



ISSN 1909-2407

Salud
Historia
Sanidad
Revista on line

MEMORIAS

2° CONGRESO NACIONAL DE PATÓGENOS HUMANOS

22,23,24 de septiembre Tunja – Boyacá
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia

21

Parasitología



*Rev.salud.hist.sanid.on-line 2008;3(2):
(mayo-agosto)*



EVALUACION DE LA TECNICA DE MICROSTROUT DURANTE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON 4 CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* EN RATONES

Fabián Falla¹, Marleny Montilla², Carolina Floréz², Paola Peña³, Alberto Díaz⁴, Santiago Nicholls²

1. Universidad INCCA-Instituto Nacional de Salud- Parasitología-Investigación
2. Instituto Nacional de Salud- Laboratorio de Parasitología
3. Universidad Javeriana- Instituto Nacional de Salud- Parasitología- RNL.
4. Universidad INCCA.

Recibido: 22 de septiembre de 2006. **Aceptado:** abril 10 de 2008.

RESUMEN

Las técnicas de diagnóstico directo para la enfermedad de Chagas son ampliamente utilizadas en centros de salud y laboratorios de Colombia, entre ellas la técnica de MicroStrout, presenta una sensibilidad del 95% y una alta especificidad para la detección del *Trypanosoma cruzi*; pero no se conoce validez de esta técnica a través de las diferentes fases de la infección. Además, cuando la infección se produce por medio transplacentario se pueden desarrollar fases asintomáticas en neonatos, obligando a realizarse seguimientos hasta por 1 año mediante pruebas de tipo serológico.

Demostrando la validez de esta técnica durante las fases de la infección podría mejorar el tiempo de diagnóstico, además de disminuir el tiempo de seguimiento del recién nacido; facilitando así implementar un tratamiento oportuno. Se pretende determinar la eficiencia de la técnica MicroStrout en la fase aguda de la infección por 4 cepas colombianas de *Trypanosoma cruzi* en ratones ICR, además de observar el comportamiento infectivo de las diferentes cepas durante la fase aguda por medio de esta técnica

Se realizó una infección experimental con 1×10^4 parásitos/ml de *Trypanosoma cruzi* con las cepas colombianas DA, MTA, CG y MG en 3 ratones respectivamente. Se tomaron muestras de la parte terminal de la cola del ratón en un capilar heparinizado cada 2 días, y estos fueron centrifugados a 3000 rpm/ durante 3 minutos; luego los capilares se rompieron entre la porción leucoplaquetaria y eritrocitaria para realizar el recuento en cámara de Neubauer con una dilución de 1/30 o 1/60. Además, se tomaron muestras en 2

capilares no heparinizados para obtención de suero y posterior análisis mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), evaluando IgG. Hasta la fecha, la parasitemia mas alta se determinó a los 14 días de la infección con 5.3×10^5 parásitos/ml en la cepa DA; entre los días 16 y 19 con 3.6×10^5 parásitos/ml cepa MTA; los días 12 y 16 con 1.7×10^5 parásitos/ml para la cepa CG; y el día 26 con 2.5×10^5 parásitos/ml para la cepa MG. Los títulos de anticuerpos obtenidos mediante la técnica serológica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) corresponden a 1/128 el día 28 post-infección para DA, 1/256 y 1/128 el día 26 para MTA, 1/128 el día 19 para CG y 1/128 el día 26 para MG.

IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS DE P30 DE *TOXOPLASMA GONDII* POR SUEROS HUMANOS EN TOXOPLASMOSIS OCULAR

Néstor Iván Cardona Pérez¹, Alejandra De La Torre¹, Hebert Siachoque¹, Jorge Enrique Gómez Marín¹.

1.Universidad del Quindío, Grupo de Estudio en Parasitología y Micología Molecular (GEPAMOL). Centro de Investigaciones Biomédicas.

24

Recibido: 22 de septiembre de 2006. **Aceptado:** abril 10 de 2008.

RESUMEN

OBJETIVO: Evaluar por medio de ELISA el reconocimiento de péptidos de P30 por parte de sueros humanos positivos para IgG anti-*Toxoplasma*.

JUSTIFICACION: Probar por medio de una técnica de inmunoensayo 9 péptidos de la proteína P30 (SAG1) de *Toxoplasma gondii* con el fin de disecar los fragmentos antigénicos contra los cuales se dirige la respuesta inmune humoral.

