

Sesión de discusión de pósters A2: Biología molecular, inmunología, Técnicas aplicadas al estudio de infecciones y control vectorial

Aula 14F, Facultad de Farmacia
Lunes 19 de Julio: 15.00-17.30

121.- Correlación entre la presencia de síntomas en la giardiosis humana y el genotipo de *Giardia duodenalis*

J. Sahagún, A. Clavel, M.T. Llorente, M. Varea, S. Capilla, C. Seral

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza, C/ Domingo Miral s/n, 50009 Zaragoza, España

Giardia duodenalis es un protozoo enteroparásito que infecta a seres humanos y muchas otras especies de mamíferos. El espectro clínico abarca desde infección asintomática a diarrea crónica con malabsorción. Los factores de riesgo para la giardiosis clínica son mal comprendidos; podrían incluir variación en la virulencia de los aislados de *Giardia*, factores del hospedador o ambos. Las cepas de *G. duodenalis* aisladas de seres humanos pueden dividirse en dos grupos principales, que se han denominado "polaco" y "belga", 1/2 y 3, o A y B. Hasta la fecha se han publicado dos trabajos sobre la correlación entre genotipo de *Giardia* y clínica. Homan y Mank (2001) hallaron una correlación entre grupo A y diarrea intermitente, por una parte, y grupo B y diarrea persistente, por otra, en 18 pacientes de entre 8 y 60 años de edad; emitieron la hipótesis de que el grupo A sería probablemente más frecuente que el B en infecciones asintomáticas. Read y otros, por el contrario, hallaron una fuerte correlación entre el grupo A e infección sintomática, y grupo B e infección asintomática, en 23 niños de menos de cinco años. Se seleccionaron en el Hospital Clínico

Universitario "Lozano Blesa" de Zaragoza (España) las muestras fecales positivas para *Giardia* y negativas para cualquier otro enteropatógeno, y se las sometió a extracción de ADN y una PCR semianidada para el gen de la triosa-fosfato isomerasa (tpi). De los 47 pacientes estudiados (20 asintomáticos y 27 sintomáticos) se halló el grupo All en 21 (45%), el B en 24 (51%) y tanto el All como el B en dos (4%). El grupo All estaba presente en 14 pacientes (52%) del grupo sintomático y en siete (35%) del asintomático, mientras que el B se halló en 12 (44%) de los pacientes con síntomas y en 12 (60%) de los asintomáticos. Un paciente de cada grupo (4% y 5%) presentó ambos grupos simultáneamente. En los 19 pacientes de menos de cinco años, siete de las ocho infecciones por el grupo All (88%) fueron sintomáticas, mientras que solo lo fueron cinco de las once por el grupo B (45%). Esto concuerda con los resultados de Read y otros (2002), que hallaron correlación entre el grupo A e infección sintomática en niños. No se halló correlación entre grupo genético de *Giardia* y clínica en los pacientes de más de cinco años.

122.- Caracterización genética de aislados de *Cryptosporidium* obtenidos de seres humanos en Aragón (España nororiental)

M.T. Llorente, A. Clavel, M. Varea, J. Sahagún, S. Olivera, M.C. Rubio

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza, C/ Domingo Miral s/n, 50017 Zaragoza, España

Los coccidios del género *Cryptosporidium* son agentes frecuentes de infección gastrointestinal en seres humanos, animales domésticos y otros vertebrados. La mayor parte de los investigadores reconocen 13 especies de *Cryptosporidium* (*C. parvum*, *C. hominis*, *C. wrairi*, *C. felis*, *C. canis*, *C. muris*, *C. andersoni*, *C. baileyi*, *C. meleagridis*, *C. galli*, *C. serpentis*, *C. saurophilum* y *C. molnari*) y al menos siete genotipos de *C. parvum* (bovino, murino, porcino, marsupial, de hurón, cervino y de oso). El genotipo bovino de *Cryptosporidium parvum* y *C. hominis* son responsables de la mayor parte de las infecciones humanas, pero hay diferencias en su distribución geográfica en los casos esporádicos. Hemos analizado la distribución de aislados de *Cryptosporidium* en zonas urbanas y rurales de nuestra provincia. Entre julio de 1997 y septiembre

de 2002 se diagnosticaron 107 casos de criptosporidiosis mediante observación de ooquistes de *Cryptosporidium* en muestras fecales concentradas mediante sedimentación en formalina-acetato de etilo y sometidas a tinción de Ziehl-Neelsen modificada. Tras la extracción de ADN, se realizó un análisis PCR-RFLP del gen de la subunidad pequeña de ARNr. Todos los casos (53 de zonas rurales y 54 de zonas urbanas) eran niños inmunocompetentes con criptosporidiosis esporádica. Se identificó *C. hominis* en 70 casos (65%), el genotipo bovino de *C. parvum* en 35 (33%), *C. meleagridis* en uno (0.9%) y *C. felis* en uno (0.9%). El 47% de los casos rurales se debieron al genotipo bovino, contra solo un 18% de los urbanos. De los 35 casos de infección por el genotipo bovino, 25 (71%) correspondían a zonas rurales.

123.- Caracterización genómica de cepas de *Toxoplasma gondii* asociadas a casos de toxoplasmosis humana en España

I. Fuentes¹, M. Rodríguez¹, C. Ladrón de Guevara², C. Pérez³, F. Del Castillo⁴, M.J. Gutierrez¹, J.M. Rubio¹

¹Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, Majadahonda, Madrid, España. ²Servicio de Microbiología, Hospital La Paz, Madrid, España. ³Laboratorio, Centro de Especialidades de Carabanchel, España. ⁴Servicio de Pediatría, Hospital La Paz, Madrid, España

La toxoplasmosis es una enfermedad endémica. El protozoo *Toxoplasma gondii*, parásito intracelular obligado, origina esta zoonosis de distribución global que afecta aproximadamente a un tercio de la población mundial y a un amplio espectro de hospedadores vertebrados. Los individuos infectados inmunocompetentes suelen ser asintomáticos o mostrar una sintomatología leve, mientras que los casos congénitos y los pacientes inmunocomprometidos pueden presentar una alta tasa de morbilidad y mortalidad. La progresión y severidad de la enfermedad puede diferir según diversas variables, destacando las características genéticas del hospedador y del parásito. La caracterización de cepas de *T. gondii* se está desarrollando para tipificar poblaciones con el fin de valorar las implicaciones epidemiológicas y determinar factores de virulencia. En el presente estudio se determinó el genotipo de cepas de *T. gondii* aisladas de casos de pacientes inmunocompetentes, inmunocomprometidos y de congénitos. El genotipo fue determinado tras la amplificación del gen

SAG 2 de *T. gondii* por PCR *nested* y posterior análisis por RFLP. Se analizaron sesenta y ocho cepas de las cuales 54% (37) fueron obtenidas de pacientes inmunocomprometidos y 46% (31) fueron de casos congénitos. En enfermos de SIDA y otros enfermos inmunodeprimidos se observó que los tres genotipos de *T. gondii* originan sintomatología. El genotipo más prevalente fue el tipo II (el 50% del total de las cepas analizadas). En otros estudios, realizados por nosotros, de caracterización de cepas procedentes de animales considerados como fuente de infección del hombre, se encontró también una significativa mayor prevalencia del tipo II en la caracterización de cepas de gatos y en el estudio de cepas procedentes de óvidos se encontró este tipo como único genotipo asociado con abortos.

Proyecto financiado por MPY 1276/01, ISCIII, Ministerio de Sanidad, España.

