción de citoquinas y de iNOS in situ por RT-PCR así como de anticuerpos específicos por ELISA e inmunoblot. Las variables clínicas e inmunológicas se compararon mediante un ANOVA no paramétrica (Kruskal-Wallis) y el grado de asociación entre las mismas se midió mediante la prueba de correlación de Spearman. En todos los casos se consideró significativo cualquier valor de P menor de 0.05. **Resultados y discusión:** La heterogeneidad clínica observada en humanos infectados con *L. (V) panamensis* es reproducible en hámster genéticamente homogéneos y se acompaña de una variabilidad inmunológica significativa, tanto a nivel celular como humoral, la cual se hace más evidente a los 60 días postinfección. En todos los grupos de animales se observó un perfil mezclado de citoquinas de tipo Th1 y Th2 cuya proporción varió dependiendo de la cepa inoculada así como del tiempo de evolución de la infección; no obstante, en los casos clínicamente más benignos predominó la respuesta de tipo Th1 la cual se dio conjuntamente con un mayor nivel de expresión de iNOS. Lo anterior sugiere que el hámster dorado es un buen modelo para el estudio de la leishmaniosis cutánea por *L. (V) panamensis* toda vez que reproduce la heterogeneidad clínica e inmunológica observada en humanos. **Conclusiones:** las características clínicas, patológicas e inmunológicas de la leishmaniosis experimental en el hámster son particularmente similares a las observadas durante la infección natural en el hombre lo que hace de este modelo una herramienta adecuada para el estudio de la patogénesis de la enfermedad así como para la evaluación de estrategias inmunoproliféricas o terapéuticas.

**C5 Caracterización de polimorfismos en el GEN Pfmrd1 responsable de resistencia a multidrogas en aislados clínicos de *P. falciparum* en dos regiones endémicas Colombianas.**  
*Montoya, P, Carmona, J, Blair, S, Maestre, A, Universidad de Antioquia - Grupo Malaria .*

**Objetivo:** caracterizar genotípicamente por medio de los marcadores MSP-1, MSP-2 y GLURP aislados de *P. falciparum* obtenidos de pacientes de los municipios de Turbo y Tumaco y determinar la presencia de polimorfismos en el gen Pfmrd1 en el codón 1246 en aislados clínicos *P. falciparum* en los municipios de Turbo y Tumaco. **Materiales y métodos:** las muestras fueron recolectadas en papel de filtro Whatman #3 y almacenadas a 4°C hasta su uso. El ADN fue extraído por el método de Chelex y mediante PCR anidada se amplificaron las familias alelicas de los genes MSP-1, MSP2 y GLURP. Esta misma metodología fue empleada para amplificar el gen Pfmrd1, el fragmento obtenido fue digerido con la enzima BglII para identificar la presencia de la mutación Asn-1246-Tyr según protocolo Djimé et. en el 2001. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa

al 2% y los de las digestiones al 3%. **Resultados y discusión:** la genotipificación demostró mayor variabilidad en el número y el tamaño de las familias alelicas en la región de Tumaco. Mediante el análisis con enzimas de restricción se ha detectado hasta el momento el polimorfismo Asn- 1246- Try en el gen Pfmrd1 en el 20% de las muestras de Tumaco. Este genotipo se caracteriza por el cambio de una Asparagina por una Tirosina en este codón. La presencia de este polimorfismo en asociación con otros descritos en este gen en los codones 86, 184 y 1042, han sido relacionados con la inducción de fenotipo resistente en aislados de *P. falciparum* en otros países y podría ser un factor predisponente al desarrollo de resistencia a medicamentos antimaláricos en nuestro país. **Conclusiones:** la presencia de polimorfismos en el gen Pfmrd1 se podría relacionar con la aparición de cepas resistentes a múltiples medicamentos antimaláricos en Colombia. La caracterización genotípica de este gen podría ser empleada como una herramienta epidemiológica para predecir la resistencia de cepas de *P. falciparum* a diferentes medicamentos antimaláricos.

**C6 Detección de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* en vectores infectados naturalmente mediante una prueba de PCR.**  
*Pavia, P, Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. Vallejo, GA, Laboratorio de Investigación en Parasitología Tropical, Universidad del Tolima, Ibagué. Montilla, M, Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá. Nicholls, RS, Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá. Puerta, CJ, Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.*