METODOLOGIA: Se realizó una prueba inicial con 3 sueros de pacientes con toxoplasmosis congénita y 3 sueros de pacientes con toxoplasmosis ocular, seguida de un segundo ensayo con el péptido 2017 probando 11 sueros de pacientes con toxoplasmosis ocular. Brevemente, se sensibilizó placa con 100 µL de cada péptido diluido en buffer carbonado pH 9.6 (Na₂CO₃ : 0159 g/100 mL, NaHCO₃ : 0,293 g/100 ml) en placas Maxisorp durante toda la noche. Los lugares inespecíficos de unión fueron saturados con 100 µL de buffer caseína fosfato al 2% por 1 h a 37°C. Se lavaron las placas una vez con 0,05% PBS+Tween 20 (pH 7.2) y luego se agregaron 100 µL de suero a cada pozo con dilución 1:100 en de buffer caseína fosfato al 2%, se incubó por 1h a 40°C. Se lavo con 0,05% PBS+Tween 20. Se agregaron 100µL de conjugado anti-humano para peroxidasa de rábano con dilución 1:6000 en buffer caseína fosfato al 2% y se incubó por 30 min a 37°C. Finalmente luego de lavar 5 veces con PBS+0,05% de Tween 20 se detectó la actividad de la peroxidasa de rábano usando TMB por 30 min a 37°C, luego se detuvo la reacción adicionando H₂SO₄ al 5%. Se realizó lectura a 450 nm. El punto de corte se determinó calculando el promedio de la absorbancia de los controles negativos + 2 desviaciones estandar.



RESULTADOS: Los resultados indicaron que, tal como ocurre en el modelo ratón, los anticuerpos reconocen solamente los péptidos del extremo carboxi-terminal y que los sueros de toxoplasmosis ocular obtuvieron mayor absorbancia en el reconocimiento del péptido 2017 de manera significativa y sin relación con los niveles de IgG anti-Toxoplasma totales. Este péptido se utilizó luego probando 11 sueros de pacientes con toxoplasmosis ocular y el 63% de ellos reconocieron el péptido. Estudios adicionales son necesarios para determinar el valor de este péptido en el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes.

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LA INVASIÓN A GLÓBULOS ROJOS EN *Plasmodium vivax*

Alvaro Monguí¹, Oscar Pérez-Leal¹, Andromeda Gómez^{1,2} y Manuel A. Patarroyo^{1,2}.

1. Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC)
2. Universidad Nacional de Colombia

Recibido: 22 de septiembre de 2006. **Aceptado:** abril 10 de 2008.

26

RESUMEN OBJETIVOS

- Identificar mediante herramientas bioinformáticas el gen codificante de la proteína de superficie del merozoito 7 de *P. vivax* (PvMSP7), a partir de su homóloga en *P. falciparum*.
- Caracterizar la proteína PvMSP7 empleando técnicas de biología molecular e inmunohistoquímica.

La malaria es una enfermedad causada por la infección de parásitos del género *Plasmodium*. Se estima que anualmente ocurren alrededor de 300-500 millones de episodios de la enfermedad en humanos, de los cuales entre 1.5 y 2.7 millones mueren a causa de la misma [1]. Aunque *P. falciparum* genera los mayores índices de mortalidad a nivel mundial, la malaria causada por *P. vivax* es más prevalente en regiones tropicales de Asia y las Américas, produciendo entre 70-80 millones de casos nuevos por año[2]. Por esta razón, se hace inminente el desarrollo de vacunas para contrarrestar los efectos sanitarios y económicos a los que se ven sometidos los países afectados por *P. vivax*. Actualmente, la secuenciación del genoma de *P. vivax* ha permitido realizar la identificación de algunos genes codificantes para antígenos homólogos de *P. falciparum*. Estos antígenos han mostrado ser importantes por su potencial como candidatos a vacuna [3-5], al encontrarse asociados, ya sea a la superficie del parásito o a los organelos apicales especializados en la invasión.

La proteína de superficie del merozoito 7 de *P. falciparum* (PvMSP7) se identificó a partir de su asociación con la MSP1, en un complejo proteico involucrado en la invasión a eritrocitos [6]. Debido a su localización, PvMSP7 puede constituir un blanco importante para el reconocimiento por parte del sistema inmune. En este estudio, se caracterizó la proteína MSP7 en *P. vivax* (PvMSP7) a partir de su homóloga en *P. falciparum*, empleando técnicas de biología molecular, bioinformática e inmunohistoquímica. Para la identificación del gen se empleó la secuencia reportada del genoma para *P. vivax* mediante herramientas bioinformáticas; el gen amplificado se clonó en un vector de expresión, con el fin de obtener la proteína recombinante en *E. coli*. La

identificación de la proteína se realizó con anticuerpos policlonales derivados de la inmunización de conejos con péptidos sintéticos específicos de PvMSP7.