124.- Variabilidad genética de *Plasmodium falciparum* en tres poblaciones de la isla de Bioko (Guinea Ecuatorial) con diferente grado de aislamiento

A. Guerra-Neira¹, J.M. Rubio², J. Roche¹, J. Cano¹, A. Sarrión¹, A. Benito^{2,3}

¹Centro de Referencia para el Control de Endemias (Guinea Ecuatorial), Centro Nacional de Medicina Tropical, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España. ²Laboratorio de Malaria, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España. ³Servicio de Medicina Tropical, Centro Nacional de Medicina Tropical, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

La malaria es una enfermedad producida por cuatro especies del parásito *Plasmodium* sp, siendo el más agresivo *P. falciparum*. Este protozoo exhibe una gran plasticidad genómica y un claro ejemplo es el alto grado de polimorfismo de sus proteínas de superficie del merozoito (MSP) 1 y 2. Sin embargo, este polimorfismo es muy variable dependiendo de la endemicidad de la infección, de la localización geográfica e incluso del grado de aislamiento de la población. En este trabajo hemos estudiado la variabilidad genética de *P. falciparum* utilizando las proteínas MSP-1 y MSP-2 como marcadores, en tres poblaciones de la isla de Bioko (Guinea Ecuatorial). Dichas poblaciones tienen unas características similares en cuanto a tamaño, localización geográfica o endemicidad de *P. falciparum* y sólo se diferencian en su aislamiento: Bareso (este) y Sácriba (noroeste) distan unos 30 km de la capital del país (Malabo) a la que les une una carretera; a Ureca (sur) sin embargo sólo se puede acceder por barco o caminando a través del bosque unos 30 km desde la ciudad más próxima. Para realizar el estudio se tomaron muestras

sanguíneas de la población menor de 10 años en papel de filtro. Se hizo la extracción del DNA y se analizó el gen de la MSP-1 y sus familias alélicas (K1, MAD20 y RO33) y el gen de la MSP-2. Se identificaron 16 alelos diferentes para MSP-1 (1 para RO33, 9 para K1 y 6 para MAD20) y 8 para MSP-2. En Ureca se observó mayor diversidad (fue la única población donde se encontraron los 8 alelos del MSP-2) y además se hallaron algunos alelos autóctonos como el de 150pb de la familia K1 o de 400pb de MSP-2. Al estar Ureca aislada geográficamente parece que su población parasitaria ha tenido menos influencias externas (movimientos de población reducidos, actividades de control escasas, menor acceso a los medicamentos), lo que la ha hecho mantener una mayor diversidad parasitaria. Es necesario tener en cuenta estos focos aislados a la hora de planificar las medidas de control.

Este trabajo ha sido subvencionado por la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), y el Instituto de Salud Carlos III.

125.- Caracterización molecular de un antígeno de tegumento de metacestodos de *Taenia solium*

E. Ferrer^{1,3}, L.M. González¹, M. Foster², M.M. Cortéz³, I. Dávila⁴, L.J.S. Harrison⁵, R.M.E. Parkhouse⁶, T. Gárate¹

¹Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Microbiología, 28220 Majadahonda, Madrid, España. ²Institute for Animal Health, Pirbright Laboratories, Woking, Surrey, UK. ³Centro de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela. ⁴Departamento de Parasitología, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela. ⁵Sir Alexander Robertson Centre for Tropical Veterinary Medicine, University of Edinburgh, Easter Bush, Roslin, Midlothian, Scotland, EH25 9RG, UK. ⁶Instituto Gulbenkian de Ciência, 2780-156 Oeiras, Portugal

Taenia solium es un cestodo parásito que causa serios problemas económicos y sanitarios. El estado larvario del parásito es responsable de la neurocisticercosis (NCC) humana, la cual es la infección parasitaria más común del sistema nervioso central. El inmunodiagnóstico es de gran importancia en la detección de la enfermedad. Se han realizado muchos estudios para identificar antígenos específicos del parásito, por lo que el objetivo principal de este trabajo fue la clonación de antígenos de metacestodos de *T. solium* y la evaluación de su antigenicidad. Por inmunocribado de una genoteca de expresión de metacestodos de *T. solium* construida en el vector λ ZAP-XR[®] España con sueros de conejos inmunizados con antígenos de excreción/secreción y glicoproteínas del parásito obtuvimos un clon (H17g) que codifica una proteína de 552 aminoácidos. El alineamiento de la secuencia aminoacídica con otras de los bancos de datos (SWISSPROT) mostró alta identidad con el antígeno de tegumento R-Tso18 de *T. saginata* y con el antígeno principal de superficie de *Echinococcus multilocularis* (Em10) y *E. granulosus* (EG10). La molécula exhibió el

dominio FERM característico de la familia de proteínas ERM (ezrin-radixin-moesin) que juegan un papel estructural y regulador en el ensamblaje y estabilización de la membranas. El inserto fue subclonado en el vector pGEX-4T-1, expresado, purificado y su inmunogenicidad evaluada por ELISA con suero y líquido céfalo-raquídeo (LCR) de pacientes con cisticercosis activa e inactiva, pacientes con helmintiasis relacionadas e individuos sanos, así como también con sueros porcinos. La sensibilidad obtenida en todos los casos fue baja contrastando con los resultados obtenidos con la molécula homóloga EM10 en el diagnóstico de hidatidosis alveolar. La expresión de la proteína en otro sistema que proporcione las modificaciones post-traduccionales adecuadas, podría mejorar la sensibilidad del ensayo de diagnóstico.

Financiamiento: EU/INCO-DC (proyecto CT95-0002), FIS (00/407, 03/1114) y ISCIII-Programa Intramural. Elizabeth Ferrer fue financiada por AECl, ISCIII y RICET-FIS.

126.- Aplicación de péptidos sintéticos en el inmunodiagnóstico de cisticercosis

E. Ferrer^{1,3}, L. Benítez¹, M.M. Cortéz³, I. Dávila⁴, L.J.S. Harrison⁵, R.M.E. Parkhouse⁶, T. Gárate¹

¹Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Microbiología, 28220 Majadahonda, Madrid, España. ³Centro de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela. ⁴Departamento de Parasitología, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela. ⁵Sir Alexander Robertson Centre for Tropical Veterinary Medicine, University of Edinburgh, Easter Bush, Roslin, Midlothian, Scotland, EH25 9RG, UK. ⁶Instituto Gulbenkian de Ciência, 2780-156 Oeiras, Portugal

Taenia solium y *T. saginata* son cestodos parásitos que causan problemas económicos y sanitarios en muchos países. El cisticercosis de *T. saginata* causa la cisticercosis bovina, mientras que el de *T. solium* la cisticercosis porcina y humana. Debido a la limitada disponibilidad del material parasitario necesario para el inmunodiagnóstico de la enfermedad, una alternativa es el uso de péptidos sintéticos para la detección de anticuerpos específicos. Por esta razón el principal objetivo de este trabajo fue la evaluación de 5 péptidos como dianas para el diagnóstico específico de neurocisticercosis (NCC). Los péptidos fueron derivados de 4 moléculas potencialmente protectoras clonadas de una genoteca de expresión de oncosferas de *T. saginata* y sus características son: HP6-3, derivado de la secuencia un antígeno de secreción protector de 18 kDa de oncosferas de *T. saginata*, identificado por el anticuerpo monoclonal HP6; Ts45W-1 y Ts45W-5, derivados de la secuencia de un antígeno de *T. saginata* homólogo al antígeno protector 45W de *T. ovis*; TS45S-10 derivado de la secuencia de un antígeno

de *T. saginata* homólogo al antígeno protector 45S de *T. ovis* y el péptido TEG-1 derivado de la secuencia de un antígeno de *T. saginata* homólogo al antígeno principal de superficie de *Echinococcus* sp. Los 5 péptidos fueron evaluados por ELISA usando suero y líquido céfalo-raquídeo (LCR) de pacientes con cisticercosis activa e inactiva, pacientes con helmintiasis relacionadas e individuos sanos, así como también con sueros porcinos. De los 5 péptidos examinados HP6-3 y Ts45W-1 fueron los más reconocidos por los sueros y LCR de los pacientes con NCC, tanto activa como inactiva. En el sistema porcino también HP6-3 fue el péptido más antigénico con los sueros de cerdos infectados. La utilización combinada de estos péptidos pudiese mejorar el inmunodiagnóstico de la enfermedad.

Financiamiento: EU/INCO-DC (proyecto CT95-0002), FIS (00/407, 1114/03) y ISCIII-Programa Intramural. Elizabeth Ferrer fue financiada por becas de AECl, ISCIII y RICET-FIS.

