

Sesión de discusión de pósters B2: Biología molecular, inmunología, resistencias, terapéutica, cultivos de laboratorio y reservorios animales

Aula 15F, Facultad de Farmacia
Lunes 19 de Julio: 15.00-17.30

145.- Caracterización de antígenos de *Plasmodium falciparum* a partir del inmunocribado de una genoteca de expresión

E. Moyano¹, L.M. González², P. Berzosa¹, Z.G. Chen¹, A. Benito³

¹Laboratorio de Referencia de Malaria, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Crta. de Pozuelo a Majadahonda km 2, 28220 Madrid, España. ²Laboratorio de Helmintos, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Crta. de Pozuelo a Majadahonda km 2, 28220 Madrid, España. ³Servicio de Medicina Tropical, Centro Nacional de Medicina Tropical, Instituto de Salud Carlos III, Sinesio Delgado 4-12 Pabellón 13, 28029 Madrid, España.

En este trabajo llevamos a cabo el cribado de una genoteca de expresión de *Plasmodium falciparum* para la caracterización y evaluación de antígenos y proteínas para terapia, diagnóstico y protección. Los estadios eritrocíticos de malaria de la cepa Dd2 de *P. falciparum* fueron empleados en la construcción de la genoteca de expresión. Se han caracterizado y secuenciado dos clones. Purificamos proteínas y diseñamos péptidos para conocer su valor diagnóstico mediante ELISA. Testamos 160 muestras de sueros de pacientes con malaria y otras enfermedades parasitarias y 34 sueros de individuos sanos. Realizamos la inmunolocalización por IFI y/o microscopía electrónica. Los antígenos secuenciados fueron denominados #3.5 y #3.12. La sensi-

bilidad mediante ELISA fue del 78,18% para la proteína recombinante (clon #3.12) y del 59% para el péptido (clon #3.5). La especificidad fue del 94 y 100%, respectivamente. Concluimos que las dos proteínas caracterizadas, 3.5 y 3.12 no han sido secuenciadas antes en la cepa resistente Dd2. Nosotros hemos conocido su valor diagnóstico mediante ELISA y han sido inmunolocalizadas por IFI y microscopía electrónica.

Trabajo financiado por Proyecto SAF 2003-08720 (MCYT), el Proyecto MPY 1118/03 Programa Intramural ISCIII y por la Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales (RICET-FIS).

146.- Disproteïnemia y respuesta de anticuerpos frente a proteínas recombinantes como marcadores de valor pronóstico en leishmaniosis canina por *Leishmania infantum*

I. Molano¹, J. Carcelén¹, C. Cámara³, J. Viñuelas⁴, V. Iniesta¹, I. Corraliza², M. Mangas¹, I. Monroy¹, L.C. Gómez-Nieto¹

¹Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Av. de la Universidad s/n, 10071 Cáceres, España. ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Av. de la Universidad s/n, 10071 Cáceres, España. ³Unidad de Inmunología, Hospital San Pedro de Alcántara, Av. Millán Astral s/n, Cáceres, España. ⁴Unidad de Microbiología, Hospital San Pedro de Alcántara, Av. Millán Astral s/n, Cáceres, España

La existencia en la población canina de sujetos con cierto grado de resistencia a la diseminación parasitaria y desarrollo de la enfermedad hace plantear el establecimiento de nuevos criterios y herramientas laboratoriales que, sumadas a las de tipo clínico, permitan discriminar entre individuos susceptibles y resistentes desde las primeras fases de la infección. El trabajo describe la correlación existente entre disproteinemia en leishmaniosis canina (LC) y respuesta inmune mediada por anticuerpos frente a ciertos antígenos recombinantes como la proteína multicomponente quimera PQ de *L. infantum* (Soto *et al.*, 1998). Se analizaron 16 de perros infectados de forma natural y 7 perros experimentalmente con la cepa M/CAN/ES/90/BCN 150, zimodema 1 de *L. infantum*. En los sueros se determinaron los valores de proteinemia y fracciones proteicas por electroforesis, junto a los niveles de reactividad de anticuerpos específicos IgG2a anti-*Leishmania* por IFAT y ELISA frente a antígenos totales (SLA) y PQ. La extremada sensibilidad que supone el uso de proteínas totales en el inmunodiagnóstico de la LC, determina la detección de la práctica totalidad de los perros infectados por el parásito independientemente del estado clínico o cronológico de la infección y de su estado de salud. Perros sintomáticos y asintomáticos, con disproteinemia o perfil proteico normal, se comportan igualmente positivos en las condiciones estándar de uso de la técnica ELISA-SLA. Otros antígenos y técnicas

(ELISA-PQ e IFI), no muestran la misma sensibilidad, existiendo casos en los que los niveles de anticuerpos se detectan bajos o incluso negativos. La PQ, tanto en infecciones naturales como experimentales, resultó poco o nada reactiva frente a sueros con proteinemia y trazados electroforéticos normales. Por el contrario, la seropositividad frente a los antígenos internos integrantes de la PQ es una constante en sueros disproteinémicos propios de las formas susceptibles de la LC, independientemente de la presencia de los síntomas propios de la enfermedad o de fases latentes sin sintomatología aparente. Los resultados del grupo de infectados experimentalmente durante más de un año permitió la observación de los cambios serológicos y de la proteinemia. Los métodos ELISA-SLA e IFI mostraron positividad en todos los casos, frente a la negatividad de 2 perros por ELISA PQ. Estos animales asintomáticos fueron los de menor título de anticuerpos por IFI y de trazado electroforético estable. El desarrollo y utilización futura de antígenos recombinantes de *Leishmania* en inmunodiagnóstico, podrán aportar una información diagnóstica y pronóstica.

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

147.- Implicaciones de la inducción de la enzima arginasa I en el desarrollo de la resistencia y susceptibilidad frente a la infección por *Leishmania major*

V. Iniesta¹, J. Carcelén¹, I. Molano¹, M. Mangas¹, E. Redondo³, L.C. Gómez-Nieto¹, I. Monroy¹, I. Corraliza²

¹Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, ³Unidad de Histología y Anatomía Patológica, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura (UEX), Av. de la Universidad s/n, 10071 Cáceres, España

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el papel que desempeña la enzima arginasa I en leishmaniosis cutánea, analizando la cinética de la misma en ratones infectados experimentalmente con la especie *Leishmania major*. Para ello se utilizaron los dos genotipos murinos clásicos de susceptibilidad (BALB/c) y resistencia (C57BL/6) a la enfermedad, infectando los animales con una dosis de 10^6 promastigotes en la almohadilla plantar. Durante el periodo de ensayo (60 días), se sacrificaron periódicamente algunos de los individuos de cada cepa con un intervalo de 7 días, a fin de obtener muestras de sangre y del tejido plantar infectado para su posterior análisis. Mediante un kit de ELISA se determinaron las concentraciones de IL-4 y IL-12 en suero sanguíneo a lo largo de la infección, y la presencia de arginasa I en el tejido mediante técnicas inmunohistoquímicas y utilizando una modificación del método de Shimke (Corraliza *et al.*, 1994). Los resultados mostraron que la expresión y actividad de la proteína sufrió un incremento proporcional al desarrollo de la enfermedad en animales susceptibles BALB/c. Por el contrario, los ratones C57BL/6

sólo presentaron un aumento en la expresión de la enzima en estadios tempranos de la infección, correlacionándose con la evolución de la lesión plantar. Este patrón tan diferente podría explicarse con las medidas de IL-4 e IL-12 en suero, ya que el pico en los niveles de IL-12 en C57BL/6 fue paralelo a la disminución tanto de la concentración de IL-4 como de la actividad arginasa en el tejido. En ratones BALB/c, no obstante, el establecimiento de una respuesta predominante Th2 permitió mantener unos niveles elevados de la enzima hasta el final de la infección. Además, el tratamiento de los animales con dosis diarias de L-ornitina incrementó la inflamación plantar en ratones C57BL/6, sugiriendo que el papel de la arginasa en la infección por *L. major* es la generación de poliaminas necesarias para la proliferación del parásito.