Los resultados muestran que la proteína se expresa en *P. vivax*, ya que los sueros policlonales inmunes reconocen una banda a ~42 kDa en el lisado del parásito, además de exhibir un patrón de fluorescencia característico para proteínas de superficie en los estadios tardíos del ciclo asexual malárico. De igual forma, se demostró que los sueros policlonales reconocieron a la proteína recombinante rPvMSP7 purificada, al realizar un ensayo de Western-blot.

REFERENCIAS

1. Greenwood, B. and T. Mutabingwa, *Malaria in 2002*. Nature, 2002. **415**(6872): p. 670-2.
2. Mendis, K., et al., *The neglected burden of Plasmodium vivax malaria*. Am J Trop Med Hyg, 2001. **64**(1-2 Suppl): p. 97-106.
3. Perez-Leal, O., et al., *Identifying and characterising the Plasmodium falciparum merozoite surface protein 10 Plasmodium vivax homologue*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **331**(4): p. 1178-84.
4. Patarroyo, M.A., et al., *Identification and characterisation of the Plasmodium vivax rhoptry-associated protein 2*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **337**(3): p. 853-9.
5. Perez-Leal, O., et al., *The Plasmodium vivax rhoptry-associated protein 1*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **341**(4): p. 1053-8.
6. Pachebbat, J.A., et al., *The 22 kDa component of the protein complex on the surface of Plasmodium falciparum merozoites is derived from a larger precursor, merozoite surface protein 7*. Mol Biochem Parasitol, 2001. **117**(1): p. 83-9.

ENFERMEDAD DE CHAGAS AGUDA EN COLOMBIA, UNA ENTIDAD POCO SOSPECHADA. INFORME DE 14 CASOS PRESENTADOS EN EL PERIODO 2002 A 2006.

Rubén Santiago Nicholls¹; Zulma Milena Cucunubá²; Angélica Knudson¹; Astrid Carolina Flórez¹; Marleny Montilla¹; Concepción Judith Puerta³; Paula Ximena Pavía³

1. Grupo Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá D.C.
2. Escuela de Medicina, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja.
3. Laboratorio Parasitología Molecular, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C.

Recibido: 22 de septiembre de 2006. **Aceptado:** abril 10 de 2008.

RESUMEN

Introducción: Los casos de enfermedad de Chagas aguda informados en Colombia son esporádicos.

Objetivo: Describir catorce casos notificados al Grupo de Parasitología del Instituto Nacional de Salud entre 2002 y 2006.

Materiales y Métodos: Utilizando información de historias clínicas, fichas epidemiológicas, informes de resultados de exámenes de laboratorio y análisis de sangre, se tabularon variables demográficas, hallazgos clínicos, paraclínicos y de laboratorio. Se realizaron extendidos de sangre periférica, identificación serológica para IgG mediante inmunofluorescencia indirecta, aislamiento en cultivo e inoculación en ratones, pruebas de reacción en cadena de la polimerasa y análisis isoenzimático.

Resultados: Cuatro casos se informaron en Casanare, tres en Putumayo, dos en cada uno de los departamentos de Norte de Santander, Santander y Vaupés, y uno en Arauca. La presunta vía de transmisión fue vectorial; en el 50% de los casos había antecedente de convivencia con el vector. El 50% de los pacientes fueron adultos, entre los 18 y los 50 años y el 50% niños entre los 6 meses y los 4 años. El síntoma predominante fue fiebre en el 92,8%. Los signos de puerta de entrada fueron infrecuentes; solamente dos pacientes presentaron signo de Romaña. Cinco pacientes presentaron miocarditis, 4 desarrollaron falla cardíaca, y uno de ellos taponamiento cardíaco. La parasitemia fue evidente en 12 casos; las pruebas serológicas fueron reactivas en 50% de los casos y también en 6 casos se logró aislamiento del parásito. El análisis isoenzimático identificó *Trypanosoma cruzi* grupo I.

