

MESAS REDONDAS: MR

Aportes de la inmunología al conocimiento de parásito. CARDONI R. coordinadora**MR1. Oligonucleotidos adyuvantes de la respuesta inmune contra *Trypanosoma cruzi*.** CORRAL, R.S.

Laboratorio de Virología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires.

Se ha comprobado que oligodesoxinucleótidos sintéticos que contienen dinucleótidos CPs no metilados dentro de un contexto particular de bases (CpG-ODN) son capaces de inducir la activación de linfocitos B, células NK y monocitos, así como la secreción de inmunoglobulinas y citoquinas de respuesta TH1. Considerando la participación de estos mecanismos en la resistencia a la infección experimental aguda por *T. cruzi*, se evaluó en un modelo murino el potencial de CpG-ODN como adyuvante para la inmunización con antígenos de este parásito. Grupos de 10 ratones BALB/c (sesgo a TH2), fueron inmunizados por vía intramuscular (2 dosis con intervalo de una semana) con antígeno homogeneizado total de *T. cruzi* (HT) mezclado con: a) CpG-ODN (10 ó 100 mg/dosis) de 18 nucleótidos con 2 motivos estimulatorios 5' GACGTT 3', sintetizado con uniones fósforotioato, b) ODN sin CpG (igual dosis); c) hidróxido de aluminio (alum, 25 mg/dosis). Los animales que recibieron HT con CpG-ODN presentaron por ELISA títulos de anticuerpos séricos específicos para *T. cruzi* entre 5 y 20 veces mayores que aquellos inmunizados con HT solamente o en combinación con ODN carentes de motivos CpG. Estos títulos se mantuvieron al menos hasta 12 semanas después de la última inmunización. El isotipo predominante de inmunoglobulinas fue IgG2a (relacionado con respuesta TH1) en los ratones inmunizados con HT y CpG-ODN ($P < 0,05$, *t* de Student), mientras que en el grupo tratado con alum como adyuvante del HT fue IgG1 (asociado con respuesta TH2). Para verificar el efecto estimulatorio de CpG-ODN sobre la inmunidad celular se realizó una prueba de hipersensibilidad retardada (HR). A las 3 semanas post-inmunización se inocularon 50 mg de HT en la almohadilla plantar de miembro posterior de animales de cada grupo inmunizado y se midió el grado de induración provocada a las 24 y 48 hs. Se observó que el antígeno sólo evocaba una respuesta HR significativa ($P < 0,001$, ANOVA) en los ratones que habían recibido CpG-ODN como adyuvante de HT. Por otra parte, en dicho grupo de animales se indujo un perfil de citoquinas TH1. Se verificó por ELISA en sobrenadante de cultivo de 72 hs que los esplenocitos obtenidos de animales a los 8 días de la última inmunización con HT y CpG-ODN secretaban principalmente IFN- γ (52,4 +/- 3,9 ng/ml) e IL-12 (703,6 +/- 99,3 pg/ml) con escasa producción de IL-4 (4,3 +/- 1,2 pg/ml). El efecto inmunoestimulador fue dependiente de la dosis de CpG-ODN administrada. Los niveles de IFN- γ e IL-12 producidos por ratones inmunizados con HT y CpG-ODN fueron significativamente mayores ($P < 0,001$ y $P < 0,0001$, *t* de Student, respectivamente) que los correspondientes a animales que recibieron ODN no CpG. Los niveles séricos de IFN- γ e IL-12 en el grupo que recibió CpG-ODN también fueron significativamente ($P < 0,0001$) mayores que los observados en ratones inmunizados con HT solo o co-administrado con alum u ODN sin capacidad inmunoestimulante. Para establecer si HT+CpG-ODN era capaz de inducir inmunoprotección contra la infección por *T. cruzi*, se realizó en los distintos grupos un desafío por vía intraperitoneal con 5000 tripomastigotes sanguíneos de cepa RA/ratón a los

30 días de la última inmunización. Se comprobó que en los animales inmunizados con HT+CpG-ODN existía una reducción significativa en el pico de parasitemia ($P < < 0,005$, Wilcoxon) y en la mortalidad ($P < 0,05$, χ^2) en comparación con el grupo al que se había co-administrado HT y ODN no CpG. Se concluye que los resultados obtenidos reflejan la capacidad de los CpG-ODN para modular hacia una respuesta predominante de tipo TH1 contra antígenos de *T. cruzi*, capaz de contribuir a una inmunoprotección parcial frente a un desafío letal con tripomastigotes, lo cual los convierte en potenciales adyuvantes de vacunas a ser ensayadas.

MR2. Compromiso de la respuesta inmune en la evolución de la infección por *Trypanosoma cruzi*. GE, A. S.

Inmunología, F. de Cs. Químicas. U N C. Córdoba. E-mail: sgea@bioclin.fcq.unc.edu.ar.

La participación de la respuesta inmune desencadenada por el *Trypanosoma cruzi* ha sido involucrada en la generación de las lesiones encontradas en la Enfermedad de Chagas. Sin embargo, los mecanismos inmunológicos y los antígenos del parásito involucrados en ella son poco conocidos. En nuestro laboratorio al estudiar la respuesta inmune a cruzipaina inducida por la infección, demostramos que anticuerpos anti-cruzipaina purificados del suero de pacientes chagásicos, se unen a miosina. Además, linfocitos de sangre periférica de estos pacientes proliferan al ser estimulados con péptidos derivados de cruzipaina que presentan homología en la secuencia de aminoácidos con miosina. Utilizando un modelo experimental inmunizando ratones BALB/c con cruzipaina, observamos que anticuerpos (Ac) IgG provenientes de ratones inmunizados se unen a un antígeno de 210 kDa presente en extractos de músculo esquelético singénico rico en miosina (ME). La absorción de los sueros con miosina purificada, fue capaz de eliminar totalmente dicha reactividad. En paralelo, se observó un incremento en la actividad plasmática de creatin kinasa, marcador bioquímico de daño muscular. El examen histológico de músculo esquelético de ratones inmunizados reveló la presencia de infiltrados inflamatorios focales y degeneración de las fibras musculares. Ensayos de proliferación de células de bazo provenientes de estos ratones fueron positivos al ser estimuladas con ME y miosina purificada. Estudios funcionales mediante electromiografía de los ratones inmunizados revelaron alteraciones significativas con incremento en la duración del potencial de unidad motora, sugiriendo un compromiso muscular en los animales inmunizados. Paralelamente, inmunoglobulinas de ratones inmunizados se fijaron a un antígeno de 223 kDa presente en un extracto de corazón singénico rico en miosina (Cor). Se realizó el análisis de la secuencia de aminoácidos de péptidos seleccionados de dicha proteína obtenidos por clivaje proteolítico. Esta proteína fue identificada mediante una base de datos de SWISSPROT como la cadena pesada de la miosina cardíaca de ratón, isoforma alpha. El perfil de isotipos IgG obtenido por Western blot, reveló la presencia de todos los isotipos de IgG reactivos con cruzipaina y miosina. La mayor reactividad con cruzipaina fue observada con el isotipo IgG1 mientras que el isotipo IgG2a fue el más reactivo con miosina. Registros electrocardiográficos de los ratones inmunizados revelaron alteraciones en la conducción intraventricular y bradicardia. Estudios ultraestructurales realizados por microscopía electrónica, revelaron alteraciones severas con adelgazamiento de las fibras, acortamiento del sarcómero y pérdida de la estriación

normal en el tejido cardíaco de ratones inmunizados. Además, las células de bazo estimuladas con Cor, proliferaron significativamente respecto de los controles. La transferencia de las células de bazo de estos ratones fue capaz de transferir las alteraciones electrocardiográficas observadas previamente. Por otra parte, la transferencia placentaria de sangre de madres inmunizadas a sus crías también fue capaz de transferir anomalías electrocardiográficas. Estos resultados fuertemente sugieren un rol patogénico de la respuesta inmune humoral y celular generada por cruzipaina el cual se manifiesta con compromiso muscular esquelético y cardíaco acompañado de disfunción orgánica.

MR3. Mecanismos de resistencia en la infección experimental con distintas cepas de *Trypanosoma cruzi*. PETRAY, PB.

Laboratorio de Virología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Gallo 1330, 1425 Buenos Aires.

Nuestro interés se centró en la investigación de mecanismos inmunológicos involucrados en la resistencia frente al *T. cruzi*. Se estudió el efecto de la administración *in vivo* de AcMo contra IFN γ e IL4 sobre la resistencia de ratones Balb/c frente a la infección con cepas de diferentes características biológicas: RA y Tulahuén, virulentas para el ratón y con capacidad para infectar fagocitos y CA-I, no letal y miotrópica. El bloqueo del IFN γ incrementó la susceptibilidad de animales infectados con RA y Tulahuén pero no alteró el curso de la infección con CA-I. La neutralización de IL-4 favoreció la resistencia de los animales infectados con RA y Tulahuén pero no afectó el curso de la parasitemia en los infectados con CA-I: el IFN γ y la IL4 serían producidos durante la infección participando en la modulación de la resistencia frente a RA y Tulahuén. Siendo el IFN γ una señal relevante para activar fagocitos, se investigó su producción por esplenocitos de ratones infectados: sólo los provenientes de animales infectados con RA y Tulahuén liberaron niveles significativamente mayores de IFN γ que los controles. A fin de evaluar uno de los parámetros de respuesta inmune celular, se desarrolló un ensayo de linfoproliferación frente a mitógenos: RA y Tulahuén indujeron una marcada inhibición de la linfoproliferación durante la fase aguda de infección, en cambio, en el caso de CA-I, el índice de inhibición fue significativamente menor. La producción de IL2 por esplenocitos también estuvo notoriamente deprimida durante el período agudo de infección con las tres cepas, aunque en el caso de CA-I, parecería menos pronunciada. Al investigar la funcionalidad de los fagocitos peritoneales analizando producción de NO, se encontró que la infección aguda con las tres cepas indujo liberación de NO, asociada a expresión de iNOS. La cinética de la síntesis fue similar entre las tres. El IFN γ está involucrado en la estimulación de la liberación de NO por los macrófagos, sin embargo no se encontró correlación entre los niveles de producción de NO y la inducción diferencial de IFN γ por las tres cepas. Se investigó la participación del NO en la inhibición de la linfoproliferación inducida por *T. cruzi*: la presencia de L-NMMA (inhibidor de NOS) en los cultivos de esplenocitos restauró parcialmente la linfoproliferación de células de animales infectados con CA-I, sin efecto sobre la depresión inducida por RA y Tulahuén. La inhibición de NOS por administración *in vivo* de L-NAME disminuyó la producción endógena de NO y la resistencia de los ratones frente a la infección aguda con las tres cepas. Asimismo, no provocó una disminución de las lesiones inflamatorias en músculo esquelético, corazón e hígado: el NO no participaría en la génesis de la patología tisular observada en la enfermedad de Chagas. La incubación *in vitro* de tripomastigotes RA, Tulahuén y CA-I con SNAP (liberador de

NO), permitió comprobar un efecto tóxico directo del NO sobre el parásito, a concentraciones biológicamente relevantes. Para comprobar o descartar una participación del NO en el control de la carga parasitaria durante la etapa crónica de infección, se realizaron experimentos de transferencia pasiva de células. Los animales fueron protegidos frente al desafío con *T. cruzi* por transferencia de esplenocitos de ratón crónico enriquecidos en linfocitos T, presentando además mayores niveles de NO³⁻ sérico que los controles transferidos con linfocitos T de ratones no inmunes. La administración de L-NAME anuló la transferencia de resistencia: el NO participaría también en los mecanismos inmunes desplegados por linfocitos T durante la fase crónica de infección.

MR4. Intervención inmunológica en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi* en ratas. REVELLI S, PIAGGIO E, WIETZERBIN J, BOTTASSO O.

Instituto de Inmunología, Fac. de Cs. Médicas de Rosario; Instituto Curie de París, Francia.

La Enfermedad de Chagas aguda ocasiona un grado variable de afectación cardíaca y neurológica que generalmente remite con la administración del tratamiento específico con benznidazol (BZL), que puede resultar tóxico para el huésped. Quisimos determinar si el BZL modificaba la funcionalidad de células parasitadas por el *Trypanosoma cruzi* como los macrófagos. Para ello se cultivaron macrófagos murinos (RAW 264.7) estimulados con: LPS (100 ng/pozo), en presencia o ausencia de interferón gamma (IFN- γ) murino recombinante (500 UI/pozo) y el agregado o no de BZL (0.1 mM, 0.5 mM o 1 mM). En sobrenadantes de 24 hs de cultivo se evaluaron el óxido nítrico (NO), factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α), e interleucinas-1 β , IL-6 e IL-10. La acumulación de nitrito (NO₂⁻) como indicador de la síntesis de NO fue máxima tras la estimulación con LPS + IFN- γ logrando niveles intermedios al agregarse LPS o IFN- γ . La síntesis de nitritos fue siempre menor cuando se agregaba BZL. En lo referente al FNT- α , el LPS constituyó el estímulo más potente para su producción siguiéndole el LPS+IFN- γ e IFN- γ sólo. El BZL resultó inhibitorio para la producción de FNT- α , pero su efecto fue menos notorio. El estímulo más importante para la producción de IL-6 fue el LPS+IFN- γ luego el LPS, y muy por debajo el IFN- γ . La adición de BZL al cultivo resultó en un descenso significativo de la IL-6. Al igual que la IL-6, el LPS+IFN- γ indujeron los niveles más altos de IL-10, mientras que el LPS o el IFN- γ en forma aislada actuaron como estimuladores menos potentes. La acción bloqueante del BZL sobre la síntesis de IL-10 sólo se verificó en las células estimuladas con LPS o IFN- γ . Similarmente, para la IL-1 β , la inhibición provocada por el tratamiento con BZL fue evidente al utilizarse un poderoso inductor como el LPS, y el BZL a su más alta concentración. Dado que el BZL inhibía la síntesis de NO, se estudió la transcripción de la enzima responsable de su síntesis, la iNOS. La detección por Northern Blot y RT-PCR del ARNm de la iNOS de los macrófagos cultivados indicaron que el BZL inhibía su transcripción. En un paso siguiente estudiamos si los efectos inhibitorios del BZL sobre la síntesis de NO también se daban *in vivo*. Para ello se trabajó en un modelo experimental en ratas desarrollado en nuestro laboratorio que presenta una fase aguda de infección que se autorresuelve. Los animales se infectaron al destete con 10⁶ tripomastigotes de la cepa Tulahuén y 7 días después se sometieron a alguno de los siguientes tratamientos durante 15 días: BZL, a una dosis subóptima de 5 mg/kg/día; IFN- γ (20.000 U/día) o ambos. El tratamiento con IFN- γ tenía un doble propósito: determinar si al combinarlo con BZL desarrollaba una acción sinérgica para el control de la infección aguda, y anali-

zar si el BZL modificaba la producción de algunos mediadores que se originan cuando los animales son tratados con esta citocina. Los resultados señalan que la administración simultánea de BZL más IFN- γ no confiere un efecto superior. La presencia de nitrato en suero, que se halla significativamente elevado en las ratas con infección y más aún en aquellas tratadas con IFN- γ deja de observarse si el animal también recibe BZL. En base a todo lo expuesto se propone que sumada a su acción tripanomicida, el BZL también modificaría la síntesis de mediadores biológicamente relevantes en la inmunopatogénesis de la infección con *T. cruzi*.

Inmunomodulación en infecciones parasitarias.

CARLOMAGNO M. coordinadora

MR5. Activadores policlonales del *T. cruzi* y su relación con el desarrollo de la infección. GRUPPI A. –

Depto de Bioquímica Clínica - Fac de Ciencias Químicas - UNC. Ala 1 Pab. Argentina. Ciudad Universitaria.5000 Córdoba e-mail: agruppi@biclon.fcq.unc.edu.ar.

La fase aguda de la infección producida por *T. cruzi* está caracterizada por dos fenómenos aparentemente opuestos: la activación policlonal y la inmunosupresión. La activación policlonal está caracterizada por una intensa proliferación y transformación blástica de linfocitos T y B. Ha sido demostrada que la mayoría de los linfocitos (Li) estimulados en la infección con el *T. cruzi* no son específicos para antígenos (Ags) parasitarios y una proporción de ellos serían autorreactivos. En la búsqueda de Ags parasitarios involucrados en la inducción de activación policlonal, observamos que Ags alcalinos, obtenidos del citosol de epimastigotes del *T. cruzi* (FI), se comportan como mitógenos policlonales de LiB murinos normales. Estos Ags son capaces de estimular (*in vitro*) la secreción de IgM reactiva con actina, miosina, mioglobina y tiroglobulina, pero no con FI; como así también de IgG1 e IgG3 (Montes y col., 1996 Scand J Immunol.44, 93-100). En los sobrenadantes de cultivo detectamos IL-10, IL-6, IL-4 e INF γ . No detectamos IL-2, lo que se correlacionó con la ausencia de proliferación de LiT frente a FI. Los LiT estimulados con FI no expresan marcadores de activación como CD25 ni CD40L. FI estimula la proliferación de las células B en ausencia de LiT (actúa como un Ag T- independiente) pero necesita de la presencia de células accesorias para ejercer su función y lo hace a través del BCR (Montes y col., 1999 Scand J Immunol.50, 159-166). Además hemos identificado dentro de FI una proteína de aproximadamente 30 kDa (no identificada hasta el presente) y una de 47 kDa, que tiene una secuencia N-terminal idéntica a la Glutamato dehidrogenasa (GDH) del *T. cruzi* (Zuñiga y col. 1999 Clinical Immunology Oct, 81:89) responsables del fenómeno descripto. La GDH, al igual que FI, no es capaz de inducir memoria inmunológica ya que no es capaz de inducir anticuerpos de tipo IgG en pacientes crónicos. Por otra parte es importante señalar que el sistema inmune tiene una remarcable capacidad para mantener un estado de equilibrio, a pesar de la constante exposición a Ags propios y luego de responder a diversos Ags extraños. Los mecanismos que actúan sobre los LiB para frenar la activación policlonal y conducir a una respuesta específica no han sido dilucidados. Previamente ha sido reportado que los Li de los animales infectados con *T. cruzi* son hiporespondedores a estímulos mitogénicos (LPS y Ags parasitarios). En nuestro laboratorio hemos observado que la hiporespuesta de los LiB de animales infectados con *T. cruzi* frente a LPS se correlaciona con un elevado grado de activación celular y apoptosis. Observamos que los LiB de estos animales presen-

tan apoptosis *in vivo* e *in vitro*. Los LiB de los animales infectados son capaces de proliferar espontáneamente, como así también de secretar IgM y cuando son estimulados con LPS disminuye la blastogénesis espontánea. El estímulo con LPS produce un arresto en la fase G0/G1 del ciclo celular (Zúñiga y col. 1999 Clin Exp Immunol. En prensa) indicando que cuando un estímulo actúa sobre los Li B activados se frena su proliferación. Consideramos que los LiB con distinto grado de activación pueden responder diferente a un mismo Ag y que las características del Ag pueden condicionar la supervivencia de ésta célula. Para comenzar a discernir esto, separamos los LiB de los animales infectados, en gradiente de Percoll, y obtuvimos fracciones de LiB de baja y alta densidad. La población de Li B de baja densidad está más activada, presenta un aumento en la expresión de Ags clase II del MHC y mayor proliferación espontánea. Los LiB de baja densidad presentan además mayor expresión de Fas y FasL. Probablemente la vía Fas/FasL esté gatillando los incrementados niveles de apoptosis observados. Estos datos explicarían porque la activación policlonal y la inmunosupresión pueden coexistir en la misma fase de la infección con el *T. cruzi*.

MR6. Modulation of host immune response by *E. granulosus* glycans and susceptibility to hydatid infection. NIETO A, BAZ A, DEMATTEIS S, HERNÁNDEZ A and MÍGUEZ M.

Cátedra de Inmunología; Facultad de Química; Universidad de la República Montevideo; Uruguay.

Infection by *E. granulosus* of its intermediate host produces cystic hydatid disease, a chronic, asymptomatic, generally long-lasting, parasitic infection. The chronically infected intermediate host develops, in most cases, cellular and humoral specific responses (1-6) that do not protect the host against the established metacestode (hydatid cyst) (7). Diversion of the antibody response by carbohydrates has been described as an evasion mechanism in other helminths (8). In the particular case of *Schistosoma mansoni* glycans elicit antibody isotypes which block the potentially protective effector function of other isotypes (9,10). Proliferation of IgM- and IgG3-producing murine B-1 cells induced by *S. mansoni* carbohydrates has been described both *in vitro* (11) and *in vivo* (12). Data from our lab suggest that *E. granulosus* carbohydrates are immunodominant in natural (13) and experimental infections (4,5). We have also observed a major PSC-specific IgG2 response in hydatid patients (14) and IgG3 in chronic mouse infection (5), as well as significant production of specific IgM and IgG3 by peritoneal cells from infected mice (6) in early infection, suggesting a T-independent stimulation of B1-cells. Collectively, these data suggest some kind of modulation of the immune response by the parasitic carbohydrates. To analyze this, we started investigating the profiles of cytokines and IgG subclasses produced during early mouse infection. We found that splenocytes stimulated *in vitro* with protoscolex somatic antigens (PSA), obtained as early as the first week post-infection, secreted high levels of IL-4, IL-5 and IL-10 and none of γ -IFN. These mice produced high specific IgM and IgG1, but low IgG2a, IgG2b and IgG3 titers. We also showed that γ -IFN/LPS activated macrophages, hydrogen peroxide and nitric oxide were able to kill PSC *in vitro* (6) in a dose dependent manner. These results indicate a strong polarization to a Th2-type response in the early infection and that activated macrophages (usually associated with Th1-type responses) could be an effector mechanism to kill PSC. These experiments describe the induction of a Th2-type polarization in infected mice, however the cellular response produced by cells in close contact with the developing protoscoleces remains

unknown. Th1/Th2-type polarization could be associated with resistance/susceptibility in some parasitic infections, however the polarization depends on the physiological compartments where it is measured. Therefore, to conclude on the role of Th1/Th2-type polarization in susceptibility/resistance to parasitic infections, it is crucial to analyze the cytokines secreted not only in spleen but also locally in the site where the parasite is developing. In the case of mice infected with *E. granulosus* we have observed that a granulomatous reaction is developed in the peritoneal cavity and liver (6). Thus, we consider it important to analyze the pattern of cytokines produced not only by splenocytes, but also by cells present within those granulomas. Furthermore, we found high levels of IgG4 and IgE in cystic hydatid patients in which the ratios of IL-5/ γ -IFN produced by specifically stimulated PBMC were significantly higher than by PHA-stimulated ones (15). These results are consistent with those observed in mice and suggest that the Th2-type polarized response may be related to susceptibility. Further research is needed to clarify this point as well as the role that carbohydrates may play in regulating Th1/Th2 balance. Protection (78%) of mice from cystic hydatid infection using PSC somatic antigen (PSA) was reported (16). We observed a similar protection using a detergent extract from the surface of PSC (17) and showed that the antibodies produced by protected mice did not recognize carbohydrates. Therefore, we have deglycosylated PSC surface using EndoF and immunized mice with the deglycosylated PSC (DGP), as well as with the carbohydrate-rich supernatant from EndoF treatment (CHP) and with several control immunogens including dead PSC (DPSC). We showed that CHP is mitogenic, immunodominant and elicits low avidity antibodies (18). We also found that CHP-immunized mice were more susceptible to infection in a dose-dependent way, while those DGP-immunized showed 100% protection (19). These results suggest that EndoF-releasable carbohydrates from the PSC surface elicit an immune response linked to increased susceptibility while that elicited by DGP is associated with resistance. Thus, analysis of the correlation between these contrasting roles in susceptibility of CHP and DGP with their roles in Th1/Th2-type polarization may provide relevant data related to immune evasion by *E. granulosus*. CHP contains mainly carbohydrates and lipids which run in the front in SDS-PAGE (18) and no structures have been defined for any of its constituents. Fractionation and rigorous characterization of the CHP glycans will provide an excellent approach to the analysis of the correlation between structure and function of these carbohydrates. We have carried out a preliminary characterization of the *N*-glycans from *E. granulosus* PSC and cyst membranes (20) and showed that they are mainly core fucosylated non-charged structures having complex-type antennae composed of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) building blocks, some of which are capped with alpha-linked galactose. We also found a small proportion of high mannose structures and truncated di- and trimannosyl core structures. We plan to use the general strategies (21, 22) implemented in the above studies complemented by new methodology to rigorously characterize the major glycans in CHP.