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

148.- Caracterización genómica y análisis de la expresión del antígeno TSL-1 gp53 en las especies de *Trichinella* encapsuladas y no encapsuladas

E. Rodríguez¹, M.J. Perteguer¹, P. Bonay², E. Pozio³, F.M. Ubeira⁴, T. Gárate¹

¹Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, 28220 Madrid, España. ²Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Universidad Autónoma de Madrid, 28046 Madrid, España. ³Laboratory of Parasitology, Instituto Superiore di Sanità, Viale regina Elena 299, 00161 Roma, Italia. ⁴Laboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, España

Los antígenos TSL-1 del género *Trichinella* son un grupo de glicoproteínas de excreción-secreción (E/S) estado específicas. Algunos de los antígenos del grupo TSL-1 parecen ejercer un papel relevante tanto en la fase intestinal como muscular de esta parasitosis. Gp53 es un antígeno TSL-1 presente en todas las especies encapsuladas y no encapsuladas de *Trichinella*. Por ello, nos propusimos analizar la expresión de la proteína gp53 mediante ensayos de northern-blot a partir del ARN de larvas musculares infectivas (L1) de las especies de *Trichinella* encapsuladas (*T. spiralis* ISS115, *T. britovi* ISS11) y no encapsuladas (*T. pseudospiralis* ISS13, ISS470, ISS141, ISS176, ISS588, *T. papuae* ISS572). Para dicho ensayo se utilizaron dos sondas marcadas con α -[³²P]: el cDNA correspondiente a la proteína gp53 de *T. spiralis* ISS115 y el de *T. pseudopsiralis* ISS13 (aislamiento Garkavi). En todas las especies analizadas se obtuvo un transcrito de idéntico tamaño -1,3 Kb-, excepto en el aislamiento de Tasmania de *T. pseudopsiralis* (ISS141), el cual no mostró hibridación con ambas sondas utilizadas. Posteriormente, los ensayos de southern-blot realizados pusieron de manifiesto la existencia del gen de gp53 en el genoma de dicho aislamiento. Este hecho nos llevo a estudiar la orga-

nización genómica de gp53 en las principales especies implicadas. Con este propósito se llevo a cabo la amplificación por PCR de los ADN genómicos de la gp53 de *T. spiralis*, *T. britovi*, *T. pseudopsiralis* (Garkavi), *T. pseudopsiralis* (Tasmania), y *T. papuae*. Los productos de amplificación obtenidos fueron subclonados en el vector pGEM-T y, posteriormente, secuenciados. Las secuencias mostraron una organización conservada del gen de gp53 en las especies estudiadas tanto en el número de exones (9) e intrones (8) como en la posición que presentan los mismos. Las secuencias nucleotídicas de los exones mostraron el mayor grado de divergencia entre las especies encapsuladas y no encapsuladas: *T. spiralis* versus *T. pseudopsiralis* Garkavi (80%) o *T. britovi* versus *T. pseudopsiralis* Garkavi (78%). Por otro lado, las especies encapsuladas (*T. spiralis* y *T. britovi*) mostraron un 94% de similitud entre ellas, mientras que las no encapsuladas (*T. pseudopsiralis* Garkavi y *T. papuae*) revelaron un 88%. Finalmente, las variantes geográficas (aislamientos Garkavi y Tasmania de *T. pseudopsiralis*) mostraron un 99% de similitud entre ambas.

Este estudio ha sido financiado por un proyecto FISS (00/0787).

149.- Estructura genómica y expresión diferencial de la GTPase Rab4 de *Trichinella pseudospiralis* en especies encapsuladas y no encapsuladas de *Trichinella*

E. Rodríguez¹, P. Bonay², M.J. Perteguer¹, E. Pozio³, T. Gárate¹

¹Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda, 28220 Madrid, España. ²Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Universidad Autónoma de Madrid, 28046 Madrid, España. ³Laboratory de Parasitología, Instituto Superiore di Sanità, Viale regina Elena 299, 00161 Rome, Italia

En un trabajo anterior del grupo se llevo a cabo el estudio de caracterización de las proteínas GTPasas de bajo peso molecular del género *Trichinella*: siete Rabs y tres Ran/TC4 aisladas tanto en especies encapsuladas como no encapsuladas. En dicho trabajo se observaron diferencias en los patrones de restricción y niveles de expresión de las GTPasas aisladas. Posteriormente, decidimos profundizar en la investigación de la molécula Rab4 de *Trichinella pseudospiralis* debido a que su expresión presentó las mayores diferencias entre las especies encapsuladas y no encapsuladas. Para ello se realizó la amplificación del ADNc completo mediante RACE-PCR. Dicho ADNc codificó una proteína con actividad GTPasa que por ensayos de transfección en células NRK fue localizada en pequeñas vesículas en posición perinuclear, lo que sugiere que son componentes del sistema de endomembranas, localización subcelular característica de las GTPasas Rab4. El ensayo de southern-blot utilizando como sonda el ADNc de la molécula Rab4 de *T. pseudospiralis* rindió unos patrones de restric-

ción diferentes entre las especies de *Trichinella* encapsuladas y no encapsuladas. Estos resultados coinciden con la alta divergencia genética descrita por La Rosa entre ambos grupos. Por otro lado, también se observó un patrón de restricción muy diferente entre *T. papuae* y los aislamientos de *T. pseudospiralis*. El gen de la molécula Rab4 de *T. pseudospiralis* -que es de copia única- también se encuentra en las especies de *Trichinella* encapsuladas pero presenta una mayor expresión en las no encapsuladas (variantes de *T. pseudospiralis* y *T. papuae*). Quizás esta diferente expresión podría reflejar en parte la distinta composición de los productos de excreción/secreción de la larva infectiva en los dos grupos de *Trichinella* o también puede que esté relacionada con los procesos moleculares que finalmente determinan la ausencia de cápsula en las especies no encapsuladas.

Este estudio ha sido financiado por un proyecto FISS (00/0787).

150.- Aislamiento y caracterización de cDNAs a partir de una genoteca de expresión de éscolex y cuello de adulto de *Taenia solium*

N. Villalobos¹, E. Ferrer^{1,2}, L.M. González¹, M.M. Cortéz², C.M. Aguilar³, R.M.E. Parkhouse⁴, T. Gárate¹

¹Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Microbiología, Majadahonda, Madrid, España. ²Centro de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela. ³Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), UC, San Carlos, Venezuela. ⁴Instituto Gulbenkian de Ciência, 2780-156 Oeiras, Portugal

Taenia solium es un parásito de importancia médica y veterinaria, ya que es el responsable de la teniasis humana y la cisticercosis porcina y humana. Pocos estudios se han realizado sobre las relaciones parásito-hospedador en el estado adulto de *T. solium* y la identificación de moléculas que pudiesen utilizarse como dianas en el diagnóstico o protección, por lo que los objetivos del presente trabajo fueron el aislamiento y caracterización de los genes que se expresan en el éscolex y cuello del adulto. Se construyó en el vector λZAP-XR[®] una genoteca de expresión con el mRNA del éscolex y cuello de un adulto de *T. solium* y, a continuación, se clonaron múltiples fagos recombinantes mediante PCR con los cebadores T3 y T7 del vector. Los cDNAs amplificados se secuenciaron, se analizaron sus secuencias y se compararon con las depositadas en los bancos de datos (GenBank, EMBL, DDBJ). En un estudio preliminar se obtuvieron 175 cDNAs, de los cuales 30 mostraron similitud significativa con las secuencias depositadas en los bancos de datos, 52 tuvieron alta similitud con secuencias bacterianas y 93 no presentaron similitud alguna con moléculas ya

descritas. Entre los cDNA con similitudes significativas se encuentran enzimas tales como, nucleosido difosfato kinasa, diacil glicerol kinasa, glutation reductasa, fucosil transferasa, aminotransferasas, glutamato racemasa y tirosin kinasas. Además se clonaron transportadores de membrana como, proteína transportadora de fosfato, transportador de nitrato NRT1, transportadores de ATP y transportador de ribosa, así como otras proteínas, actina, proteína de unión a RNA, proteína 12S ribosomal y varias hipotéticas. Por otro lado, se aisló un cDNA que codifica el RNA 28S ribosomal. Es la primera vez que se describen los genes que se expresan en éscolex y cuello del parásito. Los resultados obtenidos concuerdan con la alta actividad metabólica que se desarrolla en esta región del parásito que da origen al resto del adulto.

Financiamiento por EU/INCO-DC (project CT95-0002), FIS (00/407, 1114) y ISCIII-Programa Intramural. Nelly Villalobos financiada por FMV-UNAM, CONACyT (Project 400310-5-35418-B), México.