**Objetivo:** dada la necesidad de evaluar otras pruebas que permitan la identificación específica de ambos tripanosomas en vectores, en este estudio se detectó la presencia de los parásitos en vectores infectados naturalmente mediante los cebadores TcH2AF/R y TrF/R2. **Materiales y métodos:** 29 *Rhodnius colombiensis* fueron capturados en Coyaima, Tolima, desinfectados, disectados y extraído su contenido intestinal, rectal y glándulas salivales. Las muestras fueron analizadas por observación directa, coloración de Giemsa y PCR con los cebadores TcH2AF/R, TrF/R2 y S35/S36. **Resultados y discusión:** la presencia de tripanosomas fue detectada en el 83% de los vectores mediante examen en fresco y en el 86% mediante coloración de Giemsa. Se detectó la presencia de *T. cruzi* en el contenido rectal e intestinal de todos los insectos con los cebadores TcH2AF/R y S36/S36. *T. rangeli*, por su parte fue detectado en el contenido rectal e intestinal del 14% con los cebadores TrF/R2 y 10% con S35/S36. De los 29 insectos, se analizaron ocho glándulas salivales, de las cuales dos fueron positivas para *T. rangeli* con los cebadores S35/S36, insectos que también fueron positivos por heces con estos cebadores. **Conclusiones:** dados estos resultados y los obtenidos en las infecciones experimentales (poster adjunto), se proponen las PCRs basadas en los genes de las histonas H2A y snoRNA como métodos alternativos para la detección de *T. cruzi* y *T. rangeli* en vectores.



**C7 Diversidad genética, distribución y dinámica de poblaciones de *Plasmodium falciparum* en Colombia.**  
*Jiménez Quiceno, JN, Vélez Bernal, ID, Muskus López, CE, PECET Universidad de Antioquia.*

**Objetivo:** caracterizar la diversidad genética y la dinámica en el tiempo de las poblaciones de *Plasmodium falciparum* por medio de los genes polimórficos MSP-1, MSP-2 y GLURP en las principales regiones de Colombia con transmisión de malaria por esta especie. **Materiales y métodos:** en este estudio se determinó el grado de diversidad genética y distribución de las poblaciones de *P. falciparum* por medio de los genes polimórficos MSP-1, MSP-2 y GLURP, en 112 muestras provenientes de 10 localidades de Colombia, ubicadas en las regiones de la Costa Pacífica, Urabá, Bajo Cauca y la Amazonía, que son las regiones donde se presenta la mayor transmisión de malaria por esta especie. Adicionalmente se evaluó la dinámica en el tiempo de las poblaciones de *P. falciparum* en la localidad de Panguí, Chocó, mediante evaluación prospectiva en una cohorte de 100 individuos por un periodo de 20 meses (enero de 2002 a agosto de 2003), y una evaluación retrospectiva en la que se analizaron 20 placas de gota gruesa con diagnóstico de *P. falciparum* tomadas en la localidad en los años 1995, 1996 y 1997. **Resultados y discusión:** los resultados muestran un alto grado de polimorfismo de los genes MSP-2 y GLURP, en los cuales se encontraron nueve y 11 alelos respectivamente y en las cuatro regiones del estudio se registraron variaciones en las frecuencias alélicas de estos genes. Las poblaciones de *P. falciparum* de la localidad de Cáceres, en el Bajo Cauca antioqueño, presentaron la mayor diversidad haplotípica relativa y el mayor número de infecciones múltiples. El análisis de estructura poblacional muestra niveles de diferenciación genética altos entre las poblaciones de las localidades de la Pedrera en el Amazonas, Buenaventura y Tumaco en la Costa Pacífica y las demás localidades evaluadas. Adicionalmente, no se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias alélicas encontradas para los genes MSP-1, MSP-2 y GLURP en las muestras de *P. falciparum* recolectadas en la localidad de Panguí durante los años de estudio. **Conclusiones:** los hallazgos del trabajo relacionados con el nivel de diferenciación genética en las poblaciones de *P. falciparum* evaluadas y el grado de diversidad, considerado como alto para las condiciones de transmisión de Colombia, deben ser tenidos en cuenta para la implementación en el país de estrategias de control como vacunas y medicamentos.

**C8 Estandarización de la técnica de ELISA, para el diagnóstico de leishmaniasis visceral canina en eluidos de sangre seca en papel de filtro.**  
*Fernández, J, López, C Universidad de Colombia.*

**Objetivo:** estandarizar la técnica de ELISA en eluidos de sangre seca en papel de filtro, para el diagnóstico de leishmaniasis visceral canina. **Materiales y métodos:** eluidos de 46 caninos de zonas endémicas y no endémicas, un control positivo comprobado parasitológicamente, un control negativo mediante prueba de IFI y una muestra para reacción cruzada fueron analizados por ELISA. El antígeno se obtuvo a partir de promastigotes de *Leishmania chagasi* MHOM/CO/84/CLO44B. Se evaluaron concentraciones de antígeno de 1, 5, 7.5, 10, 20 y 40 mg/ml; los controles con dilución inicial de 1:100 fueron evaluados en 1:400, 1:800, 1:1600 y 1:3200. Diluciones de 1:3000, 1:6000 y 1:12000 de Anti-Ig G canina unida a fosfatasa alcalina fueron empleadas. La lectura se efectuó 405 nm. **Resultados y discusión:** se estableció una concentración de antígeno de 7.5 mg/ml, dilución de eluido de sangre de 1:400 y de conjugado de 1:6000. El punto de corte se determinó en la densidad óptica de 0.282 calculando el promedio