References (1) Lightowers MW & Gottstein B. 1995. *Echinococcus* and Hydatid Disease. Ed. by RCA Thompson & AJ Lymbery. Published by CAB International, Oxon, U.K. pp. 355-410. (2) Barbieri M, et al. 1994. *Int. J. Parasitol.* 24: 937-942. (3) Profumo E, et al. 1994. *Parasite Immunology* 16: 393-398. (4) Ferragut G & Nieto A. 1996. *Parasite Immunology* 18: 393-402. (5) Severi MA, Ferragut G & Nieto A. 1997. In press in *Parasite Immunology*. (6) Dematteis S, et al. Submitted for publication. (7) Lightowers MW. 1990. *Int. J. Parasitol.* 20: 471-

478. (8) Maizels RM, et al. 1993. *Nature* 365: 797-805. (9) Butterworth A, et al. 1988. *Biochimie* 70: 1053-1063. (10) Langley JG & Dunne DW. 1992. *Parasite Immunology* 14: 185-200. (11) Velupillai P & Harn DA. 1994. *Proceed. Natl. Acad. Sci.* 91: 18-22. (12) Velupillai P, et al. 1996. *Inf. Immun.* 64: 4557-4560. (13) Sterla S, et al. 1997. *Infectious Disease* 8: 145-148. (14) Sterla S. Personal communication. (15) Hernandez A, et al. 1997. In press in *Parasite Immunology*. (16) Dempster R, et al. 1992. *Int. J. Parasitol.* 22: 435-441. (17) Hernández A. & Nieto A. 1994. *Parasite Immunology* 16: 537-544. (18) Miguez M., et al. 1996. *Parasite Immunology* 18: 559-569. (19) Miguez M & Nieto A. 1997. 9th European Carbohydrate Symposium, July 6-11, Utrecht, The Netherlands. (20) Khoo K-H., et al. 1997. *Molec. Biochem. Parasitol.* 86: 237-248. (21) Dell A., et al. (1993). In *Glycobiology: A Practical Approach*, Eds. (22) Dell A., et al. *Methods Enzymol.* 230: 108-132.

MR7. Inmunomodulación en Distomatosis experimental. MASIHD.

Parasitología y Micología, Dpto. Bioquímica Clínica, Facultad Ciencias Químicas, UNC

La inmunobiología de las infecciones por helmintos difieren de las infecciones por protozoarios principalmente porque los metazoarios son más grandes y no se reproducen en el huésped vertebrado. Las diferencias en el tamaño restringe las vías por las cuales el huésped puede montar una respuesta inmune efectiva y la falta de replicación influye en las estrategias de sobrevivencia tanto del huésped como del parásito. *Fasciola hepática* es un trematode que vive en los canalículos biliares del hombre y del ganado ovino y bovino principalmente. Es hermafrodita y en su ciclo de vida involucra a un molusco como huésped intermediario. Los huevos, liberados del cuerpo con las heces, en contacto con el agua incuban el primer estado larval: miracidio. Este pequeño organismo ciliado tiene fuerza limitada de sobrevivencia y debe contactar con la especie correcta de caracol acuático para que el ciclo continúe. Al penetrar en el caracol pierde la epidermis ciliada. El esporoquiste permanentemente divide células embriogénicas y se diferencia a las formas larvales próximas (por miracidio que penetra en el caracol emergen entre 200 000 y 500 000 cercarias). Las cercarias permanecen enquistadas en las plantas acuáticas. Luego de la ingestión de las metacercarias por el huésped final, el pasaje de intestino a peritoneo, penetración en hígado y localización en los canalículos biliares, se producen cambios en la estructura y en las propiedades fisiológicas del tegumento que recubre al parásito. Es a través del tegumento que el parásito se relaciona íntimamente con el huésped y allí se encuentran las glicoproteínas de secreción. Distintos autores han involucrado a estos productos de excreción - secreción (PES) en la evasión de la respuesta inmune (RI) del huésped para poder sobrevivir. En *F. hepática* se han descrito mecanismos de regulación de la RI por los PES tales como el recambio del glicocalix del tegumento del parásito, recambio y excreción del complejo antígeno - anticuerpo del tegumento y la liberación de enzimas similares a papaína o catepsina B. Con estos antecedentes decidimos conocer la participación de los PES de *F. hepática* en la modulación de la RI celular y la generación de algún probable mecanismo evasor. Observamos que los PES inducen alteraciones funcionales de las células presentadoras de antígenos, disminuyen la fagocitosis y alteran la capacidad presentadora de antígenos tanto en células presentadoras de antígenos provenientes de animales infectados como de ratas normales inoculadas intraperitonealmente con los PES. La inoculación de los PES en ratas induce poblaciones celulares

esplénicas con actividad supresora de la respuesta de hipersensibilidad de tipo demorado a antígenos propios y extraños, suprimiendo también la respuesta blastogénica de las células mononucleares de bazo (Cmb) de ratas normales a mitógenos, con participación de peróxido de hidrógeno y anión superóxido. Durante el estudio de la progresión de la infección de ratas, con 30 metacercarias de *F. hepática* por vía oral, durante 60 días pudimos observar disminución transitoria de la respuesta proliferativa a Con A y variación en la producción de óxido nítrico (NO) por células peritoneales (CP) entre los días 7 y 14 pos-infección. Concomitantemente se encuentra aumentada la IL-10 y disminuida la IL-2

La disminución de la producción de NO por CP, que se produce durante la migración del parásito por peritoneo, podría sugerir la existencia de un mecanismo para evitar su acción tóxica. También se puede considerar la posibilidad de que el parásito estimule la liberación de citoquinas que inhiban la producción de NO como la IL-10. Estos fenómenos se pueden interpretar como un mecanismo del parásito para evitar la acción tóxica del metabolito nitrogenado, responsable de la muerte de larvas de otros helmintos como *Schistosoma mansoni*. Se conoce la susceptibilidad de diversos microorganismos al NO, el cual se produce durante la infección y el pico de producción se correlaciona con el control de la infección. Además los inhibidores de la óxido nítrico sintetasa exacerbaban la enfermedad. Por otra parte, cuando los reactivos intermediarios del nitrógeno (RIN) son producidos en exceso pueden ser citotóxicos para las células del huésped causando patologías y aun la muerte. ¿Qué factores pueden determinar si la producción de los RIN es protectora o patógena para el huésped?. Todo dependerá de la interrelación huésped parásito, porque los parásitos manipulando las citoquinas pueden mediar la RI del huésped. Un perfil Th2 suprime la producción de óxido nítrico. La liberación de los PES durante su fase de migración por peritoneo y comienzo de la penetración en hígado generaría en macrófagos peritoneales disminución en la producción de NO, alteración en la fagocitosis y en la capacidad presentadora de antígenos, permitiendo al parásito evitar la RI contra él. Por otra parte, el estudio de los PES en geles de poliacrilamida reveló una composición compleja con un rango de bandas comprendido entre 14 y 150 kDa. La separación de las bandas en 4 fracciones y su posterior ensayo en cultivos de Cmb demostraron que la fracción comprendida entre 12 y 24 kDa ejercieron una acción supresora sobre la respuesta proliferativa a Con A, similar al efecto observado con los PES totales. Dentro de la fracción supresora se identificaron dos bandas que demostraron homología con la glutatión transferasa de *F. hepática* constitutiva. La forma dimérica de estas proteínas suprimieron la respuesta proliferativa y la producción de NO. En la actualidad estamos estudiando la capacidad de diferentes antígenos del parásito, totales y/o fraccionados para balancear la respuesta Th1 - Th2 a favor del huésped, generando mecanismos de protección.

MR8. Respuesta inmune mediada por glicosilfosfatidilinositol (GPI) de *Plasmodium falciparum* sobre células NKT. HANSEN D Y SCHOFIELD L.

The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Melbourne, Australia.

Las células NKT son una subpoblación de linfocitos CD4⁺ o CD4⁺8⁺; NK1⁺ que presentan características fenotípicas y funcionales diferentes de los linfocitos T convencionales. Estas células producen grandes cantidades de IL-4 e IFN- γ cuando son estimuladas inespecíficamente con anticuerpos anti-CD3 o específicamente con ciertos glicolípidos en contexto de moléculas CD1d que constituyen un nuevo linaje de moléculas

presentadoras de antígeno diferente de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. Se ha descrito que los glicosilfosfatidilinositales (GPI) de distintos parásitos protozoos son capaces de estimular la proliferación de células NKT de ratones previamente expuestos al parásito. En el presente trabajo se estudió la capacidad del GPI de *Plasmodium* de estimular la proliferación y la producción de citoquinas en células NKT provenientes de animales naïve. Esplenocitos de ratones deficientes en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (clase II^{-/-}) naïve o inmunizados con esquizontes de *P. falciparum* fueron estimulados con GPI de *Plasmodium* y se analizó el porcentaje de células NK1⁺, CD4⁺ y la producción de IL-4 e IFN- γ en los sobrenadantes de cultivo. Después de 3 días de estimulación, el GPI (10 nM) fue capaz de estimular la proliferación y la producción de citoquinas tanto en las células NKT de animales inmunes como en las de animales naïve, indicando que a diferencia de lo descrito para linfocitos T convencionales, la presensibilización in vivo no es un requisito para la estimulación in vitro de esta población celular. Este hecho sugiere que las células NKT podrían participar en estadios tempranos durante la defensa contra infecciones, jugando un rol intermedio entre la inmunidad innata y la adquirida. Sin embargo la función de esta población celular in vivo no ha sido completamente esclarecida. Se ha postulado que las células NKT podrían estar involucradas en la regulación del balance Th1/Th2 y en el control de enfermedades proinflamatorias. Dado que el síndrome de malaria cerebral esta mediado por una fuerte respuesta inflamatoria, estudiamos también el rol de las células NKT en éste modelo experimental. Para esto, se evaluó la susceptibilidad a la infección con el parásito *Plasmodium berghei* ANKA en ratones Balb/c (resistentes) y ratones Balb/c deficientes en moléculas CD1d (CD1^{-/-}). Un grupo de ratones C57Bl/6 (susceptibles) fue incluido como control positivo de malaria cerebral. El 100 % de estos animales mostraron síntomas clínicos y murieron entre los días 6 a 10 post-infección (p.i.) con niveles de parasitemia inferiores al 10%. Los ratones Balb/c no desarrollaron malaria cerebral y el 90% de los animales sobrevivieron después de 3 semanas de infección. En contraste los ratones Balb/c CD1^{-/-} mostraron síntomas de malaria cerebral y el 50% de los animales murieron entre los días 8 a 11 p.i. con niveles de parasitemia comparables a los encontrados en los ratones C57Bl/6. Al día 7 p.i los ratones Balb/c CD1^{-/-} mostraron un marcado aumento en el porcentaje de células CD4⁺ produciendo IFN- γ (Th1) con respecto a los ratones Balb/c salvajes. Tomados en conjunto estos resultados sugieren que durante la infección con *P. berghei* ANKA, las células NKT jugarían un rol protectoro contra el desarrollo de la malaria cerebral, probablemente favoreciendo el desarrollo de respuestas Th2 capaces de inhibir la respuesta inflamatoria causada durante la infección con el parásito. La capacidad del GPI de activar células NKT abre la posibilidad de su uso en la inmunomodulación de esta población celular hacia la obtención de una respuesta protectora contra el síndrome de malaria cerebral.

Expresiones de moléculas en infecciones parasitarias. ISOLA ED coordinadora

MR9. Estructura y función de la *trans*-sialidasa de *Trypanosoma cruzi*. LEGUIZAMÓN MS¹ Y CAMPETELLA O².

¹Depto. de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA. ²Inst de Investigaciones Biotecnológica, Univ. Nac. De San Martín, Argentina.

T. cruzi requiere de epitopes sialilados para interactuar con la célula huésped. Sin embargo es incapaz de efectuar síntesis *de novo* de ácido siálico debiendo adquirirlo del medio. Para ello expresa una actividad única de tripanosomas: la *trans*-sialidasa (TS). Esta enzima es capaz de transferir directamente entre macromoléculas residuos sialil alfa (2-3) a galactosas terminales unidas en beta. De esta manera el tripomastigote queda capacitado para efectuar adhesión/invasión de células de mamífero. La caracterización bioquímica de los productos naturales y el clonado de los genes codificantes, demostró que existen dos formas activas de la TS: una expresada en tripomastigotes y otra en cultivos de epimastigotes tardíos (a punto de diferenciarse en tripomastigotes). La forma presente en tripomastigotes se encuentra anclada a su superficie por glicosilfosfatidilinositol lo que permite su liberación al medio, siendo detectada en sangre de animales y pacientes infectados. La forma expresada en epimastigotes posee anclaje integral de membrana. Estos genes están incluidos en una superfamilia conteniendo centenares de genes codificantes para proteínas estrechamente relacionadas pero carecientes de actividad enzimática (Campetella et al. 1992). La TS de tripomastigotes tiene asociado en su extremo C-terminal una repetición en tándem altamente inmunogénica conocida como SAPA (por "Shed Acute Phase Antigen"). Recientemente se ha podido establecer que estas repeticiones participan en la permanencia en sangre de la TS (Buscaglia et al. 1998, 1999). En sueros de pacientes y de animales sobrevivientes a la infección, se encuentran anticuerpos neutralizantes de la actividad de TS y su detección ha permitido desarrollar un ensayo de diagnóstico altamente sensible (Leguizamón MS, et al 1994, 1997, 1998). Algunas de las proteínas inactivas incluidas dentro de la familia de la TS son capaces de ligar galactosas terminales unidas en beta, es decir, los aceptores naturales del residuo de ácido siálico transferido (Cremona ML et al, 1999). La actividad biológica de la TS en sangre está en estudio pero se ha comprobado su participación en la inducción de apoptosis en células del sistema inmune *in vivo* (Leguizamón MS et al, 1999). Para ello se requiere actividad enzimática dado que las moléculas enzimáticamente inactivas, aunque capaces de interactuar con galactosas terminales no inducen apoptosis indicando que es necesaria la movilización de residuos de ácido siálico. A partir de la estructura 3D de la sialidasa de *T. rangeli*, la cual posee una homología mayor al 80% con la TS, se pudo establecer la interacción de determinados residuos aminoacídicos en la catálisis y se pudo modelar la distribución de epitopes identificados por bibliotecas combinatorias.

Buscaglia CA et al, J. Infect. Dis. 177: 431 (1998); Buscaglia CA et al. Blood 93: 2025 (1999); Campetella O et al., Parasitol. Today 8: 378 (1992); Cremona ML et al, Glycobiology 9: 581 (1999); Leguizamón MS, et al, J. Infect. Dis. 170: 1570 (1994)

Leguizamón M.S et al. J. Infec. Dis. 175: 1272 (1997); Leguizamón MS et al. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 5: 254 (1998); Leguizamón MS et al. J. Infect. Dis. 180: 1398 (1999).

MR10. Cistein proteinasa en *Trypanosoma cruzi*. DUSCHAK VG¹, BARBOZA M¹, COUTO A²; de LEDERKREMER RM²; LAMMEL E³, de ISOLA ED³ Y CAZZULO JJ¹.

¹Inst. de Invest. Biotecnol., UNSAM; ²Depto de Quim. Orgánica. Fac. Cs. Exactas. y Nat., UBA, ³Depto de Microbiol. Parasitol. e Inmunol. Fac. de Medicina, UBA.

Las cisteínas proteinasas (CPs) son las peptidasas más estudiadas y mejor caracterizadas en Tripanosomátidos. En *Trypanosoma cruzi*, pertenecen a esta clase: a) cruzipaína, b) otras CPs de membrana, c) cruzipaína2, d) una CP de 30 kDa,

tipo catepsina B y e) una CP de alto peso molecular aparente identificada en tripomastigotes metacíclicos. a) La cruzipaína, cistein proteinasa principal del parásito, (Cazzulo. J. et al, 1997, Biol. Chem., 378,1-10) se expresa como una mezcla compleja de isoformas. La heterogeneidad en carga y tamaño aparente encontrada en las preparaciones enzimáticas naturales se puede atribuir: I) a la expresión simultánea de diferentes genes, con polimorfismos detectados fundamentalmente en el dominio C-terminal (C-T) de la molécula, que se traducen en cambios de residuos de aminoácidos que alteran el punto isoeléctrico de la molécula (Martinez, J. et al, 1998, FEMS Microbiol. Lett.,159, 35-39), II) a la distinta composición de los oligosacáridos que ocupan los posibles sitios de N-glicosilación de la molécula (Parodi et al, 1995, Mol. Biol. Par., 69, 247-255), y III) probablemente a otras posibles modificaciones postraduccionales. Hemos detectado la presencia de ácido siálico como componente de las cadenas de oligosacáridos unidos a Asn de la cruzipaína en el C-T. Esto sugiere que la enzima debe pasar por la superficie, aunque sea de manera transitoria, dado que los residuos de ácido siálico son agregados a los glicoproteínas por la transialidasa en la superficie del parásito. También se obtuvo evidencia de O-glicosilación (cadenas cortas de oligosacáridos unidos a residuos Ser y/o Thr), específicamente en el C-T. A esto debe sumarse la presencia de isoformas de membrana y de isoformas solubles que no se unen a Concanavalina-A. Las últimas se purificaron por afinidad a columnas de Cystatin-Sepharosa, fueron reconocidas por el suero policlonal específico anticruzipaína y presentaron un patrón electroforético heterogéneo, y de peso molecular aparente similar al de las isoformas que se unen a la lectina. Se verificó que están glicosiladas, pero con diferente patrón que el de las isoformas mayoritarias adsorbidas a Con-A. Ensayos preliminares indican que ambos grupos parecen tener diferente especificidad de sustrato. b) Isoformas de membrana: mediante extracción de parásitos con detergente Tritón X-114 seguida de partición en fases, identificamos CPs, tal vez isoformas de cruzipaína en la fase detergente, con diferente patrón electroforético al de las formas hidrofílicas. Las mismas están presentes en las distintas formas de desarrollo del parásito y reaccionan con el suero policlonal anticruzipaína. Están concentradas en la fracción microsomal obtenida por centrifugación diferencial, la cual consiste esencialmente de membrana plasmática y se marcan con derivados de biotina en condiciones de marcación exclusivamente de proteínas de superficie. Son inhibidas por E-64, inhibidor irreversible y específico de CPs y se unen a columnas de afinidad de Cystatin-Sepharosa. (Parussini et. al, Cell. Mol. Biol.,1998, 44, 513-519). c) Cruzipaína 2: El gen que codifica para la cruzipaína 2 (Lima et. al., Mol. Biol. Par., 1994, 67, 333-338) tiene 86% de homología con los genes ya secuenciados que codifican para isoformas de la cruzipaína (llamada cruzipaína 1). Las diferencias se ubican principalmente en el dominio catalítico, el cual carece del primer sitio potencial de N-glicosilación y presenta reemplazos de aminoácidos en los subsitios de unión a sustrato, lo que avala la diferente especificidad de sustrato encontrada entre ambas cruzipaínas; carece también de la última cisteína del C-T lo que podría determinar que tuviera un puente disulfuro menos. d) Se identificó una CP minoritaria de 30 kDa con alta homología con la catepsina B (García et. al., 1998, Mol. Biol. Par., 91, 263-272). Se clonó y secuenció el gen que la codifica, confirmando la homología predicha y se informó recientemente su antigenicidad en Enfermedad de Chagas. e) El análisis de los sobrenadantes de cultivo de diferenciación de epimastigotes de *T. cruzi*, cepa RA, estimulados con macerado de intestino de *Triatoma infestans* mostró, acompañando a la cruzipaína, una nueva actividad gelatinolítica de peso

molecular aparente entre 97-116 kDa, que sería una CP, pues es sensible a E-64 y no se inhibe por Pepstatina-A ni o-phenantrolina. No reacciona con el suero policlonal específico anticruzipaina, ni en condiciones desnaturalizantes ni en las de los geles de actividad (sin reducir ni hervir), y sería una glicoproteína con oligosacáridos de alta manosa, según se infiere de su comportamiento en columna de Con-A-Sepharosa. Esta nueva actividad de CP se observó también en sobrenadantes de cultivo de epimastigotes del clon CL Brener obtenidos por diferenciación espontánea, lo que sugiere que su expresión y secreción al medio sería un fenómeno general que acompaña a la metaciclogenesis.

MR11. Clonado molecular, secuenciación y expresión de un inhibidor de serin proteinasas de *Toxoplasma gondii*.

PSZENNY V¹, ANGEL S¹, PAULINO M², LEDESMA B¹, YABO M³, GUARNERA E¹, RUIZ A¹ Y BONTEMPI E J¹.

¹INP 'Dr. M. Fátala Chaben', A.N.L.I.S./Malbrán, ²Cátedra de Química Cuántica, Fac. de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ³INPB, Servicio de Bioterio de Experimentación, A.N.L.I.S. /Malbrán.

Toxoplasma gondii es un protozoo parásito intracelular obligado, miembro del phylum Apicomplexa y estrechamente relacionado a otros importantes parásitos como *Plasmodium* y *Eimeria*. Infecta a alrededor del 50% de la población mundial. La etapa aguda de la infección se caracteriza por la diseminación de la forma proliferativa del parásito, el taquizoito, mediante divisiones intracelulares. Esta etapa es controlada por el sistema inmunológico a través de respuestas mediadas por células T y B. La infección progresa sin demasiadas complicaciones hacia la etapa crónica caracterizada por la persistencia de parásitos enquistados (bradizoítos) en los tejidos del huésped. Hay dos dramáticas excepciones a estos procesos: 1) la reactivación de parásitos enquistados, resultando en encefalitis severa o fatal en individuos inmunodeficientes, y 2) la infección transplacentaria que puede conducir a importantes malformaciones neonatales o al aborto. Dentro del marco general concerniente a la búsqueda de antígenos del parásito de interés diagnóstico, protectorio y como potenciales blanco de terapias específicas, el presente trabajo tiene como objeto la caracterización y el estudio del rol biológico de una proteína de *T. gondii* con alta homología con inhibidores de serin proteinasas (serpin). En protozoos parásitos no se ha descrito hasta la fecha la presencia de este tipo de proteínas inhibidoras. Recientemente en nuestro laboratorio hemos aislado, mediante el rastreo inmunológico de una genoteca de cDNA de taquizoítos de *T. gondii* construida en el fago λ Zap, un clon (TgPI), que codifica para un inhibidor Serpin perteneciente a la familia Kazal. La familia de inhibidores Kazal es una de las más numerosas dentro de la superfamilia serpin. La estructura básica de este tipo de inhibidores consiste en uno o varios dominios que interactúan con sus correspondientes proteasas. Cada dominio contiene un residuo sitio reactivo rodeado por residuos de cisteínas ubicadas en posiciones extremadamente conservadas involucradas en tres puentes disulfuro intradominio. El sitio reactivo y la geometría de esta región, establecida por la relación topológica entre el sitio reactivo y los puentes disulfuro, confiere especificidad de acción. El clon TgPI aislado fue completamente secuenciado y contiene un marco de lectura abierto de 882 pares de bases que codifica para una proteína de 294 aminoácidos, con una secuencia N-terminal de 23 aminoácidos con las características de un péptido señal y un posible sitio de clivaje entre los aa 23 y 24. El peso molecular teórico de la proteína madura es de 31 kDa y su punto isoeléctrico 4.86. La proteína despliega una homología de se-

cuencia interna entre los residuos 30-66, 114-150, 181-217 y 247-283, indicando una estructura de cuatro dominios. Basado en la secuencia de aminoácidos los cuatro dominios exhiben homología significativa con inhibidores de serin proteinasa tipo Kazal. La mayor homología fue encontrada con el inhibidor de triptasa (LDTI) del gusano parásito *Hirudo medicinalis*. (Sommerhoff et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler 375:685-694, 1994). Experimentos de Southern Blot de ADN genómico total, mostraron que el gen existe en copia única. Secuenciación de fragmentos de ADN genómico amplificados por PCR utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia del cDNA mostraron que el gen tiene aproximadamente 3000 pares de bases y posee intrones. Para su expresión, un fragmento que codifica para la proteína madura, amplificado por PCR a partir del clon de cDNA TgPI, fue subclonado en el plásmido de expresión pQE30, el cual agrega 6 residuos de His en el extremo N-terminal de la proteína. La proteína expresada fue purificada por cromatografía de afinidad utilizando una columna de níquel y analizada por SDS-PAGE. Un inhibidor de proteasas en *Toxoplasma gondii* podría estar implicado en la protección al ataque de los jugos digestivos del huésped, evasión a la respuesta inmune y/o autorregulación de los mecanismos de invasión que involucren serin proteinasas. La real función de esta proteína está siendo investigada.

Quimioterapia y marcadores de evolución en parasitosis. SOSA ESTANI S. coordinador

MR12. Criterium of serological cure in treated chronic chagasic patients by chemiluminescent immunoassay using *Trypanosoma cruzi* trypomastigote mucins.
ALMEIDA IC¹, PEREIRA-CHIOCCOLA VL², PIOVEZAM AG¹, SILVA L.S³, VELAZQUEZ E⁴, FRAGATA AA², SEGURA EL⁵, SOSA ESTANI S⁶, TRAVASSOS L.R³.

¹Department of Parasitology, USP, São Paulo; ²Laboratory of Xenodiagnosis, Instituto Dante Pazzanese de Cardiología, São Paulo; ³Cell Biology Division, UNIFESP, São Paulo; ⁴INP Dr. Mario Fátala Chaben/ANLIS, Malbrán; ⁵ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, ⁶CeNDIE/ANLIS Malbrán.