127.- Expresión en células y larvas de insectos (sistema Baculovirus) de un antígeno de excreción/secreción de metacestodos de *Taenia solium* relevante en diagnóstico

E. Ferrer^{1,3}, J.A. Martínez-Escribano², M.E. González-Barderas², P. Resino², M.M. Cortéz³, I. Dávila⁴, M. Foster⁵, L.M. González¹, L.J.S. Harrison⁶, R.M.E. Parkhouse⁷, T. Gárate¹

¹Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Microbiología, 28220 Majadahonda, Madrid, España. ²Departamento de Biotecnología, INIA, Madrid, Spain. ³Centro de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela. ⁴Departamento de Parasitología, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela. ⁵Institute for Animal Health, Woking, Surrey, England, UK. ⁶Sir Alexander Robertson Centre for Tropical Veterinary Medicine, University of Edinburgh, Scotland, EH25 9RG, UK. ⁷Instituto Gulbenkian de Ciência, 2780-156 Oeiras, Portugal

Neurocisticercosis (NCC) es la infección parasitaria causada por el cisticerco de *Taenia solium*. El inmunodiagnóstico tiene limitaciones en cuanto a especificidad debido a reacciones cruzadas con otros helmintos parásitos. Una alternativa es la utilización de antígenos recombinantes específicos, pero la expresión de estos recombinantes en sistemas procariontes no proporcionan la mayoría de las modificaciones post-traduccionales, principalmente glicosilación, que podrían ser importantes en el reconocimiento antigénico. Por esta razón el objetivo principal de este trabajo fue la clonación y expresión de un antígeno de excreción/secreción (E/S) de metacestodos de *T. solium* en el sistema Baculovirus, evaluar su antigenicidad y compararla con la de la proteína expresada en el sistema procarionte. El antígeno E/S de metacestodo de *T. solium* (B1) fue clonado de una genoteca de expresión de metacestodos de *Taenia solium* por PCR. El inserto fue subclonado en el vector de expresión pGEX-4T-1 y expresado en *Escherichia coli* BL21 (B1-GST). El gen fue también subclonado en el

sistema Baculovirus pBacPAK9/BacPAK6 (B1-Bac) y expresado en las células de insecto *Spodoptera frugiperda* (Sf9) y larvas de *Trichoplusia ni*. Las proteínas se purificaron y su antigenicidad se evaluó por ELISA con sueros y líquidos céfalo-raquídeos (LCR) de pacientes con NCC activa e inactiva. Se compararon los resultados obtenidos con los dos sistemas de expresión. B1-GST y B1-Bac mostraron 96,8% de sensibilidad con sueros de pacientes con NCC activa. En NCC inactiva se obtuvo 67,7% y 70,1% respectivamente. Los resultados indican que los dos tipos de antígenos fueron reconocidos por los sueros de los pacientes con NCC en proporciones similares, especialmente en la fase activa sugiriendo estos datos que el epitopo reconocido por los sueros podría ser peptídico.

Financiamiento: EU/INCO-DC (project CT95-0002), FIS (00/407, 03/1114) y ISCIII-Programa Intramural. Elizabeth Ferrer fue financiada por becas de AECL, ISCIII y RICET-FIS.

128.- Identificación de cestodos larvarios en ganado vacuno y porcino mediante herramientas moleculares

N. Villalobos¹, L.M. González¹, R. Alamo Sanz², L.J.S. Harrison³, R.M.E. Parkhouse⁴, T. Gárate¹

¹Departamento de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, España. ²Consejería de Sanidad y Bienestar Social, Dirección General de Salud Pública y Asistencia, Junta de Castilla y León, Valladolid, España. ³Department of Tropical Animal Health, University of Edinburgh, Sir Alexander Robertson Centre for Tropical Veterinary Medicine, Easter Bush Veterinary Centre, Roslin, Midlothian, Scotland EH25 9RG, UK. ⁴Instituto Gulbenkian de Ciencia, R. Quinta Grande 6, Apartado Postal 14-2781 Oeiras, Portugal

Algunos cestodos son responsables de serios problemas sanitarios, además de afectar al ganado vacuno y porcino produciendo grandes pérdidas económicas en áreas endémicas. Mientras que el control del problema puede alcanzarse parcialmente a través de mejoras en la salud pública, mantenimiento adecuado de animales domésticos y vigilancia veterinaria, el desarrollo de técnicas diagnósticas específicas en los hospedadores intermedios favorecería la lucha contra estas enfermedades. Por ello, en la presente comunicación se describen los resultados de un estudio preliminar en la identificación de quistes de los siguientes parásitos: *Taenia saginata*, *T. solium*, *T. hydatigena*, *Echinococcus granulosus*, *Sarcocystis hominis* y *S. suihominis* presentes en los hospedadores intermedios, bovinos y porcinos, mediante técnicas histológicas y moleculares. Las técnicas moleculares empleadas fueron: (i) PCRs, PCR-RFLPs y multiplex-PCR derivadas del fragmento HDP2 (diseñadas por nuestro grupo); (ii) PCRs y PCR-RFLPs derivadas de los espaciadores transcritos

internos del ADN ribosomal (ITS-1 y ITS-2), (iii) PCR optimizada a partir del gen 18S rRNA. Tras la aplicación de los protocolos indicados algunos de los correspondientes amplicones fueron secuenciados para obtener más información sobre la especie a identificar. Además, se llevó a cabo un estudio histológico de las muestras. Los resultados de estos estudios confirman el valor de las herramientas moleculares empleadas como un método de diagnóstico rápido, sensible y específico, identificando cisticercos de *T. saginata*, *T. solium*, *T. hydatigena*, hidátides de *E. granulosus* y quistes de *S. hominis* y *S. suihominis* en diferentes órganos extraídos de los animales infectados. Por tanto, dichos protocolos podrían emplearse como métodos alternativos para discriminar cestodos larvarios de *Sarcocystis spp.* y evitar posibles confusiones por el diagnóstico macroscópico.

Financiación por FIS-97/0141 y FIS-00/407. Nelly Villalobos financiada por FMV-UNAM, CONACyT. (Project 400310-5-35418-B), México.

129.- Enzima convertidora de la angiotensina sérica en el inmigrante con eosinofilia: utilidad diagnóstica

C. Carranza¹, M. Riaño², J. Pardo³, O. Sanz¹, A. Angel-Moreno^{1,4}, A. Muro³, J.L. Pérez-Arellano^{1,4}

¹Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, España. ²Servicio de Bioquímica, Hospital Insular, Las Palmas, España. ³Laboratorio de Parasitología, Universidad de Salamanca, Salamanca, España. ⁴Unidad de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical, Hospital Insular, Las Palmas, España

La enzima convertidora de la angiotensina (ECA) se expresa de forma constitutiva en la cara vascular del endotelio de los vasos pulmonares y de forma inducible en los granulomas (macrófagos activados). En modelos experimentales de esquistosomosis se ha observado una elevación de la actividad de esta enzima en plasma. Por ello, el objetivo del estudio fue la evaluación de esta actividad enzimática en pacientes con diferentes tipos de helmintosis en los que existía eosinofilia. Para ello estudiamos 54 pacientes subsaharianos con eosinofilia: 27 esquistosomosis (13 *S. mansoni*, 12 *S. haematobium*, 1 *S. intercalatum* y 1 *S. mansoni* + *S. haematobium*), 15 filariosis (7 *Mansonella perstans*, 4 *Loa loa*, 3 *Wuchereria bancrofti* y 1 *Loa loa* + *Mansonella perstans*) y 12 uncinariosis, todas ellas diagnosticadas por métodos directos (heces, orina o sangre). Como grupo control se estudiaron 39 inmigrantes subsaharianos sanos procedentes de los mismos países en los que se descartó la presencia de helmintosis tanto por métodos directos (coproparasitario, estudio de orina y test de Knott) como indirectos (serología frente a *Dirofilaria* sp., *Schistosoma* sp., *Trichinella* sp., *Fasciola* sp. y *Strongyloides* sp.) en los que no se detectó eosinofilia.

En todos los casos se obtuvo una muestra de sangre sin anticoagulante, para la obtención de suero. Se determinó la actividad ECA en suero mediante técnica espectrofotométrica con sustrato PAPGG (Sigma®). Los resultados de esta actividad en los diferentes grupos (media \pm SD) expresados en U/L fueron: (i) controles (90,30 \pm 67,28); (ii) esquistosomosis (57,84 \pm 40,39); (iii) filariosis (62,74 \pm 40,69) y (iv) uncinariosis (40,96 \pm 33,46). El análisis estadístico mediante la prueba de Kruskal-Wallis demostró diferencias significativas globales entre los grupos y el test de Dunn identificó diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de uncinariosis. Estos resultados no comprueban la hipótesis de que en la esquistosomosis humana esté incrementada la actividad ECA plasmática. Sin embargo, ponen de manifiesto dos hechos: (i) la mayor actividad ECA en sujetos subsaharianos con respecto a la población autóctona y (ii) el descenso de la actividad ECA en presencia de uncinariosis.