más dos desviaciones estándar ( $p < 0,05$ ) de las absorbancias obtenidas a partir de eluidos de caninos de zonas no endémicas. Esta prueba permitiría identificar la presencia de Ig G Anti-Leishmania a partir de eluidos de sangre de caninos. Sin embargo, es necesario tener en cuenta otros Trypanosomátidos ya que un eluido de sangre positivo parasitológicamente a *Trypanosoma evansi* presentó reacción cruzada. **Conclusiones:** la prueba de ELISA con eluidos de sangre hace eficiente el manejo de gran número de muestras facilitando su conservación y transporte disminuyendo los costos de muestreo. Por lo tanto, se constituye en una nueva herramienta para el diagnóstico de Leishmaniasis visceral en caninos que debe ser evaluada en condiciones de campo en estudios epidemiológicos y de control.

**C9 Identificación de infección toxoplásmica en gatos por PCR.**  
*Bedoya, A, Universidad del Quindío, Gallego, DC, Universidad del Quindío, Catania, S, Centro de Zoonosis Armenia, Gómez, JE, Universidad del Quindío.*

**Objetivo:** identificar infección por Toxoplasma en tejidos de gatos sometidos a eutanasia en el Centro de zoonosis de la Ciudad de Armenia. **Materiales y métodos:** se obtuvieron muestras de tejido cerebral y cardíaco en gatos menores de un año que fueron sometidos a eutanasia practicada por una médica veterinaria en el centro de zoonosis de la ciudad de Armenia. La extracción de ADN de los tejidos se hizo con el estuche Wizard Genomics (Promega). Las muestras fueron analizadas para búsqueda del gen B1 específico de Toxoplasma por el método de PCR anidada. Los controles fueron ADN de Toxoplasma de la cepa Rh y como control negativo mezcla de amplificación sin template. La visualización de los productos se hizo luego de electroforesis en gel de agarosa al 0,2% en un transiluminador de luz ultravioleta. **Resultados y discusión:** en un total de seis muestras de cerebro analizadas al presente se encontraron tres positivas y en cuatro muestras de tejido cardíaco se encontraron tres de ellas positivas. No existen reportes previos de aplicación de esta técnica en tejidos de gato. **Conclusiones:** la prueba de PCR fue exitosa en amplificar ADN de Toxoplasma en tejido de gato. Esta técnica permitirá ahora lo que hasta el presente ha sido difícil pues sólo se han caracterizado dos cepas aislada de gato a nivel mundial.



**C10 Identificación de una secuencia homóloga a tripsina en el genoma de *Toxoplasma gondii*.**

Arenas Soto, A, Gutiérrez, A, Gómez Marín, JE, Universidad del Quindío.

**Objetivo:** identificar secuencias putativas de serinas proteasas y verificar su existencia y expresión en el genoma de *Toxoplasma gondii*. **Materiales y métodos:** se realizó la búsqueda de secuencias de serinas proteasas diferentes a subtilisina en el NCIB (GenBank) y EMBL. Las secuencias fueron analizadas en ToxoDB para encontrar el marco de lectura. Las secuencias con mayor homología fueron analizadas a través del programa Interproscan para la búsqueda de motivos y dominios. Se realizó un análisis de estructuras secundarias en una base de datos PDF (Swiss model) y se realizó un árbol filogenético de serinas proteasas por el programa MEGA. El diseño de primers se ejecutó con el programa Gene Runner y se realizó una prueba RT-PCR de dos pasos con el estuche comercial RT PCR Access (PROMEGA) en taquizoitos de *Toxoplasma*. **Resultados y discusión:** se encontró una secuencia en el genoma de *Toxoplasma gondii* con una homología del 100% al dominio catalítico de la proteasa del sistema de complemento C1R, con un marco de lectura de 535 pb. En el ensayo de RT PCR se encontraron dos bandas de DNA lo cual sugiere la existencia de dos copias del gen. Esto confirma que *Toxoplasma gondii* posee una secuencia que codifica una serina proteasa diferente de la subtilisinas ya reportadas. Se sugiere la existencia de transferencia horizontal de genes. **Conclusiones:** se logró demostrar por medio del uso de técnicas in silico y moleculares la presencia de una secuencia codificante de serina proteasa del tipo tripsina en el genoma *Toxoplasma gondii*

**C11 Evolución clínica y parasitológica en el hamster dorado (*Mesocricetus auratus*) por infecciones acumulativas de *Leishmania panamensis* con y sin saliva del vector *Lutzomyia longipalpis*.**

Estévez García, AI, Universidad Nacional de Colombia. Travi, BL, Centro internacional de entrenamiento e investigaciones médicas - CIDEIM - Cali, Colombia. López, MC, Universidad Nacional de Colombia.