Conclusiones: La variabilidad clínica predominó. Ningún caso se sospechó clínicamente. Llama la atención la alta incidencia en adultos. Es importante incluir esta enfermedad como diagnóstico diferencial del síndrome febril en regiones endémicas debido a su buena respuesta al tratamiento etiológico el cual previene la fase crónica.

TRANSCRIPCIÓN DE UNA SECUENCIA PUTATIVA PARA FOSFOLIPASA A2 SECRETORIA (sPLA2) EN *Toxoplasma gondii*

JC Rodríguez Montoya¹; AJ Gutiérrez¹; Jorge Enrique Gómez Marín¹

1. Universidad del Quindío, Grupo de Estudio en Parasitología y Micología Molecular (GEPAMOL). Centro de Investigaciones Biomédicas.

Recibido: 22 de septiembre de 2006. Aceptado: abril 10 de 2008.

29

RESUMEN

Nuestro grupo ha descrito y anotado recientemente con herramientas bioinformáticas una secuencia putativa para fosfolipasa A2 secretoria (sPLA2), la cual se ha descrito; favorece el proceso de invasión de *Toxoplasma gondii*. Este trabajo busca complementar los resultados previos *in silico* con observaciones *in vitro*. **Objetivos:** Determinar si la sPLA2 de *Toxoplasma gondii* se encuentra en ADN geonómico y si se transcribe utilizando la técnica de amplificación en cadena de la polimerasa del producto de transcriptasa reversa (RT-PCR) a partir de RNA y determinar la localización física en cromosomas utilizando herramientas bioinformáticas. **Materiales y métodos:** Se diseñaron cebadores (iniciadores) para amplificar el gen CF369262.1 secuencia putativa de sPLA2 de *Toxoplasma gondii* a partir del estadio de taquizoitos de la cepa RH de *T. gondii* obtenidos de cultivo en ratón cepa ICR, para realizar PCR en ADN geonómico y RT-PCR semicuantitativo en RNA. Adicionalmente se realizó una caracterización del gen, utilizando las herramientas bioinformáticas ToxoDB, BLAST, y GBrowse. **Resultados y discusión:** Se logró evidenciar la existencia del gen para la fosfolipasa A2 en el parásito y descartar contaminaciones propias de los procesos de secuenciamiento de los genomas completos de estos organismos. También se desarrolló la expresión de este gen putativo utilizando la técnica RT-PCR semicuantitativo, donde se identificó la fase "plateau" a partir de el ciclo número 34. Se logró ubicar la posición específica del gen de la fosfolipasa A2 en el cromosoma número XII. En conclusión, la metodología utilizada permitió obtener unos resultados exitosos con respecto a la ubicación del gen en el genoma y su expresión en el parásito.

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA PROTEÍNA DE SUPERFICIE DE MEROZOITO (MSP5) DE *Plasmodium vivax* EN AISLADOS COLOMBIANOS

Andrómeda Gómez^{1,2}, Pilar Martínez¹ y Manuel A. Patarroyo^{1,2}

1. Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC)
2. Universidad Nacional de Colombia

Recibido: 22 de septiembre de 2006. Aceptado: abril 10 de 2008.

RESUMEN

Objetivo General: Determinar la variabilidad genética de la proteína de superficie de merozoito MSP5 de *Plasmodium vivax*, a partir de ADN genómico parasitario aislado de enfermos con Malaria procedentes de áreas endémicas de Colombia (Llanos Orientales, Norte de Santander y Nariño).

Objetivos específicos

- Aislar el parásito y extraer su ADN a partir de muestras de sangre de pacientes Colombianos infectados con malaria por *P. vivax*.
- Amplificar, clonar y secuenciar la MSP5 de *Plasmodium vivax*.
- Determinar la diversidad nucleotídica, tipo de selección y recombinación, analizando las secuencias de Colombia obtenidas.

La malaria es una de las parasitosis más ampliamente distribuidas en el mundo, se estima que anualmente se presentan de 300 a 515 millones de casos clínicos y de 1.5 a 2.7 millones de muertes, siendo sus principales víctimas niños menores de 5 años y adultos en edad productiva. Cerca de 101 países se encuentran afectados, especialmente aquellos localizados en zonas tropicales y subtropicales (WHO 2002; Snow, Guerra et al. 2005). Una de las estrategias para el desarrollo de una vacuna, está basada en la identificación y caracterización molecular y funcional de antígenos de superficie del estadio asexual. Este grupo de proteínas, denominadas Proteínas de Superficie del Merozoito (MSPs), son importantes en el proceso de unión inicial e invasión del parásito al glóbulo rojo. Adicionalmente, por su localización, se convierten en blanco del sistema inmune. Los estudios de diversidad genética (polimorfismo) de estos antígenos, permitirán la selección de regiones conservadas que puedan ser posteriormente usadas como candidatas a vacuna contra la malaria (Dubovsky 2001; Benet, Tavul et al. 2004). La proteína de superficie de merozoito MSP5 de *P. vivax* ha sido