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto FIS 01/0685.

130.- Diagnóstico de la amebosis intestinal con el kit TechLab *Entamoeba histolytica* II en muestras fecales en Zaragoza (España nororiental)

A. Clavel¹, C. Seral², M.T. Llorente², J. Sahagún², F.J. Castillo², A. Rezusta¹, M.C. Rubio², M.J. Revillo¹

¹Hospital Universitario "Miguel Servet", Paseo Isabel la Católica 1, 50009 Zaragoza, España. ²Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa", Av. San Juan Bosco 15, 50009 Zaragoza, España

El diagnóstico microscópico de *Entamoeba histolytica* y *E. dispar* es impreciso. En el presente estudio se ha usado una prueba que detecta la lectina Gal/GalNAc y es capaz de distinguir entre *E. histolytica*, patógena, y *E. dispar*, no patógena pero morfológicamente idéntica. Durante los años 2002 y 2003 se recogieron muestras fecales de 96 pacientes, en las cuales se observaron trofozoítos o quistes morfológicamente compatibles con *E. histolytica/E. dispar*. Se las sometió al test TechLab *Entamoeba histolytica* II, según las instrucciones del fabricante. La prueba resultó de realización rápida y sencilla, sin requerir ningún equipamiento especial. La prueba resultó positiva en

cuarenta pacientes (42%), procedentes de los siguientes países: Ecuador (14), Guinea Ecuatorial (6), Colombia (3), España (3), Bulgaria (2), Kenya (2), Nicaragua (2), Sáhara Occidental (2), Argelia (1), Armenia (1), Costa Rica (1), Gambia (1), Ghana (1) y Marruecos (1). Uno de los tres pacientes españoles había viajado recientemente a Bali y Marruecos. Los otros no habían estado en el extranjero; uno de ellos era pareja de hecho de una inmigrante colombiana, y el otro tenía contacto con inmigrantes africanos en su trabajo. Veintinueve pacientes eran asintomáticos, diez presentaban trastornos intestinales, y uno padecía un absceso hepático amebiano.

131.- Evaluación de la detección de antígenos de *Entamoeba histolytica* mediante una técnica de ELISA comercial como complemento a la microscopía tradicional

M.J. Gutiérrez¹, R. Cogollos², A. Alhambra², I. Fuentes¹

¹Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, Majadahonda, Madrid, España. ²Servicio de Microbiología, Hospital de Móstoles, Madrid, España

La amebiasis, enfermedad originada por el protozoo *Entamoeba histolytica*, se considera una enfermedad tropical asociada a población inmigrante y a viajeros, grupos de riesgo en constante incremento en nuestro país. Para la realización de un correcto diagnóstico y tratamiento es importante diferenciar *E. histolytica* de *E. dispar* al ser especies indistinguibles microscópicamente, por su identidad morfológica, y ser la última no patógena. Esto ha llevado al desarrollo y utilización de diferentes técnicas inmunoenzimáticas para la detección de antígenos de *E. histolytica*. Entre los pacientes a los que se les realizó exámenes coproparasitológico, en muestras remitidas al Laboratorio de Parasitología de un hospital al suroeste de Madrid (Enero/2002-Abril/2004), se estudiaron 53 pacientes, que fueron agrupados según el resultado de la microscopía tras la realización del método de concentración de Ritchie: a) observación de quistes de amebas con morfología compatible con *E. histolytica/dispar*, b) observación de quistes de amebas de morfología no identificada como *E. histolytica/dispar* y/o difícil de precisar, en pacientes originarios de

zonas endémicas y/o con sospecha clínica o epidemiológica (viajeros), c) exámenes coproparasitológicos negativos en pacientes con marcada sospecha clínica o epidemiológica. A 129 muestras de heces congeladas de estos pacientes se les realizó la detección de antígeno de la adhesina de *E. histolytica* mediante una técnica de ELISA comercial (Cellabs). Los resultados obtenidos mostraron parasitación por *E. histolytica* en 28 pacientes (50 muestras). Aunque pensamos que el diagnóstico basado en la microscopía sigue siendo importante como técnica de screening, la técnica de ELISA de detección de antígeno, evaluada por nosotros, se mostró como una técnica útil para los laboratorios de parasitología al presentar una mayor sensibilidad y especificidad. Es importante señalar que en nuestra experiencia el estudio seriado de al menos tres muestras de heces es necesario tanto para las técnicas basadas en la microscopía como para la técnica de detección de antígenos.

Proyecto financiado por MPY 1199/04 ISC, Ministerio de Sanidad.

132.- Diagnóstico de tricomoniasis mediante PCR: valoración en un estudio clínico

J. Ordás¹, F. Pérez¹, A. Rodríguez¹, M. Oña¹, S. Melón¹, F.J. Méndez¹, F. Vázquez²

¹Servicio de Microbiología I, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, España. ²Servicio de Microbiología, Hospital Monte Naranco, Oviedo, España

El objetivo del trabajo fue optimizar y comparar la PCR con el cultivo en medio de Diamond en el diagnóstico de la tricomoniasis, y su valoración en un ámbito clínico. Para la correcta optimización de la PCR, se utilizaron como controles positivos 40 cepas de *Trichomonas vaginalis* obtenidos de distintas muestras vaginales, y como controles negativos, 14 microorganismos no relacionados obtenidos de diferentes muestras clínicas y 13 exudados vaginales de pacientes sin ninguna patología. El ADN fue extraído mediante la técnica de la proteinasa K y como cebadores se utilizaron los desarrollados por Mayta et al. (2000). En los controles positivos se calculó la concentración de ADN mediante espectrofotometría, con diluciones sucesivas para detectar el límite de sensibilidad. Para la realización de la PCR se añadieron 5 µl de muestra a 20 µl mezcla de reacción habitual para esta técnica (cebadores, Taq polimerasa, Mg 2+, dNTPs). La presencia de bandas de amplificación se puso en evidencia mediante electroforesis en gel de agarosa, observándose una banda de 312 pb, correspondiente al amplicón del genoma de *T. vaginalis*. Para el estudio clínico se estudiaron 500 muestras vaginales procedentes de las consultas de Ginecología del HUCA y procesadas según protocolo del Servicio de Microbiología, incluyendo cultivo en medio de Diamond y además se realizó la técnica de PCR anteriormente descrita. No se observaron

bandas de amplificación en ninguno de los 27 controles negativos, mientras que en los 40 controles positivos las bandas obtenidas fueron las esperadas (312 pb). El límite de sensibilidad de la PCR se determinó en 6-60 mol/ml. De las 500 muestras vaginales se detectó la presencia de *T. vaginalis* mediante PCR en 27 (5,4%) y el cultivo fue positivo en 9 (1,8%), de las cuales dos no fueron positivas por PCR. La sensibilidad de la PCR fue del 93,5% frente al 61,7% del cultivo y una especificidad para ambas del 100%, siendo la PCR significativamente más sensible que el cultivo ($p < 0.0017$). *T. vaginalis* fue el segundo microorganismo aislado en cuanto a número (29 aislados), por detrás de *Candida* sp. (83), y por delante de *S. agalactiae* (27) y *G. vaginalis* (22). Los aislados de *T. vaginalis* se obtuvieron: 14 en embarazadas (sin problemas en su gestación), 11 en pacientes con sintomatología de infección vaginal y 4 en pacientes con otro tipo de patologías. La PCR desarrollada en este trabajo es válida para su aplicación en el diagnóstico de la tricomoniasis ya que cumple los criterios de sensibilidad requeridos, siendo su sensibilidad significativamente mayor que el cultivo de Diamond. La incidencia de la tricomoniasis en la población estudiada está dentro del rango esperado en países occidentales. *T. vaginalis* fue el segundo microorganismo aislado después de *C. albicans* y el único no flora vaginal habitual.