**Objetivo:** evaluar la influencia de múltiples inoculaciones a intervalos de tiempo reducidos, con y sin lisado de glándula salival del vector *Lutzomyia longipalpis*, sobre la evolución clínica y el estado parasitológico, utilizando el modelo hámster -*Leishmania viannia panamensis*. **Materiales y métodos:** fueron empleados promastigotes de *L. panamensis*. N total= 40 hámsteres, 4 inóculos diferentes: \* Único, Acumulativo, Único + Lisado de glándula salival (LGS) 10X, Acumulativo + LGS 1X. Se preparó LGS, según Mbow y col. (1998). Evaluación clínica por 90 días: peso corporal, lesión por score lesional y mediante calibrador digital. Se utilizó dilución limitante para estimar carga parasitaria en dichos tejidos. Se cultivó ganglio retrofaringeo para evaluar diseminación. Análisis estadístico: SPSS, ANOVA, t de student impar (dos colas), chi-cuadrado, Shapiro-Wilk, Levene, Kruskal-Wallis, U de Mann - Whitney; significancia  $P < 0.05$ . **Resultados y discusión:** inóculo único + LGS = lesiones mayores, por el contrario inóculo acumulativo+ LGS= lesiones más pequeñas. Día 90 p.i., inóculo acumulativo + LGS, 90% de este grupo tenían lesiones benignas ó totalmente cicatrizadas, 10% con necrosis. No hubo diferencias parasitológicas entre los cuatro tipos de inóculo. En estudios previos sobre la influencia de la saliva de vector, se han empleado tradicionalmente inóculos exagerados que pueden sesgar los resultados. La reexposición continua de *L. panamensis* + LGS produjo infección subclínica: hubo mejoría clínica pero la carga parasitaria se mantuvo. Esto coincide con investigaciones anteriores. Es posible que la saliva disminuya las citoquinas pro-inflamatorias. **Conclusiones:** se

observó un efecto exacerbador o atemperador de la inflamación, dependiendo de la frecuencia de inoculación. La respuesta inmune no estuvo ligada al control de la infección. Esto marca diferencias con el modelo murino y plantea la necesidad de probar diversos modelos experimentales antes de extrapolar resultados de importancia epidemiológica potencial para la salud humana.

**C12 Respuesta inmune humoral al péptido sintético K1 de la proteína de membrana de kinetoplastidos KMP-11 de *Trypanosoma cruzi*.**

Díez, H, Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana. Rodríguez, A, Centro de Investigaciones Odontológicas, Pontificia Universidad Javeriana. Guzmán, F, Fundación Instituto Inmunológico de Colombia. Mercado, M, Departamento de Microbiología, Facultad Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Rosas, F, Fundación Clínica Shaio Abood. Velasco, V, Fundación Clínica Shaio Abood. Puerta, CJ, Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana.

**Objetivo:** dado que la proteína 11 de membrana de kinetoplastidos presenta reactividad humoral y celular en pacientes con Chagas y Leishmaniosis, en este trabajo se evaluó la respuesta inmune humoral en un grupo de pacientes chagásicos frente a un péptido amino terminal de la misma. **Materiales y métodos:** la reactividad de anticuerpos frente a K1 fue determinada mediante un inmunoensayo enzimático (ELISA) en el suero de 50 pacientes chagásicos crónicos, 40 asintomáticos y 40 donantes sanos (Controles). La prueba de ELISA se estandarizó según lo reportado por Arciniegas et al., 2000. Los ensayos fueron realizados por duplicado y doble ciego y en cada uno de ellos las muestras se montaron por duplicado. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el Test de Shapiro Wilk. **Resultados y discusión:** el 100% de los pacientes crónicos presentó reactividad frente al péptido K1, seguido del 76% de los individuos asintomáticos. Los controles no presentaron reactividad, siendo las diferencias entre los grupos de infectados y controles estadísticamente significativas ( $p < 0.0001$ ). Aun cuando no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes asintomáticos y crónicos, éstos últimos presentaron valores de absorbancia mayores. **Conclusiones:** los resultados obtenidos sugieren que el péptido K1 actúa como una epítotope de células B en pacientes chagásicos, constituyendo un marcador humoral importante de esta enfermedad.



**C13 Obtención, purificación y caracterización de anticuerpos policlonales (IgY) anti-trofozoito de aislados colombianos de *Giardia duodenalis* desarrollados en gallina.**

García, DA, Instituto Nacional de Salud, Grupo de Parasitología - Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas, Postgrado. Duque, S, Instituto Nacional de Salud, Grupo de Parasitología. Nicholls, RS, Instituto Nacional de Salud, Grupo de Parasitología. Arévalo, A, Instituto Nacional de Salud, Grupo de Parasitología. Torres, O, Pontificia Universidad Javeriana, Departamento de Microbiología.