151.- Expresión en el sistema Baculovirus de un antígeno protector de 18 kDa secretado por oncosferas de *Taenia saginata*, evaluación de su antigenicidad y comparación con su expresión en el sistema procariota

E. Ferrer^{1,3}, J.A. Martínez-Escribano², M.E. González-Barderas², P. Resino², M.M. Cortéz³, I. Dávila⁴, L. Benítez¹, L.M. González¹, L.J.S. Harrison⁵, R.M.E. Parkhouse⁶, T. Gárate¹

¹Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Microbiología, 28220 Majadahonda, Madrid, España. ²Departamento de Biotecnología, INIA, 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

La cisticercosis es la infección parasitaria causada por el cisticerco de *Taenia solium*. Los antígenos recombinantes específicos son una alternativa para el inmunodiagnóstico de la enfermedad, sin embargo los antígenos expresados en sistemas procariotas no proporcionan la mayoría de las modificaciones post-traduccionales, principalmente glicosilación, que podrían ser importantes en el reconocimiento antigénico y en la funcionalidad de la proteína. Por esta razón los objetivos principales de este trabajo fueron la clonación y expresión de un antígeno protector secretado por oncosferas de *T. saginata* (HP6) en el sistema Baculovirus y la evaluación de su antigenicidad en comparación con la de la proteína expresada en el sistema procariota. El antígeno HP6 fue previamente clonado de una genoteca de expresión de oncosferas de *T. saginata* por inmunocribado con el anticuerpo monoclonal HP6. El inserto fue subclonado en el vector de expresión pGEX-4T-1 y expresado en *Escherichia coli* BL21 (HP6-GST). El gen

fue también subclonado en el sistema Baculovirus pBacPAK9/BacPAK6 (HP6-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 céfaloraquídeos (LCR) de pacientes con NCC activa e inactiva. Se compararon los resultados obtenidos con los dos sistemas de expresión. HP6-GST y HP6-Bac mostraron sensibilidad similar, 80,6% y 77,4% respectivamente con sueros de pacientes con NCC activa. En NCC inactiva se obtuvo 29% y 64,5%, respectivamente, sugiriendo un perfil de reconocimiento antigénico diferente en las dos fases de la enfermedad.

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.

152.- Antígenos recombinantes de *Anisakis simplex* con posible importancia biológica en la relación parásito-hospedador

G. Ortiz¹, E. Rodríguez¹, M.J. Perteguer¹, 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

En nuestro país la anisakisosis es una enfermedad emergente ocasionada por la ingestión de pescado crudo o poco cocinado infectado por el tercer estadio larvario (L3) del nematodo *Anisakis simplex*. Tanto en la fase aguda como crónica de la enfermedad se ha demostrado que es necesario una sensibilización previa del hospedador con los productos de excreción/secretión (E/S) liberados por la larva viva. En la fase crónica de la enfermedad, debido a la destrucción de la larva, el sistema inmune del hospedador está expuesto a los antígenos del parásito durante largos periodos de tiempo. El principal objetivo de este estudio ha sido la caracterización de moléculas recombinantes con posible carácter alérgico o con interés en la relación que se establece entre el parásito y el hospedador, a fin de desarrollar nuevas herramientas diagnósticas o elucidar los mecanismos de patogénesis de la enfermedad. Con este propósito se construyó una genoteca de cDNA de L3 de *A. simplex* en el vector λ ZAP II que fue inmunocribada con un suero de conejo hiperinmune, obtenido a partir de un extracto crudo de L3 de *A. simplex*, y el anticuerpo monoclonal UA6. El anticuerpo monoclonal UA6 (IgG1/k) se une a la célula excretora de *A. simplex*, origen de los productos de E/S. Con el suero de conejo hiperinmune se aislaron y

purificaron varios clones positivos procediéndose posteriormente a la secuenciación de los correspondientes plásmidos recombinantes. Uno de estos clones, tras su secuenciación, presentó una alta similitud con los miembros descritos de la familia de las serpinas. Su cDNA de 1192 pb presentó un marco abierto de lectura de 334 aminoácidos que codificó una proteína inhibidora de las cistein-proteasas. Con respecto al inmunocribado con el anticuerpo monoclonal UA6, se aislaron dos clones denominados H3A y M8, los cuales fueron purificados y secuenciados. H3A mostró un cDNA truncado de 1828 pb con un marco de lectura abierto de 384 aminoácidos y sin ninguna homología con las proteínas descritas en el banco de datos GenBank. Finalmente, la secuencia aminoacídica deducida del clon M8 codificó una proteína de 232 aminoácidos con un peso molecular teórico de 26,65 kDa y un punto isoeléctrico de 9,21. La comparación de la secuencia con los datos obtenidos del GenBank-EMBL reveló una alta similitud con el dominio catalítico de las Ser/Thr/Tyr fosfatases.

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

153.- Eficacia del Melarsoprol en el tratamiento de la Tripanosomiasis Humana Africana en Haut Mbomou, Republica Centroafricana (RCA): resultados preliminares

J.A. Ruiz¹, P.P. Sitarro², G. Bassets³, S. Mbadinai⁴

¹Médicos Sin Fronteras-España (MSF-E), Haut Mbomou, RCA. ²OMS/CDS/CPE/ZFK Ginebra-Yaunde. ³MSF-E, C/ Nou de la Rambla 26, Barcelona 08001, España. ⁴Programa Nacional de Lucha Contra la Tripanosomiasis Humana, Ministerio de Salud Pública, Bangui, RCA

Con el objetivo de estudiar la eficacia del melarsoprol (ML) como fármaco de primera elección para el tratamiento de la Tripanosomiasis Humana Africana (THA) en fase neurológica en el foco del Haut Mbomou en la República Centroafricana (RCA) se realizó un seguimiento mediante evaluación clínica y análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR) a los 6, 12 y 24 meses después del tratamiento de 190 enfermos. Un fracaso terapéutico se define por una de las siguientes características del LCR observadas en uno de los controles de seguimiento: a) Presencia de tripanosoma (T+); b) LCR con >50 leucocitos/ μ L, doblando el valor precedente; c) LCR entre 11-50 leucocitos/ μ L más síntomas clínicos neurológicos (somnia, cefalea, etc.) indicativos de THA en evolución. Los resultados obtenidos muestran que de las 190 personas que fueron tratadas entre enero y diciembre del año 2002, el 1% (2/190) abandonó el tratamiento antes de finalizarlo; durante el tratamiento, el 0,5% (1/188) falleció a

causa de la enfermedad y un 4,2% (8/188) fallecieron a causa de una intoxicación arsenical. Los datos del seguimiento post-tratamiento muestran que 56% (100/179) de los enfermos acudieron al control con una media de seguimiento de 8 meses (rango [4-15]). Un 21% (21/100) fueron considerados como fracasos terapéuticos al ML. En conclusión, el ML, a pesar de su toxicidad, es el fármaco más utilizado para el tratamiento de la THA en fase neurológica. Las tasas de fracaso terapéutico informadas habitualmente por diferentes países es inferior a 10%. Los datos obtenidos por nuestro estudio muestran una tasa de fracasos terapéuticos al ML del 21%, así como una tasa del 4,2 % de muertes iatrogénicas, lo que debe llevarnos a una reflexión sobre la conveniencia de utilizar este fármaco como primera elección para los enfermos de THA en fase neurológica en Haut Mbomou. Una alternativa sería la utilización de eflornitina en monoterapia o biterapia.

154.- Pauta Rifampicina/Piracinamida (2 meses) en el tratamiento de la tuberculosis latente en inmigrantes subsaharianos irregulares: pocas complicaciones pero escaso cumplimiento

E. Pisos¹, O. Sanz¹, M. Hernández-Cabrera^{1,2}, A. Ángel-Moreno^{1,2}, Z. Redondo², A. Hernández³, J.L. Pérez-Arellano¹

¹Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, España. ²Unidad de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical, Hospital Insular, Las Palmas, España. ³Centro Udjama (Cruz Roja), Las Palmas de Gran Canaria, España