133.- Estudio comparativo para el diagnóstico de la leishmaniasis visceral: procedimientos no-invasivos (KAtex y LnPCR en sangre) versus métodos gold standard (cultivo y microscopía de médula ósea)

I. Cruz, C. Chicharro, J. Cuadrado, E. García, C. Cañavate, J. Alvar

WHO Collaborating Centre for Leishmaniasis, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo km 2, 28220 Majadahonda, Madrid, España

En la cuenca mediterránea la *Leishmaniasis Visceral* (LV), causada por *Leishmania infantum*, es endémica, afectando principalmente a niños y adultos inmunocomprometidos. Las técnicas *Gold Standard* para el diagnóstico de la LV se basan en procedimientos invasivos: microscopía y/o cultivo de médula ósea. Un test no-invasivo y eficaz es necesario para evitar un daño innecesario en enfermos sometidos a toma de muestra seriada. En este estudio investigamos la eficacia de dos procedimientos no-invasivos para el diagnóstico de la LV en niños: i) un test de aglutinación con látex (KAtex) para la detección de antígeno de *Leishmania* en orina, y ii) LnPCR para la detección de ADN de *Leishmania* en sangre. Un grupo de 25 pacientes pediátricos con LV fue sometido a toma de muestra: sangre, médula ósea y orina durante su primer episodio de LV. Las muestras de sangre fueron procesadas para obtener suero, analizándose mediante IFI para detectar anticuerpos anti-*Leishmania*. Las muestras de orina se analizaron mediante KAtex para detectar antígenos de *Leishmania*. Los aspirados de médula ósea se procesaron por cultivo en medio NNN y microscopía para demostrar la presencia de promastigotes y amastigotes de *Leishmania* respectivamente. Se procedió a la extrac-

ción de ADN de sangre y médula ósea mediante el kit EZ-DNA (Biological Industries), tras su aislamiento se aplicó la LnPCR para detectar ADN de *Leishmania*. Los siguientes resultados de sensibilidad, en porcentajes, fueron obtenidos para las diferentes técnicas diagnósticas: IFI 95%, KAtex 76%, cultivo de médula ósea 45%, microscopía de médula ósea 70%, LnPCR en sangre 75% y LnPCR en médula ósea 100%. Los resultados obtenidos con KAtex y LnPCR en sangre son lo suficientemente buenos, en comparación con los gold standard, como para considerar la aplicación de estos procedimientos no invasivos en el diagnóstico de la LV en pacientes pediátricos. Sin embargo, la mayor sensibilidad se obtiene con la LnPCR en médula ósea, un procedimiento invasivo. Una buena opción, considerando la elevada sensibilidad del IFI en estos pacientes, sería combinar IFI, KAtex y LnPCR en sangre para el diagnóstico en un primer paso, y si resultan negativos pero manteniendo sospecha clínica en un segundo paso habría que realizar LnPCR en médula ósea.

Trabajo financiado por: Convenio GILEAD-WHO Collaborating Centre for Leishmaniasis (ISCIII).

134.- Epidemiología de la leishmaniasis canina en Ibiza (Islas Baleares): estudio comparativo de diferentes métodos de diagnóstico

C. Chicharro, J. Nieto, E. García, I. Cruz, C. Cañavate, M. Flores, J. Cuadrado, J. Alvar

Centro Colaborador de la OMS para la Leishmaniasis, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo km 2, 28220 Majadahonda, Madrid, España

La leishmaniasis canina es una importante enfermedad sistémica causada por el parásito protozoo *Leishmania infantum*. La enfermedad es endémica en los países del área mediterránea, donde la prevalencia oscila entre el 10-37%. Se ha demostrado que los perros infectados, aunque asintomáticos, son fuente de parásitos para los flebotomos, artrópodos vectores de la enfermedad, y por tanto juegan un papel fundamental en la transmisión de *Leishmania infantum*. Por esta razón, la leishmaniasis canina es un creciente problema de salud pública. Nuestro grupo ha estudiado la seroprevalencia y prevalencia de la infección por *Leishmania infantum* en un área donde la leishmaniasis canina es endémica. Novecientos treinta perros de la isla de Ibiza han sido estudiados y noventa y uno de ellos (9,8%) presentaron una serología positiva frente al antígeno recombinante rK39 empleado en un test de diagnóstico serológico rápido. Los perros con serología positiva fueron examinados clínicamente, y se obtuvo aspirado de médula ósea y/o ganglio poplíteo de cada uno de ellos, para ser inoculado en medio NNN con el fin de aislar el pará-

sito. Por otro lado, la presencia de ADN del parásito en estas muestras fue investigada por PCR. Sólo el 46% de los perros con serología positiva presentaban síntomas clínicos compatibles con la leishmaniasis. La presencia de ADN del parásito se detectó en 50 de los 91 perros con serología positiva, siendo 16 de ellos (32%) asintomáticos. El parásito pudo aislarse a partir de muestras biológicas procedentes de 20 perros sintomáticos y 14 asintomáticos. Las cepas fueron caracterizadas e identificadas como *L. infantum* MON-1 (33 cepas) y MON-253 (1 cepa). Estos resultados muestran que un importante número de perros asintomáticos que viven en zonas endémicas están infectados por *L. infantum*. Esta información es esencial para el diseño y la puesta en marcha de medidas de control apropiadas.

Este estudio ha sido financiado por el Programa de la Comisión Europea "Quality of Life and Management of Living Resources" (Contract No.QLK2-CT-2001-01810), Brussels, EU.

135.- Uso de técnicas laparoscópicas en el diagnóstico y valoración pronóstica de la leishmaniasis canina

J. Carcelén¹, I. Molano¹, V. Iniesta¹, I. Corraliza², E.M. Pérez³, J. Jiménez³, J.M. Usón³, M. Mangas¹, I. Monroy¹, L.C. Gómez-Nieto¹

¹Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. ³Unidad de Cirugía, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Av. de la Universidad s/n, 10071 Cáceres, España

Los estados de susceptibilidad y resistencia frente a la infección por parásitos del género *Leishmania* son actualmente un tema de enorme interés. El desarrollo y aplicación de herramientas clínicas o inmunológicas que actúen como marcadores de la infección y la enfermedad latente o futura por *L. infantum* son prioritarios. En el presente trabajo se describen los métodos y resultados obtenidos con el uso de las técnicas de laparoscopia flexible aplicadas al diagnóstico de la leishmaniasis canina (LC). Sobre tres perros infectados de forma experimental (IE) y 1 con infección natural (IN) por *Leishmania infantum*, se practicaron los clásicos análisis biopatológicos, parasitológicos e inmunológicos, realizándose biopsias laparoscópicas de los órganos hígado y riñón según metodología descrita por Usón Gargallo (1989) para su posterior estudio histopatológico. Los datos presentados corresponden a los 236 (2 perros) y 422 días de infección (1 perro) y 1 perro asintomático diagnosticado por técnicas inmunológicas. Los resultados ponen de manifiesto la utilidad de estas técnicas desde el punto de vista diagnóstico y pronóstico en determinados casos, ya que formas asintomáticas, bien por estados de resistencia o de fases preclínicas de la enfermedad, pueden ser discriminadas a través de los estudios histopatológicos realizados. De esta forma, 2 perros seropositivos y asintomáticos (1 IN y 1 IE)

mostraron marcadas diferencias en la histología hepática y renal, presentando hepatomegalia, hepatitis granulomatosa, degeneración de hepatocitos y glomerulonefritis, frente a órganos con imágenes macroscópicas e histológicas aparentemente normales. La utilización de técnicas inmunohistoquímicas para la detección de amastigotes en hígado son también expuestas. Los datos inmunológicos obtenidos sobre la respuesta de anticuerpos por las técnicas de IFI y ELISA con el uso de antígenos totales de *Leishmania infantum* y el test de intradermorreacción muestran su escasa utilidad desde el punto de vista pronóstico. La aplicación de las técnicas de laparoscopia flexible, puede permitir en ciertos casos una mejor evaluación pronóstica de la LC, por lo cual podrían ser utilizadas en control de la eficacia terapéutica de perros medicados con antimoniales u otros fármacos. Igualmente, la utilización de estas herramientas podría ser valiosa en los ensayos de vacunación que actualmente (Molano et al., 2003) están siendo realizados contra la leishmaniasis canina.