The efficacy of chemotherapy in patients with Chagas' disease has been the centre of much controversy. Nevertheless, at present it is well accepted that the drug benznidazole is very effective in the acute phase of the disease. In the chronic phase, however, due to the absence of a clear clinical evolution in the majority of patients, the follow-up of treatment is based on serological tests that usually employ a great variety of epimastigote antigens. Therefore, these complex preparations lack specificity and are not adequate for an accurate post-treatment monitoring. Here, we have evaluated the efficacy of chemotherapy in two distinct panels of patients, using a highly sensitive and specific chemiluminescent ELISA (A&T CL-ELISA) (Almeida et al., *Transfusion* 37:850,1997), which employs purified trypomastigote mucins as antigens (Almeida et al., *Biochem. J.* 304:793,1994). This assay has previously been used to successfully monitor the treatment in children with chronic Chagas' infection (Andrade et al., *Lancet* 348:1407,1996). The first panel consisted of 56 chronic adult patients, diagnosed by conventional serology (IHA, IIF and ELISA) and treated with benznidazole for 60 days (5 mg/Kg/day). Before treatment and up to 10 years afterwards, 3-10 serum samples per patient were analysed by A&T CL-ELISA. The majority (>95%) of the patients showed decreasing serum titers for trypomastigote mucins according to an exponential function: $Y = Y_0 \times 10^{-kt}$, where Y is the titer in relative luminescent

units (RLU); Y_0 is the serum titer before treatment, according to the exponential function; k is the constant for each patient's curve; t is the time in years. To estimate the time for negative seroconversion, the Y value in the formula above is equivalent to the cutoff value for the A&T CL-ELISA. Three groups according to the negative correlation coefficient (r) of their titration curves were identified: 1) -0.801 to -1.0 ($n=31$; 55.4%); 2) -0.601 to -0.8 ($n=13$; 23.2%); and 3) -0.001 to -0.6 ($n=12$; 21.4%). Only curves with a high negative r value (>0.6) were used for a reliable prognosis of negative seroconversion, in agreement with the exponential function. The time for seroconversion is dependent on the titer at the beginning of treatment (Y_0) and the k value for each curve. At the end of the follow-up, 14 patients of group 1 and 4 patients of group 2 were considered negative for the A&T CL-ELISA, showing an average time for negative seroconversion of 4.1 ± 2.0 and 9.7 ± 6.1 years, respectively. For 17 patients of group 1 with still positive A&T CL-ELISA results, the average time for negative seroconversion is estimated in 8.2 ± 3.3 years. All 13 patients of group 3 remained positive for the CL-ELISA at the end of the follow-up. Also, three patients in this group showed very low k values (≤ 0.03) as they did not respond to the treatment. None of the patients in groups 1 and 2 presented positive xenodiagnosis and/or hemoculture at the end of the follow-up. The second panel consisted of children (6-12 years of age) with chronic indeterminate phase of Chagas' disease, submitted to treatment with either benznidazole (5 mg/Kg/day; 60 days) ($n=44$) or placebo ($n=44$), as previously described (Estani *et al.*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59:526,1998). Serological titers for trypanomastigote mucins were evaluated before treatment and 12 and 48 months after the onset of chemotherapy. All patients were positive for A&T CL-ELISA before the treatment. Forty-eight months following the end of chemotherapy, 24 patients (55%) in the benznidazole-treated group and 3 patients (7%) in the placebo-treated group were negative for the A&T CL-ELISA. All these patients were also negative for xenodiagnosis. Taken these data together, we can conclude that the CL-ELISA using trypanomastigote mucins can successfully evaluate the efficacy of benznidazole treatment in both chronic and acute Chagasic patients. Furthermore, the A&T CL-ELISA may be used for a reliable prognosis of the time required for serological cure in patients with chronic Chagas' disease. Supported by FAPESP and ANLIS Malbrán.

MR13. Utilización de la histona H3 de *Leishmania* como antígeno específico para el diagnóstico de leishmaniosis humana. TARANTO NJ¹, SEMBAJ A², SOTO M³, REQUENA JM³, ALONSO CA³, MORENO JM².

¹Inst. de Investig. en Enfermedades Tropicales, UN de Salta; ²Química Biológica, CEPIDEM, Fa. Cs.Médicas, UNC; ³CBM "Severo Ochoa", España.

La leishmaniosis es una zoonosis causada por distintas especies de protozoarios parásitos del género *Leishmania*, transmitida por dípteros flebotomíneos del género *Lutzonia*. La leishmaniosis tegumentaria americana es considerada en el norte argentino una patología endemo-epidémica de la selva chaqueña y de áreas de desmonte, constituyendo un importante problema de salud pública, toda vez que se observan brotes en nuevas regiones, sin antecedentes históricos, como por ejemplo la selva misionera. La enfermedad, fundamentalmente cutánea, comienza con un eritema ocasionado por la picadura del flebotomo infectado, que rápidamente se convierte en úlcera. Esta se caracteriza por tener lecho granulomatoso con bordes sobre-elevados y violáceos. El tratamiento consiste en la administración, por vía intramuscular, de antimoniales pentavalente regulándose la dosis en mg/kg de peso corporal.

El diagnóstico se realiza por frotis del borde de la lesión en procura de visualizar, previa coloración, amastigotes en macrófagos hísticos. Se emplea además cultivo en medio NNN, de material obtenido por biopsia. En general los parásitos están presentes en escasa cantidad, en particular cuando la especie involucrada es *L. brasiliensis*, por lo que se hace difícil su observación y diagnóstico. Un método de diagnóstico complementario consiste en la Intradermoreacción de Montenegro que evalúa la respuesta inmunocelular tardía, mediante la inoculación intradérmica de una suspensión de promastigotes de *Leishmania*. Diferentes proteínas intracelulares del parásito (kinesinas, hsp70, proteínas ácidas ribosomales) han sido descritas como antígenos inmunodominantes durante el curso de la infección. Sobre esta base, se han desarrollado diferentes métodos serodiagnósticos para el reconocimiento diferencial específico de leishmaniosis: La sensibilidad y especificidad de estos métodos depende del tipo fuente y pureza del antígeno empleado, ya que muchos antígenos presentan epitopes comunes con proteínas de otros hemoparásitos. En canes infectados con *L. (d) infantum* se observó que el 81% de los sueros muestran reactividad frente a la histona H3 del parásito y que existe una correlación directa entre el nivel de anticuerpos anti-histona y la progresión de la enfermedad. En este trabajo se analizó el valor diagnóstico del antígeno H3 de *Leishmania* para el diagnóstico específico de leishmaniosis en humanos. En una primera etapa se aisló el cDNA que codifica para la histona H3 de *L. (d) infantum*; el mismo fue clonado en el plásmido de expresión pQE con la finalidad de producir la proteína recombinante en *E. coli*. La proteína recombinante fue purificada mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas de níquel-agarosa. La presencia de anticuerpos anti-H3 de *Leishmania* en sueros humanos se determinó por ELISA utilizando H3 recombinante como antígeno y anti-IgG humana-peroxidasa como anticuerpo secundario. En pacientes con leishmaniosis se determinó la carga parasitaria en frotis del borde de la lesión, diámetro de la herida, localización y tiempo de evolución. Estas variables no mostraron diferencias significativas frente a la reactividad determinada por ELISA. Las reactividades más altas corresponden al grupo con leishmaniosis ($0,66 \pm 0,1$), que se diferencia significativamente de los sanos y chagásicos ($0,33 \pm 0,05$ y $0,35 \pm 0,04$). ($p < 0,01$). Estos últimos grupos no muestran diferencia entre sí. Los resultados indican que durante la infección con *Leishmania* hay respuesta inmune-específica en contra H3 del parásito. El suero de pacientes con Chagas no muestra anticuerpos capaces de reaccionar con el antígeno recombinante. Consideramos que la histona H3 recombinante podría ser utilizada para serodiagnóstico de leishmaniosis, en especial, en áreas endémicas para Chagas.

MR14. Evolución clínica y serológica en niños en fase indeterminada de la infección por *Trypanosoma cruzi*, tratados con Benznidazol. Seguimiento de 7 años. SOSA ESTANI S¹, SEGURA EL², CURA E³, VELAZQUEZ E⁴, PRADO N⁴.

¹CeNDIE/ANLIS-Malbrán; ²ANLIS-Malbrán; ³CNCC de Biológicos/ANLIS-Malbrán. ⁴INP «Dr. Mario Fatała Chaben»/ANLIS-Malbrán; Secretaría de Salud, Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación, Buenos Aires, Argentina. Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación y el TDR/OMS.

Introducción: En un trabajo previo demostramos, a través de un ensayo clínico controlado a doble ciego, la eficacia del tratamiento con Benznidazol (Bz) contra la infección por *T. cruzi* en un seguimiento de 48 meses (Sosa Estani S et al, *Am J Trop*

Med Hyg, 59(6):526-529, 1998). Basados en los resultados, consideramos relevante evaluar, a través de estudios serológicos y parasitológicos, si los resultados son consistentes 84 meses después de realizado el tratamiento. -Objetivos: 1-Evaluar en niños entre 6 y 12 años de edad en fase Indeterminada de la infección por *T. cruzi*, el efecto del Benznidazol dado a 6 mg/Kg./día, en 2 tomas, durante 60 días, 84 meses después de tratados. 2- Evaluar la presencia de cambios clínicos y electrocardiográficos en la misma población. -Metodología: El área en el norte de Salta, localizada al noroeste de Argentina, está bajo un continuo sistema de vigilancia del vector desde 1982. Sesenta y siete personas fueron evaluadas con edades entre 13 y 19 años en 1998. El efecto del tratamiento fue evaluado con 3 técnicas serológicas, con antígeno(Ag.) total, antes y después del tratamiento; y en repeticiones a los 3, 6, 12, 18, 24, 48 y 84 meses. Las técnicas serológicas fueron hemoaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI), ensayo inmuno-enzimático (EIA-ANLIS) y EIA con un antígeno recombinante, F29 (Ag F29). Se realizó xenodiagnóstico al final del seguimiento. Los niños que recibieron placebo en 1991 debían ser tratados con Benznidazol al final del seguimiento de 48 meses. De los 33 niños que fueron encontrados en 1998, solamente 13 habían respondido a la convocatoria para recibir el tratamiento. En 1998 fueron clasificados de acuerdo al antecedente del tratamiento con Bz al momento de la evaluación, en: Pacientes tratados con Bz en 1991 (TBz91=34), Pacientes tratados con placebo en 1991, sin tratamiento con Bz en 1998 (TP=20) y Pacientes tratados con placebo en 1991 y tratados con Bz en 1997 (TBz97=13) - Resultados: El examen clínico no mostró antecedentes patológicos serios para los sistemas cardiovascular, digestivo, neurológico y locomotor. En el análisis serológico, a los 84 meses de seguimiento la media del log₂ de los títulos entre TP y TBz97 no fue diferente estadísticamente, por lo que se analizó como un solo grupo. Durante el seguimiento, se observó una disminución significativa de los títulos de HAI e IFI, y Densidad Óptica (OD) de EIA-ANLIS medidos en los TBz91, siendo más pronunciada al final del seguimiento (Tabla). Tabla: Seguimiento serológico en niños tratados con Benznidazol o placebo. 84 meses de seguimiento. Salta, Argentina, 1991-1998.

Entre los TP y TBz97 hubo un discreto cambio en la media a los 84 meses. La EIA-ANLIS mostró una disminución significativa de la D.O. a los 84 meses. La frecuencia de casos con 2 o 3 pruebas con resultados «no reactivos» fue mayor en los TBz91 (51.5%) que en los TBz97 (15.4%) y los TP (5.5%). El porcentaje de pacientes con 3 pruebas «no reactivas fue 24.2% en los TBz91 significativamente mayor al 11% observado a los 48 meses, y 0% entre los TBz97 y TP. En el análisis usando EIA con Ag. F29 se observó una disminución significativa de la D.O. en todos los grupos. Aunque a los 84 meses la media de D.O fue significativamente menor en los TBz91 (0.163±0.087) que en TBz97 (0.236±0.135) y TP (0.223±0.106). Los xenodiagnósticos realizados resultaron positivos en 50%, 7.6% y 3.% en los TP, TBz97 y TBz91 (p<0.001), respectivamente. Se tomaron las providencias para que los pacientes que aún estaban sin tratamiento con Bz en 1998 lo recibieran. - Conclusiones: El tratamiento con Bz en niños entre 6 y 12 años de edad, no mostró secuelas clínicas a los 7 años de seguimiento.- No se observaron cambios significativos en el electrocardiograma en cualquiera de los grupos.- El tratamiento demostró ser efectivos a través de los diferentes indicadores:- 24.2% de seroconversión después del tratamiento entre los TBz91 y 0% entre los TP y TBz97.-La disminución significativa de los títulos entre los TBz91 se observó a partir del tercer

mes postratamiento, mientras que entre los TP/TBz97 se observó solamente a los 84 meses. - La disminución de la reactividad usando Ag. F29 fue mayor entre los TBz91 que en los TP/TBz97. - La parasitemia, fue significativamente mayor entre los TP que en los TBz91/TBz97.-Los parámetros de evaluación de la eficacia por serología tienen resultados variables, y dependen de la edad del paciente al recibir el tratamiento y el tiempo transcurrido hasta la evaluación.La ausencia de anticuerpos o resultados negativos entre los TP podría deberse a que:-Para establecer una infección por *T. cruzi* a largo plazo, serían necesarias frecuentes picadas infectantes. En otras palabras, la ocurrencia de la transmisión como evento único y asilado puede generar una resistencia natural a lo largo del tiempo (cura espontánea), en ausencia de nuevas exposiciones a picadas infectantes. Esto estaría relacionado a la vigilancia entomológica continua que se ejerce en el área. Estos resultados muestran una vez más el impacto de las acciones del control y vigilancia del vector, con la posibilidad de la cura espontánea en niños recientemente infectados y viviendo (durante más de 7 años) en residencias bajo vigilancia entomológica.

MR15. Utilidad clínica de s-VCAM-1 y s-P-Selectina en la evaluación de niños chagásicos tratados con benznidazole. LAUCELLA S.

Instituto Nacional de Parasitología «Dr. Mario Fatala Chaben»/ ANLIS Malbrán Buenos Aires.

En los últimos años diversa evidencia ha demostrado que el tratamiento específico contra el *Trypanosoma cruzi* previene la progresión hacia la patología cardíaca asociada a la enfermedad de Chagas (Viotti, 1994). El tratamiento con benznidazole está indicado en la etapa aguda de la infección y en la infección crónica reciente (Sgambatti, 1996; Sosa Estani, 1998). Sin embargo, la evaluación del tratamiento es aún complicada ya que la mayoría de los pacientes presentan serología convencional positiva por largo tiempo. La respuesta inmune, asociada con mecanismos protectores y patogénicos en la infección con el *T. cruzi*, es altamente regulada por la expresión de distintas moléculas de adhesión celular (MACs). En un trabajo anterior hemos demostrado que existe una expresión diferencial de MACs, involucradas en la extravasación de leucocitos hacia los sitios de inflamación, durante las etapas aguda y crónica de la infección (Laucella, 1996). Los niveles de la molécula de adhesión vascular 1 soluble (s-VCAM-1) y la selectina plaquetaria soluble (s-P-selectina) se evaluaron en el suero de niños en fase indeterminada de la enfermedad de Chagas. Asimismo, se evaluó el efecto del tratamiento con benznidazol sobre los niveles de dichas moléculas (Laucella, 1999 *en prensa*). Cuarenta y un niños chagásicos fueron seleccionados entre 106 niños provenientes de área endémica de nuestro país tratados con benznidazol (Sosa Estani, 1998). Los niveles de s-VCAM-1 y s-P-selectina se determinaron antes (día 0) y al final del tratamiento (día 60) con benznidazol (n=23) o placebo (n=15). Los niveles de s-VCAM-1 y s-P-selectina se encontraron aumentados durante la fase indeterminada de la infección con el *T. cruzi* antes del tratamiento específico. Sin embargo, un pequeño grupo de pacientes presentó niveles comparables a los controles no infectados sugiriendo diferencias en el grado de activación del sistema inmune entre estos pacientes. Una correlación positiva se observó entre s-VCAM-1 y s-P-selectina demostrando que su regulación *in vivo* es en cierta medida coordinada. Esto se debe probablemente a la existencia de un perfil de citoquinas inflamatorias inductoras de MACs similar en cada paciente así como por la observación de que algunas citoquinas inducen la expresión de ambas moléculas. Los niveles de s-VCAM-1 y s-P-selectina disminu-

Grupo	Control meses	HA- ANLIS ()	IFI- ANLIS ()	EIA- ANLIS(*)
TBz 91	0,	7.98	7.05	0.467
	n=51	(1.82)	(1.12)	(0.099)
	48,	5.93	5.65	0.343
	n=44	(2.11) ^a	(2.18) ^a	(0.094) ^a
	84,	4.55	3.75	0.189
	n=34	(2.91) ^a	(2.91) ^a	(0.102) ^a
TP/ TBz 97	0,	8.00	6.80	0.472
	n=50	(1.16)	(1.22)	(.095)
	48,	7.47	6.97	0.501
	n=44	(0.95)	(1.39)	(0.115)
	84,	7.12	6.09	0.310
	n=33	(2.67)	(1.64) ^a *	(0.113) ^a

Referencia: * p<0.01, ^ap<0.00, () media del log₂, (*) media de D.O

yeron significativamente al día 60 de tratamiento con benznidazol en contraposición a lo observado en el grupo placebo. 67% de los niños chagásicos con niveles basales de s-P-selectina por encima del cut-off, mostraron niveles comparables a los controles no infectados al final del tratamiento con benznidazol, mientras que el 41% presentó niveles de s-VCAM-1 comparables a los niños no infectados. Contrariamente, no se observaron variaciones en los niveles de estas moléculas en los niños chagásicos que presentaban valores basales por debajo del cut-off, ya sea luego del tratamiento con benznidazol o placebo. Las variaciones en los niveles iniciales de estos MAC y su monitoreo en los pacientes chagásicos en fase indeterminada, permitiría distinguir poblaciones de pacientes con diferente grado de sensibilidad a la terapia específica. Nuestros resultados corroboran que los niveles de s-VCAM-1 y s-P-selectina se encuentran aumentados como consecuencia de la infección con el *Trypanosoma cruzi*. y sugieren que s-P-selectina sería un marcador temprano de "clearance parasitario". Queda por esclarecer si s-P-selectina pudiese ser un marcador temprano de eficacia terapéutica. Financiación: Ministerio de Salud y Acción Social, FONCYT, CONICET.

Patogenia en parasitosis. POSTAN M. coordinadora

MR16. Remodelación miocárdica durante la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. ARNAIZ MR.

INP "Dr. Mario Fatala Chaben" /ANLIS Malbrán Paseo Colón 568. Buenos Aires.

Introducción: La cardiopatía chagásica se caracteriza por la presencia de miocarditis con necrosis de fibras musculares cardíacas, nidos parasitarios e infiltrados inflamatorios. Este proceso es reemplazado por fibrosis con engrosamiento de las paredes y dilatación de las cavidades, constituyendo una cardiopatía dilatada (Laranja et al., 1956, Rosenbaum MB., 1964). Tradicionalmente se ha tenido el concepto de que el aumento de tamaño del corazón se realizaba solamente a expensas de un aumento del tamaño de las células musculares cardíacas (hipertrofia). Sin embargo se ha descripto recientemente la capacidad de las células musculares cardíacas de proliferar (hiperplasia, Liu et al., 1995, Quaini et al., 1994). Siempre se ha atribuido al compartimento intersticial, la función de responder ante situaciones de estrés del miocardio, a través, de la replicación de sus células o bien de la síntesis de colágeno.

La actividad proliferativa de las células musculares cardíacas e intersticiales se determinó utilizando un anticuerpo monoclonal de proliferación nuclear anti-PCNA, indispensable para la duplicación de las cadenas de ADN y para la replicación celular. Nosotros hemos utilizado ratas para nuestro trabajo porque las ratas reproducen la cardiopatía chagásica del humano y porque la mayoría de los estudios sobre remodelación miocárdica fueron llevados a cabo en sistemas experimentales de ratas y perros. Materiales y métodos: Ratas Wistar de 4 a 6 semanas de edad fueron infectadas intraperitonealmente con 10⁶ parásitos de trypomastigotes del clon SylvioX-10/4. En diferentes momentos de la infección los animales fueron, sacrificados por dislocación cervical, se les diseccionó el corazón y se hicieron cortes transversales seriados de las paredes ventriculares. Los cortes fueron fijados en formol buffer y luego procesados rutinariamente, para técnicas de hematoxilina-eosina y de Inmunohisto-química con peroxidasa contrastada con PAS. Se cuantificaron los núcleos PCNA+ de las células musculares cardíacas e intersticiales y el número de núcleos/área, en cuatro focos inflamatorios y cuatro focos no inflamatorios de cada una de las paredes cardíacas, utilizando una grilla colocada en el ocular del microscopio que comprende una superficie de 0.062 μ (X850). Se evaluaron en el mismo sistema experimental parámetros de hipertrofia celular como la determinación del número de núcleos/volumen de miocardio (Anversa et al., 1984, 1986b, Loud et al., 1978) y área nuclear (Arbustini et al., 1992). Se midieron los diámetros transversales y longitudinales de los núcleos con una regla micrometrada de 100 μ colocada en el ocular del microscopio (1200X). Se analizaron los datos con el método de análisis de varianza ANOVA de los datos con homogeneización de la muestra.

Conclusiones: En la miocarditis chagásica experimental hay aumento de la actividad proliferativa de las células miocárdicas e intersticiales, preferentemente en relación a los focos inflamatorios. El proceso de fibrosis también está relacionado con la inflamación y aumento de la actividad proliferativa. El número de núcleos/volumen fue menor en los focos inflamatorios y el área nuclear presentó valores más bajos en los focos inflamatorios que en los no inflamatorios, sugiriendo hipotrofia celular. Como conclusión de estos resultados se puede inferir que la hipertrofia y la hiperplasia intervienen en el proceso de remodelación del miocardio

MR17. Modulación en la expresión de ligandos de moléculas de adhesión celular en la enfermedad de Chagas crónica. LAUCELLA SA.

INP "Dr. Mario Fatala Chaben"/ANLIS Malbrán Av. Paseo Colón 568, 1063 Buenos Aires.

La consecuencia patológica más importante de la infección por *Trypanosoma cruzi* es el desarrollo de cardiomiopatía en la fase crónica de la infección (Laranja et. al. 1956). Si bien la patogénesis de la enfermedad de Chagas no se ha aclarado en su totalidad, diversa evidencia muestra la participación de la respuesta inmune (Petry & Eisen 1989, Higuchi et. al. 1993).

El funcionamiento del sistema inmune depende de la expresión coordinada de diversas moléculas de adhesión celular. Así, el reclutamiento de leucocitos hacia los sitios de inflamación involucra una serie de eventos consecutivos en los que distintas moléculas de adhesión celular, citoquinas y quimioquinas actúan en forma regulada dirigiendo los leucocitos desde el lumen vascular y a través del endotelio hacia el estímulo inflamatorio. Sin embargo una desregulación en este proceso resultaría perjudicial para el huésped (Wahl et.al. 1996). En un trabajo previo (Lauella et. al. 1996) hemos demostrado que los niveles de s-P-selectina (selectina plaquetaria soluble) y s-VCAM-1 (molécula de adhesión vascular-1 soluble),- expresa-

das en plaquetas y/o células endoteliales activadas, respectivamente -, están aumentados en el suero de pacientes chagásicos crónicos. s-P-Selectina se asoció con el grado de compromiso clínico de los pacientes. Recientemente, hemos determinado la expresión de alpha-4 integrinas (CD49d) y sialyl lewis x (Sle^x), - ligandos de VCAM-1 y P-Selectina respectivamente -, en linfocitos periféricos de pacientes chagásicos crónicos con diferente severidad de la enfermedad. Los pacientes chagásicos con compromiso cardíaco leve mostraron una disminución en el porcentaje de células CD49d⁺ en comparación al encontrado en pacientes con compromiso cardíaco severo o controles no infectados. La expresión de CD49d disminuye tanto en células CD3⁺ como CD3⁻. La observación de que existe una modulación de a4b1 y a4b7 integrinas durante la activación de células T y B (Hernández-Casalles et. al. 1996, Postigo et. al. 1991) sugiere que la disminución de células CD49d⁺ tendría consecuencias importantes en la activación y migración de linfocitos. Contrariamente, los linfocitos de pacientes chagásicos con compromiso cardíaco severo presentaron una disminución en la expresión de Sle^x. La asociación entre niveles aumentados de s-P-selectina con una disminución en la expresión de su ligando sugiere un rol importante de la vía P-selectina /Sle^x en el desarrollo de daño tisular ya que la expresión de Sle^x es modulada luego de la unión a su ligando (Munro et. al. 1992). Asimismo, los niveles de s-PECAM-1 (molécula de adhesión endotelio-plaqueta-1 soluble) - molécula que participa en la etapa final de la migración de leucocitos- están aumentados durante la fase crónica de la enfermedad mientras que los niveles de s-MCP-1 (molécula quimiotáctica para monocitos-1 soluble) no se vieron alterados. Los niveles más elevados de s-PECAM-1 se observaron en los pacientes en estadio más avanzado de la enfermedad. En síntesis, los pacientes chagásicos crónicos con diferente compromiso clínico presentan una expresión diferencial de los ligandos celulares de P-Selectina y VCAM-1 así como niveles alterados de moléculas de adhesión celular circulantes. La presencia de distintos mecanismos de interacción célula - célula, así también como célula - matriz extracelular, podrían tener un rol importante en el desarrollo de las lesiones inflamatorias progresivas características de la enfermedad de Chagas. Financiación: Ministerio de Salud y Acción Social, FONCYT, CONICET.