postulada como posible candidata a vacuna (Black, Barnwell et al. 2002); dado que no se ha establecido hasta el momento su variabilidad genética, se hizo necesario realizar este estudio para el posterior desarrollo de una vacuna multiantígeno-multiestadio que contenga regiones conservadas de ésta y otras proteínas. El presente trabajo se realizó amplificando, clonando y secuenciando el gen que codifica la proteína de superficie de merozoito 5 de *P. vivax* (*PvMSP5*) a partir de muestras de pacientes infectados, provenientes de áreas de Colombia con diferentes tasas de transmisión. Nuestros resultados revelaron que *PvMSP5* es una de las proteínas de superficie de *P. vivax* mas polimórficas, estando este polimorfismo restringido a regiones específicas de esta proteína. El intrón y el exón II (el cual incluye un dominio de anclaje a membrana GPI y un dominio EGF-like) fueron altamente conservados comparados con el exón I, encontrándose en este último la mayoría de variación y eventos de recombinación. No se observó agrupamiento geográfico. El test de Nei-Gojobori mostró selección positiva en las muestras analizadas; sin embargo los test de Tajima y Fu and Li presentaron un patrón de selección neutral. Los resultados obtenidos reflejan un patrón de variación localizado, recombinación entre alelos de *PvMSP5* y presiones inmunes y funcionales, donde fuerzas selectivas pueden actuar en el Exón I más que en el Exon II, lo cual evidencia la importancia de este último en la generación de una vacuna antimalárica.

REFERENCIAS

- Benet, A., L. Tavul, et al. (2004). "Diversity of Plasmodium falciparum vaccine candidate merozoite surface protein 4 (MSP4) in a natural population." *Mol Biochem Parasitol* **134**(2): 275-80.
- Black, C. G., J. W. Barnwell, et al. (2002). "The Plasmodium vivax homologues of merozoite surface proteins 4 and 5 from Plasmodium falciparum are expressed at different locations in the merozoite." *Mol Biochem Parasitol* **120**(2): 215-24.
- Dubovsky, F. (2001). "The malaria vaccine initiative.status." *PATH (program for apropiate technology in health)*.
- Snow, R. W., C. A. Guerra, et al. (2005). "The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria." *Nature* **434**: 214-217.
- WHO (2002). "Epidemiological Bulletin." *World Health Organization*.

ANÁLISIS DE RECURRENCIAS EN PACIENTES CON RETINOCOROIDITIS POR TOXOPLASMOSIS EN EL CENTRO DE SALUD DE LA UNIVERSIDAD DEL QUINDIO

Alejandra de la Torre¹, Ángela Cristina Ríos Cadavid¹, Carlos Mario Cardozo García¹, Jorge Enrique Gómez Marín¹

1. Grupo de Parasitología y Micología Molecular (GEPAMOL) Universidad del Quindío

32

Recibido: 22 de septiembre de 2006. **Aceptado:** abril 10 de 2008.

RESUMEN

JUSTIFICACION: No se conoce la frecuencia de recurrencias de retinocoroiditis por toxoplasmosis ni los factores asociados a ellas en pacientes colombianos.

OBJETIVOS: Determinar la frecuencia de recurrencias y los factores asociados, en la retinocoroiditis por toxoplasmosis

DISEÑO: Revisión retrospectiva de historias clínicas de pacientes con toxoplasmosis que asistieron a consulta entre Junio de 2004 a Junio de 2006 al Centro de Salud de la Universidad del Quindío.

RESULTADOS: Se revisaron las historias de 41 pacientes. Se encontraron un total de 32 episodios de recaídas de retinocoroiditis por toxoplasmosis en un período de seguimiento de 3034 meses, equivalente a 1,5 episodios por cada 10 años. El promedio de edad en que se presentaron las recurrencias fue menor en los pacientes de sexo masculino (29 ± 8) frente a los de sexo femenino (39 ± 8) de manera estadísticamente significativa ($p = 0,0024$).