Trabajo financiado por el Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica del Ministerio de Ciencia Y Tecnología (Ref: BIO2002-04049-C02-02).

136.- Real-Time PCR para el diagnóstico y determinación de la carga parasitaria en la leishmaniasis humana y canina

I. Cruz, E. Carrillo, J. Cuadrado, J. Moreno, C. Cañavate, J. Alvar

WHO Collaborating Centre for Leishmaniasis, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo km 2, 28220 Majadahonda, Madrid, España

La determinación de la carga parasitaria es una herramienta útil en la leishmaniasis humana y canina en el estudio de la inmunobiología de *Leishmania*, prueba de la eficacia de nuevas drogas y vacunas y en el seguimiento clínico de pacientes con esta enfermedad. En la mayoría de estos estudios la detección y cuantificación de los niveles de *Leishmania* se hace mediante técnicas basadas en el cultivo, que presentan limitaciones como la cantidad de tiempo requerido y la presencia de parásitos viables pero no-cultivables, en particular parásitos persistentes. En este estudio presentamos la estandarización de una Real-Time PCR usando el Termociclador Light Cycler (Roche Diagnostics) para la detección de los niveles de ADN de *Leishmania* en muestras biológicas de humanos y perros con leishmaniasis. Se desarrolló una curva standard con ADN de *Leishmania* más ADN de hospedador para establecer una regresión lineal y cuantificar la carga parasitaria en las diferentes biopsias analizadas. Tres grupos de enfermos fueron estudiados en este trabajo, pacientes coinfectados VIH/*Leishmania* (N=4), pacientes pediátricos con leishmaniasis visceral (N=4) y perros infectados experimentalmente (N=4). El ADN fue extraído de diferentes biopsias (sangre y médula

ósea de humanos y piel, ganglio linfático, sangre y médula ósea de perros) mediante el kit EZ-DNA (Biological Industries). La Real-Time hot-start PCR fue desarrollada con LC FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics). Otras técnicas diagnósticas como IFI, cultivo, microscopía y PCR convencional (LnPCR) también fueron aplicadas. Las curvas standard permitieron cuantificar la cantidad de DNA de *Leishmania* presente en los diferentes tejidos. La Real-Time PCR resultó capaz de detectar niveles de ADN de *Leishmania* entre 10⁴ y 1 parásito en 2 μ l de muestra. La posibilidad de determinar la carga parasitaria en diferentes tejidos de humano y perro con un método rápido y preciso como la Real-Time PCR será de gran interés en la leishmaniasis humana y canina, con aplicación en ensayos de drogas y vacunas, monitorización del tratamiento y epidemiología.

Trabajo financiado por Convenio GILEAD-WHO Collaborating Centre for Leishmaniasis (ISCIH), Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL 2000-0284), Proyecto Intramural ISCIH "Interacción entre patógenos en la coinfección VIH/*Leishmania infantum*", MPY-1015.

137.- Diagnóstico diferencial de teniasis humanas en el Servicio de Parasitología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III

L.M. González¹, I. Fuentes¹, N. Villalobos¹, S. Puente², T. Gárate¹

¹Departamento de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, España. ²Sección de Medicina Tropical, Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Carlos III, Madrid, España

Los dos grandes ténidos del hombre con mayor importancia médica son *Taenia solium* y *Taenia saginata*. Ambas especies causan la teniasis intestinal, a su vez los huevos de *T. solium* producen la cisticercosis humana cuya complicación más grave es la neurocisticercosis, en ocasiones mortal. Cabe destacar que en los últimos años, se ha producido un aumento del número de casos de cisticercosis en zonas endémicas y no endémicas debido a las variaciones producidas en factores demográficos, técnicos y políticos. Con respecto a la teniasis no existen estimaciones sobre su verdadera incidencia en dichas zonas, siendo evidente la importancia que supondría el desarrollo de un diagnóstico diferencial específico y sensible para detectar los portadores de *T. solium* e interrumpir la transmisión de las cisticercosis, incluida la humana. En este sentido, el presente trabajo se ha centrado en demostrar la gran utilidad de la multiplex-HDP2-PCR, optimizada por nuestro grupo de trabajo, para el diagnóstico diferencial de teniasis de forma rutinaria. Para ello, se ha realizado un estudio de identificación especie-

específico mediante múltiple-PCR de proglótides emitidas por pacientes con teniasis y remitidas al Servicio de Parasitología del CNM-ISCIIII durante los años 1998-2004. Se estudiaron las proglótides grávidas expulsadas por 55 pacientes (viajeros, inmigrantes y casos autóctonos) mediante métodos coprológicos y multiplex-HDP2-PCR. Las muestras procesadas dieron el siguiente resultado: 53 pacientes infectados con *T. saginata* y 2 pacientes infectados con *T. solium*. Destacar el fracaso del estudio morfológico en 15 proglótides deterioradas o fijadas en formol, siendo posible su diagnóstico mediante multiplex-HDP2-PCR. Proponemos el empleo de la multiplex-HDP2-PCR como método de rutina para el diagnóstico de la teniasis, siendo capaz de diferenciar de manera segura las infecciones producidas por *T. saginata* o *T. solium*.

Financiación por FIS-97/0141, FIS-00/407 y FIS-03/1114. Nelly Villalobos financiada por FMV-UNAM, CONACyT (Proyecto 400310-5-35418-B), México.

138.- Aplicación de técnicas moleculares para el diagnóstico de un caso de Anisakidosis humana aguda

M.J. Perteguer¹, G. Ortiz¹, E. García¹, M. Flores¹, E. Rodríguez¹, F.M. Ubeira², T. Gárate¹

¹Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, 28220 Madrid, España. ²Laboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, España

La anisakidosis es una enfermedad causada por la ingestión de pescado crudo o poco cocinado parasitado por nematodos de la familia *Anisakidae*. En función de su localización, la anisakidosis se divide en gástrica, intestinal y ectópica con dos formas clínicas principales: aguda y crónica. En la mayoría de los casos, la especie aislada con más frecuencia es *Anisakis simplex* aunque también pueden estar implicadas otras especies de anisákidos. En los casos agudos, el diagnóstico definitivo se basa en el aislamiento y posterior estudio morfológico del nematodo. En este trabajo se presenta la identificación por técnicas moleculares del parásito causante de un caso agudo de anisakidosis humana. Con este propósito se desarrolló una técnica PCR-RFLP que permite la identificación de 11 tipos de anisákidos, independientemente de su estado evolutivo. Dicha técnica (una modificación de la descrita por Zhu *et al.*, 1988), está basada en la amplificación del ADN correspondiente a la fracción ITS-1, 5,8 S, ITS-2 y aproximadamente 70 pb del gen 28S del ARN ribosomal y en la posterior digestión enzimática de los productos amplificados con la endonucleasa *Taq I*. El método se estandarizó previamente a partir de larvas de anisákidos obtenidas de pescado destinado a consumo humano, obteniéndose diferentes anisákidos (*A. simplex* e *Hysterothylacium aduncum*) los cuales rindie-

ron distintos fragmentos de amplificación y patrones de restricción, que concuerdan con los previamente descritos para los mismos parásitos de otras regiones geográficas. Hecho que permite el uso de esta prueba independientemente del origen geográfico del material larvario. Con respecto al caso humano, tras la extracción por endoscopia del nematodo, se llevó a cabo la identificación del mismo mediante la aplicación de la técnica PCR-RFLP obteniéndose un producto de amplificación de 960 pb correspondiente a *Anisakis simplex* o *Anisakis pegreffi*. La posterior digestión del mismo con la enzima de restricción *Taq I* permitió la caracterización del agente etiológico a nivel de especie siendo en este caso la fuente de la infección *Anisakis simplex*. La alta sensibilidad de la prueba y la ausencia de variaciones intraespecíficas confirma la utilidad de esta técnica en la identificación de parásitos implicados en la anisakidosis humana. Actualmente estamos realizando trabajos para establecer si el método propuesto puede ser aplicado en aquellos casos crónicos donde el material genético ha sido destruido por el sistema inmune del paciente.

Este estudio ha sido financiado por un proyecto SAF-2002-04057-C02-01.