Hasta el replanteamiento reciente, recogido en el Consenso para el manejo de la tuberculosis en inmigrantes (*Med Clin* 2003;121:549-62), la actitud práctica ante un inmigrante con infección tuberculosa (Mantoux \geq 10 mm) en ausencia de enfermedad (sin datos clínicos ni radiología torácica con datos de lesión activa) consistía en la quimioprofilaxis secundaria. La pauta clásica con isoniacida durante 6 (o mejor) 9 meses, que presenta problemas de cumplimiento en la población general, resulta especialmente compleja en el inmigrante irregular. Por ello, el empleo de un esquema más corto (rifampicina/piracinamida durante dos meses) planteaba una opción atractiva, teniendo en cuenta que la estancia en Centros de Atención para inmigrantes se limita a un periodo corto de tiempo. Las ventajas de esta opción quimioprofiláctica deben ser evaluadas, teniendo en cuenta el riesgo de complicaciones graves descritas en la bibliografía. El diseño del trabajo incluyó una evaluación clínica protocolizada de todas las personas acogidas en un Centro de la Cruz Roja en Las Palmas. En todos ellos se realizó un estudio complementario sistemático que incluyó, además de Mantoux y radiología simple de tórax, determinación de enzimas hepáticas, la determinación de serología frente a virus hepatotropos primarios (B y C) y VIH. En todos los pacientes con enfermedad tuberculosa latente se propuso esta opción bajo los siguientes consideraciones a) el consentimiento informado y documentado por escrito b) el compromiso a la realización de controles analíticos periódicos c) la ausencia de embarazo

d) la normalidad de las pruebas hepáticas y e) la ausencia de marcadores de infección activa por virus B o C de la hepatitis. De las 1.069 personas evaluadas, se obtuvo información completa (clínica, Mantoux y Rx de tórax) en 685. El perfil epidemiológico correspondía a inmigrantes africanos (96%), varones (81,38%) con una edad media de 27 años. De los 685 personas en las que se dispuso de los datos mencionados, se diagnosticó infección tuberculosa en 125 (18,25%). De ellos en 5 personas no se inició la pauta propuesta (1 por no aceptar el consentimiento, 3 por coinfección por virus hepatotropos primarios y 1 por alteraciones de la bioquímica hepática). 100 sujetos abandonaron el centro antes del inicio de la quimioprofilaxis y en los 20 restantes, se realizó una quimioprofilaxis completa, debiendo suspenderse únicamente en 1 caso por dispepsia. A pesar del compromiso previo, sólo en 7 individuos se realizaron los controles analíticos previstos. Por todos los datos descritos, aunque la opción RZ (x2) no ha presentado problemas médicos en esta serie, el cumplimiento de la quimioprofilaxis antituberculosa en el inmigrante subsahariano irregular es claramente insuficiente. Nuestros resultados apoyan claramente la opción planteada en el Consenso para el manejo de la tuberculosis en inmigrantes (*Med Clin* 2003;121:549-62), específicamente en los inmigrantes subsaharianos irregulares.

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

155.- Evolución de la resistencia a antimicrobianos en cepas de *Campylobacter* spp. causantes de diarrea del viajero (1993-2003)

J. Ruiz¹, I. Oliveira¹, F. Marco², M. Corachán¹, J. Vila², J. Gascón¹

¹Centro de Salud Internacional, IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona, España. ²Servei de Microbiologia, IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona, España

Se evalúa la evolución de la resistencia a diferentes antimicrobianos en *Campylobacter* spp. a lo largo de los últimos 11 años. En este intervalo de tiempo 2.939 viajeros fueron atendidos por presentar diarrea del viajero (DV) en el Hospital Clínic de Barcelona. La detección de *Campylobacter* se realizó mediante métodos convencionales, estableciéndose la susceptibilidad mediante la técnica de Kirby Bauer. En total, se aislaron 98 cepas (3% del total de diarreas) de viajeros provenientes de más de 40 países. Por zonas geográficas, la mayoría de las cepas eran de viajeros procedentes del subcontinente indio (India y Nepal) (un total de 27 aislamientos), seguido de América del Sur (con 13) y África del Oeste y América Central con 12 y 11, respectivamente. Se detectó un 45% de resistencia frente a quinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacino y norfloxacino), 66% a ampicilina (AMP), 41% a tetraciclina (TC) y 21% a amoxicilina más ácido clavulánico (AMC). En el resto de los antibióticos estudiados (gentamicina, cloranfenicol y eritromicina) oscilaba entre 0% y 2%. No obstante, si consideramos las cepas agrupadas en dos periodos (1993-1998 [48 cepas]; 1999-2003 [50 cepas]), se observa que la distribución

de las cepas resistentes no es uniforme, así en el primero de los periodos se detectó un 14% de resistencia a AMC, 35% de resistencia tanto a quinolonas como a TC y 54% de resistencia a AMP, mientras que en el segundo periodo los niveles de resistencia fueron de 28% a AMC, 46% a TC, 54% a quinolonas y 78% a AMP. Al estudiar los niveles de resistencia por zona geográfica de procedencia se comprobó que no existía ninguna asociación específica. Las cepas de *Campylobacter* aisladas como causa de DV han experimentado un incremento en los niveles de resistencia a antimicrobianos en los últimos años, especialmente noticable en el caso de las quinolonas, dado que son los antimicrobianos usualmente utilizados cuando se requiere tratar a un paciente con DV. Ante los resultados encontrados, al menos en lo que se refiere a ciprofloxacino y norfloxacino, no pueden ser considerados como tratamiento de elección ante DV causadas por estos patógenos. Asimismo, los elevados niveles de resistencia presentes en estas cepas hacen preciso efectuar un seguimiento y vigilancia epidemiológica de los aislamientos clínicos de *Campylobacter* aislados como causa de DV, a fin de prevenir y limitar la diseminación de resistencias.

156.- Caracterización y susceptibilidad a antimicrobianos de cepas de *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. aisladas en niños menores de 5 años en una zona rural del sur de Mozambique

I. Mandomando^{1,2}, X. Valles¹, M. Espasa¹, S. Sanz³, J. Ruiz³, J. Gascon³, M. Levine⁴, P.L. Alonso^{1,3}

¹Centro de Investigação em Saude de Manhica (CISM), Moçambique. ²Instituto Nacional de Saude, Maputo, Moçambique. ³Centro de Salud Internacional, Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS. ⁴Center for Vaccine Development, Of Maryland University, Baltimore, USA

Se determinó la prevalencia y susceptibilidad a antimicrobianos de cepas de *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. aisladas en niños <5 años atendidos en consulta externa en una zona rural del sur de Mozambique. Se recogieron muestras de heces de niños <5 años con diarrea tanto aguda como con sangre entre julio de 2001 y julio 2003 atendidos en triagem en el Centro de Salud de Manhica. Los cultivos bacterianos se realizaron en medios sólidos (MacConkey, XLD y SS agar) y en caldo selenite, identificándose los microorganismos mediante pruebas bioquímicas y API20E. Las serotipificaciones se realizaron con antisueros específicos. La sensibilidad a ampicilina (Amp), cloramfenicol (Cm), cotrimoxazol (Sxt), ácido nalidíxico (Nal), tetraciclina (Tc), ceftriaxona (Cro) y ciprofloxacino (Cip) se determinó mediante disco difusión en placa. Se recogieron 1.351 muestras de heces de niños (310 con diarrea con sangre (22,9%), y 1.041 de niños con diarrea aguda (77,1%). En global hubo un 145 (10,7%) de positividad, siendo 111 (76,6%) Shigellas (95 *S. flexneri*, 15 *S. sonnei* y 1 *S. dysenteriae*) y 34 (23,4%) Salmonellas (*Salmonella* spp. 25, *S. typhimurium* 7 y *Salmonella enteritidis* 2). *Salmonella*

spp. fue más frecuente en niños <1 año, mientras que *Shigella* spp. se aisló prevalentemente entre niños de 1 y 4 años. Apenas un 4,8% de los patógenos se aislaron de niños entre 48 y 59 meses. Las cepas de *Shigella* fueron más resistentes que las de *Salmonella*, detectándose un 81,1% de cepas de *Shigella* resistentes a Sxt frente a un 14,7% de cepas de *Salmonella*. Frente a Tc, Amp, Cm, Nal, Cro y Cip hubo un 61,3%, 57,6%, 52,2%, 0,9%, 2,7% y 0,9% de *Shigellas* resistentes, frente a un 20,6%, 26,5%, 11,1%, 2,9%, 0% y 0% de *Salmonellas* resistentes. *Shigella* spp. es más prevalente que *Salmonella* como causa de diarrea en niños siendo la *S. flexneri* la más relevante. *S. flexneri* y *Salmonella* spp. fueron los patógenos más frecuentes: *Shigella* spp. predomina en niños de 13-48 meses mientras *Salmonella* spp. lo hace en niños de 0-12 meses. Asimismo es de reseñar los elevados niveles de resistencia a diferentes antimicrobianos que presentan las cepas de *Shigella*, que hacen preciso mantener una vigilancia continua de los mismos, a fin de que los tratamientos aplicados sean efectivos y no resulten en fallos terapéuticos.