CONCLUSIONES: La probabilidad de recurrencias es similar a la reportada en otros sitios del mundo. La diferencia de promedio de edad según sexo sugiere alguna relación entre hormonas e inmunidad que merece mayor estudio. Dada la probabilidad de mayor daño en cada recurrencia es una prioridad conocer mejor las causas que la determinan con el fin de evitar los factores desencadenantes.

EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE PROTEINAS RECOMBINANTES DE *Plasmodium vivax* EN MONOS *Aotus nancymae*

José Rojas-Caraballo¹, Gabriela Delgado^{1,2}, Raul Rodríguez¹ y Manuel A. Patarroyo^{1,2}.

1. Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC)
2. Universidad Nacional de Colombia

Recibido: 22 de septiembre de 2006. Aceptado: abril 10 de 2008.

33

RESUMEN

Objetivo general

- Escalar la producción de proteínas recombinantes de *Plasmodium vivax* en *E. coli* e inmunizar monos *Aotus nancymae* con estas proteínas, a fin de caracterizar la respuesta inmune inducida.

Resumen

La malaria es una enfermedad parasitaria transmitida por mosquitos hembra del género *Anopheles*, y se considera que es una de las enfermedades infecciosas más prevalentes alrededor del mundo. Cerca de 300 – 500 millones de casos de malaria se presentan anualmente de los cuales más de 2 millones resultan ser mortales (Suh et al. 2004), (Greenwood and Mutabingwa 2002), (Snow et al. 2005). *Plasmodium vivax* es el responsable de cerca del 50% de los casos de malaria por fuera del continente Africano, principalmente en el Sureste Asiático, en América del Sur y Central. Por esto y debido al incremento de la resistencia a los fármacos antimaláricos por parte del parásito (Ridley 2002), así como a los insecticidas por parte del vector transmisor de la enfermedad (Chandre et al. 1999) es necesaria una vacuna contra parásitos de este género. Uno de los principales rasgos característicos de los merozoitos de *Plasmodium vivax* es su invasión selectiva hacia reticulocitos humanos y en este evento molecular participan las proteínas de unión a reticulocitos 1 y 2 las cuales han sido previamente descritas (Galinski and Barnwell 1996); (Galinski et al. 1992).

En nuestro grupo de investigación se han identificado y caracterizado algunos antígenos de *P. vivax* (Pérez-Leal et al. 2005); (Pérez-Leal et al. 2006); (Patarroyo M, A et al. 2005) que pueden llegar a ser potenciales candidatos a vacuna, ya que sus homólogos en *P. falciparum* han mostrado ser inmunogénicos y algunos de ellos han mostrado protección frente a reto experimental con *P. falciparum*. Sierra et al 2005 demostraron que segmentos recombinantes de la PwMSP1 (Merozoite surface protein 1) resultaron ser inmunogénicos en

monos *Aotus*, antigénica en humanos y mostró protección parcial ante reto experimental con la cepa VCG1 de *Plasmodium vivax*.

En el presente estudio se evaluó la inmunogenicidad en monos *Aotus* de un segmento recombinante de la proteína de unión a reticulocitos 1 de *Plasmodium vivax* (PvRBP1), la cual es de gran importancia debido a que participa en la unión selectiva de los merozoitos de *Plasmodium vivax* a los reticulocitos. En este estudio se demostró que el segmento recombinante de la PvRBP1 resultó ser altamente inmunogénico en monos *Aotus*, induciendo buena respuesta inmune celular (proliferación de linfocitos T) y humoral (altos títulos de anticuerpos anti - rPvRBP1), además es reconocida por sueros de pacientes que han sufrido diferentes episodios de malaria y por lo tanto se recomienda evaluar su capacidad inductora de protección frente a reto experimental con *Plasmodium vivax*.