139.- Especificidad del ICT Filariasis (Binax®) en el diagnóstico de la infección por *Wuchereria bancrofti*

C. Carranza¹, J. Pardo², M. Hernández Cabrera^{1,3}, T. Martín², A.M. Martín⁴, A. Muro², J.L. Pérez-Arellano^{1,3}

¹Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. ²Lab. de Inmunología Parasitaria y Molecular. CISET. Universidad de Salamanca. ³Unidad de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical. Hospital Insular. Las Palmas. ⁴Servicio de Microbiología. Hospital Insular. Las Palmas

La infección por *Wuchereria bancrofti* en inmigrantes procedentes de África subsahariana presenta dificultades diagnósticas debido a la necesidad de realizar tomas de muestras nocturnas para la detección de microfilaremia. El test ICT Filariasis (*ICT Fil*) permite la detección de antígeno circulante de *Wuchereria bancrofti* en sangre o en suero. Este estudio pretendía dos objetivos: i) evaluar la utilidad del *ICT Fil* en el diagnóstico etiológico de filariosis probable [serología positiva frente a antígeno somático de *Dirofilaria immitis* (DiSo) sin microfilaremia sanguínea o cutánea] y ii) evaluar la especificidad de la prueba, en presencia de otras parasitosis. Para conseguir el primer objetivo se estudiaron 52 inmigrantes subsaharianos sanos mayores de 14 años sin microfilaremia y con serología frente a DiSo positiva, empleando como control el suero de un paciente en el que se detectaron mediante test de Knott microfilarias de *Wuchereria bancrofti*. En este grupo se observó que el *ICT Fil* era positivo en dos casos. Los 3 pacientes con diagnóstico directo de infección por *W. bancrofti* procedían de Guinea Bissau, Sierra Leona y Tanzania. La edad media de los pacientes fue 25 años. Ninguno de los tres pacientes presentaba síndrome linfático, aunque los tres pacientes presentaban eosinofilia (>450

µL). Para conseguir el segundo objetivo, estudiamos 32 inmigrantes subsaharianos sanos mayores de 14 años, en los que se detectó mediante técnicas directas una o varias helmintosis diferentes de la infección por *Wuchereria bancrofti*. Los helmintos individuales presentes en este grupo fueron 43: *Loa loa* (2), *Mansonella perstans* (6), *Onchocerca volvulus* (1), Uncinarias (11), *Trichuris trichura* (7), *Ascaris lumbricoides* (2), *Strongyloides stercoralis* (2), *Enterobius vermicularis* (1), *Trichostrongylus* sp. (1), *Schistosoma mansoni* (2), *Schistosoma haematobium* (5), *Schistosoma intercalatum* (2), y *Echinococcus granulosus* (1). En ninguno de estos casos el *ICT Fil* fue positivo. En resumen, podemos indicar i) que la *ICT Fil* permite detectar algunos casos de infección por *W. bancrofti* en pacientes filariosis probable ii) que la especificidad del test resultó del 100% al ser negativo en todos los pacientes con otras filariosis tropicales y en los pacientes con otras infecciones helmínticas testadas. Finalmente, indicar que, en nuestra experiencia, el empleo de suero frente a sangre total facilita la interpretación de los resultados.

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto FIS 01/0685.

140.- Aplicación de los sistemas de información geográfica en el estudio de la transmisión de la tripanosomiasis humana africana en Guinea Ecuatorial

J. Cano¹, N. Ndong-Mabale¹, P. Ndong²

¹Centro de Referencia para el Control de Endemias (Guinea Ecuatorial), Centro Nacional de Medicina Tropical, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España. ²Programa Nacional de Control de la Tripanosomiasis, Guinea Ecuatorial

La enfermedad del sueño (THA) es una amenaza continua para 60 millones de personas en 36 países de África subsahariana, de los que 22 figuran entre los países menos adelantados del mundo. Guinea Ecuatorial ha pasado a ser un país de baja endemias de THA debido, fundamentalmente, al esfuerzo desarrollado en los últimos años para controlar la enfermedad mediante la detección y tratamiento temprano de casos. Por otra parte, el desarrollo de las comunicaciones y la liberalización de los sistemas de posicionamiento global, han facilitado la expansión y simplificación de los sistemas de información geográfica (SIG) y su aplicación en estudios epidemiológicos. Con este estudio pretendemos establecer el patrón de transmisión de la THA e identificar las zonas de mayor riesgo de infestación, en dos focos endémicos de Guinea Ecuatorial: Kogo y Mbini. Se ha empleado un SIG (MapInfo 6.0 Professional) para representar los datos obtenidos en las encuestas de detección activa de casos y en las encuestas entomológicas. Tanto en Kogo como en Mbini, la presencia de la glosina vectora está asociada al manglar, aumentando la densidad de población en el límite

entre el bosque húmedo (secundario) y el mangle. A medida que nos internamos en el bosque de mangle, disminuye la presencia de mosca tsetse. En el foco de Kogo, los puntos de mayor riesgo de transmisión de la THA lo constituyen los embarcaderos de las localidades situadas en el epicentro del foco (donde mayor número de casos se han detectado en los últimos años) y los secaderos de pescado distribuidos en el estuario de Río Muni, especialmente los localizados a orillas del río Mitong. En el foco de Mbini, los puntos de mayor riesgo de transmisión de la THA lo constituyen los embarcaderos de los poblados situados en el epicentro del foco y del barrio de Ndong Nze (en la ciudad de Mbini). Al contrario de lo que ocurre en Kogo, en los poblados del epicentro del foco de Mbini la transmisión también puede tener lugar dentro del propio poblado (riachuelos, pozos, manantiales, etc.).

Este trabajo ha sido subvencionado por la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), y el Instituto de Salud Carlos III (Centro Nacional de Medicina Tropical).

141.- Malaria Panel Assay vs PCR: detección de *Anopheles melas* naturalmente infectados en una localidad costera en Guinea Ecuatorial

M. Moreno¹, J. Cano², S. Nzambo², L. Bobuakasi², J.N. Buatiche², M. Ondo², F. Micha², Z.G. Chen¹, A. Benito³

¹Laboratorio de Malaria, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España. ²Centro de Referencia para el Control de Endemias (Guinea Ecuatorial), Centro Nacional de Medicina Tropical, Instituto de Salud Carlos III, Guinea Ecuatorial. ³Servicio de Medicina Tropical, Centro Nacional de Medicina Tropical, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

Se llevó a cabo un estudio en la región continental de Guinea Ecuatorial para determinar a) aquellos miembros del complejo gambiae implicados en la transmisión y b) la tasa de infectividad de *Anopheles melas* comparando dos métodos, una técnica de PCR capaz de detectar ADN de esporozoítos y un ensayo inmunocromatográfico (Malaria Rapid Panel Assay o Vectest). Los mosquitos se muestrearon por capturas intradomiciliarias en dos casas de una localidad costera en Guinea Ecuatorial (Ayantang). Se analizaron las cabezas y tórax por PCR para determinar la especie dentro del complejo gambiae. Se emplearon cabezas+tórax para realizar el Malaria Rapid Panel Assay (MRP assay) y se realizó la extracción de ADN. La relación entre dipstick y PCR para la detección de esporozoítos de *P. falciparum* se midió con la sensibilidad, especificidad y un test de asociación (valor kappa). Se estudiaron 264 hembras de *Anopheles gambiae* s.l. (214 individualmente y cinco pooles con 10 mosquitos cada uno). Los análisis por PCR mostraron que 207 mosquitos eran *An. melas*, 3 *An. gambiae* s.s. y 4 no pudieron identificarse. En la comparación de

la PCR con MRP, se obtuvieron resultados concordantes en 6 mosquitos, y en un caso MRP es positivo mientras PCR no. MRP presenta una baja sensibilidad (3,3%) si lo comparamos con la detección de ADN de *P. falciparum* (17,7% y 14,3%, series A y B respectivamente). La medida de concordancia entre las dos técnicas utilizadas se realizó ($\kappa = 0,224$). Se determinó que *Anopheles melas* es el principal vector implicado en la transmisión de malaria en Ayantang, una localidad costera en la región continental de Guinea Ecuatorial. Además, en la comparación de PCR y VecTest, se puede concluir que la PCR es una herramienta mucho más sensible y útil que el dipstick a la hora de determinar la tasa de infección en mosquitos en una zona de transmisión estable y alta como Guinea Ecuatorial.