**Objetivo:** desarrollar anticuerpos policlonales aviares (IgY) anti-trofozoito de aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis* y evaluar mediante actividad biológica la concentración recuperada y la pureza de cinco métodos diferentes de purificación a partir de yema de huevo. **Materiales y métodos:** se inmunizaron tres gallinas intramuscularmente con trofozoitos del parásito cada 15 días hasta el día 60 y cada mes hasta el día 120; se recolectaron huevos en cada inmunización; se purificó la IgY por delipidación (D) y precipitación (P) según cinco protocolos diferentes: M1: (P: sulfato de amonio (SA) /D: dextrán sulfato-cloruro de calcio (DS-CC)); M2: (D: DS-CC/P: SA); M3: (D: cloroformo (C)/P: SA 50%); M4: (D: solución A/P: solución B), y M5: (D: C/P: SA 30%); se evaluó la actividad biológica de IgY por inmunodifusión, contraelectroforesis y Western blot, la pureza por SDS-PAGE y la concentración por espectrofotometría y densitometría. **Resultados y discusión:** la IgY presentó actividad biológica hasta el título 1:32; el SDS-PAGE mostró, en condición no reductora, una banda de 180 kDa propia de esta y, en condición reductora, bandas de 30 y 68 kDa características de cadena liviana y pesada, y concentraciones hasta de 7,4 mg/ml; los resultados obtenidos permiten recomendar el M2 en términos de actividad biológica y recuperación en mg/ml como el ideal para desarrollar anticuerpos IgY anti-*G. duodenalis*, debido a su facilidad y economía de producción, pues reemplaza la sangría por la recolección de huevos; además del número de ejemplares, estos anticuerpos podrán utilizarse para desarrollar inmunoensayos que detecten el parásito en efluidos de heces. **Conclusiones:** aunque con todos los métodos de purificación utilizados se recupera IgY anti-trofozoito de aislamientos colombianos de *G. duodenalis*, el método más eficiente fue M2 en el cual inicia con una delipidación con dextrán sulfato-cloruro de calcio y finaliza con la precipitación con sulfato de amonio al 30%.

**C14 Evaluación histopatológica de nemátodos de la familia anisakidae en hígado de lisas (*Mugil incilis*) de la bahía de Cartagena, Colombia.**

Baldiris Ávila, R, Arroyo Salgado, B, Olivero Verbel, J, Universidad de Cartagena.

**Objetivo:** realizar la evaluación histopatológica de nemátodos presentes en hígado de Lisa (*Mugil incilis*) en especímenes colectados en la Bahía de Cartagena en la costa atlántica colombiana. **Materiales y métodos:** 201 especímenes de lisa fueron colectadas de la Bahía de Cartagena, sector de Castillo Grande entre febrero y septiembre de 2002. El tejido hepático fue extraído por disección y los análisis histopatológicos realizados sobre muestras aleatorias. La preservación del mismo fue efectuada en formaldehído neutralizado al 10 %, luego el material fue deshidratado con etanol absoluto y xileno, obteniendo secciones de 5 µm en parafina. Las placas fueron teñidas con hematoxilina y eosina y examinadas para lesiones por microscopía óptica. **Resultados y discusión:** en la mayoría de muestras examinadas fueron observados quistes de nemátodos. Lesiones

leves relacionadas con focos necróticos, vasodilatación, hemosiderosis y ausencia de inflamación en el tejido hepático circundante al parásito fueron observadas con frecuencia. La colestasia fue moderada en tejidos. Además, existe variabilidad en tamaño del parásito a lo largo de la arquitectura celular hepática. La morfología interna de parásitos adultos permitió observar un lumen intestinal en forma de "Y", caracterizado por células en altas columnas y cordones laterales. De igual manera fue identificada la glándula excretora lateral al lumen intestinal. Estas características son comunes al género *Anisakis*. **Conclusiones:** el análisis histopatológico del hígado de lisas reveló la presencia de nemátodos de la familia Anisakidae en forma de quistes y en estado adulto, además de algunas alteraciones colaterales con baja inflamación. La lisa es un huésped intermediario de nemátodos y su ingestión por pescados contaminados con larvas de este tipo podría convertirse en un problema de Salud Pública.

**C15 Inhibición del ciclo esporogónico de *Plasmodium vivax* en *Anopheles albimanus* con compuestos aislados de la planta *Solanum nudum*.**

Arango, E, Grupo Malaria Universidad de Antioquia. Londoño, B, Grupo Malaria Universidad de Antioquia. Solarte, Y, Malaria Vaccine and Drug Testing Center, Instituto de Inmunología del Valle, Universidad del Valle. Herrera, S, Malaria Vaccine and Drug Testing Center, Instituto de Inmunología del Valle, Universidad del Valle. Carmona-Fonseca, J, Grupo Malaria Universidad de Antioquia. Blair, S, Grupo Malaria Universidad de Antioquia.