REFERENCIAS

1. Chandre, F., Darrier, F., Manga, L., Akogbeto, M., Faye, O., Mouchet, J., and Guillet, P. 1999. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bull World Health Organ* **77**: 230-234.
2. Greenwood, B., and Mutabingwa, T. 2002. Malaria in 2002. *Nature* **415**: 670-672.
3. Galinski, M.R., Medina, C.C., Ingravallo, P., and Barnwell, J.W. 1992. A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites. *Cell* **69**: 1213-1226.
4. Galinski, M.R., and Barnwell, J.W. 1996. *Plasmodium vivax*: Merozoites, invasion of reticulocytes and considerations for malaria vaccine development. *Parasitol Today* **12**: 20-29.
5. Patarroyo, M.A., Perez-Leal, O., Lopez, Y., Cortes, J., Rojas-Caraballo, J., Gomez, A., Moncada, C., Rosas, J., and Patarroyo, M.E. 2005. Identification and characterisation of the *Plasmodium vivax* rhoptry-associated protein 2. *Biochem Biophys Res Commun* **337**: 853-859.
6. Perez-Leal, O., Sierra, A.Y., Barrero, C.A., Moncada, C., Martinez, P., Cortes, J., Lopez, Y., Salazar, L.M., Hoebeke, J., and Patarroyo, M.A. 2005. Identifying and characterising the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 10 *Plasmodium vivax* homologue. *Biochem Biophys Res Commun* **331**: 1178-1184.
7. Perez-Leal, O., Mongui, A., Cortes, J., Yepes, G., Leiton, J., and Patarroyo, M.A. 2006. The *Plasmodium vivax* rhoptry-associated protein 1. *Biochem Biophys Res Commun* **341**: 1053-1058.
8. Ridley, R.G. 2002. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature* **415**: 686-693.
9. Sierra, A.Y., Barrero, C.A., Rodriguez, R., Silva, Y., Moncada, C., Vanegas, M., and Patarroyo, M.A. 2003. Splenectomised and spleen intact *Aotus* monkeys' immune response to *Plasmodium vivax* MSP-1 protein fragments and their high activity binding peptides. *Vaccine* **21**: 4133-4144.
10. Snow, R.W., Guerra, C.A., Noor, A.M., Myint, H.Y., and Hay, S.I. 2005. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **434**: 214-217.
11. Suh, K.N., Kain, K.C., and Keystone, J.S. 2004. Malaria. *Cmaj* **170**: 1693-1702.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA TOXOPLASMOSIS OCULAR EN UNA COHORTE COLOMBIANA

Alejandra de-la-Torre, Christian Adrián López-Castillo, Javier Andrés Bernal Urrego, Jorge Enrique Gómez-Marín.

1. Universidad del Quindío, Grupo de Estudio en Parasitología y Micología Molecular (GEPAMOL). Centro de Investigaciones Biomédicas.

Recibido: 22 de septiembre de 2006. **Aceptado:** abril 10 de 2008.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar las características clínicas de los pacientes con toxoplasmosis ocular atendidos en un centro de referencia para toxoplasmosis.

Diseño: Estudio retrospectivo, descriptivo de una serie de casos.

Métodos: Revisamos las historias clínicas de 52 pacientes (80 ojos) con diagnóstico de toxoplasmosis ocular atendidos en una consulta especializada en toxoplasmosis del centro de salud de la Universidad del Quindío en la ciudad de Armenia (Colombia) entre los meses de Septiembre de 2005 a Marzo de 2006.

Resultados: Se incluyeron 41 pacientes con diagnóstico de toxoplasmosis ocular (52 ojos afectados), los cuales fueron clasificados según criterios de adquisición, clínicos y serológicos. La distribución por sexo fue de 22 hombres (53,7%) y 19 mujeres (46,3%). la mediana de edad fue de 26 años; (P₂₅ 18 – P₇₅ 37). En 17 casos la enfermedad se encontró en fase activa (41,5%). El compromiso unilateral se encontró en 28 casos (68,3%) y el ojo más afectado fue el izquierdo (OI) sin diferencias estadísticamente significativas ($p=0,07$). Hubo compromiso severo (<20/200) de la agudeza visual en 10 (31,3%) de los ojos afectados en fase inactiva. En los casos con cicatrices hiperpigmentadas inactivas se encontró que 7 (29,2%) de los casos presentaron sinequias posteriores asociadas, 5(20,8%) desviación ocular, 2 (8,3%) cataratas y 1 (4,2%) neovascularización coroidea en el sitio de la lesión. En cuanto a los criterios serológicos encontramos que de las lesiones recurrentes un 14,3% presentaron IgM positiva. Cuando se compararon los diferentes esquemas de tratamiento utilizados y las recaídas previas se encontró una relación estadísticamente significativa entre los pacientes que habían recibido esteroides subconjuntivales previamente con las recaídas ($p = 0,01$).