157.- Mecanismos moleculares de resistencia a antimicrobianos en cepas de *Salmonella typhimurium* causantes de bacteriemia en niños menores de 5 años en el sur de Mozambique

J. Ruiz¹, I. Mandomando^{2,3}, P. Esquivel⁴, J. Vila⁵, J. Gascón¹, P.L. Alonso^{1,2}

¹Centro de Salud Internacional, IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona, España. ²Centro de Investigaçao de Manhiça, Manhiça, Mozambique.

³Instituto Nacional de Salud, Maputo, Mozambique. ⁴Facultad de Medicina, UNNE, Argentina. ⁵Servei de Microbiologia, Hospital Clínic, Barcelona, España

El objetivo de este estudio fue analizar los mecanismos de resistencia a diferentes antimicrobianos en una colección de 85 cepas de *Salmonella typhimurium* aisladas en sangre de niños menores de 5 años. Las cepas recolectadas entre enero de 1999 y agosto de 2001 se identificaron mediante pruebas bioquímicas y serotipado específico. La susceptibilidad a ampicilina (Amp), amoxicilina más ácido clavulánico (A/C), cloranfenicol (Cm), gentamicina (Gm), cotrimoxazol (Sxt), ácido nalidixico (Nal) y tetraciclina (Tc) se estableció mediante la técnica de Kirby Bauer. La presencia de b-lactamasas, al igual que la de tetA, tetB, tetC y tetG (resistencia a tetraciclina), *cmIA* y *floR* (resistencia a cloranfenicol) e integrones de tipo 1 se estableció por PCR con cebadores específicos, la presencia de DHFR plasmídicas (resistencia a trimetoprim) mediante PCR-RFLP y la actividad CAT (resistencia a cloranfenicol) mediante un ensayo colorimétrico. En total se observaron 7 patrones de resistencia: I.- Sensible (38 cepas); II.- Amp, Sxt, Gm, A/C (37); III.- Amp, Tc, Cm (2); IV.- Amp, Tc, Sxt, Cm (2); V.- Amp, A/C (4); VI.- Amp, Sxt, A/C (1); VII (1).- Sxt. La resistencia

a: b-lactámicos se debió a b-lactamasas tipo TEM (IV), CARB-2 (cepas del patrón de resistencia tipo III), y TEM y OXA30 (II, V, VI); la resistencia a cloranfenicol a CAT (III, IV) y *floR* (III): a tetraciclina a tetB (IV) y tetG (III); a cotrimoxazol a *dfrA1* (IV), no identificándose el mecanismo subyacente en las cepas encuadradas en los patrones II, VI y VII. La resistencia a Gm se asoció a la presencia del gen *aadB* (II), que se detectó al analizar los integrones de tipo 1. Se identificaron integrones en las cepas con patrón de resistencia II (750 pb - *aadB*; 2000 pb *Oxa30*, *aadA1*), III (900pb - *Carb2*, 1100 - *aadA1*), IV (1500pb - *dfrA1*, *aadA1*), V (2000pb - *oxa30*, *aadA1*) y VI (2000pb - *oxa30*, *aadA1*). Los resultados muestran una gran diversidad de mecanismos de resistencia, que potencialmente son susceptibles de ser transferidos entre microorganismos, lo que, dadas las limitaciones del arsenal antibacteriano de la zona, obliga a extremar las precauciones a la hora de utilizarlo, a fin de que los tratamientos sean efectivos y la vida útil de los antibacterianos lo más larga posible.

158.- Resistencia antimicrobiana en patógenos diarreogénicos de una área rural del sur de Mozambique

I. Mandomando^{1,2}, X. Valles¹, D. Quelhas¹, J. Ruiz³, S. Sanz³, J. Vila⁴, J. Gascon³, P. Alonso^{1,3}

¹Centro de Investigaçao em Saude de Manhiça (CISM), Moçambique. ²Instituto Nacional de Saude, Maputo, Moçambique. ³Centro de Salud Internacional, Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS. ⁴Servei de Microbiologia, Hospital Clínic de Barcelona, España

El objetivo de este estudio es describir los patrones de susceptibilidad a antimicrobianos de patógenos diarreogénicos aislados en niños ingresados <5 años en una zona rural del sur Mozambique. Se analizaron 117 *E.coli* diarreogénicas [48 enteroagregativas (EAEC), 32 enterotoxigénicas (ETEC), 26 enteropatógenicas (EPEC), 9 enterohemorrágicas (EHEC)] 13 *Salmonella* spp., 9 *Campylobacter* spp., 1 *Shigella flexneri* y 1 *Vibrio* spp. Los patógenos fueron identificados por métodos bioquímicos y API20E, siendo *Campylobacter* spp identificados por morfología y tinción de gram. La sensibilidad antimicrobiana a ampicilina (Amp), cloranfenicol (Cm), ceftriaxona (Cro), cotrimoxazol (Sxt), ciprofloxacino (Cip), tetraciclina (Tet) y ácido nalidixico (Nal) se realizó por disco/difusión. Adicionalmente se miró la susceptibilidad frente a eritromicina (Er) en las cepas de *Campylobacter* y aquella frente a amoxicilina/ácido clavulánico (A/C) en las cepas de *E.coli* y *Salmonella* spp. resistentes a Amp. Las *E.coli* presentaron elevados niveles de resistencia a Amp, Cm, Tet y Sxt que oscilaban desde el 22,2% a Cm en el caso de las cepas EHEC, hasta el 89,6% a Amp en EAEC. Tomando las *E.coli* diarreogénicas en con-

junto, los niveles de resistencia a estos antimicrobianos eran de 45,2%; 47,8%; 57,9% y 71,3% a Cm, Tet, Sxt y Amp respectivamente. *Salmonella* spp. presentó elevados niveles de resistencia a Sxt y Amp (38,5% y 61,5%, respectivamente). Es de reseñar que en *Campylobacter* spp. sólo se detectaron elevados niveles de resistencia a Sxt (88,9%) y que no se aislaron cepas resistentes a eritromicina. Los niveles de resistencia frente al resto de antimicrobianos fue bajo en todos los casos, oscilando desde 0% a Cro (en todos los microorganismos) al 11,5% a Nal en cepas EPEC. En general, los patógenos aislados en diarrea muestran una elevada resistencia frente a los antimicrobianos comúnmente usados para tratar las gastroenteritis en la zona, siendo las quinolonas y las cefalosporinas de tercera generación los antibióticos más efectivos frente a la mayoría de patógenos diarreogénicos estudiados. Los elevados niveles de resistencia a los antimicrobianos de elección en el área de Manhiça, muestran la necesidad de revisar las pautas terapéuticas, a fin de evitar la posibilidad de fallos frente al tratamiento en los casos que este es necesario.

159.- Evaluación del crecimiento de *Trypanosoma cruzi* en diferentes medios de cultivo

L. Calderón-Romero¹, J. Tay¹, D. Ruiz-Sánchez¹, J. Sánchez-Vega¹, F. Ibarra²

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México, D.F., México. ²Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México, D.F., México

Trypanosoma cruzi puede ser cultivado con éxito en diversos medios de cultivo. Sin embargo, no todos estos medios son, en ocasiones, fáciles de elaborar, ya que requieren ser preparados en varias etapas y varios días antes de su utilización, lo que consume tiempo y propicia su contaminación. Además, la necesidad de adicionar sangre fresca, en muchos casos humana, expone al personal encargado de su preparación a los riesgos inherentes al manejo de ésta. En este trabajo se evalúan medios de cultivo con y sin sangre, con el fin de seleccionar el medio idóneo para el crecimiento, desarrollo y conservación de *T. cruzi* en el laboratorio. Se utilizaron cuatro diferentes medios de cultivo para tripanosomátidos: NNN, TOBIE, LIT, BHI, en los cuales se inocularon epimastigotes de once diferentes cepas de *T. cruzi* mantenidas previamente en nuestro laboratorio en el medio tradicional de NNN. Los medios de cultivo inoculados fueron incubados a temperatura ambiente (23-28 °C), durante un promedio de 35 días. Se observaron cada 48 horas y se hizo un conteo de parásitos utilizando la cámara de Neubauer, hasta su declinación. Los cuatro medios de cultivo resultaron ser favorables para el crecimiento de *T. cruzi*, sin

embargo, en los medios de LIT y BHI se observaron las mayores curvas de crecimiento de los parásitos. Numerosos ensayos se han llevado a cabo con el fin de reproducir in vitro algunos de los estadios del ciclo vital de los tripanosomátidos al incubarlos a temperatura ambiente (25°C-28°C). Estos ensayos han llevado a elaborar y evaluar un sinnúmero de medios de cultivo, los cuales han sido preparados de diversas maneras, con el objeto de encontrar un medio sencillo y que propicie el crecimiento óptimo de los tripomastigotes en sus diferentes estadios. Aún cuando los medios conteniendo sangre fresca han demostrado ser los más eficientes para este crecimiento, los parásitos también son capaces de crecer, desarrollarse y conservarse en medios carentes de este ingrediente, por lo que se han considerado como una buena alternativa, dada la facilidad de preparación y disponibilidad en el mercado. Aún cuando los medios de cultivo conteniendo sangre son sumamente efectivos para el crecimiento de los parásitos, el hecho de que el medio de LIT no requiera la adición de sangre fresca, lo hace más sencillo en su elaboración, pero será decisión de cada laboratorio, el utilizar el medio que más satisfaga a sus necesidades.