**Objetivo:** evaluar la capacidad de tres esteroides (SN-1, SN-2 y SN-4) derivados de la planta *Solanum nudum* (Solanaceae) para bloquear el desarrollo de *Plasmodium vivax* en *Anopheles albimanus*. **Materiales y métodos.** Parásitos y mosquitos: se utilizaron lotes de 100 mosquitos *An. albimanus* (cepa Buenaventura) de tres a cuatro días de emergidos; y sangre de pacientes infectados con *P. vivax* procedentes de Buenaventura. Ensayo: los eritrocitos infectados fueron lavados con RPMI y diluidos en pool de sueros humanos AB no inmunes y en compuesto a tres dosis (50, 100 y 200 µg/mL). Cada preparación fue administrada a los mosquitos mediante un sistema de alimentación artificial. En cada ensayo se contó con un lote control sin tratamiento y tres experimentales. Al séptimo día pos-infección se determinó el porcentaje de mosquitos positivos y el promedio de ooquistes por cada lote. **Resultados y discusión:** con 200 µg/mL de SN-1 y SN-2, se encontró una positividad del 1%, mientras que en los controles fue del 38% y 39%, respectivamente (p=0,000). La positividad tratamiento con SN-4 a 200 µg/mL fue del 17% y la del control fue de 22% (p=0,109). El promedio de ooquistes de los mosquitos tratados con SN-1 no difirió significativamente del control (promedio ooquistes tratamiento: 1,43 y control: 2,11; p=0,863). Con SN-2 estas diferencias si fueron significativas (promedio de ooquistes tratamiento: 1,26, y control: 3,14; p=0,018) aunque no se observó efecto dosis respuesta. Los antimaláricos que interrumpen el ciclo esporogónico de *Plasmodium* y por tanto bloquean la transmisión son considerados una alternativa para controlar el problema de la malaria. **Conclusiones:** el esteroide SN-2 disminuyó los mosquitos infectados en un 90% y el promedio de ooquistes en un 60%. Posiblemente, según el protocolo utilizado, este efecto se debe a una acción gametocitocida del compuesto. Este compuesto puede constituir una alternativa prometedora como medicamento para prevenir la transmisión de la malaria.



### C16 Caracterización y purificación de serina proteasa en *Toxoplasma gondii*.

Lora, F, Maldonado, JI, Gallego, DC, Gómez, JE, Universidad del Quindío.

**Objetivo:** purificar y caracterizar bioquímicamente una serina proteasa en *Toxoplasma gondii*. **Materiales y métodos:** con el fin de purificar la enzima serina proteasa de *Toxoplasma gondii* se obtuvieron taquizoitos de *Toxoplasma gondii* cultivados en peritoneo de ratón, con la cual el cual se filtró a través de una membrana de policarbonato de tres se obtuvieron un total de 1 x 10<sup>8</sup> taquizoitos. Los taquizoitos fueron sometidos a sonicación y ciclos de congelación y descongelación para obtener un lisado de antígeno total el cual se paso a través de una columna de sefrosa con L-arginina. La actividad proteasa en las fracciones fue evaluada por los métodos de azocaseína y zimograma de caseína. La cantidad de proteínas se midió por el método de Lowry. **Resultados y discusión:** se ha demostrado que la inhibición de serina proteasa en *Toxoplasma* reduce su capacidad de invasión. Por ello se utilizó una cromatografía específica para purificar serinas proteasas. Luego de pasar el antígeno total por la columna de arginina y de la elusión con tampones a varios pH, se obtuvieron tres fracciones a pH 5 (21, 22 y 23) y tres fracciones a pH 4 (21, 22 y 23) con picos de absorbancia para proteínas. Se demostró que de estas fracciones la 23 (que contenía la mayor cantidad de proteína) tenía una actividad, tanto en azocaseína como en el zimograma, específica de serina proteasa y en la cual se observó una banda de peso aproximado de 51 KDa luego de electroforesis y tinción de plata. **Conclusiones:** fue posible obtener una proteína con actividad serina proteasa en antígeno total de *Toxoplasma*. La elucidación de su sustrato permitirá entender mejor el proceso de invasión y diseñar nuevos medicamentos que lo inhiban.

### C17 Detección molecular de *Anopheles* infectados por *Plasmodium*.

Zapata, M, Grupo Microbiología Molecular, Escuela de Bacteriología, Universidad de Antioquia. Muskus, C, Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia. Luckhart, S, Departamento de Bioquímica, Virginia Polytechnic and State University. Correa O., M, Grupo Microbiología Molecular, Escuela de Bacteriología, Universidad de Antioquia.