Este trabajo ha sido financiado por la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), MPY-1118/03 del Instituto de Salud Carlos III, SAF2003-08720 de MCYT y por la Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales-FIS.

142.- Eficacia de las trampas piramidales (Lancien & Gouteux, 1986) en el control de la transmisión de la tripanosomiasis humana africana en Guinea Ecuatorial

J. Cano¹, N. Ndong-Mabale¹, P. Ndong²

¹Centro de Referencia para el Control de Endemias (Guinea Ecuatorial), Centro Nacional de Medicina Tropical, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España. ²Programa Nacional de Control de la Tripanosomiasis, Guinea Ecuatorial

El control de la mosca tsetse es la principal medida para frenar la propagación de los tripanosomas patógenos al hombre y al ganado, ya que la mosca es vector y reservorio. Para *Tripanosoma b. gambiense*, especie responsable de la THA en esta región, la eliminación temporal de moscas tsetse infectadas e infectivas nos lleva a la "esterilización" del reservorio humano, logrando interrumpir el ciclo de transmisión. Las primeras experiencias de lucha antivectorial con trampas en Guinea Ecuatorial, se llevaron a cabo en 1985 en el foco de Luba (isla de Bioko). Este modelo de trampa es de confección sencilla, poco costosa y fácil de transportar. Estas cualidades la hacen ideal para las campañas de control a gran escala. La incorporación de un sistema de recolección de las glossinas (bolsa o botella recolectora con líquido conservante) permite emplearlas para establecer parámetros vectoriales tales como, especies presentes y densidad relativa. El objetivo de este estudio es evaluar la eficacia de las trampas piramidales en el control de la THA en dos focos endémicos de Guinea Ecuatorial: Kogo y Mbini. En Kogo se distribuyeron 78 trampas piramidales en embarcaderos y secaderos de la cuenca del río Mitong, zona próxima al epicentro del foco, y en Mbini 93 trampas piramidales en los poblados y barrios del

epicentro, y secaderos del río Wele. La periodicidad en la revisión de las trampas piramidales fue: semanal durante el primer mes que estuvieron colgadas, quincenal el segundo mes, y mensual a partir del tercer mes. En Kogo, entre el mes de abril y diciembre de 2002, se recolectaron un total de 28.573 moscas tsetse. La densidad aparente global dentro del foco disminuyó de 2,87 glossinas/(trampa*día) en el primer mes de captura a 0,57 en el último mes. En Mbini, se recolectaron un total de 21.312 glossinas desde el mes de julio de 2002 hasta enero de 2003. La densidad aparente global dentro del foco disminuyó de 4,19 glossinas/(trampa*día) en el primer mes de captura a 0,44 en el último mes. Este estudio demuestra que las trampas piramidales son un instrumento eficaz para la reducción del contacto hombre vector en los focos endémicos de Kogo y Mbini. Cabe esperar que se puedan obtener buenos resultados en hábitat similares (manglar).

Este trabajo ha sido subvencionado por la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), y el Instituto de Salud Carlos III (Centro Nacional de Medicina Tropical).

143.- Empleo de pantallas impregnadas con deltametrina en el control de la transmisión de la tripanosomiasis humana africana en Guinea Ecuatorial

J. Cano¹, N. Ndong-Mabale¹, P. Ndong²

¹Centro de Referencia para el Control de Endemias (Guinea Ecuatorial), Centro Nacional de Medicina Tropical, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España. ²Programa Nacional de Control de la Tripanosomiasis, Guinea Ecuatorial

Las pantallas son un sistema simple de control de la tripanosomiasis, basado en la atracción que ciertos colores ejercen sobre el vector (color azul y negro). Estos atrayentes incitan a las glosinas a posarse sobre el tejido que previamente ha sido impregnado con un insecticida (en la actualidad se emplean piretroides sintéticos foto estables). Este estudio se llevó a cabo con el fin de probar la eficacia de las pantallas en el control de las poblaciones de glosinas vectoras en dos focos endémicos de THA en Guinea Ecuatorial: Kogo y Mbini. Durante los meses de enero y febrero de 2003 se distribuyeron un total de 82 pantallas impregnadas con deltametrina en Kogo y 84 en Mbini, en todos los puntos donde se consideró que existía riesgo de transmisión de la tripanosomiasis (en base a estudios previos con trampas piramidales). Se llevaron a cabo visitas trimestrales para: i) reponer en aquellos lugares donde habían desaparecido, ii) sustituir las restantes por nuevas pantallas recién impregnadas y, iii) recuperar aquellas pantallas que todavía estuviesen en buen estado, para ser reimpregnadas. Para valorar la eficacia protectora de las pantallas se llevaron a cabo dos encuestas transversales con trampas piramidales en Kogo (agosto 2003 y febrero 2004) y una en Mbini (febrero de 2004). En Kogo, la densidad aparente (DAP) en el foco durante las

evaluaciones fue de 3,96 glosinas/(trampa*día) y 2,03 glosinas/(trampa*día), en agosto de 2003 y febrero de 2004, respectivamente. En Mbini, la DAP en febrero de 2004 fue de 1,25 glosinas/(trampa*día). Teniendo en cuenta que, empleando trampas piramidales en el foco de Kogo, la DAP fue de 1,07 en agosto de 2002, y finalizado el estudio en enero de 2003 era de 0,57, la DAP obtenida tras la campaña con pantallas demuestran una recuperación de las poblaciones de glosinas vectoras. Una recuperación similar se detectó en el foco de Mbini (de un DAP igual a 0,44 con trampas piramidales se pasó a 1,25 con pantallas). Este estudio demuestra que las pantallas impregnadas con deltametrina son menos eficaces que las trampas piramidales en el control de las poblaciones de glosinas. Probablemente, ciertos factores ambientales (pluviometría, humedad relativa, etc.), junto a las particularidades del comportamiento de reposo de estos vectores, hacen que, en ecosistemas tropicales, las pantallas sean un herramienta menos eficaz para el control de la THA.

Este trabajo ha sido subvencionado por la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), y el Instituto de Salud Carlos III (Centro Nacional de Medicina Tropical).

144.- Rotavirus detection in drinking water in a Mexico-USA border city

M.A. Rodríguez-Pérez¹, M. Almora-Hinojosa¹, C. Lizarazo-Ortega¹

¹Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional (IPN), Blvd. Del Maestro esquina Elías Piña, Reynosa 88710, México

The detection of rotavirus in drinking water samples has been reported elsewhere. In the present study, two techniques were evaluated: the technique for water standards to public water systems (filter Metricel® GN-6 of 45 mm ϕ and 0.45 μ m porosity), and another technique adapted for the recovery of rotavirus (filter Centricom plus 80®). After rotavirus recovery, it was concentrated using a centrifuge and vacuum apparatus. In brief, the rotavirus was diluted in water samples from a known concentration sample. The samples were passed through each filter and concentrated. Each assay was replicated five times. To determine the rotavirus genotype, the samples were tested by a multiplex semi-nested RT-PCR. After the detection methods had been established, the technique with Centricom was used to test water samples collected in the drinking water network of Reynosa city. Reynosa is located on the south bank of the Rio Grande (= Rio Bravo del Norte) of Mexico and USA. Reynosa is McAllen's sister city on the Mexican side of the border, and they are 5 miles apart. A water

sample was taken before and after chlorine treatment as disinfectant, and eight more samples per month were taken from the most distant areas of the potable water network. The sampling was conducted in November-December 2002, and January-February 2003, where the highest incidence of rotavirus cases had been reported. Residual chlorine values were 0.2 mg/l and less than 25 psi. Centricom plus 80® was a more reliable technique for recovering rotavirus from drinking water samples than Metricel® GN-6. One out of 40 samples tested by RT-PCR was positive for rotavirus in the water network. The genotype of the rotavirus found in the positive sample was the G1-P1. G1-P1 has been the most frequent rotavirus genotype recorded from clinical samples in Mexico.

Work supported by funding from the Centro de Biotecnología Genómica/IPN. Congress attendance funded by COFAA/IPN and COTACYT/Tamaulipas.