MR18. Mecanismo de modulación de granulomas en la esquistosomiasis experimental. MIRKIN GA,

Depto de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Fac de Medicina. UBA.

La infección humana y de diversos mamíferos, utilizados como modelos experimentales, por parásitos de la especie *Schistosoma mansoni* se caracteriza por el desarrollo de granulomas periovais en las paredes del intestino grueso, hígado y, excepcionalmente, en el bazo. Estos están constituidos por un core, el huevo, rodeado por macrófagos, células gigantes, leucocitos eosinófilos, plasmocitos y linfocitos T CD4. Si bien hay un consenso generalizado en cuanto al papel que los linfocitos T CD4 juegan en la formación de los granulomas, existen opiniones divergentes con relación al papel que tienen los linfocitos Th1 (productores de IL-2 e IFN- γ) y Th2 (productores de IL-4, IL-5 e IL-10), en las etapas de inducción y mantenimiento de dichas estructuras (1). Otro de los aspectos centrales, con relación a la dinámica de formación de granulomas, es el fenómeno de modulación que se observa durante la fase crónica de la infección. En esta etapa, los granulomas que se forman *de novo* desarrollan un menor tamaño que los formados durante la etapa aguda, aún considerando idénticos tiempos de evolución. Uno de los factores esenciales asociados a este fenómeno es la producción de IL-10 (2). Esta citocina,

producida tanto por linfocitos Th-2 como por macrófagos en los granulomas, modula negativamente la expresión de moléculas de coestimulación CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2), necesarias para inducir la activación de linfocitos T CD4 naïve y de memoria (3). Las manifestaciones clínicas que resultan de la formación de los granulomas en el colon e hígado encuadran la enfermedad dentro de tres categorías, esquistosomiasis intestinal, hepática y hepato-esplénica, relacionadas con el compromiso orgánico. En ese orden también, se acentúan las consecuencias patológicas de la infección. Las manifestaciones clínicas parecen estar asociadas, al menos en parte, a la expresión de ciertos haplotipos del MHC en el hombre y el ratón (4). En este modelo experimental, las líneas de ratones que expresan el haplotipo H-2^k (por ejemplo, CBA/J, CBA), desarrollan granulomas de gran tamaño, que resultan extensas áreas de fibrosis durante la fase crónica. Además, se observa frecuentemente la presencia de granulomas esplénicos. Por el contrario, los ratones que expresan H-2^b (por ejemplo, C57BL/6, B6), desarrollan granulomas pequeños, que resulta en una fibrosis leve durante la etapa crónica de la infección. En este marco quisimos evaluar el papel que la apoptosis de los linfocitos T CD4, tiene en la expresión de las diferencias observadas en la modulación de los granulomas desarrollados en ratones CBA y B6. Nuestra hipótesis era que los primeros debían presentar menores niveles de apoptosis con relación a los segundos, dando lugar a granulomas de mayor tamaño. El análisis mediante citometría empleando la técnica de TUNEL, de linfocitos T CD4 obtenidos de ganglios mesentéricos, no demostró diferencias significativas entre líneas de ratones. La situación fue distinta cuando se analizaron los linfocitos T CD4 obtenidos de granulomas. Los ratones B6 mostraron niveles significativamente mayores de apoptosis con relación a los ratones CBA. Esto indicaría que durante la fase crónica de la infección experimental por *S. mansoni*, la apoptosis no está asociada a la inducción de la respuesta inmune, fenómeno que ocurre en los ganglios linfáticos, sino a la etapa efectora, que se manifiesta en los granulomas. Estos resultados nos orientaron a pensar que la apoptosis podía ser consecuencia de un mecanismo de muerte celular inducida por activación (AICD) o por privación de IL-2 de las células de memoria o efectoras en el granuloma. Para investigar esto evaluamos, en primer lugar, los niveles de expresión del receptor para IL-2, analizando la expresión de CD25. Al igual que lo observado para la apoptosis, no se detectaron diferencias significativas en la expresión de esta molécula en los ganglios regionales. Por el contrario en los granulomas se observó mayor frecuencia de células T CD4 expresando este marcador en los ratones CBA, en comparación con los ratones B6. En esos últimos, además, un porcentaje pequeño de las células presentaba niveles elevados de expresión del receptor (mayor intensidad media de fluorescencia, mfi). La expresión elevada de este receptor en ausencia de IL-2 en el medio celular, también es un factor conducente a la apoptosis. La apoptosis elevada y la escasa proporción de células que expresaba IL-2R (es decir, activadas) en los ratones B6 se vio también reflejada en la menor capacidad de los linfocitos T CD4 de granuloma, para proliferar en respuesta al Ag específico (SEA, «soluble egg antigen») e IL-2, en comparación con los linfocitos T CD4 de ratones CBA. Estos resultados mostraron que los linfocitos T CD4 de los ratones B6 eran incapaces de responder a IL-2 exógena. Esta incapacidad se correlaciona con la baja proporción de linfocitos que expresan el receptor para esta citocina. La función efectora de los linfocitos Th1 y Th2 de los granulomas se evaluó mediante el análisis de la producción de IL-2, IFN- γ , IL-5 e IL-10, mediante ELISA en sobrenadantes de cultivo. En ambas líneas de ratones se observó predominio de citocinas Th2, característico de

la fase crónica. Además, los ratones B6 produjeron cantidades significativamente menores de todas las citocinas, en comparación con los ratones CBA, siendo los niveles de IL-2 los más bajos. Estos datos indican que no solamente está alterada la capacidad de los ratones B6 de responder a IL-2 exógena, sino de producirla. Como resultado de esto, se verían afectadas la capacidad de sostén autocrino y paracrino de la proliferación, inducida por IL-2. Previamente se había comunicado mayor susceptibilidad a la apoptosis en líneas y clones de linfocitos Th1 que en Th2 (5). Dado que los resultados de producción de citocinas nos orientaban a pensar que la esquistosomiasis no escapaba a este paradigma, decidimos evaluar mediante citometría de flujo la proporción de células apoptóticas productoras de citocinas Th1 (IFN- γ e IL-2 y Th2 (IL-5 e IL-10). Si bien el análisis volvió a demostrar un mayor porcentaje de linfocitos T CD4 apoptóticos en los granulomas de ratones B6 comparados con los de CBA, no se observaron diferencias en la proporción de células apoptóticas en las subpoblaciones Th1 y Th2. Estos resultados sugieren que las diferencias observadas previamente, dependen del establecimiento de líneas o clones de linfocitos T, pero no son necesariamente operativos *ex vivo* o *in vivo*. Como conclusión, estos estudios muestran que: Las diferencias clínico - patológicas en la esquistosomiasis experimental están relacionadas con diferencias en la susceptibilidad a la apoptosis de los linfocitos T CD4 de los ratones B6 y CBA. Dicha susceptibilidad parece asociada a las diferencias en la capacidad de producción de, y respuesta a IL-2. No hay diferencias de susceptibilidad a la apoptosis en células Th1 y Th2, en las dos líneas de ratones estudiadas. Esto sugiere que el sesgo de la respuesta Th1 a Th2 que se observa en las infecciones agudas y crónicas no está relacionado con apoptosis diferencial de células Th1. Bibliografía (1) J. Immunol., 147: 3921, 1991; J. Immunol., 150: 1413, 1993; Exp. Parasitol., 90:122, 1998; J. Immunol., 160:1850, 1998. (2) J. Immunol., 145: 2697, 1990; J. Immunol., 153: 5190, 1994; J. Immunol., 156: 3315, 1996 (3) Curr. Opin. Immunol., 5:361, 1993; Ann. Rev. Immunol., 14: 233, 1996. (4) J. Immunol., 123: 1829, 1979; Am. J. Trop. Med. Hyg., 37: 85, 1987. (5) Int. Immunol., 6: 1545, 1994; PNAS, 94: 5778, 1997; J. Exp. Med., 185: 1837, 1997.

Patologías asociadas a la inmunosupresión.

LIEN K. coordinador

MR19. Aplicación de técnicas moleculares al diagnóstico de las infecciones por protozoarios oportunistas. CARNEVALES.

Dpto. de Parasitología Sanitaria de INP "Dr. Mario Fatała Chaben" ANLIS/Malbrán.

Los protozoarios reconocidos como patógenos importantes que afectan a pacientes con SIDA incluyen: *Cryptosporidium* sp., *Isospora belli*, *Cyclospora cayetanensis*, Microsporidios, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* sp. y *Toxoplasma gondii*. Diferentes técnicas de biología molecular han sido aplicadas al diagnóstico de estos protozoarios en muestras biológicas y ambientales, que incluyen métodos de hibridación molecular y amplificación génica mediante PCR. Los elementos del genoma que se han estudiado con estos fines involucran, para los parásitos entéricos, los genes del rRNA y sus correspondientes espaciadores intergénicos. En *T. cruzi* y *Leishmania* sp., ha sido empleado, con preferencia, el DNA del kinetoplasto. En *T. gondii*, se han utilizado para el diagnóstico secuencias del gen B1, P30, ribosomales y repetitivas. Se ha desarrollado un test de nested-PCR para detección de *Cyclospora* que amplifica la región del 18S rRNA, pero el amplicón generado tiene el mismo tamaño molecular que en *Eimeria*. La posibilidad de dife-

renciar el producto de amplificación tiene importancia en muestras ambientales y alimenticias, para lo cual se ha empleado RFLP. Diferentes protocolos de nested-PCR y AP-PCR han sido desarrollados para la diferenciación de aislamientos y detección de *Cryptosporidium* sp. en muestras fecales y ambientales. Se ha empleado como secuencia blanco, entre otras, el gen del 18S rRNA. No se han descrito aún técnicas moleculares para diagnóstico de *Isospora belli*. En los microsporidios, la caracterización del genoma se ha focalizado principalmente en el gen de la ss rRNA. Esta secuencia ha sido empleada para diagnóstico y estudios taxonómicos, involucrando técnicas de PCR, RFLP, Southern blot y secuenciación. Ha sido diseñado un gran número de primers y sondas dirigidos contra diferentes especies de microsporidios, incluyendo algunos de carácter genérico. Nuestro desarrollo en diagnóstico molecular se enfoca principalmente a microsporidiosis entérica causada por *Enterocytozoon bieneusi* y *Encephalitozoon intestinalis*. Hemos aplicado la técnica de PCR en biopsias duodenales frescas, aspirados duodenales y materia fecal, empleando primers que amplifican el único espaciador intergénico transcrito (ITS) de los genes del rRNA de *E. bieneusi*. Esta región fue utilizada posteriormente por otros investigadores para identificar cepas de esta especie. También empleamos PCR, con un protocolo modificado de doble amplificación, para el diagnóstico en heces colectadas en diferentes soluciones conservadoras y guardadas en discos de papel de filtro. Otra aplicación de la amplificación génica se efectuó utilizando primers complementarios al gen de la ss rRNA y muestras de biopsias duodenales fijadas e incluidas en parafina, en un estudio retrospectivo sobre material de archivo. Se emplearon tres protocolos que incluyeron: PCR simple, doble PCR y nested-PCR. También hemos desarrollado la técnica de hibridación *in situ* sobre cortes histológicos, utilizando como sonda un oligonucleótido sintético biotinilado complementario al ITS de *E. bieneusi*. La aplicación de estos métodos nos permitió identificar, en estudio prospectivo a partir de un grupo de 118 pacientes HIV positivos con diarrea crónica, 11 casos de microsporidiosis por *E. bieneusi* y, en el estudio retrospectivo que incluyó 98 pacientes, 8 casos de infección por *E. bieneusi* y un caso de infección mixta por *E. bieneusi* y *E. intestinalis*. Con respecto a infección por *T. cruzi*, hemos determinado la presencia de DNA parasitario en biopsias duodenales de pacientes con SIDA con estructuras compatibles con amastigotes, empleando la técnica de PCR con primers específicos que amplifican un fragmento de DNA del kinetoplasto. La aplicación de técnicas de diagnóstico molecular para protozoarios oportunistas requiere de una cuidadosa selección de primers y sondas, con el fin de realizar la detección e identificación de especie de los organismos en las muestras de estudio. La potencialidad de la técnica de PCR para identificar los parásitos en muestras adquiridas mediante métodos no invasivos o en material de archivo, hace de este método una opción diagnóstica de gran interés.

MR20. Infecciones fúngicas oportunistas. DAVEL G.

Dpto. de Micología del INEI/ANLIS Malbrán.

La incidencia de las infecciones fúngicas oportunistas ha aumentado en los últimos años de forma alarmante y hoy en día son una importante causa de morbimortalidad. Este aumento en el número y gravedad de estas infecciones ha venido aparejado a la aparición de nuevas tecnologías y procedimientos invasivos desarrollados para curar o aumentar la sobrevivencia de neonatos de bajo peso y pacientes con enfermedades mortales, quemaduras extensas, traumatismos y heridas graves. Estas prácticas médicas producen una profunda inmunosupre-

sión del paciente haciéndolo susceptible a la invasión por cualquier microorganismo y/o proporcionan la vía de acceso de patógenos oportunistas al huésped susceptible. Además de esto, el grupo de pacientes de riesgo ha aumentado dramáticamente en la década pasada debido a la epidemia mundial de infección por HIV, lo que no sólo ha provocado un aumento en las infecciones causadas por hongos oportunistas sino también por los agentes de micosis endémicas. Las infecciones fúngicas sistémicas han emergido entonces como una complicación muy importante de los procesos antes mencionados, tanto en individuos inmuno-comprometidos como inmunocompetentes. Sus agentes etiológicos son hongos saprófitos o comensales que se encuentran normalmente en el suelo, sobre animales o vegetales o asociados a ellos, y no forman parte de la flora humana normal, a excepción de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Malassezia furfur*. La vía de ingreso de estos hongos al huésped susceptible puede ser mediante aerosoles, inoculación percutánea o por vía gastrointestinal; sin embargo, su habilidad para invadir los tejidos depende primariamente del estado inmunológico del huésped potencial. Los pacientes con neutropenia profunda y prolongada, con recuentos de neutrófilos menores a 100/mL durante más de 15 días, tienen un alto riesgo de adquirir una micosis sistémica diseminada generalmente fatal. Estas infecciones oportunistas pueden adquirirse fuera o dentro del hospital y en este último caso pueden ser endémicas o epidémicas. Datos del Sistema Nacional de Control de Infecciones Nosocomiales del CDC muestran que durante la última década los hongos causaron el 7,9% del total de infecciones nosocomiales en grandes y pequeños hospitales, y ascendieron a un 9% entre 1990-1996, emergiendo como el quinto patógeno nosocomial. Las especies del género *Candida* causaron el 78% de las infecciones fúngicas en pacientes inmuno-comprometidos o gravemente enfermos. A su vez, en los hospitales oncológicos la incidencia de estas infecciones alcanza el 17%; se incrementan significativamente las infecciones sistémicas graves producidas por *Aspergillus* spp., *Zygomycetes* y hongos patógenos emergentes a expensas de las causadas por *Candida* spp., que disminuyen hasta un 57%. Las infecciones debidas a *Fusarium* spp, *Malassezia furfur*, *Trichosporon beigeli*, hongos dematiaceos y otros hongos habitualmente no patógenos ambientales se observan cada vez con más frecuencia en pacientes oncológicos, con heridas graves, diálisis reiteradas y transplantados. Este aumento del número de especies capaces de causar infecciones sistémicas, la mayoría de ellas desconocidas para el personal de salud, dificulta su diagnóstico y/o tratamiento. Las altísimas tasas de mortalidad de estas infecciones se deben en parte a la falta de diagnóstico o la demora en el mismo. La aparición de especies resistentes a los antifúngicos hace necesaria la identificación del agente etiológico a nivel de género y especie y el estudio de su sensibilidad. Ambas metodologías requieren de una experiencia que no es fácil de adquirir cuando no se estudia gran número de cepas, es por eso que se hace necesario el desarrollo de la Red de Laboratorios de Micología, que centraliza estas técnicas en Laboratorios de referencia. En nuestro país se desconoce la incidencia y prevalencia de especies fúngicas causantes de infecciones nosocomiales, por lo que es necesario realizar estudios que permitan esclarecer la situación y establecer un sistema nacional de notificación de estas patologías.

MR21. Estrategias clásicas de diagnóstico en protozoarios entéricos oportunistas. VELÁSQUEZ JN.

Htal. Francisco Muñiz, Buenos Aires.

Los pacientes con SIDA y severa inmunodepresión presentan diferentes síndromes clínicos de compromiso entérico,

hepatobiliar y pancreático. Muchas de estas complicaciones están dadas por infecciones oportunistas que incluyen: protozoarios, virus, bacterias, micobacterias y hongos. Los protozoarios han sido reconocidos como responsables de una gran proporción de estos severos cuadros, e incluyen diferentes géneros y especies tales como: Microsporidios, Coccidios, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* sp. A continuación se describen las características clínicas y microbiológicas de las infecciones causadas por protozoarios que afectan al aparato digestivo en pacientes con SIDA. Diarrea crónica: Las estrategias clásicas de diagnóstico de protozoarios en pacientes con SIDA y diarrea crónica dependen de la detección de los parásitos en fluidos y biopsias duodenales por microscopía óptica o microscopía electrónica de transmisión (TEM). Esta presentación comprendió el estudio de 118 pacientes adultos de ambos sexos, con edades que variaron entre los 21 a 41 años, con SIDA y diarrea con una duración igual o mayor de 1 mes, con valores de CD4 inferiores a 500/mm³. Los aspirados duodenales y las materias fecales se recolectaron y conservaron en solución salina formolada al 5% a temperatura ambiente. Las materias fecales se concentraron y se observaron en forma directa y en extendidos coloreados con las técnicas de Kinjoun y Tricrómicas. Los sedimentos de los aspirados se colorearon con las técnicas anteriores. Se realizaron videoesofagogastro-duodenoscopías (VEDA) con un equipo Pentax EPM 2000. En todos los pacientes se aspiró líquido duodenal y se obtuvieron cinco biopsias de la porción más distal del duodeno. Dos de las muestras se fijaron en formol 10% para efectuar estudios histológicos de rutina y las otras tres se conservaron con el fijador de Karnovsky. Las biopsias incluídas en parafina se colorearon con Hematoxilina-eosina y Giemsa. Las muestras fijadas con Karnovsky se colorearon con Azur II. En los casos sugestivos de microsporidiosis se procesaron y se observaron por TEM. Con la metodología utilizada se llegó al diagnóstico en 45 casos del total de 118 pacientes. Los hallazgos microbiológicos más frecuentes fueron: *Cryptosporidium* sp. (13 casos), Microsporidios (11 casos) e *Isospora belli* (9 casos). Los pacientes con diagnóstico de Microsporidios reunían las características clínicas y las estructuras compatibles en los cortes coloreados con Hematoxilina-eosina, Giemsa y Azur II. En tres casos se determinó la especie por TEM. Con estos métodos se detectaron 9 pacientes en los que se diagnosticó *Isospora belli*. En dos pacientes se pudo identificar algún estadio del ciclo evolutivo del parásito en lámina propia. Colangiopatía asociada al SIDA: Las anomalías de las vías biliares han sido reconocidas como complicación en los pacientes con SIDA. Los sujetos estudiados incluyeron seis pacientes adultos con SIDA, manifestaciones digestivas y patrón humoral de colestasis con ecografía abdominal con anomalías de las vías biliares. A todos se les efectuó colangiografía. Los métodos invasivos de diagnóstico incluyeron colangiopancreatografía retrógrada y VEDA. Las muestras de biopsia de papila, duodeno y duodeno peripapilar se procesaron utilizando las técnicas histológicas de rutina y parte de ellas se conservó con el fijador de Karnovsky, se colorearon con Azur II y posteriormente se procesaron y observaron por TEM. Las muestras de materia fecal concentradas se colorearon con las técnicas de Kinjoun y Tricrómicas. Con estos métodos se diagnosticó colangitis esclerosante en todos los pacientes, uno asociado a papilitis estenosante y otro a pancreatitis. Se identificaron microorganismos en 4 casos: en biopsias duodenales y peripapilares, sólo microsporidiosis (2/4), microsporidiosis y coccidiosis (1/4); en materia fecal, criptosporidiosis (1/4).

Consideramos que las manifestaciones clínicas a nivel entérico, biliar y pancreático originado en infecciones oportu-

nistas en pacientes con SIDA y severo compromiso inmunológico pueden presentarse como cuadros únicos, simultáneos o evolucionar en forma progresiva.

MR22. Sida y enfermedad de Chagas. SINAGRA A, LUNA C y RIARTE A.

INP Dr. M Fatała Chaben, ANLIS Carlos G Malbrán.

El SIDA es la manifestación más grave de la infección por VIH, y las infecciones oportunistas que lo caracterizan incrementan la morbi-mortalidad de los pacientes infectados. La primera descripción de la asociación de enfermedad de Chagas (ECH) y VIH fue realizada en 1990 por Castillo y col. Se trataba de un paciente de 19 años con hemofilia tipo B, infección por VIH y compromiso del SNC. La lesión cerebral fue reseca y se observaron numerosos amastigotes de *T. cruzi*. En ese momento, los autores ya señalan la importancia de incluir la ECH entre los diagnósticos diferenciales en cuadros de presentación similar al descripto. Publicaciones posteriores reafirman al SNC como órgano blanco principal, y al miocardio como segunda localización selectiva, en la reactivación de la ECH crónica en pacientes con SIDA. En nuestra serie, 12 de 14 pacientes (85.7%) presentaron compromiso neurológico. Diez pacientes evidenciaron lesiones por TAC o RNM compatibles con chagoma cerebral. En 4 pacientes se comprobó el *T. cruzi* como agente etiológico de la lesión cerebral, 3 por biopsia y 1 post-mortem. En 3 pacientes se detectaron parásitos en LCR. Un paciente presentó chagoma cutáneo con biopsia de piel positiva para *T. cruzi*. En 12 se detectó parasitemia por la técnica de Strout. En 8 pacientes se realizó el recuento de linfocitos CD4⁺, en 7 los valores variaron entre 25-150/mm³ y en el restante 212/mm³. Ocho de 14 (57%) pacientes fallecieron durante el tratamiento con benznidazol, 2 (15%) entre los 6 y 8 meses post reactivación de la ECH y en 4 no se conoce la evolución a distancia. El *Toxoplasma gondii* es el patógeno oportunista que afecta más frecuentemente al SNC de los pacientes VIH reactivos; la presencia de un cuadro neurológico con serología reactiva para *T. gondii* y lesiones en SNC detectadas por TAC o RNM orientan habitualmente al diagnóstico de toxoplasmosis y su confirmación posterior se basa en la respuesta al tratamiento específico. Sin embargo, los protocolos actuales deberían contemplar el diagnóstico diferencial con ECH. La ausencia de este criterio produce en la mayoría de los pacientes el diagnóstico tardío de la infección por *T. cruzi*. La demora en establecer el diagnóstico diferencial con ECH es crucial para la sobrevida, debido a la severidad de la presentación clínica y al estado evolutivo de la infección por VIH en estos pacientes. La aplicación de un protocolo que contemple el diagnóstico de la ECH basado en el diagnóstico serológico y en la búsqueda activa del parásito es imprescindible y de fácil implementación. La serología no parece ser siempre relevante para el diagnóstico. En nuestra serie, 1 paciente con antecedente de serología reactiva, en pleno episodio de reactivación presentó negativización serológica y otros 3 pacientes presentaron solo 1 test (1/3) positivo. En los 4 casos hubo detección directa del parásito en sangre. Similares resultados fueron publicados por Rocha y col. en 2 pacientes con SIDA y reactivación de la ECH crónica. En toxoplasmosis cerebral se demostró un 3% de serología negativa en pacientes con SIDA. En nuestra experiencia, pacientes chagásicos crónicos inmunosuprimidos por diferentes tipos de trasplantes de órganos han mostrado negativización serológica. Esta particularidad en la evolución serológica en pacientes chagásicos sometidos a inmunosupresión nos permite sugerir que si bien una serología reactiva es importante para orientar el diagnóstico, la ausencia de la misma no permite descartar con certeza

la reactivación de la ECH. En conclusión: La asociación de la infección por VIH y ECH debe ser considerada de alto riesgo. La reactivación de la ECH crónica es más frecuente y grave en pacientes VIH reactivos, especialmente en aquellos que presentan recuentos de linfocitos CD4⁺ < 200/mm³, satisfaciendo de esta manera los criterios de infección oportunista. La vigilancia de la reactivación de la ECH crónica debería implementarse mediante un protocolo de periodicidad determinada y con controles serológicos, parasitológicos y clínicos. El protocolo debería incluir, evaluación de la dinámica de progresión de la infección chagásica, determinación de la carga viral como indicador de actividad de la infección por VIH, recuento de linfocitos CD4⁺ como marcador del grado de inmunodeficiencia, y la presencia de enfermedades marcadoras de SIDA. Pacientes con un recuento de linfocitos CD4⁺ < 400/mm³ podrían ser considerados de riesgo y ser objeto de una vigilancia clínica especial. No existe experiencia para recomendar pautas de profilaxis primaria, sin embargo ésta podría ser considerada en los casos de pacientes asintomáticos con ECH crónica con recuentos de linfocitos CD4⁺ < 200/mm³. La presencia de fiebre, signos neurológicos, miocarditis, lesiones en piel deben alertar sobre la potencial reactivación de la ECH crónica; muestras de sangre, LCR, deberán ser examinadas exhaustivamente para detectar parásitos y las lesiones deberán evaluarse en la búsqueda de amastigotes de *T. cruzi*. La prueba terapéutica con benznidazol podría ser contemplada en pacientes con sintomatología neurológica grave y lesiones en SNC, en ausencia de otro diagnóstico etiológico. La profilaxis secundaria continua con benznidazol o nifurtimox en "dosis mínima necesarias para obtener eficacia" ha sido sugerida recientemente por un comité de expertos para el SIDA, sin embargo no hay suficiente experiencia con terapia continua ni intermitente por largo tiempo en humanos para avalar dicha recomendación.