**Objetivo:** detectar la infección de especies particulares de *Anopheles* por *Plasmodium* es importante para direccionar políticas de seguimiento y control de la malaria; por ello nuestro trabajo buscó adecuar una técnica molecular para determinar la asociación de diferentes especies de *Anopheles* con diferentes especies de *Plasmodium*. **Materiales y métodos:** se utilizó PCR anidada y primers dirigidos al DNA de la subunidad ribosomal pequeña del *Plasmodium* y las condiciones de amplificación descritas por Singh et al (1999). La adecuación de la técnica se realizó utilizando DNA de *P. falciparum* solo o adicionado a DNA extraído de *An. albimanus* de colonia (sin diluir y en diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1000); luego se realizó con DNA extraído de mosquitos individuales y grupos de mosquitos *An. stephensi* infectados con *P. berghei*. Los controles negativos fueron *An. albimanus* de colonia, no infectados. **Resultados y discusión:** en la PCR anidada utilizando *An. albimanus* de colonia adicionado con DNA de *P. falciparum* se observó amplificación en las muestras que contenían DNA del parásito sin diluir, o en las diluciones 1:10, 1:100, pero no en la 1:1000. Al utilizar DNA extraído de un mosquito o de grupos de *An. stephensi* infectados con *P. berghei* se observó amplificación del DNA del parásito tanto en un mosquito, como en 10; el amplicon tuvo un tamaño aproximado 240 bp. Utilizamos un protocolo que

permite la detección del equivalente a un parásito en un mosquito infectado (Oskam et al. 1996, Arez et al. 2000); el nivel de detección es superior al obtenido cuando se utiliza la técnica de ELISA (Burkot et al. 1984, Beier et al. 1988). **Conclusiones:** la PCR anidada utilizando primers dirigidos al DNA de la subunidad ribosomal pequeña del *Plasmodium* permite identificar *Anopheles* infectados con *Plasmodium*. La técnica podrá ser utilizada en estudios para detectar infección en *Anopheles* colectados en el campo y conocer cuales son las especies involucradas en la transmisión de la malaria en un periodo y lugar específico.

### C18 Identificación de genes para fosfolipasas A2 en *Toxoplasma*: expresión y filogenia.

Gómez Marín, JE, Universidad del Quindío. Gutiérrez, A, Universidad del Quindío. Psezenny, V, Jhon Hopkins University. Carruthers, V, Jhon Hopkins University.

**Objetivo:** identificar las secuencias codificantes para las enzimas fosfolipasas A2 en *Toxoplasma gondii* **Materiales y métodos:** utilizando los recursos de la base informática del proyecto genoma *Toxoplasma* (<http://toxodb.org/ToxoDB.shtml>) se buscaron secuencias homologas para enzimas PLA2. Las secuencias con homología significativa fueron analizadas en el programa Smart para buscar dominios y el análisis de regiones de baja complejidad fue realizada utilizando el programa Echofinger. Las secuencias homólogas halladas en ToxoDB con homologías estadísticamente significativas para familias de proteínas de PLA2 se analizaron en BlastBork. Se hizo un ensayo de PCR con ADN genómico de *Toxoplasma* para sPLA2 Toxo 1 y para Cal PLA2 Toxo y se hizo análisis por RT-PCR en una librería de cDNA de *Toxoplasma*. A partir del alineamiento de la secuencia de proteína y usando el método de Neighbor Joining, se realizó una construcción filogenética con el programa PHILIP. **Resultados y discusión:** se hallaron dos secuencias con homologías estadísticamente significativas: una para PLA2 secretoria del grupo 1 (sPLA2 Toxo 1) y otra para PLA2 calcio independiente del grupo IV (Cal PLA2 Toxo). Un ensayo de PCR con ADN genómico de *Toxoplasma* logró amplificar segmentos de los tamaños esperados, uno de ~234 pb para sPLA2 Toxo 1 y uno de ~3,000 pb para Cal PLA2 Toxo. Los cebadores de sPLA2 Toxo1 y de CaiPLA2 Toxo fueron utilizados en una librería de cDNA de *Toxoplasma* en las cuales se obtuvo amplificación con sPLA2 Toxo1. Se realizó un dendrograma con 73 secuencias de proteínas PLA2 de diferentes grupos. Este dendrograma ubica la sPLA2 Toxo1 con una relación cercana a una PLA2 del grupo XII (PLA2 secretoria) y a la CaiPLA2 Toxo con una PLA2 del grupo X. **Conclusiones:** la identificación de estos nuevos genes en *Toxoplasma* abre expectativas en cuanto a definir su papel en la fluidificación de la membrana de la célula hospedera para las sPLA2 y la señalización intracelular para la cPLA2. Dado el interés en identificar factores de virulencia, se pudieran estudiar polimorfismos de secuencias relacionados con el grupo clonal de las cepas.