160.- Viabilidad de la cepa RH de *Toxoplasma gondii* en condiciones extrabiológicas

W. Strauss

Cátedra de Parasitología, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, Av. Saavedra No. 2224, La Paz, Bolivia

Con el objetivo de determinar si a una temperatura de 4 °C la cepa RH de *Toxoplasma gondii* es capaz de sobrevivir y mantener su infectividad, se realizó el presente trabajo determinando además el comportamiento de la misma en diferentes tiempos de almacenamiento. Los resultados obtenidos muestran que esta viabilidad e infectividad de los toxoplasmas a 4 °C puede extenderse hasta los 160 días, mostrando

que los taquizoitos presentes en el líquido ascítico de los ratones están en una mayor proporción en forma extracelular en un principio y conforme aumenta la duración del almacenamiento a 4 °C esta proporción se invierte en forma inversa al tiempo. También el período presintomático de los ratones inoculados se prolonga en forma proporcional al tiempo de almacenamiento de la cepa.

161.- Diferencias de las alteraciones patológicas producidas en la infección experimental por *Angiostrongylus costaricensis* en dos cepas de ratones, BALB/c y C57BL/6

M.F. Brazil dos Santos¹, P. Morera², J.R. Gil³, S. Azzouz³, M. Maache³, A. Osuna³

¹Universidade do Estado da Bahia, Avenida Men de Sa No. 20, Ribeira, Salvador-Bahia, Brazil. ²Instituto de Investigaciones en Salud y Escuela de Medicina, Universidad Rodrigo Facio, P.O. Box 2117-1000, San Jose, Costa Rica. ³Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, Granada, España

El nematodo *Angiostrongylus costaricensis* es un parásito de ratas, frecuente en las zonas endémicas de América. El hombre se infecta por la ingestión de larvas del nematodo presentes en los alimentos, originando una enfermedad infecciosa grave. El objetivo de este trabajo fue estudiar las alteraciones patológicas de la infección experimental por *Angiostrongylus costaricensis* en dos cepas de ratones, BALB/c y C57BL/6. Estas dos cepas de ratones muestran de una forma natural diferencias en el tipo de inmunidad: Th2 para la Balb/c y mayoritariamente Th1 para los C57BL/6. Las larvas (L3) se obtuvieron, según Wallacen y Rosen (1969), tras digestión de babosas infectadas por *A. costaricensis*, procedentes de Costa Rica y mediante centrifugación en gradiente de Ficoll al 10% y 20%, isotonzado con 0,9% de NaCl pH 7.0. Se infectaron 45 ratones hembras de cada una de las cepas, inoculando 8 larvas a cada uno, por vía intraperitoneal. A 30 días post infección, los ratones fueron sacrificados para recuento de parásitos y estudios anatómo-patológicos. Los porcentajes de mortalidad de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados, antes de los 24 días

fueron, 29,23% y 11,12%, respectivamente. Los BALB/c presentaron alteraciones en el intestino, uréteres, hígado, bazo, estómago, testículo, pulmón, riñones y en miembros inferiores. Los ratones tenían el hígado hiperplásico y granulomatoso, degeneración grasa, dilatación en el intestino delgado, adherencias ileocecal, nodulaciones en el bazo y fistulización al exterior del abdomen. Además, observamos presencia de zonas hemorrágicas en el pulmón. Encontrándose parásitos en las arterias del mesenterio, aorta y femoral, así como en el uréter. En los ratones C57BL/6 se observaron alteraciones, pero no se eliminaron larvas con las heces. Las alteraciones fueron inflamación granulomatosa con intensa eosinofilia, envolviendo todo el intestino, proceso de degeneración y lisis, con hepatitis degenerativa. Los ratones BALB/c presentaron mayores alteraciones patológicas, con migración ectópica del parásito adulto. La respuesta patológica y la eliminación de larvas en heces que completan el ciclo biológico natural de este parásito parecen estar mediados por el tipo de inmunidad presente en el hospedador.

162.- Análisis de la poliartritis asociada a las formas susceptibles de la leishmaniosis canina por *Leishmania infantum*

M. Mangas¹, J. Carcelén¹, I. Molano¹, V. Iniesta¹, I. Corraliza², A. Gomez¹, L. Gómez³, I. Monroy¹, L.C. Gómez-Nieto¹

¹Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, ³Unidad de Histología y Anatomía Patológica. Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura (UEX), Av. de la Universidad s/n, 10071 Cáceres, España

Las formas activas de Leishmaniosis Canina (LC), engloban a un complejo cuadro patológico presente tanto en fases latentes como sintomáticas de su evolución. Su diagnóstico basado en la identificación del parásito *L. infantum*, o de la respuesta de anticuerpos en sangre, tiene que venir acompañado frecuentemente de un estudio médico que permita una valoración pronóstica y de la existencia de complicaciones o patologías concomitantes. El caso corresponde a una perra Teckel de siete años con un cuadro agudo de postración, anorexia, deshidratación, mucosas pálido-amarillentas y problemas de locomoción con crepitación articular, inflamación y dolor agudo también presente a nivel abdominal en la zona de proyección hepática. Los resultados analíticos manifestaron un hemograma normal y variaciones de la bioquímica sérica acusadas: BUN 48,8 mg/dl; AST 88 U/L; Fosfatasa Alcalina 1125 U/L y proteinemia de 9 g/dl entre otros. El diagnóstico de leishmaniosis realizado por biopsia y serológico por IFI y ELISA confirmó la enfermedad, cediendo el propietario el caso para su eutanasia. El estudio postmortem completo se detalla a nivel macroscópico e histológico, centrado éste en los hallazgos observados en articulaciones, las cuales aparecieron rojizas e inflama-

das. Microscópicamente fueron observados abundantes infiltrados celulares constituidos en su mayoría por células plasmáticas y macrófagos muy parasitados con típicas formas amastigotes de *Leishmania infantum*. En el infiltrado inflamatorio también se observan fibroblastos parasitados y escasa cantidad de polimorfonucleares y linfocitos. En la grasa articular también se exponen las imágenes del infiltrado inflamatorio dominante de células plasmáticas y macrófagos parasitados. Igualmente se describen y discuten las lesiones de encefalitis linfocítica, esclerosis glomerular, nefritis intersticial, hepatitis y pancreatitis aguda halladas en esta forma activa de la leishmaniosis canina. La elevada incidencia canina de esta zoonosis parasitaria y complejidad en cuanto a la variabilidad de su curso y grados de susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad, permite poner en evidencia cuadros lesionales hasta hoy poco conocidos en la práctica totalidad de órganos y tejidos.