Infecciones intrahospitalarias. LOSSA G. coordinador

MR23. La infección hospitalaria. DURLACH RA.

Hospital Alemán, Buenos Aires.

La infección hospitalaria es una situación endemo-epidémica de los hospitales que reviste mayor gravedad cuanto mayor es su nivel de complejidad. Se considera que entre un 5 y un 14% de los pacientes hospitalizados adquirirán una infección que no estaba presente, ni incubándose, el día de su internación. Es una complicación indeseada que acarrea una mortalidad directa cercana al 1% y capaz de contribuir con ella, en el 4 a 5% en forma indirecta. Implica también prolongación en días de internación, costos agregados y un riesgo legal difícil de ponderar. El estudio de la infección hospitalaria incluye el análisis de las causas, las características de los pacientes que se infectan y la frecuencia con la que ocurren. El paciente que permanece internado está expuesto al riesgo de adquirir una infección por varios motivos: la gravedad de la enfermedad de base, los procedimientos invasivos, la permanencia de sondas y canalizaciones vasculares, antibióticoterapia prolongada, colonización previa por bacterias invasivas, alimentación artificial y otros. La infección se considera del hospital cuando comenzó transcurridas 48 a 72 horas de la admisión del paciente o dentro de los 10 días después del alta. Estos términos pueden cambiar de acuerdo al tiempo de incubación de la enfermedad. Para la infección en el sitio quirúrgico se considera un término de 30 días a partir de la operación o hasta un año si ocurre con relación a la colocación de una prótesis. Teóricamente el 90% de las IH ocurri-

rán en una de estas cinco localizaciones: tracto urinario (40%); infección en el sitio quirúrgico (22%); tracto respiratorio bajo (15%); piel y partes blandas (6%) y bacteriemias (5%). El medio hospitalario, particularmente la sala de terapia intensiva, es un lugar apto para el desarrollo y diseminación de bacterias resistente a los antibióticos. La presencia de bacterias resistentes es el resultado de la interacción de los microorganismos, pacientes y el medio hospitalario, incluyendo el uso de antibióticos. La selección de bacterias multirresistentes en el medio hospitalario es el resultado de la interacción de muchos factores. Factores naturales como la capacidad intrínseca de mutar de las bacterias, la presión específica y selectiva en el hospital como consecuencia del exceso en la prescripción de antibióticos, la transmisión horizontal y la susceptibilidad del huésped, entre otras causas. Un programa de control de infecciones tiene su eje principal en el sistema de vigilancia; con definiciones escritas, sencillas y claras. El programa debe contar con objetivos, prioridades y Metodología. Llamamos vigilancia epidemiológica a la observación sistemática, activa y prolongada de la presencia y distribución de la infección hospitalaria, entre los pacientes internados y de los factores de riesgo que aumentan o de las acciones preventivas que disminuyen el riesgo de su ocurrencia. Para eso es necesario vigilar al huésped (el paciente y al personal de salud), a los agentes causales: los microorganismos residentes y al medio ambiente. Los objetivos generales de un programa de vigilancia son: a) Estimar la prevalencia e incidencia de las infecciones en los hospitales. b) Observar la tendencia de las tasas. c) Identificar los sitios de la infección. d) Reconocer los factores de riesgo asociados. e) Considerar la evolución de los pacientes. f) Monitorear los microorganismos de adquisición hospitalaria. g) Monitorear la resistencia de los microorganismos a los antibióticos. h) Efectuar las intervenciones necesarias para su control. i) Evaluar los cambios esperados para conocer la eficiencia del programa. j) Comunicar los resultados. Los objetivos específicos se deciden según el plan de acción propuesto, el tiempo y los recursos disponibles. Las IH más frecuentes son las infecciones urinarias asociadas a sonda vesical, las infecciones en el sitio quirúrgico evaluadas por servicio, por intervención o por cirujano, neumonías asociadas a ARM o postoperatorias y bacteriemias asociadas a catéteres endovenosos.

La Metodología actual exige la utilización de informática. El programa más amigable y de distribución gratuita, es el Epi-info. En el Hospital Alemán los datos se cargan automáticamente en la red que une los programas existentes en laboratorio, farmacia, cirugía, etc. con un ahorro de tiempo y esfuerzo enorme. Ordenados los datos, se analizan y se preparan para su comunicación.

MR24. Epidemiología de las infecciones hospitalarias. La importancia de los programas de prevención y control.
LOSSA GR.

Dpto. de Vigilancia y Clínica Epidemiológica Hospitalarias I.N.E. "Dr. Juan H. Jara" ANLIS - Malbrán

La Infección Hospitalaria es tan antigua como la existencia de los hospitales debido a que en un mismo ámbito colocamos pacientes susceptibles de adquirir infecciones y personas capaces de transmitir microorganismos potencialmente patógenos. De tal modo que la Infección Hospitalaria es una afección endemoepidémica de los hospitales, controlable pero difícilmente erradicable, que puede afectar a las personas que concurren al hospital. Principalmente a los pacientes a través de las técnicas cruentas de diagnóstico y tratamiento y al personal por los accidentes laborales. Se define como infección hospitalaria la infección adquirida por las personas que concurren al

hospital, distinta del motivo de concurrencia y mientras no se demuestre lo contrario. En el caso de los pacientes se estima que son las infecciones que no se encuentran en incubación al ingreso hospitalario, tomándose como margen práctico las producidas 48 hs después de hospitalizado. No obstante las definiciones varían, según la localización y el tipo de infección. Las I.H. pueden ser endógenas o exógenas y participan en su transmisión las manos, los fomites y fundamentalmente todas las técnicas cruentas, así como la gravedad de los pacientes hospitalizados y el tiempo de estadía. Es decir que es una infección multicausal de las personas que concurren al hospital. En lo que respecta a los pacientes los factores de riesgo están en el equipo médico, las manos, los alimentos, las excretas y secreciones, los vectores, el agua, el aire, etc., actuando como contribuyente los factores intrínsecos de los pacientes como la obesidad, la diabetes, la edad, etc. En el conjunto multicausal juega un papel muy importante las conductas humanas que en definitiva son responsables de más del 80% de las infecciones hospitalarias, por tal motivo se dice que las mismas son controlables, si se logran cambios de conductas. La infección hospitalaria constituye un importante problema de Salud Pública ya que en la mayoría de los países causa una morbilidad que oscila entre el 5 y 15% o más de los pacientes hospitalizados, con un peso de entre el 1 y 3% de la mortalidad hospitalaria como causa directa y entre 4 y 6% como contribuyente. Produce una prolongación de la internación entre 4 y 10 días y un costo económico extra que puede considerarse en promedio de 2000\$ por episodio, tomando todos los pacientes internados en el hospital. Según Jarvis W R el costo promedio estimado para las infecciones urinarias es de 558 a 593 \$, el de las infecciones del sitio quirúrgico de 2.734 \$, el de las neumonías de 4.947 \$ y el de las bacteriemias oscila entre 3.061 y 40.000\$. Adicionalmente existe un costo social para el paciente y su grupo familiar difícil de ponderar en términos económicos. Así como el ausentismo laboral y todas las consecuencias emergentes de las incapacidades con los que los mismos pueden quedar como consecuencia de las I.H. También significa una disminución de las posibilidades de uso de las camas ocupadas por la prolongación de la estadía que las I.H. ocasionan, siendo esta un afección prevenible. Las I.H. más frecuentes son las urinarias 40%, las neumonías 15%, las postquirúrgicas 25% y las bacteriemias 5%, variando sus valores en los distintos establecimiento y estando relacionadas fundamentalmente con las practicas invasivas (catéter urinario, ARM, operaciones, catéteres vasculares centrales, etc.) Introducir medidas de prevención y control que impliquen una disminución de las infecciones hospitalarias conlleva a una disminución en el riesgo para la vida de los pacientes, una minimización de costos y por ende, mejoramiento de la Calidad de la Atención Médica. El estudio 'SENIC llevado a cabo en EEUU en la década del 80 pudo demostrar que la aplicación de programas de vigilancia y control de infecciones permite reducir en forma significativa las tasas de infecciones hospitalarias. El porcentaje de disminución estuvo relacionado con el grado de sofisticación alcanzado por dichos programas, pudiendo éstos ser estratificados en: poco efectivos, moderadamente o altamente efectivos. El impacto de los programas disminuye la morbimortalidad y los costos. Si tomamos como ejemplo: cien camas con un porcentaje ocupacional superior al 80 %, producirían 5000 egresos anuales, si se producen 10 infecciones cada 100 pacientes hospitalizados significa 500 I.H. por año, con una tasa de mortalidad del 1% son 5 pacientes que fallecerían por esta causa. El costo estimado fue de 2000\$ por paciente por episodio lo que en este caso significa 1.000.000 de pesos. Si se reduce la I.H. un 15% se ahorrarían 150.000\$ y si la disminución es del 30% el ahorro es de 300.000. Esto

no solo compensa los gastos que genera el programa de control sino que produce un significativo ahorro económico y el consecuente beneficio social.

Para abordar este problema es menester la existencia de un Comité de Infecciones que depende de la dirección del establecimiento y está integrado: 1.- Por una comisión ejecutiva formada por 3 o 4 personas, preferentemente una enfermera especializada en control de infecciones, un médico epidemiológico y/o infectólogo, un microbiólogo y un representante de la dirección. 2.- Un comité ampliado integrado por representante de los distintos servicios del hospital y que trabajan formando grupos para el abordaje de temas comunes. Las funciones principales del comité son la investigación, docencia, normatización, vigilancia, asesoramiento, evaluación y difusión de resultados. Con ello se ahorra en costos, días camas y juicios, y se gana en Calidad de la Atención Médica y Prestigio de la Institución. En lo que respecta al personal hospitalario este puede sufrir una infección durante su trabajo por lo que es fundamenta establecer un Programa de Salud del Personal que se debe ocupar del estudio del personal al ingreso, la prevención con vacunas, la educación, el asesoramiento y la vigilancia de las infecciones en el personal. Se debe tener en cuenta que un programa es una herramienta de trabajo, que nunca un programa será mejor que las personas que lo lleven a cabo y según refiere Hernán de San Martín: "Programar y no ejecutar es un Error, ejecutar y no programar es un Absurdo, y que programar, ejecutar y no evaluar es un Despilfarro".

MR25. Estrategias para la prevención de accidentes laborales. TODISCO E.

I.N.E. "Dr. Juan H Jara" ANLIS/Malbrán.

Los riesgos potenciales de accidentes laborales de quienes trabajan en instituciones de salud, constituyen un problema que cobra cada día más relevancia. Con cada nuevo elemento que se introduce en el campo de la atención médica, éstos aumentan, tanto para los pacientes que concurren a las instituciones como para el personal que los asiste. Existen numerosos estudios de nivel internacional, que demuestran que además de la existencia de riesgos ocupacionales físicos, químicos, ergonómicos y psicosociales se incrementan progresivamente los riesgos biológicos causados por agentes patógenos infecciosos a los que están permanentemente expuestos los trabajadores planteando serios riesgos para su salud. La emergencia del SIDA una patología con connotaciones sociales trascendentes, así como la de la Hepatitis C, (enfermedades para las cuales no se dispone de vacunas en la actualidad), han propulsado un cambio radical en las estrategias de prevención. Estudios multicéntricos a publicados en estos últimos años, destacan los accidentes por exposición percutánea, entendiéndose a aquéllos que conllevan una penetración a través de la piel con agujas u otros objetos cortantes o punzantes potencialmente contaminados. Para todos los microorganismos transmitidos por vía hematogéna estas estrategias están basadas en una premisa fundamental: «La sangre y los fluidos corporales deben considerarse siempre potencialmente infecciosos». La Hepatitis B es, en este momento, la enfermedad infecciosa más frecuente, siendo la probabilidad de adquirirla accidentalmente tres veces mayor que el SIDA. Pero a pesar de las recomendaciones realizadas por organismos oficiales como por ejemplo el CDC de Atlanta, los trabajadores sanitarios continúan realizando su tarea no siempre de la forma más segura. La definición de accidente de trabajo en Argentina ha evolucionado a partir de la ley del año 1900, pasando por las leyes de 1955 y las leyes de Seguridad Social de 1966 y 1974. En su artículo 84 dice la ley: «Se entiende por accidente de trabajo toda lesión corporal que el trabajador sufra

con ocasión o por consecuencia del trabajo que ejecute por cuenta ajena». Luego la ley 9688 establece el concepto de Infortunio Laboral, que agrega al concepto anterior las lesiones inmediatas o mediatas con efectos incapacitantes que alteren negativamente su posición en el mercado laboral, extendiéndose a un sentido más amplio que contiene también las enfermedades profesionales. A partir del año 1992, entró en vigencia la ley 24151 que declara obligatoria la vacunación contra la Hepatitis B en el personal de salud, su incidencia no ha disminuido. A partir de la Resol. 19/98, publicada en el Boletín Oficial 28836 del 13 de febrero de 1998, se aprueban las Normas de Notificación y Atención de Accidente Laboral del Personal de Salud con riesgo de Infección por patógenos sanguíneos surgiendo como recomendación general para empleadores y empleados 1) Orientación inicial: Su propósito es facilitar la labor del personal que debe ocupar un área de trabajo, ya sea porque es de nuevo ingreso, cambia de servicio, de turno o de puesto de trabajo. Esta propuesta incluye una introducción su tarea específica, conocer horarios, equipos, materiales, permitiendo expresar al ingresante sus inquietudes, y de esa manera mejorar la eficiencia de la misma y la eficacia de la prevención. 2) Educación continuada: Pretende reforzar la confianza del trabajador y hacerlo sensible al cambio, a las innovaciones y responsabilidades. Puede ser en forma sistemática o incidental, por medio de conferencias, cursos, seminarios, complementándolo con material educativo gráfico, medios audiovisuales, avisos o carteles que indiquen medidas de higiene y seguridad. 3) Entrenamiento del personal de salud sobre epidemiología: El conocimiento de la distribución de los factores de riesgo que puedan provocar accidentes en las instituciones serán armas imprescindibles que permitirán la participación activa del trabajador para actuar sobre ellas. 4) Modo de transmisión de patógenos: Es imprescindible informar sobre el comportamiento de los microorganismos, sus reservorios, fuentes y mecanismos de transmisión de enfermedades. 5) Necesidad de observación de Normas Universales de protección: El manejo de sangre, fluidos corporales, tejidos y órganos. Debe adaptarse a las normas y a las leyes de protección e higiene laboral vigentes. 6) Provisión de equipamientos elementos. Los recursos materiales son elementales para minimizar los riesgos de infección con patógenos. 7) La participación de las asociaciones profesionales y organizaciones laborales: Los programas continuados de educación para el personal de salud deben estar dirigidos a destacar la necesidad de cumplir las normas de seguridad biológica recomendada. Son los mismos trabajadores a través de sus representaciones, quienes deben lograr el cumplimiento de las leyes. El eje central es la existencia de una medicina ocupacional donde el trabajador sea uno de los principales protagonistas, asumiendo la responsabilidad de cumplir con medidas de autocuidado sin desconocer la trascendencia que tienen tanto para él como para su grupo de trabajo. Pero no debemos olvidar que el trabajador en su concepción humanista es un ser histórico social, con una capacidad de percepción que depende, según la teoría Taylorista, de sus propias experiencias durante la socialización, por lo tanto, su capacidad de interpretación es en gran medida individual. Esto hace que las campañas masivas sean útiles en cuanto al nivel de información que él recibe, pero no aseguran el cambio de actitud. Las estrategias que proponemos para la prevención de accidentes laborales desde la realidad de nuestro país son: La racionalización del trabajo teniendo en cuenta turnos y períodos de descanso. La correcta distribución de tareas de acuerdo a la capacitación del personal. Los protocolos de actuación, o sea la existencia de normas basadas en cada realidad institucional. La lógica y adecuada relación recursos humanos-pacientes. El seguimiento del personal expuesto permanentemente a riesgos biológicos (Vigilancia Epidemiológica). La implementación de servicios de sa-

lud ocupacional donde además se notifiquen los accidentes de trabajo, favoreciendo de esta manera la estadística y la investigación. Desde una u otra posición, la educación se revela como un camino ineludible para la prevención de accidentes, pero fundamentalmente es la ciencia que nos guía hacia el logro de una mejor calidad de vida laboral.

Red de enfermedades emergentes. RIVAS M. coordinadora

MR26. Síndrome urémico hemolítico: emergencia de *Escherichia coli* O157: H7. RIVAS M.

Servicio Fisiopatogenia INEI/ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".

Escherichia coli O157:H7, patógeno emergente transmitido por alimentos, fue reconocido por primera vez como patógeno humano en 1982, responsable de dos brotes de colitis hemorrágica, asociados epidemiológicamente al consumo de hamburguesas contaminadas. A partir de entonces numerosos brotes han sido notificados en distintas partes del mundo. La infección por *E. coli* O157:H7 puede causar diarrea, generalmente sanguinolenta, y evolucionar a formas severas de enfermedad extraintestinal como el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). La infección se caracteriza por presentar inicialmente vómitos, dolores abdominales intensos, sin fiebre o febrícula y una diarrea acuosa que frecuentemente se convierte en sanguinolenta al segundo o tercer día. La infección se autolimita en el término de una semana sin dejar secuelas. Sin embargo, del 5 al 10% de los pacientes evoluciona a SUH. El SUH es una entidad clínica y anatomopatológica caracterizada por insuficiencia renal aguda, trombocitopenia y anemia hemolítica. Superada la fase aguda, el 60% de los pacientes se recupera, después de dos o tres semanas, sin tener secuelas. El 5% de los niños desarrolla insuficiencia renal crónica y al cabo de años o décadas presenta una enfermedad renal terminal la cual requiere procedimientos dialíticos o trasplante renal. Otro 30% de los pacientes tiene microhematuria o grados variables de proteinuria crónica, pudiendo algunos de ellos evolucionar hacia una insuficiencia renal crónica al cabo de años o décadas. La tasa de letalidad es del 2-3% aproximadamente. La asociación entre SUH e infección por *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC), particularmente cepas del serotipo O157:H7, fue demostrada primero en Canadá en 1983-1985 y posteriormente confirmada por numerosos estudios realizados en distintos países, incluyendo Argentina. En nuestro país se producen alrededor de 250 casos nuevos por año. En mayo de 1999, el MSAS ha declarado al SUH como enfermedad de notificación obligatoria al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, con modalidad semanal e inclusión en la Planilla C2 (diagnósticos médicos), de acuerdo a la ley 15.465. Este sistema de vigilancia permitirá contar con una base de datos más estable y de esta manera monitorear el comportamiento de una región a través del tiempo y detectar brotes en forma temprana. En 1998, la tasa de incidencia de SUH en Argentina fue de 8,2 pacientes por cada 100.000 niños menores de 5 años, habiéndose acumulado más de 7.000 casos desde 1965 hasta el presente. Ambos valores son los más elevados del mundo. Los niños afectados son menores de 5 años, principalmente entre los 6 y 36 meses, de ambos sexos, eutróficos, de buenas condiciones higiénico - sanitarias. Los casos se presentan durante todo el año pero la frecuencia es mayor en los meses cálidos. Las provincias del centro y del sur presentan las tasas de incidencia más elevadas. La enfermedad tiene un alto impacto en el sistema de salud por el costo de atención tanto en la fase

aguda como en la fase crónica. En nuestro país, el 30% de los niños y adolescentes que reciben trasplante renal han padecido SUH. Este valor también es el más elevado del mundo. *Escherichia coli* O157:H7 es el prototipo de un grupo de más de 150 serotipos de *E. coli*. Los factores de virulencia de STEC son las toxinas Shiga (Stx1, Stx2 y sus variantes); la intimina, proteína codificada por el gen cromosomal *eaeA* responsable de la unión íntima de la bacteria al enterocito y la desorganización de las microvellosidades con producción de la lesión AE (del inglés attachment and effacement"); y la enterohemolisina (E-Hly) codificada por un plásmido de 60 Mda (pO157). Los animales domésticos, especialmente los rumiantes, han sido identificados como reservorio de STEC. El ganado bovino es señalado como el reservorio principal. La transmisión se realiza a través del consumo de alimentos contaminados. La contaminación cruzada durante la preparación de alimentos y la transmisión persona a persona por la ruta fecal-oral han sido señalada como rutas de infección. El Servicio Fisiopatogenia constituye el Laboratorio de Referencia Nacional (LRN) para el SUH en el marco de la Red de Gastroenteritis Bacterianas y Cólera constituida por 26 laboratorios de referencia provinciales y 150 laboratorios de Nivel II. El funcionamiento de esta Red permite estimar la incidencia de infección por *E. coli* O157:H7, identificar otros serogrupos prevalentes en las diferentes regiones y sus factores de virulencia, El LRN utiliza tres criterios diagnósticos: 1) aislamiento y caracterización de STEC; 2) detección de Stx libre en materia fecal; 3) detección de anticuerpos anti-Stx. Realiza además, la caracterización de los aislamientos de origen animal y de alimentos estableciendo la relación clonal entre cepas de distinto origen mediante técnicas de epidemiología molecular. La información obtenida servirá de base para el diseño de estrategias de prevención y control, y priorización de futuras investigaciones, tal como lo enfatiza la Organización Mundial de la Salud.

MR27. Tuberculosis: una emergencia y reemergencia global. LATINI OA.

I.N.E.R. «E. Coni» - ANLIS. «C.G. Malbrán».

En la década del 80 la situación epidemiológica de la tuberculosis en los Estados Unidos de Norteamérica se tornó preocupante al punto que se diseñaron estrategias de impacto inmediato a costos muy altos; a mediados de la década del 90 la situación parecía estar en vías de control, lo que llevó a establecer como meta el comienzo de erradicación para el año 2005. En 1999 el Consejo Asesor en Eliminación de la Tuberculosis anunció que esta meta no iba a poder ser cumplida, a pesar del impacto logrado. (1) A comienzos de la década de 1990 la OMS y el CDC-USA (2-3) estimaban, basados en las notificaciones de los países, que en el año 2005 se producirían en el mundo 4.000.000 más casos que en 1990, a expensas de cambios demográficos y aumento de la infección HIV; no se tuvieron en cuenta los cambios económicos globales que ocurrieron a mediados de la década, que favorecieron el aumento de los principales riesgos asociados a la transmisión de la infección: desnutrición, hacinamiento y estrés. Las metas establecidas por la OMS para el año 2000 serán difíciles de cumplir aún en América Latina, la Región con menos problemas entre las consideradas en desarrollo (4). Por su morbimortalidad la tuberculosis en el mundo se considera entre las de mayor preocupación: reemerge una enfermedad que había sido considerada fácilmente controlable hasta hace no más de quince años (2-3). A medida que la magnitud aumenta los recursos necesarios para controlarla tienen que ser mayores; paradójicamente la magnitud aumenta más en los países de menores recursos, hasta que la brecha entre una y otro

se hace tan grande que supera la capacidad de respuesta efectiva. La comprobación de la eficacia de la rifampicina en la década de 1970, una droga bactericida y esterilizante, unida a la isoniacida, de igual efectividad, hacía prever éxitos en los tratamientos; a mediados de 1980 se comenzaron a identificar cepas resistentes simultáneamente a ambas drogas: multiresistentes. Esta aparición tiene dos vertientes: los tratamientos irregulares, insuficientes y la transmisión entre huéspedes inmunocomprometidos, fundamentalmente con SIDA, generalmente intrahospitalaria. Cualquiera sea su origen esta variante de la tuberculosis está adquiriendo una magnitud preocupante en el mundo, en particular por su alta letalidad y por el altísimo costo del tratamiento, entre 180 y 250 veces mayor que el de uno de primera línea: emerge una nueva forma de una enfermedad conocida (5). En Argentina, donde se notifican anualmente alrededor de 12.500 casos nuevos, la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis estimó, en base a los aislamientos y comunicaciones, que en 1998 hubo aproximadamente 200 casos de enfermos multiresistentes, cerca de dos tercios de los cuales correspondían a SIDA y posibles infecciones intrahospitalarias (6-7). El número de casos con tuberculosis resistente generados directamente por tratamientos erráticos es relativamente bajo, aunque no por ello menos preocupante, debido a la provisión regular de medicamentos, al uso generalizado de esquemas de eficacia comprobada normatizados por la OMS, la asociación de las principales drogas en una misma forma farmacéutica que disminuye la posibilidad de emergencia de bacilos resistentes y al paulatino aumento de cobertura de DOTS. La multiresistencia puede ser evitada implementando estrategias de tratamientos totalmente observados y supervisados (DOTS) en los servicios de salud, y contenida estableciendo condiciones adecuadas de bioseguridad para la internación de pacientes sólo cuando sea indispensable. Es probablemente más difícil la solución de la reemergencia ya que está determinada por cambios globales, de los que el país no puede quedar ajeno, que favorecen la transmisión y dificultan el acceso de la población a los servicios de salud, aun cuando la red de laboratorios y el Programa de Tuberculosis estén estructurados. El desafío será encontrar vías alternativas que permitan llegar a la población en riesgo a tiempo y con eficiencia. 1.-. MMWR 1999; 48 (Nº RR-9): 1-13; 2.-Dolin P.J., Raviglione M., Kochi A Bul. WHO,1994, 72 (2): 213-220; 3.-. MMWR 42 Nº 49. Dic. 1993; 4.- WHO Report 1999. WHO/CDS/CPC/TB/99.259; 5.-. WHO/TB/99. 260; 6.- Datos no publicados de la Red de Laboratorios TBC. ANLIS «C.G. Malbrán»; 7.- Kantor I.N. de y col. 1998. Medicina, 58: 202-208

MR28. Avances en hantavirus en Sudamérica. MIGUEL S.