**C19 Mutaciones puntuales en los genes dhps y dhfr de *Plasmodium falciparum* asociadas a la respuesta terapéutica in vivo a Sulfadoxina-pirimetamina.**

Villa R, AF, Estudiante Msc - Grupo Malaria, Docente Escuela Bacteriología y Laboratorio Clínico. Carmona F, J, Grupo Malaria-Universidad de Antioquia. Blair T, S, Grupo Malaria-Universidad de Antioquia.

**Objetivo:** este trabajo pretende determinar la asociación entre el número de las mutaciones puntuales de los genes dhps y dhfr de *Plasmodium falciparum* de pacientes con malaria no complicada con la respuesta terapéutica (falla y respuesta adecuada) a Sulfadoxina-pirimetamina (SP) en dos zonas endémicas de malaria en Colombia. **Materiales y métodos:** a los pacientes con malaria no complicada por *P. falciparum* de Turbo y Zaragoza se les tomó sangre en papel de filtro el día del diagnóstico (día 0) y el día de la falla. El día 0, se les suministró el tratamiento con SP de acuerdo al peso y se les realizó examen clínico y gota gruesa los días 1, 2, 3, 7, 14 y 21 postratamiento. El diagnóstico de infección se realizó por gota gruesa y fue corroborado mediante PCR semianidada multiplex. Mediante PCR anidada se determinó la variabilidad genética de *P. falciparum* el día 0 y el día de falla. La genotipificación de las mutaciones puntuales en los genes pfdhfr y pfdhps se realizó con la técnica de PCR-RFLP. **Resultados y discusión:** se evaluaron 34 pacientes en Zaragoza y 44 en Turbo. Allí, se presentó un 20 y 26% de falla terapéutica, respectivamente. El 100% tuvo monoinfección por *P. falciparum*. La variabilidad genética del día 0 y día de falla confirmó verdaderos casos de falla terapéutica en los pacientes. Hasta el momento se ha encontrado la mutación ASN108 en el 100% de las muestras analizadas de ambos municipios. Estos resultados representan un avance en la comprensión del problema de falla terapéutica en estas zonas y son el punto de partida para estudios que permitan el seguimiento de la variabilidad genética y el esparcimiento de los genes de resistencia en las cepas de *P. falciparum* de Colombia. **Conclusiones:** la genotipificación de pfdhps y pfdhfr permite identificar mutaciones asociadas a resistencia, y la variabilidad genética confirmar la falla terapéutica de los antimaláricos. Así, conforman herramientas epidemiológicas para evaluar la eficacia terapéutica y predecir su comportamiento, permitiendo crear guías oportunas y efectivas de tratamiento de la malaria en el país.

**C20 Evaluación diagnóstica de 24 fracciones polipeptídicas de 12 -118 kDa del metacéstodo de *Taenia solium* con sueros humanos, mediante el ensayo inmunoenzimático absorbente (ELISA).**

Giraldo, JC, Universidad Incca de Colombia. Medina, G, Universidad Incca de Colombia. Vargas, CH, Universidad Incca de Colombia. Yanine, HF, Universidad Incca de Colombia. Vásquez, LR, Universidad del Cauca. Zamora, T, Universidad del Cauca. Sandoval, C, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Sotelo, MJ, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Toquica, AM, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Vargas, LE, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

**Objetivo:** con el fin de evaluar el comportamiento diagnóstico de polipéptidos aislados de un extracto total del estadio larval de *Taenia solium* con sueros humanos mediante el ensayo inmunoenzimático absorbente ELISA. **Materiales y métodos:** se obtuvieron 24 polipéptidos en un rango de peso molecular de 12 a 118 kDa mediante el empleo de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y elución pasiva. Dichas fracciones fueron valoradas mediante la prueba ELISA con 30 sueros control positivo, 30 sueros control negativo y 13 sueros positivos para otras entidades parasitarias y negativos para cisticercosis. **Resultados y discusión:** para los parámetros de sensibilidad(S), especificidad(E), valor predictivo positivo(VPP) y valor predictivo negativo(VPN), las fracciones de 12, 19, 29, 35, 53, 61, 66, 77, 81, 92 y 110kDa se localizaron en un rango de 80% a 100%. Las fracciones de 118, 115, 105, 97, 90, 72, 55, 60, 13, 14, 21, 24, 22 y extracto crudo total, presentaron al menos un valor de los cuatro parámetros inferior a 80%. En cuanto a reactividad antigénica(RA) superior a un valor de 0.7 y ausencia de reacciones cruzadas(RC) sobresalieron las fracciones de 29, 35, 53, 66, 72 y 77kDa. **Conclusiones:** las fracciones de 29, 35, 53, 66 y 77kDa se destacaron por presentar valores más altos de S, E, VPP, VPN, RA y ausencia de RC con las otras entidades parasitarias incluidas en el estudio, siendo ideales para la estandarización de pruebas diagnósticas de campo para detección de NCC humana en estudios epidemiológicos.