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

163.- Vacunación contra la leishmaniosis canina con la proteína recombinante Quimera (PQ) de *Leishmania infantum* (I): protección clínica, inmunológica y parasitológica

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

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

En este trabajo se describen la metodología y resultados obtenidos al analizar la respuesta inmune generada en *Canis familiaris* cuando se le administra una proteína recombinante Quimera, compuesta por cinco regiones antigénicas de cuatro antígenos diferentes del parásito *Leishmania infantum* (Soto *et al.*, 1998), junto el adyuvante BCG empleado en numerosos ensayos de inmunización. El estudio tuvo una duración de 504 días, utilizando un total de 9 perros, tres fueron inmunizados con la vacuna proteína quimera (PQ) y el adyuvante BCG, dos inoculados con el adyuvante y cuatro con PBS utilizados como testigos. Se realizan tres inmunizaciones, vía intraperitoneal, con un intervalo de 21 días, completando un periodo de inmunización de 105 días, el cual fue analizado por las técnicas IFI y ELISA. La respuesta de anticuerpos generada por los animales inmunizados PQ+BCG fue exclusivamente frente a los determinantes antigénicos utilizados (PQ) y negativo frente a proteínas totales e IFI, lo que permitiría distinguir entre anticuerpos vacunales y de infección. Posteriormente, los 9 perros se sometieron a una misma dosis infectiva 500.000 promastigotes de *L. infantum* M/CAM/ES/96/BCN 150 zimodema MON-1, administrados vía intravenosa. La protección de los animales se determinó mediante análisis clínicos y exploratorios, parasitológicos

e inmunológicos. La aparición de síntomas estuvo presente en los cuatro animales testigo y los dos animales control de BCG, no apareciendo síntomas externos en los animales vacunados. El aislamiento y cultivo de parásitos fue positivo en los cuatro perros testigo y en uno inoculado con el adyuvante BCG. En los perros inmunizados no se aislaron parásitos de las biopsias a lo largo de todo el estudio. La respuesta de anticuerpos a partir de la infección experimental fue distinta entre grupos y con las técnicas utilizadas, mostrando mayor reactividad los animales testigo y control de adyuvante que los animales inmunizados con la proteína Q. El test de intradermoreacción DTH, presentó niveles de induración positivo (>5 mm) en los animales inmunizados frente a los dos grupos control utilizados. Las diferencias mostradas en los animales vacunados con la PQ respecto a los controles utilizados por los diferentes parámetros de estudios analizados evidencian el posible papel inmunoprolifático de esta proteína como vacuna frente a la leishmaniosis canina.

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

164.- Vacunación contra la leishmaniosis canina con la proteína recombinante Quimera (PQ) de *Leishmania infantum* (II): estudio patológico e histopatológico

I. Molano¹, J. Carcelén¹, V. Iniesta¹, I. Corraliza², M. Mangas¹, E. Redondo³, I. Monroy¹, L.C. Gómez-Nieto¹

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

El estudio y resultados de protectividad presentados (I) con la vacuna multicomponente proteína quimera (PQ) es concluido con los análisis de tipo histológico y de los fluidos obtenidos de los perros una vez realizada la necropsia reglada y estudio anatomopatológico completo. En los perros utilizados como control, se detectaron por la técnica Elisa anticuerpos específicos anti *-Leishmania* frente antígenos totales en los fluidos humor acuoso y cerebroespinal frente a resultados negativos obtenidos en el grupo de vacunados. El estudio anatomopatológico permitió evidenciar lesiones propias de la LC como hepatomegalia, esplenitis congestiva, hiperplásica, linfadenitis, etc., frente a imágenes aparentemente normales en los perros vacunados. Los análisis histológicos completos en los diferentes grupos de perros marcaron las diferencias patológicas y de protectividad detectados entre los diferentes grupos de perros. Las lesiones observadas en los perros no vacunados fueron en hígado un abundante infiltrado portal formado por linfocitos, células plasmáticas y escasos macrófagos. También se observaron áreas de degeneración vacuolar y zonas de necrosis hepatocelular con infiltrado inflamatorio difuso o formando granulomas. En riñón aparecieron diferentes grados de glomerulonefritis membrano proliferativa con perclerulalidad glomerular y engrosamiento de la membrana basal produciendo esclerosis mesangial. El sistema tubular de los perros no inmunizados presentaron también áreas de necrosis e infiltrado linfoplasmocelular

intersticial característico. La histopatología esplénica de los perros no vacunados fue la de una esplenitis hiperplásica reactiva característica con presencia de un reducido número de linfocitos a nivel de la vaina periarterial apareciendo los senos y cordones esplénicos engrosados debido a la presencia de células plasmáticas linfocitos y macrófagos. La pulpa esplénica roja se presentó expandida dando imágenes de una notable desestructuración de la arquitectura esplénica. En los perros inmunizados por el contrario se detectó una masiva expansión de la pulpa esplénica blanca a nivel de zonas periarteriales y de las vainas linfoides. Los folículos linfoides estaban hiperplásicos con abundante actividad mitótica. En base a los resultados presentados en ambos estudios (I, II) se puede concluir que la respuesta inmune generada por la inmunización con la PQ de *L. infantum*, controló además de la multiplicación del parásito, el fenómeno de hipersensibilidad tipo III y la expresión clínico-patológica de la leishmaniosis canina, lo cual permitirá realizar en un futuro, estudios de vacunación aplicables en numerosas zonas endémicas que consigan disminuir la incidencia de esta grave enfermedad y sus consecuencias.

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

165.- Prevalencia de parásitos intestinales en gatos vagabundos, gatos de explotación y gatos de propietario en EspañaA. Montoya¹, I. Fuentes², S. Jiménez³, C. Frisuelos¹, M. Mateo¹, A. Pérez³, G. Miró¹¹Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España. ²Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, 28224 Majadahonda, Madrid, España. ³Consejería de Salud, 26071 Logroño, La Rioja, España

El gato padece una serie de parasitosis intestinales que conducen a la eliminación con las heces de formas parasitarias que contaminan el medio ambiente y que suponen un riesgo para otros animales de su misma especie e incluso para el hombre, representando un riesgo desde el punto de vista de salud pública. La prevalencia de parásitos intestinales fue analizada en 382 gatos de España mediante el método de Telemann modificado. Se encontraron parásitos intestinales en el 28% de las muestras analizadas, de las cuales el 32,9% fueron gatos vagabundos, el 29,2% gatos de explotación y el 16,5% gatos de propietario. Encontrándose las siguientes prevalencias para los distintos parásitos intestinales: *Toxocara cati* (18,3%), *Toxascaris leonina* (1,3%), Fam. *Ancylostomatidae* (1%), *Capillaria* spp. (1,3%), *Aelurostrongylus abstrusus* (1%), Fam. *Taeniidae* (3,7%), *Dipylidium caninum* (2,6%) y *Cystoisospora* spp. (6,3%). En ninguna de las muestras fecales se encontraron ooquistes de *T. gondii*. De los gatos positivos a parásitos intestinales un 30,8% resultaron tener infecciones

mixtas con más de un parásito. De las cuales, el 24,2% correspondieron a la asociación de *Toxocara cati* y *Cystoisospora* spp. La prevalencia de parásitos intestinales fue mayor en gatos vagabundos y de explotación que en gatos de propietario con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias entre los niveles de parasitación producidos por protozoos y nematodos en el grupo de los gatos vagabundos y de explotación, pero estas diferencias si se encontraron en el grupo de los gatos de propietario donde su frecuencia fue menor de forma estadísticamente significativa ($p < 0.05$). No obstante la parasitación por cestodos fue similar en los tres grupos de gatos, no encontrándose diferencias significativas.

Este estudio ha sido financiado en parte por el Grant MPY 1276/01 ISCIII del Ministerio de Sanidad de España y por CIBE Sharp & Dohme (España).

166.- Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en gatos vagabundos, gatos de explotación y gatos de propietario en EspañaA. Montoya¹, G. Miró¹, S. Jiménez², C. Frisuelos¹, M. Mateo¹, A. Pérez², I. Fuentes³¹Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España. ²Consejería de Salud, 26071 Logroño, La Rioja, España. ³Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, 28224 Majadahonda, Madrid, España

Toxoplasma gondii es un protozoo parásito intracelular obligado, que parasita a animales vertebrados incluyendo el hombre. Los gatos y otros felinos juegan un papel primordial en su epidemiología. Ya que son los únicos hospedadores definitivos y eliminan al medio ambiente ooquistes a través de las heces. La seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* fue testada en 585 gatos de diferentes regiones de España, 306 muestras procedentes de La Rioja, en el norte de España, y 279 muestras procedentes de Madrid, en el centro de España. Las muestras fueron analizadas mediante el test de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Anti-*Toxoplasma* Ig G específicos fueron encontrados en el 32,3% de los gatos: 36,9% gatos vagabundos, 33,3% gatos de explotación y 25,5% gatos de propietario. La seroprevalencia fue del 30,8% en Madrid y del 33,7% en La Rioja. Los resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas entre la seroprevalencia encontrada en Madrid y La Rioja. Si se encontraron diferencias estadísticamente

significativas entre la seroprevalencia y el origen de los gatos ($p \leq 0.01$). La seroprevalencia en gatos vagabundos y de explotación (36,9%) fue mayor que en los gatos de propietario (25,5%). Se encontraron anticuerpos de *T. gondii* en 31,1% de las hembras y en 34% de los machos, no encontrándose diferencias significativas. Sin embargo, la prevalencia fue significativamente mayor ($p < 0.01$) en machos vagabundos (45,3%) que en hembras vagabundas (32%). La seroprevalencia fue significativamente mayor en gatos adultos (> 6 meses, 36,8%) que en gatos jóvenes (< 6 meses, 13,9%) demostrándose que con la edad se incrementa el riesgo de exposición a *T. gondii*. No se encontró la presencia de ooquistes de *T. gondii* en ninguna muestra fecal.