Dpto Virología. INEI/ANLIS Malbrán.

El Síndrome Pulmonar por Hantavirus (SPH), considerado actualmente como una zoonosis Panamericana, es una enfermedad que aún no tiene tratamiento específico y las medidas preventivas son esenciales para su control. En 1995 se describen los primeros casos de SPH en Argentina y Chile y en forma retrospectiva desde 1993, informándose hasta septiembre de 1999 cerca de 400 casos en Sudamérica con una mortalidad que varió entre el 80% y el 25% según año y/o región considerada. En 1998 se registraron en Argentina mas de 70 casos, proyectándose para 1999 una cifra similar. La exposición del hombre a los hantavirus ocurre principalmente a través del tracto respiratorio, por inhalación accidental de orina, heces o saliva de roedores infectados, siendo también posible el contagio por mordeduras. En Argentina se ha comprobado la transmisión persona a persona del virus Andes, tanto por datos

epidemiológicos como moleculares. Asimismo es probable que este tipo de transmisión haya ocurrido en dos grupos familiares chilenos. Otros aspectos diferenciales de la infección por hantavirus en América del Sur con respecto a América del Norte son el mayor compromiso renal y la presencia de poblaciones nativas con alta seroprevalencia, que alcanza en algunos casos al 40%. La nucleoproteína del virus Andes se expresó en *Escherichia coli*, luego se purificó y se controló su especificidad, y se aplicó como antígeno para la producción de ELISA directa para la detección de anticuerpos IgG e IgA o μ -captura ELISA para la detección de anticuerpos IgM. La evaluación de estos reactivos en sueros provenientes de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, México, Paraguay, Uruguay y Venezuela mostró que la detección de IgM e IgG tiene un 100% de especificidad y sensibilidad. Anticuerpos IgM específicos se detectaron en la primera muestra, usualmente entre 48 a 72 hs después del inicio de síntomas, de 140 pacientes con cuadro clínico compatible con HPS. La infección fue confirmada por técnica de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Todos los pacientes convalecientes presentaron anticuerpos IgG en la mayoría de los casos a partir de la primer semana del inicio de los síntomas. En varios pacientes fue posible detectar anticuerpos IgG con el antígeno Andes en muestras que resultaron negativas para el ELISA basado en el antígeno Sin Nombre. Sin embargo muestras posteriores de esos pacientes resultaron positivas para ambos antígenos. La respuesta IgA sérica se produce tempranamente en todos los pacientes alcanzando su máximo a las dos semanas de iniciados los síntomas. Los resultados negativos de muestras provenientes de 400 personas sanas, residentes en áreas no endémicas y en 70 personas con otras afecciones respiratorias mostraron la especificidad de estos tests. Tampoco se detectaron anticuerpos en ninguna de las 460 personas en contacto con casos de SPH y que no desarrollaron enfermedad. Se ensayó la detección de IgA específica en saliva determinándose que estos anticuerpos estaban presentes durante el primer mes. La detección de IgA en saliva constituye un método alternativo de diagnóstico de probable utilidad para comunidades aisladas o para pobladores que por razones culturales no acepten la extracción de sangre por vía venosa. Hasta la fecha en Argentina se han registrado 5 linajes diferentes de virus Andes que afectan al humano, uno en la zona sur andino patagónica tres en la zona central, uno de los cuales se encontró en Uruguay, uno en la zona norte, Salta y Jujuy y al menos dos linajes diferentes se encontraron en Paraguay. De los roedores estudiados a la fecha solo los del género *Oligoryzomys* son los involucrados en la transmisión al ser humano en Argentina, sin embargo en Paraguay el *Calomys laucha* es el único reservorio reportado hasta el momento. Se ha observado también que es posible hallar más de una especie de roedor portando el mismo linaje viral, así como también que una especie de roedor sea huésped de más de un genotipo viral, dependiendo de la zona geográfica considerada. El laboratorio de hantavirus del INEI-ANLIS «Dr. C.G. Malbrán» realizó, la transferencia y capacitación tecnológica del diagnóstico de hantavirus mediante cursos nacionales e internacionales a los principales centros de diagnóstico e investigación de 10 países de Latinoamérica (3 laboratorios de Brasil, 2 de Paraguay, 1 de Chile, 1 de México, 1 de Perú, 1 de Uruguay, 1 de Colombia, 1 de Bolivia, 1 de Costa Rica y 1 de Venezuela) y a 7 laboratorios de las provincias de Argentina donde se presentaron casos de hantavirus. Desde el laboratorio de referencia de hantavirus del INEI-ANLIS «Dr. C.G. Malbrán» se efectúa el control de calidad de los laboratorios integrantes de la red confirmando los diagnósticos realizados en los centros capacitados y mediante la distribución de un panel de muestras ciegas.

Diagnóstico y control de calidad en helmiasis. MOLINA V coordinadora

MR29. Diagnóstico de Distomatosis por *Fasciola hepática*. CARNEVALE S.

Dpto. de Parasitología Sanitaria de INP "Dr. Mario Fatała Chaben" ANLIS/Malbrán.

El diagnóstico de la parasitación por *Fasciola hepática* en el hombre presenta dificultades relacionadas con las características complejas de su ciclo biológico. La operación más sencilla se basa en el hallazgo de los huevos del trematode en las heces o en la bilis del duodeno y de la vía biliar, sin embargo el método coproparasitológico no es seguro, ya que las infecciones en el hombre son por unos pocos ejemplares y el tránsito de huevos en intestino es muy bajo. Con el fin de evitar la baja sensibilidad del método coproparasitológico, el diagnóstico de distomatosis humana es principalmente indirecto, basado en la demostración de anticuerpos circulantes y en la captura de antígenos en sueros y heces. Los antígenos empleados en la detección de anticuerpos han evolucionado desde los somáticos hacia los metabólicos. Actualmente, se trabaja en la purificación de aquellos antígenos metabólicos de alta inmunogenicidad y existen reportes que los emplean en su forma nativa para detección de diferentes isotipos de IgG. También han sido clonados los cDNA de algunos antígenos parasitarios y se están evaluando las proteínas recombinantes para el diagnóstico. Nuestra situación actual en el diagnóstico de la distomatosis por *Fasciola hepática* en el humano está asentada en la detección de anticuerpos mediante el uso de antígeno de excreción-secreción del parásito. Para ello empleamos el enzoinmunoensayo, en sus variantes de micro-ELISA y ELISA convencional. El primer paso es la obtención del antígeno, el cual se efectúa a partir de adultos vivos de *Fasciola hepática* de hígados bovinos naturalmente infectados. Los parásitos recuperados son incubados en presencia de inhibidores de proteasas para la producción de sus metabolitos, los cuales son obtenidos a partir de la clarificación y concentración de sobrenadante de incubación. Luego de la obtención de estos productos, los mismos son evaluados entre lotes de producción mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Las técnicas de diagnóstico que se emplean, micro-ELISA y ELISA, fueron puestas a punto mediante el empleo de sueros controles positivos (con hallazgo coproparasitológico o quirúrgico), y sueros controles negativos. También fue evaluada la especificidad de ambos métodos utilizando sueros de otras parasitosis y patologías. El método de micro-ELISA mostró reacción cruzada con HBV Ags y HCV. No se presentó este inconveniente cuando la técnica de ELISA fue utilizada. Cada uno de estos métodos presenta sus ventajas y desventajas. El micro-ELISA emplea una mínima cantidad de antígeno parasitario, suero y segundo anticuerpo, es de rápida realización y permite el almacenamiento de la placa con el antígeno por períodos de hasta seis meses. Además, se efectúa a temperatura ambiente, pero presenta las desventajas de: lectura de la reacción en forma visual ya que la medición de absorbancia es compleja, y sistema de lavado conjunto de la placa. Por su parte, el método de ELISA convencional genera un consumo elevado de reactivos, requiere de mayor tiempo de realización pero la lectura de reacción colorimétrica se efectúa en forma cuantitativa automatizada independientemente del operador. Evaluando en forma conjunta las características de ambos métodos es posible establecer el sistema de diagnóstico basado en la detección de anticuerpos contra antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepática*. Este sistema se aplicaría a estudios de tipo epidemiológico empleando el micro-ELISA como test de

screening y el ELISA como estudio confirmatorio. En el caso de diagnóstico asistencial en casos aislados, el test de elección será directamente el ELISA. Nuestro objetivo actual es el clonado y expresión de antígenos recombinantes con potencialidad diagnóstica. El Departamento de Parasitología Sanitaria de Instituto Nacional de Parasitología realizará para la Red Nacional de Helmintos el diagnóstico serológico de Distomatosis mediante la técnica de ELISA.

MR30. Diagnóstico y Control de Calidad en Enteroparásitos. LATAPIE LB.

Dpto. de Parasitología Sanitaria de INP "Dr. Mario Fatała Chaben" ANLIS/Malbrán.

De acuerdo al objetivo deseado, el diagnóstico enteroparasitológico comprende tres grandes ramas: Estudios epidemiológicos, pacientes individuales e investigación. El diagnóstico parasitológico se inicia cuando el médico sospecha o considera que las manifestaciones clínicas que presenta un paciente pueden deberse a una parasitosis. Para su confirmación, se solicita un examen coproparasitológico. Para lograr un resultado certero, es indispensable conocer los antecedentes epidemiológicos y clínicos, que orientan la búsqueda. La investigación de Helmintos en heces, se basa en la búsqueda de huevos, larvas y ocasionalmente otros elementos de diagnóstico como proglótidos y larvas adultas. De acuerdo a la concentración uterina, la hembra ovipone en forma intermitente, siendo eliminados en forma intermitente y distribuidos uniformemente en la materia fecal; aunque existen algunas excepciones, pudiendo mencionarse dos géneros: *Schistosoma* y *Fasciola*. En cambio el diagnóstico de protozoarios intestinales ofrece mayores dificultades, existiendo diferencias entre sus dos estadios, trofozoitos y quistes. Los trofozoitos son frágiles, y se alteran o destruyen con gran rapidez fuera del huésped. Por ello para reconocerlos, deben ser observados en forma inmediata o bien usar fijadores para su conservación (PAF, MIF, SAF, PVA). Los quistes (forma de resistencia), son los encargados de la propagación. Su presencia en las heces se produce cuando las condiciones en el medio intestinal le son adversas por Ej. desecación en las heces del colon. En diarreas amebianas, *E. histolytica* no produce quistes cuando la virulencia de la misma causa lesiones en el intestino. Mientras que las infecciones producidas por *Giardia lamblia*, ingresan al organismo como quistes. Luego de ser liberadas por los jugos gástricos comienza el desenquistamiento y la división en duodeno, (protegido por el mucus). Existen numerosas sustancias tóxicas que destruyen a los trofozoitos (enzimas lipolíticas, ácidos grasos no saturados, monoglicéridos, etc.). En el caso de *Cryptosporidium spp* e *Isospora belli*, la aparición en heces es discontinua, con formación de sucesivos periodos sexuales y asexuales, con periodos de prepatencia variable. Por lo antedicho concluimos que no se puede diagnosticar con la recolección de una sola muestra fecal. Para búsqueda de trofozoitos, quistes y huevos, se recomienda recoger 6-7 muestras de materia fecal. En caso de diarreas crónicas, o sospecha de amebiasis, se recomienda recolectar 6-7 muestras día por medio, en un lapso de 15-20 das. El conocimiento del potencial biótico, el periodo de prepatencia y ciertas características fisico-químicas como la gravedad específica contribuyen a mejorar y orienta la búsqueda. Cuando el parásito involucrado presenta bajo potencial biótico y el método utilizado es de baja sensibilidad disminuye la posibilidad de hallazgo. Si bien el diagnóstico parasitológico perfecto no existe pero podemos mejorar la probabilidad de hallazgo utilizando técnicas de concen-

tración por flotación, por centrifugación, otras técnicas especiales.

Las técnicas de diagnóstico se dividen en: a) Métodos de concentración: físicos (sedimentación, flotación, etc.) y fisicoquímicas o bifásicas. Además es conveniente usar técnicas especiales: Escobillado anal, test de Graham para recuperar huevos de *Enterobius vermicularis* y huevos de *Taenia* spp. Técnica de Baerman y cultivo de Harada Mori para recuperar larvas. Técnica de Stool, Kato Katz para recuento de huevos. Para mejorar la visualización se utilizan coloraciones extemporarias: lugol, Mif, eosina. b) Coloraciones permanentes: tricrómica de Gomorri - Wheatley, hematoxilina férrica, etc. c) Coloraciones especiales para coccidios: Kinyoun, Auremina, Safranina etc. El control de calidad se realiza testeando las técnicas usadas con muestras recibidas periódicamente por un ente organizador, que envía, controla los resultados y las técnicas usadas por el laboratorio emisor. El laboratorio de enteroparásitos del Departamento de Parasitología Sanitaria del Instituto Nacional de Parasitología Mario Fatała Chaben, realiza para la Red Nacional de helmintos, control de calidad en el diagnóstico, para lo cual recibe y envía muestras incógnitas con diferentes enteroparásitos.

MR31. Estudios de epidemiología molecular de la hidatidosis. ROSENZVIT M.

Dpto. de Parasitología Sanitaria de INP "Dr. Mario Fatała Chaben" ANLIS/Malbrán.

Para realizar estudios epidemiológicos de la hidatidosis que permitan conocer la prevalencia de las distintas áreas endémicas es necesario determinar si el principal transmisor de esta zoonosis, el perro, está infectado con *Echinococcus granulosus*. Esto se realiza en la actualidad mediante purga con bromhidrato de arecolina y observación de los gusanos adultos expulsados. Este método es específico, pero tiene baja sensibilidad y reproducibilidad y presenta riesgos para el personal involucrado, no resultando adecuado para trabajar con altos números de muestras. Otro inconveniente es que, por distintos motivos, como preñez, enfermedad o edad avanzada del animal, no siempre es factible realizar la purga a todos los perros que se desea analizar o bien ésta puede fallar. Teniendo en cuenta estos inconvenientes hemos propuesto un método para detectar huevos del parásito en heces de perros recientemente expulsados o depositados en el ambiente. Para esto se solicitaría al personal sanitario de cada zona endémica la recolección de materia fecal canina. En nuestro laboratorio se realizaría la amplificación de un elemento de repetitivo de ADN específico de *Echinococcus granulosus* mediante PCR. Este método se complementaría con la detección de coproantígenos, cuya sensibilidad dificulta el análisis en los perros con baja carga parasitaria, 20 parásitos adultos expulsados o menos. Otro factor que juega un papel importante en la epidemiología de la hidatidosis es la existencia de cepas del parásito. Una cepa de *Echinococcus* se define como un grupo de individuos que difieren estadísticamente de otros grupos de la misma especie en uno o más caracteres genéticamente determinados que tengan importancia actual o potencial en la epidemiología y el control de la hidatidosis. Las distintas cepas se denominan de acuerdo al huésped intermediario donde fue detectado por primera vez. Las cepas descriptas hasta el momento son las cepas oveja, vaca, oveja de Tasmania, cerdo, caballo, camello, búfalo y cérvido. La existencia de distintas cepas afecta la transmisión y el control de la hidatidosis ya que cada cepa puede tener distinto rango de huéspedes, algunas de ellas no son infectivas para el hombre. Otro aspecto en que difieren es en la duración del período prepatente, es decir el tiempo que transcurre desde la ingestión por parte del perro de

protoescolices hasta la eliminación de huevos en su materia fecal. En los programas de control de la enfermedad se le suministra a los perros un antiparasitario antes de que pueda eliminar huevos del parásito, para lo que se tiene en cuenta la duración de este período. Por este motivo es de fundamental importancia conocer con qué cepa están infectados los perros de cada región. La existencia de cepas también afecta la patogénesis y el curso clínico de la hidatidosis y debe tenerse en cuenta para el diseño de reactivos de diagnóstico ya sean inmunológicos o basados en ADN y en el diseño de vacunas y drogas quimioterapéuticas de la enfermedad. Para determinar las cepas presentes en nuestro país hemos establecido una red en la que se nos envía material parasitario, quistes hidatídicos de distintos huéspedes intermediarios, incluido el hombre y parásitos adultos para su análisis. Se extrae el ADN y se determina la cepa mediante el análisis de genes ribosomales y mitocondriales. De esta manera se determinó la existencia en nuestro país de las cepas oveja, oveja de Tasmania, camello, cerdo y vaca. La infección en humanos en nuestro país es causada por las cepas oveja, oveja de Tasmania y camello. Hasta el momento no se había descrito la infección en humanos por estas dos últimas cepas. Estos datos deben tenerse en cuenta en el diseño de programas de control. El laboratorio de Hidatidosis del Departamento de Parasitología Sanitaria del Instituto Nacional de Parasitología realiza el diagnóstico de cepas para la Red Nacional de Helmintos según acuerdos establecidos para caracterizar las variantes genéticas que se encuentran en distintas áreas endémicas del país. Además, está organizando la determinación del riesgo de transmisión en heces de perros, coproantígenos positivos.

MR32. Inmunodiagnóstico y control de calidad de Equinococcosis y Trichinellosis. SANTILLAN G.

Dpto. de Parasitología Sanitaria de INP "Dr. Mario Fatała Chaben" ANLIS/Malbrán.

El líquido hidatídico ovino es el material más usado para el serodiagnóstico de Equinococcosis quística (EQ), contiene varios antígenos derivados del metabolismo del parásito, junto con algunos componentes del huésped. La técnica más empleada en los últimos años para el diagnóstico de EQ es la doble difusión 5(DD5). La sensibilidad de esta técnica para la detección de EQ hepática es de 50 a 80%. Actualmente se prefiere el empleo de ELISA para la detección de pacientes asintomáticos, ya que son altamente sensibles aunque no son 100% específicas, debido a la reactividad cruzada entre componentes antigénicos del líquido hidatídico comunes con otras parasitosis o con proteínas contaminantes del huésped. En nuestro Dto. se capacitara a personal de los programas de control, para iniciar la red de diagnóstico tanto de EQ como la detección de Parásitos adultos en perro. En el diagnóstico de EQ se empleará la técnica de ELISA con antígeno total. La técnica de western blot, se utilizará para confirmar casos individuales. Se realiza empleando antígeno purificado por cambios en la fuerza iónica, llamado S2 B (Coltorti, 1989) es una fracción rica en componentes del antígeno 5 y B, considerando positivo cuando se visualizan las bandas de 55-65 kD perteneciente al antígeno 5 ya que los componentes del antígeno B no son reconocidos por todos los pacientes, La sensibilidad de esta última técnica fue del 100%, para el antígeno 5 y la especificidad del 95%, solo se observó reactividad cruzada, en pacientes con neurocisticercosis. Esta cross reacción de las bandas de 65-55 kD ya fue descrita anteriormente por otros grupos de trabajo. En todas las técnicas serológicas para disminuir la reactividad con componentes del líquido hidatídico, las diluciones de los sueros se realizan en un buffer con fosforil

colina, hapteno común en la naturaleza. Para evaluar el tratamiento quirúrgico o quimioterápico o cuando la serología es negativa, se emplea, Elisa de captura para la detección de antígenos circulantes (CAG) y complejo inmune circulante (CIC). El diagnóstico de equinococcosis en perros se realiza por ELISA de captura descrita por Allan et al (1992), de poco riesgo de contaminación con huevos tanto para el operador, como la población y el medio ambiente. Se emplea como anticuerpo un anti- antígeno total del parásito, obteniéndose una sensibilidad del 78% y una especificidad de 85% comparada con la purga de arecolina. Otro helminto presente en la República Argentina es la *Tricinellosis*, produce infecciones transmitidas por alimentos que se deben a la ingesta de carne de cerdos y sus derivados. La *Tricinellosis* produce diferentes tipos de antígenos, contra los que responde el sistema inmune del huésped. Dentro de estos antígenos se encuentra los de excreción-secreción que se originan en los esticosomas. Estos se emplean en técnicas inmunoenzimáticas que son útiles tanto para el diagnóstico de personas como de cerdos. También se utiliza la técnica de IFI donde se detectan antígenos de la cutícula del parásito. En nuestra experiencia la sensibilidad de ambas técnicas fue del 100%, mientras que la especificidad fue del 90% para ELISA y 76 % para la IFI. En este caso también se capacitará personal y se distribuirá antígeno para el diagnóstico por IFI. El control de calidad de estas técnicas serológicas se realiza mediante el control de antígeno, la titulación del conjugado con sueros de referencia. El Servicio de Inmunología del Dto. realiza estos diagnósticos para la Red Nacional de Helmintos, tanto para el diagnóstico clínico como para cooperar con los estudios de campo que soliciten las distintas jurisdicciones y hace control de calidad del diagnóstico aceptando muestras para confirmación del resultado como enviando muestras desconocidas a los laboratorios de la Red.

Mapa epidemiológico de las parasitosis en la República Argentina. GÜRTLER R coordinador

MR33. Epidemiología y control de la hidatidosis/ equinococcosis en América del Sur. LARRIEU E.

Consejo Provincial Salud Pública de Río Negro, Argentina. Cátedra de Epidemiología y Salud Pública de la U. N. de La Pampa. E mail: msrione@anmat.gov.ar.

La Hidatidosis/ Equinococcosis se extiende por todo América del Sud. Las zonas de mayor prevalencia son, sin embargo, las regiones rurales donde la cría de ganado es la actividad económica principal: Argentina, Uruguay, Chile, el sur del Brasil y las sierras del Perú. El ciclo oveja - perro es el más extendido en América del Sur ofreciendo las condiciones óptimas para el desarrollo del parásito. Esto ocurre al permitirse que los perros domésticos se alimenten de vísceras crudas de animales infectados, situación que se produce básicamente en el faenamiento para consumo en los establecimientos ganaderos, siendo habitualmente sacrificados con esta finalidad ovinos adultos que presentan altas tasas de parasitismo y elevado porcentaje de quistes fértiles. Los animales muertos en el campo, especialmente en el invierno, constituyen otra fuente de infección. La transmisión de la enfermedad también se produce en muchas áreas urbanas debido a las deplorables condiciones sanitarias de un gran número de mataderos que posibilitan la salida de desechos de faena sin tratamiento adecuado. A pesar de la dispersión de datos existentes, se ha estimado que más de 2.000 casos nuevos humanos se notifican cada año en la Región. En Argentina en particular, la hidatidosis está

difundida en todo su territorio, aunque alcanzando los mayores niveles endémicos en la Patagonia (Río Negro, Chubut, Neuquén, Santa Cruz y Tierra del Fuego), sur de Mendoza, Prov de Bs As, Corrientes y región noroeste (Jujuy y Salta) En relación al hombre, se han registrado 2096 casos nuevos en las Prov del Sur del País (Chubut, Río Negro, Neuquén y Tierra del Fuego) en el período 1984/88 (tasa de incidencia anual de 41×10^5) y 471 casos nuevos en la Prov de Bs As en el período 1983/87 (tasa de incidencia 0.8×10^5). En el período 1988/92 el promedio anual de casos para todo el país es de 464 casos (tasa de incidencia nacional de 1.42×10^5 , aunque en alguna de las Prov endémicas esta tasa se ubica entre el 32×10^5 y el 66.3×10^5). La mortalidad alcanza a 45 casos al año, siendo la tasa de letalidad del 6%. Entre el 2% y el 3% de los días/cama ocupados en los servicios oficiales en áreas endémicas, corresponde a enfermos de Hidatidosis. Encuestas seroepidemiológicas con DD5 realizadas en escuelas rurales de Río Negro revelaron que 2050 $\times 10^5$ de los niños eran portadores de quistes hidatídicos, ubicándose estas cifras en el 150×10^5 en la Prov de Bs As y en el 3010 $\times 100000$ en Tierra del Fuego. Las encuestas ultrasonográficas en población rural, por su parte, mostraron cifras de 5510 $\times 10^5$ en Pilcaniyeu (Río Negro), 14900 $\times 10^5$ en Loncopue (Neuquén) y 6200 $\times 10^5$ en (Chubut). El huésped definitivo, por su parte, presenta elevados niveles de parasitación. Las tasas globales de infección equinococcosis canina correspondientes a la Patagonia y la Prov de Bs As fluctuaban, antes de la aplicación de medidas de control, entre el 28.2% (Huiliches, Neuquén), el 40.2% (Cushamen, Chubut), el 41.5% (Ñorquinco, Río Negro) y el 28.2% (Azul, Bs As). En el ganado, las tasas más altas de infección hidatídica se han registrado también en La Región Patagónica, la Prov de Bs As y la Mesopotamia, con variaciones del 10% al 39% para los bovinos y del 8% al 63% para los ovinos. Se reconocen desde 1940 variados intentos de Control de la Hidatidosis en áreas endémicas de Brasil, Chile, Argentina y Perú. Estos intentos adquieren desde 1970 características de diseño integral en los Proyectos de Control de Neuquén (Argentina), Flores (Uruguay) y SAIS Tupac Amará (Perú) alcanzando éxitos parciales en la disminución de las tasas de prevalencia equinococcosis canina y en el número de casos humanos nuevos. En la actualidad se desarrollan Programas en forma estable en las Regiones XII y XI (Chile) puestos en marcha en 1979 y 1982 respectivamente, en las Prov de Tierra del Fuego, Río Negro, Chubut y Bs As (Argentina) desde 1975, 1979, 1980 y 1990 respectivamente y en Uruguay desde 1990. Estos Programas han desarrollado estrategias generales de Registro y desparasitación sistemática de canes con el tenicida Praziquantel, evaluación de la Equinococcosis canina mediante la dosificación a un porcentaje de perros con el tenífugo Bromhidrato de Arecolina, control de faena en mataderos oficiales y promoción de la construcción de carneaderos en establecimientos ganaderos, educación sanitaria, registro de casos humanos nuevos y legislación. También se han sistematizado encuestas seroepidemiológicas y, modernamente, encuestas ultrasonográficas en grupos humanos específicos (por ejemplo escolares o trabajadores rurales) para vigilancia epidemiológica, diagnóstico precoz y tratamiento específico (basado en el seguimiento ecográfico de los quistes de menos de 3 cm de diámetro, quimioterapia con albendazol como primera estrategia de ataque, tratamiento quirúrgico no invasivo mediante punción como segunda estrategia o tratamiento quirúrgico convencional en algunos tipos específicos de quistes) En conjunto, en América del Sur aproximadamente 221000 canes son sometidos a actualmente a desparasitación sistemática con Praziquantel. Los resultados de los Programas de Control en Chile, Argentina (ej.