Conclusiones: Este es el primer reporte en Colombia sobre características clínicas en pacientes con toxoplasmosis ocular de Colombia. Los resultados de este estudio muestran un porcentaje importante de los



casos en fase inactiva con ceguera legal (31,3% de los ojos afectados) demostrando que la toxoplasmosis ocular causa ceguera y discapacidad visual, afectando particularmente en su mayoría la población joven. La toxoplasmosis ocular afectó frecuentemente la mácula (55,8% de los ojos afectados). Es importante tener en cuenta las manifestaciones atípicas de la toxoplasmosis ocular, así como las complicaciones que esta puede ocasionar. Se hacen necesarios estudios prospectivos que evalúen el papel de los esteroides subconjuntivales y las recaídas. Debido a su importancia enfatizamos en la creación de programas de prevención primaria dirigida a la población general en nuestro país.



CLONACIÓN DE DOS UNIDADES GÉNICAS DEL GEN CODIFICANTE PARA LA PROTEÍNA KMP-11 EN UNA CEPA KP1(+) DE *Trypanosoma rangeli*

Cuervo Claudia, Suárez Brian, Puerta Concepción

1. Laboratorio de Parasitología Molecular, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana.

Recibido: 22 de septiembre de 2006. **Aceptado:** abril 10 de 2008.

37

RESUMEN

OBJETIVO

Amplificar y clonar dos unidades génicas codificantes para la proteína KMP-11 en la cepa Choachi KP1(+) de *Trypanosoma rangeli*.

JUSTIFICACIÓN

Teniendo en cuenta que *Trypanosoma rangeli* ha sido dividido en dos grupos molecularmente diferentes (Vallejo et al., 2002), que estudios moleculares recientes usando secuencias de ADN ribosomal extienden su división a por lo menos 4 grupos (Da silva et al., 2004) y que la posición taxonómica de la especie se ha mantenido controversial debido al poco conocimiento de la estructura genética de *T. rangeli* y por tanto a los limitados estudios de la población del parásito; en el presente trabajo se propone la proteína KMP-11 como un blanco para el estudio de las relaciones filogenéticas entre tripanosomátidos, toda vez que esta es una proteína altamente conservada y abundante en los kinetoplástidos (Diez et al., 2005).

METODOLOGÍA

Teniendo en cuenta el carácter repetido de los genes codificantes para la proteína KMP-11 (Diez et al., 2005) a partir de ADN genómico de la cepa Choachí KP1(+) se amplificó un fragmento génico correspondiente a dos unidades del gen KMP-11. Dicho fragmento se extrajo del gel y se clonó en el vector pGEM-T Easy (Promega®). Producto de la clonación se obtuvieron varios clones, verificandose mediante PCR la presencia del fragmento esperado. A los clones positivos se les realizó la extracción del ADN plásmidico con el estuche comercial Wizard® Plus SV Miniprep System (Promega). Dicho ADN fue digerido con la endonucleasa de restricción *EcoRI*, la cual corta en ambos lados del sitio múltiple de clonación y posteriormente fue transferido

a membranas de "nylon" e hibridado con la sonda correspondiente al gen KMP-11 de la cepa Tre KP1(-) de *T. rangeli*.

RESULTADOS

Producto de la PCR se obtuvieron varias bandas de amplificación correspondientes a las unidades de repetición conteniendo 1 (300 pb) y 2 regiones codificantes (800 pb). La banda de 800 pb fue clonada, obteniéndose dos clones los cuales amplificaron una banda del tamaño esperado. El ADN plásmidico de los clones se purificó y luego de digestión con la endonucleasa de restricción *EcoRI* ambos clones mostraron liberar un fragmento de 800 pb. Mediante ensayo de "Southern blot" dicho fragmento liberado mostró una fuerte señal de hibridización con el gen homologo de la cepa Tre KP1(-) confirmando la clonación de dicho gen en la cepa Choachi KP1(+) del parásito. Actualmente ambos clones están siendo secuenciados con el objeto de comparar su secuencia con las reportadas de otros tripanosomátidos.

BIBLIOGRAFIA

Da Silva FM, Noyes H, Campaner M, Junqueira AC, Coura JR, Anez N, Shaw JJ, Stevens JR, Teixeira MM. 2004. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology* 129, 549-61.

Diez H, Thomas MC, Uruena CP, Santander SP, Cuervo CL, Lopez MC, Puerta CJ. 2005. Molecular characterization of the kinetoplastid membrane protein-11 genes from the parasite *Trypanosoma rangeli*. *Parasitology*.130, 643-51.

Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Lozano LE, Sanchez JL, Jaramillo JC, Gualtero D, Castaneda N, Silva JC, Steindel M. 2002. kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. *Acta Tropica* 81, 77-82.