Este estudio ha sido financiado en parte por el grant MPY 1276/01 ISCIII del Ministerio de Sanidad de España y por CIBE Sharp & Dohme (España).

167.- Caracterización genotípica de cepas de *Toxoplasma gondii* aisladas de gatos vagabundos, de explotación y de propietario, en España

A. Montoya¹, G. Miró¹, S. Jiménez², M. Mateo², C. Frisuelos¹, C. Ramírez³, I. Fuentes³

¹Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, UCM, Madrid, España. ²Consejería de Salud, 26071 Logroño, La Rioja, España.

³Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, Majadahonda, Madrid, España

La toxoplasmosis, zoonosis de distribución global que afecta aproximadamente a un tercio de la población mundial y a un amplio espectro de hospedadores vertebrados, es originada por el protozoo *Toxoplasma gondii*. Su prevalencia es debida al ciclo biológico del parásito que presenta dos principales rutas de transmisión en la naturaleza: la propagación sexual y asexual. El ciclo sexual se origina exclusivamente en el intestino de los felídeos, siendo éstos, los hospedadores definitivos del parásito, mientras que el ciclo asexual se puede originar en la mayoría de los animales, incluidos los gatos. Los gatos y felinos salvajes juegan un papel crucial en la epidemiología de la enfermedad. 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 gatos infectados naturalmente, con el fin

de mostrar la prevalencia de los diferentes tipos asociados a los tres grupos en los que fueron incluidos según el origen: gatos vagabundos, de granja y de propietario. El genotipo fue determinado tras la amplificación del gen SAG 2 de *T. gondii* por PCR *nested* y posterior análisis por RFLP. Se analizaron veintiséis cepas de las cuales 84,6% fueron tipo II y 15,4% tipo I, no aislándose cepas de tipo III. El tipo II fue, por tanto, el más prevalente estando en relación con la mayor prevalencia de este tipo encontrada en casos humanos. El presente estudio permitió el análisis de cepas que no estaban causando sintomatología en los gatos, por lo que se pudo comprobar la distribución de los genotipos en la naturaleza y su relación con el papel epidemiológico.

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

168.- Caracterización genotípica de cepas de *Toxoplasma gondii* aisladas de óvidos en España: comparación de aislados procedentes de abortos frente a los procedentes de óvidos adultos asintomáticos

I. Fuentes¹, A. Montoya², A.L. García-Pérez³, C. Ramírez¹, M. Rodríguez¹, J.F. Barandika³, J.M. Rubio¹

¹Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, Majadahonda, Madrid, España. ²Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, UCM, Madrid, España. ³Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER), España

El protozoo *Toxoplasma gondii*, parásito intracelular obligado, origina la toxoplasmosis, zoonosis de distribución global que afecta aproximadamente a un tercio de la población mundial y a un amplio espectro de hospedadores vertebrados. Los óvidos son particularmente susceptibles a la infección por *Toxoplasma*, adquiriéndola por la ingesta de ooquistes o por transmisión congénita. La mayoría de los óvidos adultos infectados son asintomáticos, pero la toxoplasmosis es reconocida mundialmente como una de las más importantes causas de abortos, mortalidad neonatal y pérdidas reproductivas. Por otro lado, hay que destacar el papel que presenta el consumo de la carne ovina en la transmisión y como fuente de infección al hombre. 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 óvidos con el fin de mostrar la prevalencia de los

diferentes tipos asociados con abortos y con ovejas adultas asintomáticas. El genotipo fue determinado tras la amplificación del gen SAG 2 de *T. gondii* por PCR *nested* y posterior análisis por RFLP. Se analizaron treinta y cuatro cepas de las cuales 85,3% fueron tipo II, 8,8% tipo I y 5,9% tipo III. Analizando el origen de las cepas: de las siete cepas aisladas de adultos asintomáticos, 42,8% fueron tipo I, 28,6% tipo II y 28,6% tipo III, mientras que las veintisiete cepas aisladas de abortos resultaron el 100% de tipo II. En contraste con estudios previos en los que las cepas analizadas fueron derivadas de casos clínicos de toxoplasmosis, el análisis de cepas de óvidos asintomáticos y abortos permitió el genotipado de individuos infectados sanos frente a enfermos, observándose la mayor patogéneidad del tipo II en los óvidos.

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

169.- Evaluación de la infección con *Strongyloides venezuelensis* en un modelo experimental murino

A.L. Ruano¹, W.A. Martins², A.L. de Melo², J. López-Abán¹, T. Martín¹, J.L. Pérez-Arellano³, A. Muro¹

¹Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular, CISET, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, España.

²Departamento de Parasitología, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil. ³Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España

Disponer de un modelo experimental de estrogiloidosis es indispensable para estudiar mecanismos patogénicos implicados en la infección. El objetivo de este trabajo fue estudiar magnitudes indicadoras de parasitosis en la infección experimental murina de *S. venezuelensis* utilizando diferentes dosis de larvas infectivas. Se utilizaron 42 ratones BALB/C, sexo masculino, con pesos entre 15,4-22,2 g. en los que se inoculó subcutáneamente 100, 200, 500, 1.000, 3.000, 10.000 y 30.000 larvas infectantes (L3) de *S. venezuelensis*. Se valoraron diariamente las siguientes magnitudes: presencia de larvas eclosionadas de huevos excretados en las heces de los animales infectados, mortalidad y datos clínicos. Se recuperaron larvas a partir del día 5 hasta el día 22 post-infección. La mayor cantidad de larvas fue encontrada en el día 7, con descenso en el día 10, con excepción de los grupos inocu-

lados con 10.000 y 30.000 larvas cuya disminución fue en el día 15. La mortalidad se presentó en el 50% de los animales infectados con 30.000 larvas. El aumento de la frecuencia respiratoria y/o tiraje se observó en todos los animales infectados con dosis máximas. Se detectó diarrea en los animales infectados con dosis de 3.000 o más larvas. El ciclo parasitológico de *S. venezuelensis* en ratones dura como máximo 22 días, demostrando ser un ciclo corto y un modelo experimental de fácil manejo para el estudio de esta parasitosis. Las dosis infectivas que presentan un comportamiento menos fluctuante son las de 1.000 y 3.000 larvas.

Financiación: RICET/ FIS No. CO3/04. A.L. Ruano es becario de la Fundación Carolina.

170.- Marcadores de enfermedad en un modelo experimental de *Strongyloides venezuelensis*

A.L. Ruano¹, J. López-Abán¹, T. Martín², A.L. de Melo², W.A. Martins², J.L. Pérez-Arellano³, A. Muro¹

¹Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular, CISET, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, España.

²Departamento de Parasitología, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil. ³Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España

Aunque el diagnóstico de infección por *Strongyloides* sp. se basa en técnicas directas o serológicas, es preciso disponer de marcadores biológicos que demuestren las lesiones producidas por estos helmintos. Por ello, el objetivo de este trabajo fue la evaluación de datos simples de laboratorio en la infección experimental por *S. venezuelensis*. Se utilizaron 54 ratas Wistar machos, con peso de 70-100 g. a las que se inoculó subcutáneamente 250, 3.000 y 60.000 larvas infectivas de *S. venezuelensis*. Se estudiaron las siguientes magnitudes: hemograma, enzimas hepáticas, amilasa, glucosa, láctico-deshidrogenasa (LDH) y creatinfosfokinasa (CK) en los días 0-5, 7, 14, 21, 28 y 35 post-infección. En el tercer día post-infección se observó aumento significativo de leucocitos en todos los grupos estudiados. Los

eosinófilos aumentaron en el primer día en animales inoculados con 60000 larvas, en el tercer día en animales infectados con 3.000 larvas y al cuarto día en animales inoculados con 250 larvas. LDH se incrementó constantemente desde el primero al quinto día en ratas infectadas con 60.000 larvas, CPK se elevó en el tercer día post-infección en todos los grupos estudiados. Se comprobó que en etapas tempranas de primo-infección por *S. venezuelensis* existe aumento de leucocitos, eosinófilos, LDH y CPK, lo que supone una ayuda importante en el diagnóstico temprano de la enfermedad.

Financiación: RICET/FIS No. CO3/04. Ruano Nieto AL es becario de la Fundación Carolina.