Rio Negro y Tierra del Fuego) y Uruguay han sido alentadores, con una disminución sostenida en el número de casos humanos en las poblaciones de riesgo beneficiadas con las estrategias de control. BIBLIOGRAFIA 1.- Thakur A. Instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura. Serie de publicaciones N° 86-003, 1986; 2.- Larrieu E. Vet. Argentina. 54:612-621, 1991.3.- Ruiz A, Schantz P, Primo Arambulo III, PAHO/HCP/95/01, 306 pag. 1994.; 4.- Thompson R y Lymbery A.. Ed Cab Internacional (England) 465 pag, 1995. 5.- Schantz P, Colli C, y Cruz R. Tropenmedizen und Parasitologie. 27:70-8, 1976. 6.- Náquira F et al. Ed MINSa. Programa Nacional de control de zoonosis. pp 122-137, 1989. 7.- Morelle, A, et al. Comisión Nacional Honoraria de Lucha contra la Hidatidosis, Uruguay, 1994.;8.- Perdomo R,et al.. The Lancet 30, 1988. 9.- Bonifacino R, et al.Trans Roy Soc Trop Med Hyg 85:769-772, 1991.10.- Cabrera P, et al Hidatidosis (Uruguay) Vol II, 1996. 11.- Vidal M, Bonilla C, Jeria E. Enfoque epidemiológico de los Programas de Control de la Hidatidosis. XI y XII Región de Chile. Servicio Agrícola y Ganadero (Chile), 1992. 12.- Retamal C, et al. Resúmenes XXIV Jornadas Internacionales de Hidatidología. Colonia (Uruguay), 1996. 13.- Larrieu E,et al. Rev San Hyg Púb, 68:393-398, 1994. 14.- Larrieu E,et al. Bol Chi Parasitol 46:3-7, 1991. 15.- Zanini Fet al. Resúmenes XXIV Jornadas Internacionales de Hidatidología. Colonia (Uruguay), 1996. 16.- Frider B et al. Rev Iber Parasitol, 46:257-266, 1986. 17.- Frider B,et al. Acta Radiol 29:431-434, 1988. 18.- Frider B,et al. Acta Gastroent Lat Amer, 4: 199-211, 1985. 19.- Cabrejos P. Resúmenes XVII International Congress of Hydatidology. Limasol (Chipre), 1995. 20.- Bossio J, y Fernandez H. Instituto Nacional de Epidemiología de Santa Fé, mimeo, 1988. 21.- De Zavaleta O,et al. Subsecretaría de Salud de Neuquén, mimeo, 1986. 22.- Larrieu E, et al. Rev San Hyg Pub. 68:197-202, 1994. 23.- Coltorti E, et al. Am J Trop Med Hyg. 38: 603-607, 1990. 24.- Coltorti E. Am J Trop Med Hyg. 35: 1000-1005, 1986. 25.- Varela Diaz V y Coltorti E. Pan American Zoonosis Center, Buenos Aires, 1976.

MR34. Epidemiología de las enfermedades transmitidas por vectores en la Provincia de Salta. ZAIDENBERG M.

Programa Nacional de Paludismo, Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación.

Paludismo: El área endémica comprende las provincias de Salta y Jujuy, y en forma esporádica, Misiones y Corrientes en el NEA. En los Departamentos de San Martín y Orán, Salta, se producen alrededor del 80% de los casos del país. De éstos, más del 80% de los casos detectados en 1998 se hallaban asociados a migraciones internacionales. Los problemas asociados con el control del paludismo se relacionan con: 1. Geografía de difícil acceso asociada a las condiciones climáticas. 2. Contigüidad de áreas en la frontera internacional con zonas sin un control adecuado. La tendencia creciente en la ocurrencia de casos de los primeros seis años de la década del 90, que en 1996 alcanzó los 2.000, obligó a un planteo activo en la zona de los distritos de Yacuiba y Bermejo, Bolivia. Así, en 1996 y 1997, personal del Programa Nacional de Paludismo realizó vigilancia epidemiológica y rociado en áreas de riesgo. Posteriormente se produjo un sensible descenso alcanzando los 135 casos para mediados de 1999. Dadas las características del paludismo en Argentina, el control de la epidemia puede mantenerse a través del sostenimiento de las actividades de vigilancia epidemiológica y el rociado eventual con insecticidas en ambos lados de la frontera.

Leishmaniosis: Es una epidemia asociada al trabajo rural y a los desmontes. La década del 90 se caracterizó por una tendencia francamente creciente en el número de casos, superan-

do en los últimos dos años el canal endémico de la provincia de Salta (más de 900 casos por año). Las actividades del programa de control de la provincia están dirigidas a la búsqueda de pacientes, diagnóstico y tratamiento oportuno. Sin embargo, no se considera suficiente este abordaje dado que la gran mayoría de los casos está relacionado con los desmontes intensivos y las condiciones de trabajo. Por tanto, se insiste en la necesidad de involucrar a los distintos sectores de la sociedad para llegar a acuerdos para el cumplimiento de la legislación laboral vigente; difundir los elementos básicos para una adecuada protección del personal involucrado, y buscar el compromiso de las empresas en su cumplimiento.

Enfermedad de Chagas: La provincia de Salta se encuentra en Vigilancia. Desde hace más de una década el promedio provincial de infestación domiciliar es inferior al 3%. Sin embargo, hay zonas como los departamentos de Rivadavia, Metán, Anta, en las que periódicamente se producen focos de reinfestación. Tales zonas se encuentran localizadas en áreas fronterizas con zonas con bajo nivel de control de la epidemia, sumadas a las características geográficas, ecológicas y culturales que favorecen la multiplicación y dispersión de los triatomíneos. La vigilancia se lleva a cabo a través de los Agentes Sanitarios y la comunidad asistida en algunas áreas. Se insiste en la necesidad de buscar más protagonismo de sectores de la sociedad, como la comunidad docente (maestros, niños, familia) de la zona a través de talleres integrados con los Agentes Sanitarios locales. Con relación a la transmisión no vectorial, se realiza el control de todos los bancos de sangre oficiales mediante la determinación sistemática de pruebas serológicas. El control del Chagas perinatal se realiza mediante los controles serológicos de las embarazadas y el seguimiento del hijo de madre chagásica.

Dengue: En Salta, luego de la epidemia de dengue clásico de 1998, están presentes los siguientes factores asociados al riesgo de transmisión de la infección por dengue: 1. Factores entomológicos: Infestación alta por *Aedes aegypti* en los meses del verano. 2. Factores ecológicos: altas temperaturas y precipitaciones intensas. 3. Participación comunitaria en los programas de control: baja, en términos generales. 4. Agravamiento de la situación epidemiológica en Bolivia, Paraguay y Brasil: confirmación de casos de dengue clásico en Yacuiba, Bolivia; epidemia de dengue clásico y hemorrágico en dos departamentos del Paraguay; circulación de tres serotipos (I, II y IV) en Brasil. 5. Respuesta inmune y circulación viral. Un estudio representativo de la población realizado en la ciudad de Tartagal, aproximadamente un año después de la epidemia del año 1998, reveló una prevalencia de infección por serotipo II del 71% (determinaciones realizadas por el INEVH-ANLIS Malbrán de Pergamino). Información preliminar de un estudio serológico con 800 determinaciones realizadas en las localidades de Salvador Mazza, Aguaray, Orán y Embarcación indicó una prevalencia para Salvador Mazza de 7,2%, Aguaray, 9,1%; Orán, 8,4%, Embarcación, 25% (Laboratorio del hospital del Milagro, Salta). De este modo, es previsible la aparición de epidemias de dengue clásico cuya magnitud podría llegar a ser de grandes proporciones en tanto estén dadas las condiciones de referencia, con el agravante de la posible aparición de casos de dengue hemorrágico.

MR 35.Riesgo de Transmisión de *Schistosoma mansoni* en Argentina. SPATZ L, GONZÁLEZ CAPPA SM.

Depto. de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA

En Sudamérica algunas especies de caracoles acuáticos del género *Biomphalaria* sirven de hospederos intermediarios du-

rante el ciclo de vida del trematode *Schistosoma mansoni*. En las últimas décadas se produjo en Brasil, país con más de seis millones de personas afectadas por el parásito, una continua expansión de la enfermedad registrándose actualmente numerosos focos en los estados de Santa Catarina, Paraná y Rio Grande del Sur, vecinos a las provincias del litoral argentino. Aunque aún no se han comunicado casos autóctonos, existen en nuestro país siete especies del género *Biomphalaria*, dos de las cuales, *B. straminea* y *B. tenagophila*, serían potencialmente capaces de transmitir a *S. mansoni*. Hasta el momento, la determinación sistemática de estas especies de caracoles se realizaba en base a diferencias observadas en la morfología del aparato reproductor. En algunos casos, este método no permite diferenciar con certeza subespecies o especies gemelas dado que las diferencias morfológicas entre ellas pueden ser mínimas. Debido a ello se utilizaron técnicas de biología molecular (PCR y RFLP), para caracterizar a todas las especies del género *Biomphalaria* presentes en Argentina. La metodología utilizada permitió identificar y distinguir correctamente a aquellas especies y/o ejemplares que presentaban gran similitud morfológica pero que tienen distinta importancia epidemiológica dado que unas pueden ser hospederos intermedios de *S. mansoni* y otras no. A fin de evaluar la capacidad de transmisión del parásito que presentan *B. straminea* y *B. tenagophila*, se realizaron estudios experimentales de susceptibilidad utilizando diversas poblaciones de caracoles del litoral argentino. Los resultados de los ensayos con *B. tenagophila* mostraron entre un 4% y un 8% de caracoles susceptibles. La especie *B. straminea* se mostró refractaria al parásito. Debido a las modificaciones que pueden provocar otros trematodos en la capacidad de transmisión de los caracoles, se realizaron infecciones experimentales simultáneas con *S. mansoni* y *Z. Lunata*, parásito presente naturalmente en las biomphalarias del litoral. Se observó un 15% de caracoles *B. straminea* (anteriormente refractaria) parasitados con *S. mansoni*. Ésto modifica la importancia de *B. straminea* como potencial transmisor de la enfermedad, dado que a pesar de mostrarse resistente en el laboratorio, en ciertas circunstancias como la descrita anteriormente presenta un mayor porcentaje de caracoles parasitados. Tanto las poblaciones de *B. tenagophila* como de *B. straminea* estudiadas son circunstancialmente capaces de transmitir la parasitosis y representan un riesgo importante ante la eventual introducción del parásito en la región

Vectores y reservorios. SALOMON O coordinador

MR36. Actualizaciones sobre entomopatógenos de culícidos (Diptera: Culicidae) de la Argentina. MICIELI MV, GARCIA JJ Y LOPEZ LASTRA C.

Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) Calle 2 N° 584, 1900 La Plata.

En relajamientos de enemigos naturales realizados en distintas especies de culícidos de la Argentina se hallaron microsporidios, hongos, nematodos y bacterias. Los microsporidios son patógenos microbianos comunes en poblaciones de mosquitos. Los estudios realizados en microsporidios de culícidos abarcan aspectos taxonómicos (aislamiento e identificación), dilucidación de ciclos biológicos y estudios epizootiológicos. Se hallaron 18 microsporidios, 10 son especies nominadas pertenecientes a los géneros *Amblyospora* Hazard & Oldacre, *Parathelohania* Codreanu y *Hazardia* Weiser (1-3), siete fueron identificados a nivel genérico (4; 5) y uno incluido en el género colectivo *Microsporidium* Balbiani (3). Las investigaciones sobre ciclos biológicos se han desarrollado en

distintas especies del género *Amblyospora* y solo en dos de ellas se dilucidó el ciclo completo, incluyendo la identidad del hospedador intermediario y las tres secuencias de desarrollo, *Amblyospora albifasciati* García & Becnel, parásita de *Aedes albifasciatus* (Macquart) y cuyo hospedador intermediario es *Mesocyclops annulatus* (Wierzejski) (6) y *Amblyospora dolosi* García & Becnel, parásita de *Culex dolosus* L. Arribalzaga y *Metacyclops mendocinus* (Wierzejski) (hospedador intermediario) (7). En estas dos especies se han realizado estudios epizootiológicos con el objetivo de conocer la dinámica de estos dos sistemas, y evaluar los niveles de regulación natural que estos patógenos ejercen sobre sus hospedadores. Se comprobó que estos protistas presentan una elevada eficiencia en sus dos vías de transmisión, horizontal y vertical. La transmisión transovárica (vertical) permite la persistencia del parásito en condiciones adversas y en ausencia del hospedador intermediario y contribuye a la dispersión del microsporidio hacia nuevos ambientes, y la transmisión horizontal permite amplificar los niveles de infección. Esta habilidad para persistir en sus hospedadores constituye un atributo de estos microsporidios como controladores biológicos pero su baja virulencia, la elevada especificidad y la producción masiva de esporas difícil y costosa limitan su comercialización. No obstante, la necesidad de hallar medidas de control seguras desde el punto de vista ambiental ofrece posibilidades para el uso de estos protistas en programas de control integrado de plagas. Con hongos entomopatógenos se han realizado hasta el presente estudios taxonómicos, de ciclos biológicos, ensayos de patogenicidad y bioensayos de laboratorio. Se identificaron 13 especies fúngicas entomopatógenas (8-13). *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes: Saprolegniales) es la especie que presenta mejor potencial como agente de control biológico de mosquitos. Fue aislada a partir de larvas de *Ae. albifasciatus* recolectadas en un cuerpo de agua temporario en el partido de La Plata (13). Presenta un ciclo de vida de un solo hospedador, una patogenicidad elevada (100% de mortalidad a las 24 horas en larvas de *Ae. albifasciatus*, *Ae. aegypti* y *Ae. cinifer*) y es fácil de conservar en cultivos in vitro (agar harina de maíz) e in vivo (en larvas de *Ae. aegypti*). En larvas de *Culex pipiens* y *Ae. aegypti* fueron halladas bacterias que hasta el presente no han sido identificadas. Se están realizando estudios epizootiológicos del nematode *Strelkovimermis spiculatus* Poinar & Camino, parásito de *Ae. albifasciatus*. Los resultados preliminares muestran una elevada patogenicidad, con altos niveles de mortalidad natural en larvas de cuarto estadio. También se observó que las formas prepásitas o formas infectivas permanecen vivas al menos 7 días en condiciones naturales y 30 días en condiciones de laboratorio. Estos atributos y la posibilidad de ser criados masivamente (14) señalan un futuro promisorio de este patógeno para ser considerado en programas de control integrado de mosquitos. Bibliografía. 1-García, J. J. & N. B. Camino. 1990. Neotrópica 36 (96): 83-86; 2-García, J. J. & J. J. Becnel. 1994. J. Invertebr. Pathol. 64: 243-252; 3-Micieli, M. V. Inéd. Tesis doctoral, FC Nat. y Museo, UNLP, La Plata, 1996; 4-García, J. J. 1989. Rvta. Soc. ent. argent. 47 (1-4)(88): 100-108; 5-Micieli, M. V. y J. J. García. 1997. Rev. Biol. Trop. 44(3)/45(1): 635-639; 6- Micieli, M. V., J. J. García & J. J. Becnel. In press. J. Invertebr. Pathol; 7-Micieli, M. V., J. J. García & J. J. Becnel. 1998. J. Invertebr. Pathol. 72: 330 – 335; 8-García, J. J. & C. C. Lopez Lastra. 1989. Neotrópica. 35: 9-14; 9- Lopez Lastra, C. C. 1990. Rev. Argent. Micol. 13 (2): 14 –18; 10 - Lopez Lastra, C. C. & J. J. García & G. R. Reboredo. 1991. Bol. Micol. 6: 43 – 47; 11-Lopez Lastra, C. C. & J. J. García & G. R. Reboredo. 1992. Bol. Micol. 7: 13-16; 12- Lopez Lastra, C. C. & J. J. García. 1997 Rev. Iberoam. Micol. 14: 69 – 71; 13- Lopez Lastra, C. C., M. M.

Steciov & J. J. Garcia. En prensa. Rev. Iberoam. Micol; 14: Camino, N. B. y G. R. Reboledo. 1996 Neotrópica, 42: 47-50.

MR37. Entomología forense y miasis. OLIVA A.

Laboratorio de Entomología Forense - Museo argentino de Ciencias Naturales.

La entomología forense estudia los artrópodos que se encuentran sobre los cadáveres, a fin de datar el deceso y, de ser posible, deducir circunstancias que lo rodearon o lo siguieron. Para esto, se determinan las especies, ya que distintas especies son atraídas por diferentes etapas de la descomposición, y en muchos casos están activas sólo durante una parte del año. Además, se toma en cuenta el punto alcanzado por cada especie en su desarrollo ontogenético. Para aplicar esta técnica, es necesario conocer el tiempo que lleva el desarrollo de cada especie en diferentes condiciones. Los estudios en la Argentina mostraron que la sucesión difiere de la aceptada por los textos usados por los médicos. Aunque las especies más importantes son cosmopolitas que desplazan a las autóctonas, se comportan de manera diferente en una zona templado-fría (p. ej. París), una templado-cálida (Buenos Aires), o una subtropical (Posadas). Además, hasta bien entrado el siglo XX los estudios se hicieron en climas húmedos. En nuestro país hay grandes áreas áridas o semiáridas, para las cuales se requiere información. Además de pericias forenses, se están haciendo muestreos constantes en Capital Federal y un experimento de campo en Gran Buenos Aires. Casos ocasionales han mostrado que en nuestros climas subtropicales se dan condiciones que merecen estudio aparte. Se está poniendo énfasis en difundir esta disciplina entre médicos legistas, magistrados y funcionarios de policía, lo cual resulta más trabajoso por la falta de textos apropiados a nuestra realidad. La miasis es la invasión de tejidos vivos, animales o humanos, por larvas de mosca. Varias especies de interés forense pueden producir miasis accidentales, porque las hembras son atraídas por la presencia de bacterias en heridas o cavidades naturales. Unas pocas especies son parásitas obligatorias. Las miasis humanas endémicas en nuestro país son causadas por dos especies: *Dermatobia hominis* (Cuterebridae) y *Cochliomyia hominivorax* (Calliphoridae). Los médicos de Buenos Aires muchas veces desconocen la etiología de estas dolencias, lo cual perjudica el tratamiento. Los facultativos del norte del país tienen un buen conocimiento empírico de estos parásitos, pero al desconocer la bionomía de los insectos encuentran dificultades para la profilaxis.

MR38. Mosquitos y enfermedades emergentes. ALMIRÓN WR.

Centro de Investigaciones Entomológicas de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, UNC, Av. Vélez Sársfield 299, 5000 Córdoba, Argentina.

Los mosquitos merecen particular atención en todo el mundo, por su importancia como reservorios y vectores de enfermedades. El papel que desempeñan como vectores de enfermedades humanas como fiebre amarilla, paludismo o malaria, filariasis, dengue, encefalitis, etc., es perfectamente conocido. Su interferencia en el trabajo de campo, en la cría de ganado y su producción, se ve reflejada en las pérdidas que provocan. El paludismo es una de las enfermedades más importantes de la humanidad que parecía estar dominado al promediar la década del 50; sin embargo, en los últimos 30 años la infección recrudesció en muchos países. Aproximadamente el 56% de la población mundial vive en áreas endémicas, mientras que el 16% de esa población está radicada en regiones donde la infección ha sido eliminada recientemente. La mayor parte de los

casos se presentan en África, le siguen Asia y áreas del Pacífico y América Latina. La tendencia en América Latina (según la OPS), indicaba un ascenso continuo en el número de casos. El área palúdica, en la Argentina, abarcaba Salta, Jujuy, Tucumán, Santiago del Estero, Catamarca, La Rioja, Formosa, Chaco, Misiones, Corrientes y pequeñas áreas en San Juan, San Luis y Córdoba; *Anopheles pseudopunctipennis* es vectora en la región paraandina y *An. darlingi* en la región misionera. Actualmente quedan focos con problemas en Salta y Jujuy, es decir, que sólo en el 4% del área palúdica tradicional se registran casos. A pesar de la ejecución de un buen programa de control del paludismo en la Argentina, la OMS la señalaba como uno de los países en que el número de casos estaba aumentando. El dengue se ha convertido en la principal enfermedad viral transmitida por mosquitos en el mundo, especialmente en las zonas densamente pobladas de los trópicos, aunque también se extiende a regiones subtropicales y templadas. *Aedes aegypti* («mosquito de la fiebre amarilla») es el principal vector del virus causante de la fiebre amarilla urbana, tanto en África como en América, y también lo es de los virus causantes de dengue. En 1963, 17 países del continente americano certificaron la erradicación de *Ae. aegypti* de sus territorios, luego de las acciones que iniciara la OPS en 1947. Durante la década del 70, el apoyo de los distintos países a los planes de monitoreo y control de estos mosquitos disminuyó. Hacia finales de la misma década numerosos países habían sido recolonizados. En 1995, *Ae. aegypti* presentaba una distribución similar a la del año 1940, es decir, la falta de una política sanitaria a largo plazo condujo a que se malograra el esfuerzo realizado. La situación en la Argentina es similar al resto de los países americanos. Actualmente, Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Misiones, Salta, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán están infestadas por estos mosquitos. Los altos índices de transmisión de dengue en Bolivia, Brasil, Paraguay, Colombia, Venezuela y Centroamérica debieron alertarnos del riesgo, máximo en momentos de globalización cuando el intercambio comercial y turístico es importante. La reciente entrada de *Ae. albopictus* al país, otra especie de importancia sanitaria y relacionada a *Ae. aegypti*, podría contribuir a desmejorar la situación. Hasta ahora, en la Argentina sólo se registraron casos de dengue en Salta, Jujuy y Misiones. La erradicación de *Ae. aegypti* resulta muy difícil, consecuentemente las epidemias de dengue están aumentando en el mundo. Es necesario disminuir el riesgo de transmisión de estas enfermedades intensificando las acciones de educación sanitaria, vigilancia y control de vectores, estudiando la biología de los vectores, coordinando el esfuerzo de las unidades ejecutoras (municipios, provincias y nación) y de investigación.

MR39. Insectos y vertebrados. LIZARRALDE DE GROSSO M.

Instituto Superior de Entomología, U.N. de Tucumán E-mail: instlillo@infovia.com.ar.

Se han descripto hasta el momento alrededor de 1.700.000 de especies biológicas, de las cuales más del 50% son de insectos. Entre los factores más importantes del éxito de este grupo se encuentran su esqueleto altamente protector a la desecación, la colonización de ambientes terrestres antes que los cordados, su cuerpo relativamente pequeño, alta tasa de reproducción con generaciones cortas, excelente capacidad de vuelo y sus tipos metamorfosis. Sus hábitats y comportamientos alimentarios son muy variados, favoreciendo que alrededor de 300 mil especies de insectos sean directamente perjudiciales para el hombre. Producen daños en sus cosechas y pro-

ductos de origen vegetal, y atacan en forma directa al hombre y su ganado. Dentro del reino animal solo los insectos y los vertebrados han logrado conquistar con éxito el medio terrestre. Ambos han convivido durante prácticamente toda su historia evolutiva. En el curso de esta larga asociación las relaciones tróficas entre ambos han evolucionado hasta alcanzar el parasitismo por parte de algunos insectos sobre los vertebrados. Los ordenes Phthiraptera y Siphonaptera, varias familias y especies de Dermaptera, Hemiptera (Suborden Heteroptera), Lepidoptera, Coleoptera, y Diptera dependen de los tejidos (entre ellos la sangre) de los vertebrados para su existencia en una parte o durante toda su vida. Esto trae como consecuencia además la posibilidad de transmisión de organismos patógenos, entre huéspedes vertebrados incluyendo algunos de los responsables de muchas de las más importantes enfermedades del hombre. Pero no solo el parasitismo los une. En el pasado la abundancia de insectos como alimento de los vertebrados jugó un papel importante en la evolución de reptiles, aves, mamíferos en general y primates en particular. Por lo que nos muestran los fósiles, las formas más antiguas de cada grupo de vertebrados parecen haber sido insectívoras, y todavía en la actualidad los insectos son una fuente de alimento importante para muchos de ellos. Los pájaros urbanos más comunes se alimentan de insectos, así como también lo hacen algunos peces de agua dulce. Los insectos a su vez pueden ser predadores de vertebrados. En general la diferencia de tamaño entre insectos y vertebrados protege a estos últimos, pero sin embargo algunos de mayor tamaño llegan a alimentarse de pequeños vertebrados. Los vertebrados en general pueden

prevenirse con éxito considerable de la predación, pero no del parasitismo. Solo pueden evitarlo los vertebrados que viven sumergidos durante la mayor parte de su vida en el agua, sobre todo los que viven en el mar. A pesar de ello hay mosquitos que transmiten filarias a los leones marinos, y han sido observados picando peces que nadan a poca profundidad. El parasitismo ha evolucionado independientemente y varias veces a lo largo de las relaciones entre estos dos grupos de animales terrestres codominantes; los primeros reptiles coinciden con la aparición de los insectos y desde entonces coexisten sobre la tierra. No hay evidencias de hábitos de parasitismo en los primeros insectos; aunque existe la posibilidad de que los hubiera y hayan desaparecido con sus huéspedes sin dejar rastros. Se sabe si, que algunos ácaros evolucionaron como parásitos de vertebrados de sangre fría, igual que los Pentastomidos. En el Mesozoico ya los insectos tuvieron vertebrados de sangre caliente como posibles huéspedes. Los primeros insectos parásitos fueron probablemente dípteros con aparato bucal masticador, cuyas estructuras están muy relacionadas con el aparato sucto-picador de los actuales chupadores de sangre, conspicuos por la gran cantidad y variedad de huéspedes vertebrados que incluye también a los de sangre fría. La mayoría de los parásitos reptantes podrían haber evolucionado luego de que algunos vertebrados adquirieron la cubierta de pelos o plumas, la que los proveyó de tibieza, humedad y elementos para sujetarse y trasladarse en el huésped. Ellos han evolucionado probablemente, a partir de insectos que vivían en los nidos de los huéspedes o de otros insectos predadores o carroñeros.

GRUPOS DE TRABAJOS: GT

GT1. Meningitis y Enfermedades Respiratorias Bacterianas. LATINI OA¹, MICELI IP², REGUEIRA M³, BALBI L⁴.

¹INER. «E. Coni» ANLIS/Malbrán; ²Dirección de Epidemiología. MsyAS; ³INEI. ANLI.S-Malbrán; ⁴Hospital Humberto Notti, Mendoza, Mendoza. *Coordinadores.

Las enfermedades respiratorias agudas de origen bacteriano y las meningitis de igual origen son una de las principales causas de morbimortalidad infantil, hecho que conlleva una gran pérdida social por el sufrimiento y los años de vida potencialmente perdidos y también por el perjuicio económico que ocasionan debido a la calidad y complejidad de atención que requieren. La mayoría de las muertes pueden ser evitadas si se implementan acciones de prevención eficaces y una vigilancia epidemiológica adecuada para prever la evolución de las enfermedades. Hasta 1993 un alto porcentaje de las meningitis ocurridas en el país no tenía definición etiológica, a partir de ese año se comienzan a diferenciar en vírales y bacterianas y posteriormente con definición del agente; sin embargo aún persiste una alta proporción de meningitis en las que el agente no se aísla, debido a la oportunidad de solicitud del examen, a la inadecuada conservación o transporte de muestras o a problemas técnicos; a su vez la proporción de meningitis sin aislamiento es muy diferente en las distintas provincias, lo que indica diferentes grados de desarrollo de las redes provinciales. La definición del perfil de *N. meningitidis* en el país a partir de los hallazgos de los laboratorios, permite observar que actualmente predomina el meningococo C, aunque en algunas provincias se está incrementando la proporción de B, lo que permite a Epidemiología estar alerta y anticipar posibles medidas de control. La identificación de agentes de meningitis permite evaluar el impacto de la vacuna contra *H. influenzae* y un estudio que se lleva a cabo desde 1993 en 25 laboratorios re-

ferentes provinciales sobre *S. pneumoniae* invasivos permitirá definir la composición de la vacuna de mayor eficacia para Argentina. Estos son sólo algunos ejemplos del valor del laboratorio en la vigilancia epidemiológica. La Red de Laboratorios de Respiratorias Bacterianas comenzó a desarrollarse a partir de 1991 y hoy involucra a 70 laboratorios coordinados por el INEI en formación de recursos humanos, control de calidad interno y externo, distribución de recursos y recolección y análisis de información. El objetivo del control de calidad es fundamentalmente el de mejorar la calidad y en esta actividad se involucran 224 laboratorios del país públicos y privados. El desarrollo de las redes provinciales es variado aunque una alta proporción realiza actividades de capacitación, organización y está involucrada en el programa nacional de control de calidad. En la Provincia de Mendoza la organización de la red comenzó en 1993 al unirse a una Comisión Interdisciplinaria que elaboró normas de diagnóstico y que actualmente está compuesta por 15 laboratorios con capacidad de realizar cultivos y 2 referenciales, uno para adultos y uno para niños, con capacidad de serotipificación. El nivel referencial de la red coordina la capacitación. Esta organización permitió mejorar la calidad de la notificación obteniendo datos de mayor precisión (serotipificación); hecho que, unido a la circunstancia de un trabajo conjunto con el Depto Provincial de Epidemiología, posibilitó una mejor comprensión de los hechos que acontecen en la provincia, tales como el aumento leve de la mortalidad por neumonías a neumococos y el diseño de un estudio para investigar las posibles causas, o el aumento de la resistencia de *N. meningitidis* C y sus posibles consecuencias. La estrategia de trabajo en red aumenta la eficiencia de los laboratorios; este hecho se ha demostrado en aquellas provincias en las que se han desarrollado y en la mejora

de la calidad de la vigilancia epidemiológica. El trabajo coordinado con Epidemiología permite identificar las actividades prioritarias de la Red, que cuenta actualmente con recursos humanos capacitados y organización adecuada en varias provincias y un sistema de control de calidad con cobertura; resta mejorar aun la eficiencia en el país, incorporando a las provincias que aun no han logrado un buen desarrollo.

GT2. Enfermedades Febriles Exantemáticas BAUMEISTER E¹, PASSEGGI C², DÉCIMA DE WOLFF C³, LÓPEZ DE CAILLOU S⁴, MALLIMACI MC⁵, BELTRAMINO JC⁶.

¹Dpto de Virología, INEI/ANLIS MALBRAN, ²Servicio de Virología, Laboratorio Central, MS Santa Fe, ³Dirección de Epidemiología Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación, ⁴Laboratorio de Diagnóstico de Rabia Sistema Provincial de Salud, Salta, ⁵Hospital Regional de Usuhia Pcia de Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur, ⁶Hospital de Niños "Dr. Orlando Alicia", Santa Fe. ^a Coordinadores.

La importancia de contar con una Red Nacional de Laboratorios (RNL) de Enfermedades Febriles Exantemáticas (EFE) radica en la valiosa información que se puede obtener acerca de los agentes causales de las EFE en nuestro medio y de la verdadera extensión de tales enfermedades en nuestro país, colaborando activamente en la Vigilancia Epidemiológica nacional y en este caso en particular en un contexto internacional, ya que nuestro país se encuentra adherido al Programa de Eliminación del Sarampión de las Américas para el 2000. Otra de las misiones de una RNL es formar recursos humanos altamente capacitados y además contar con un sistema normatizado que asegure la buena calidad de la información obtenida y la posibilidad del cruzamiento de datos de diferentes regiones. Durante el desarrollo de la actividad se presentó la organización actual de la RNL de EFE, se informaron los resultados del funcionamiento de la Red durante el brote epidémico de Sarampión 97-98-99, se puso en evidencia el rol fundamental del laboratorio en la definición de los casos y que el estudio etiológico de las EFE necesita de la confirmación del laboratorio también en momentos no epidémicos. Se hizo hincapié en la necesidad de realizar intento de aislamiento viral del virus sarampión para poder hacer genotipificación y de esta manera distinguir casos autóctonos de importados. Las experiencias mostradas por los laboratorios de Tierra del Fuego y de Tucumán ratificaron la importancia de la comunicación entre el área de Epidemiología local y el Laboratorio, ya que trabajando en conjunto los esfuerzos individuales se complementan.

GT3. Meningitis e Infecciones Respiratorias Virales. FREIRE MC¹, BAUMEISTER EG¹, KNEZ V², MALLIMACI MC³, BORSA AM⁴, BALBI L⁵, DESCHUTER J⁶.

¹Dpto de Virología, INEI/ANLIS MALBRAN, ²Instituto de Virología "Dr. Jose María Vanela" Córdoba, ³Hospital Regional de Usuhia Pcia de Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur, ⁴Laboratorio de Virología, Hospital de Niños «Sor María Ludovica» La Plata, ⁵Hospital Humberto Notti Mendoza, ⁶Ministerio de Salud Pública, Posadas, Misiones. ^a Coordinadoras.

La importancia de la existencia de las Redes Nacionales de Laboratorios (RNL) de Infecciones Respiratorias Agudas y Meningitis Virales radica en la valiosa información que se puede obtener acerca de los agentes causales de dichas patologías en nuestro medio y de la verdadera extensión de tales problemáticas en nuestro país colaborando activamente en la Vigilancia Epidemiológica. Otra de las misiones de una RNL es

formar recursos humanos altamente capacitados para el diagnóstico virológico y además contar con un sistema normatizado que asegure la buena calidad de la información obtenida.

En este sentido la intención de este grupo de trabajo fue mostrar los logros obtenidos de la Red de Infecciones Respiratorias Virales, cuya creación data desde el comienzo de los años 90, la cual fue creciendo en número de laboratorios, capacidad de procesamiento de muestras y generación de datos fundamentales para la epidemiología nacional, en el transcurso de esta década. Cabe destacar que se pudo confirmar la circulación de los virus respiratorios clásicos con diferencias en la temporalidad de dichos agentes en puntos extremos de nuestro país, como por ejemplo en Tierra del Fuego. Otra consecuencia relevante del funcionamiento de esta Red es que le permite a las Instituciones donde funcionan los laboratorios integrantes adoptar acciones que tiendan a lograr un mejor manejo de los pacientes y en consecuencia un uso racional de los recursos de Salud, y que por primera vez en el año 1999 se pudo disponer de una vacuna para Influenza actualizada para nuestro país. El otro aspecto mostrado fue la necesidad de la implementación de una Red Nacional de Meningitis Virales. Teniendo en cuenta que la utilización de vacunas para los agentes bacterianos más importantes causantes de esta patología han reducido el impacto de estos agentes y han permitido dar a los agentes virales una relevancia que hasta el momento no era tenida en cuenta. En una primera etapa el Laboratorio Cabecera ha formado los recursos humanos necesarios de los Laboratorios participantes, como así también se encuentra organizando un sistema de control de calidad y gestionando la compra de insumos imprescindibles para el funcionamiento de la Red.

GT4. Redes de Gastroenteritis Virales. GÓMEZ J¹, BORSA A², GONZALEZ F³.

¹Dpto de Virología, INEI/ANLIS MALBRAN, ²Laboratorio de Virología, Hospital de Niños «Sor María Ludovica», La Plata, Buenos Aires, ³Laboratorio de Virología, Hospital de Niños «Ricardo Gutiérrez» Capital Federal. ^a Coordinador.

Ante la posible disponibilidad de una vacuna contra rotavirus (RV), en 1996 se puso en funcionamiento un Proyecto Multicéntrico de Vigilancia de Diarreas por Rotavirus. El análisis de los 2 primeros años ha permitido estudiar 1296 casos de diarrea de las cuales 549 (42,4%) fueron por rotavirus. La diarrea por RV fue observada durante todo el año con un pico entre los meses de Abril y Junio. La internación por RV fue mayor en el primer año de vida. De los 549 casos de diarrea por RV observados, el 66,7% (366 casos) fue de 0-11 meses de vida. Esta situación es de relevancia dado que la vacuna aprobada y recomendada para su uso masivo en los EEUU en Agosto de 1998, se aplica en 3 dosis entre los 2-6 meses de edad, por lo que podría prevenir la mayoría de los casos observados. Además, durante el primer año de vigilancia los serotipos mas encontrados fueron G2 (49,6%) y G1 (27,7%), mientras que durante el segundo año fueron los tipos G1 (50,7%) y G4 (26,9%). Dado que la mayoría de las cepas identificadas pertenecen a uno de los 4 serotipos presentes en la vacuna, la misma parece tener la composición adecuada para su utilización en nuestro país. Sin embargo, las variaciones observadas cada año a hacen necesario la instalación de un sistema de vigilancia epidemiológica constante de las cepas de rotavirus prevalentes. Rotavirus es el principal agente productor de diarrea infantil aguda en nuestro país y es llamativa la casi nula implementación de su diagnóstico en hospitales pediátricos. Por lo expuesto, se decidió incluir la vigilancia de este virus en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). En

abril de 1999 se elaboraron nuevas normas para el SINAVE que comenzarán a regir en el año 2000. El sistema de vigilancia elegido para rotavirus es en base a un sistema de Unidades Centinela (Red de Laboratorios de Rotavirus). Durante la reunión se presentó y discutió el protocolo de trabajo de la Red. Se recibió importantes sugerencias las que están siendo incorporadas al protocolo. Se prevé terminar de preparar la versión final del sistema de trabajo en el mes de Octubre de 1999. Ya han aceptado su participación y nombrado sus Unidades Centinelas las Direcciones de Redes de Laboratorio de 13 Provincias. Las mismas son: Chubut, Salta, Chaco, Formosa, Tucumán, Santa Cruz, Tierra del Fuego, Santa Fe, Catamarca, San Juan, La Rioja, Mendoza, y San Luis. La Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación (M.S.yA.S.) está culminando la compra de los reactivos necesarios, que serán enviados en forma periódica a las Unidades Centinela. Las mismas enviarán mensualmente una planilla con la información obtenida al Laboratorio de Gastroenteritis Virales del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS «Dr. Carlos G. Malbran». Este analizará la información, y preparará boletines para ser redistribuidos a las Unidades Centinela. También, recibirá las muestras rotavirus positivas para su caracterización molecular. Por último, enviará la información recibida a la Dirección de Epidemiología del M.S.yA.S., quienes la utilizarán para el diseño de políticas de salud y para su difusión masiva. Esperamos que la Red permita un mayor reconocimiento de la importancia de este patógeno. De esta forma se logrará un mejor manejo del paciente, del uso de la antibioticoterapia, del control de la diarrea intrahospitalaria, y una mejor asignación de recursos para una enfermedad que puede ser prevenida. La incorporación de la vacuna al programa de inmunizaciones es compleja y requiere mayor información. Para llegar a una decisión racional se necesitará la evaluación del impacto de la enfermedad en todo el país y un adecuado análisis costo-beneficio.

GT5. Red de Hepatitis Virales. GONZALEZ J¹, RIVA POSSE C², REY JA³, EPOSTO M⁴.

¹Dpto de Virología, INEI/ANLIS MALBRAN, ²MSAS de la Nación, ³Htal de Clínicas. Cdad. de Buenos Aires, ⁴Htal Posadas. Haedo. Buenos Aires. ^a Coordinador.

Antecedentes: En el ámbito del MsyAS de la Nación, en la Dirección de Epidemiología, a comienzos de 1992 se gestó el Programa Nacional de Control de las Hepatitis Virales, creándose un Grupo Asesor en el tema. Una de las estrategias para cumplir el objetivo de vigilancia epidemiológica, fue crear una red de Unidades Centinela Regionales (UCR) coordinadas por médicos y bioquímicos especialistas en el tema con el Laboratorio Nacional de Referencia como cabecera (LNR). El criterio base para el desarrollo de la Red fue: *recurso humano formado, *densidad poblacional y *distribución geográfica. Así se llegó a la designación de 10 Centros, 3 de los cuales comprenden mas de un laboratorio, haciendo un total de 14 laboratorios distribuidos estratégicamente en 9 jurisdicciones del país. En función de la experiencia adquirida, el GT decidió tomar como temas a discutir y/o revisar los que a continuación se detallan: 1) Regionalización: Las características particulares de algunas provincias de nuestro país, hacen que no siempre sea posible lograr una regionalización en términos de más de una jurisdicción Razones de índole presupuestaria y también de orden administrativo, han dificultado el desarrollo de las acciones y por lo tanto la integración regional. La proposición del GT en base a esta caracterización del tema, es extender el número de Unidades Centinela a todas las jurisdicciones del país (24), categorizándolas, en función del recurso humano y

de la complejidad de infraestructura tomadas en conjunto, priorizando la capacidad de resolución. Por lo tanto, la propuesta concreta es realizar una amplia invitación a participar en la Red a través de los responsables de laboratorio de cada jurisdicción, y que el Grupo Asesor realice una encuesta evaluativa de todos los laboratorios para su categorización. Se facilitará la integración de aquellos laboratorios que teniendo la voluntad requieran de formación de recurso humano y transferencia tecnológica para cumplimentar los requisitos de Unidad Centinela Provincial (UCP). Otro aspecto importante a tener en cuenta, sobre todo para facilitar la operatividad de las acciones, es lograr el reconocimiento de las autoridades locales y centrales de las funciones referenciales del laboratorio provincial y de la Red en el tema, ya sea a través de una designación oficial o a través de una circular. Reclamo este muchas veces formulado por los integrantes de la Red existente y que tiene su fundamento en mejorar las acciones propias de una Unidad Centinela para relacionarse e interactuar con distintas estructuras a diferentes niveles jerárquicos. 2) aportes al SINAVE: En el comienzo del Programa, en el año 1992, solamente cuatro jurisdicciones discriminaban las hepatitis en las notificaciones. Actualmente, todas las jurisdicciones en alguna medida discriminan en hepatitis A, B, C y no ABC (Boletín Epidemiológico Nacional 1998 p.42). En la medida en que todas las jurisdicciones estén integradas al Programa seguramente se mejorará la notificación. Aunque esto seguramente requerirá como mínimo: *revisar y mejorar la Red, *revisar y mejorar las vías de comunicación con los niveles centrales de Epidemiología provinciales en cada jurisdicción y a nivel central Nacional y *usar y mejorar los instrumentos de notificación (L2, C2 y ficha única para pedido de lab.). 3) supervisión: *Indirecta: se ha cumplimentado a través del Programa de control de calidad. Antecedentes LNR a partir de la coordinación de la red UCR del Programa Nacional de Control de Hepatitis Virales, cuenta con un Programa de Control de Calidad (PCC) para serología de Hepatitis B y C. Brevemente, el PCC consiste en la obtención, producción y envío, dos veces por año (Abril y Octubre), de un panel de cinco (5) miembros incógnita a todos los participantes, a quienes se les sugiere remitir el resultado en quince (15) días. Luego se envía la clave del panel a cada participante y con el envío del panel siguiente se adjunta un informe general ampliado y anónimo de todos los participantes donde se analizan todos los aspectos técnicos de los resultados recibidos. *Estado actual. Actualmente (Septiembre 1999), además de las UCRs, participan del PCC, Bancos de sangre de todo el país, debido a la necesidad existente en la materia, a partir de solicitudes recibidas espontáneamente o por conocimiento del PCC a través de colegas participantes en cursos o reuniones científicas de la especialidad. La evolución en el número de participantes puede verse en el siguiente cuadro:

Prog De Control De Calidad Serología Para Hepatitis B Y C

Panel	Fecha	Nº partic	Lab. UCR	S Hemoterapia Púv	Priv	Lab prov
I	10-1996	16	14	2	0	0
II	07-1997	19	14	5	0	0
III	10-1997	21	14	5	1	1
IV	04-1998	28	14	10	2	2
V	10-1998	39	14	20	3	2
VI	04-1999	50	14	26	3	7
VII	10-1999	?	14	¿?	¿?	¿?

U. Centinela Reg (UCR) 9 jurisdicciones, Serv. Hemoterapia (SHT) 17 jurisdicciones (algunas coinciden con las de las UCRs) estando comprendidas las 24 jurisdicciones del país.

Detalle técnico: El panel esta caracterizado para: HBV, HBsAg y antiHBc, HCV antiHC Por lo tanto teniendo en cuenta los cinco miembros del panel, cada laboratorio debiera remitir quince (15) respuestas (tres (3) marcadores por tubo).La realidad es que muchos laboratorios, sobre todo de Hemoterapia no incorporaron la determinación de antiHBc, por lo que solo remiten diez (10) respuestas del panel. *Directa: no se ha realizado en forma sistemática, si esporádica por el gasto que implica una supervisión in situ en todo el país. Sería conveniente considerar su implementación luego de la encuesta evaluadora para la ampliación de la Red. 4) Reactivos: a) aprobación : Dado que existen en el mercado distintas calidades de equipos diagnósticos, no obstante su aprobación por la autoridad competente, y que no se dispone de datos del control de calidad de distintos lotes, sería conveniente formar en el seno del Grupo Asesor con los laboratorios referenciales una comisión evaluadora de los reactivos que el Programa pueda adquirir.b) compra, distribución : Sería conveniente relevar periódicamente la disponibilidad de tecnologías de los laboratorios integrantes de la Red, para eficientizar el gasto y uso de los insumos. La compra de reactivos debiera programarse en función del cumplimiento de los objetivos y adecuar la distribución a las necesidades operativas discutidas en conjunto.Se recuerda que las compras a nivel central (Nación) son solo para impulsar y/o apoyar acciones discutidas en conjunto y aceptadas por las distintas jurisdicciones. Por lo tanto esto implica que no debe obviarse el apoyo local para la compra de insumos a través de las distintas modalidades existentes. Han participado en este GP en forma no presenciales: O Fay. Ctro Tecnol Salud Pública. Rosario. Sta Fe, A Rueda. Htal Padilla. Tucumán. Tucumán, M Kina. Htal Argerich. Cdad. de Buenos Aires. A Sorrentino. Htal Perrando. Resistencia. Chaco C Espul, Htal Central. Mendoza. Mendoza

GT6. Gastroenteritis Bacterianas y Cólera. RIVAS M^{1*}, AGUIRRE A², BALBI L³, NEPOTE A⁴

¹Dpto de Bacteriología, INEI/ANLIS MALBRAN, ²Laboratorio de Bacteriología, Hospital interzonal San Juan de Dios, La Plata, Buenos Aires. ³Hospital Humberto Notti, Mendoza, ⁴INER «Dr. Emilio Coni», ^a Coordinadora.

La Red de Cólera y Gastroenteritis Bacterianas se organizó a partir de la reaparición del cólera en la América, en 1991. Está constituida por: el Laboratorio de Referencia Nacional (LRN) en el Depto de Bacteriología (Servicios de Enterobacterias; Bacteriología Sanitaria, Antimicrobianos y Fisiopatogenia) del INEI; 27 Laboratorios de Referencia Provinciales; 137 Laboratorios de Nivel II y 294 Laboratorios de Nivel I. Se ha promovido y fortalecido el funcionamiento de la Red Nacional y las de las distintas Jurisdicciones a través de la implementación de las siguientes actividades: formación de recursos humanos, normatización de técnicas diagnósticas, transferencia tecnológica, control de calidad y provisión de reactivos e insumos de laboratorio, flujograma de la información. Los temas tratados en el Grupo de Trabajo (GT) fueron:1) organización de cada una de las redes provinciales; 2) actividades ya desarrolladas y aquellas planeadas para los próximos dos años (transferencia tecnológica, control de calidad, capacitación); 3) implementación de la ficha única de pedido de análisis y de la planilla L2 (resultados de los diagnósticos de laboratorio); 4) flujograma de la información en las actividades de vigilancia (análisis de resultados, integración con la clínica y la epidemiología, derivación de la información); 5) análisis de los resultados de notificación de diarreas por planilla C2 (diagnósticos médicos) y por laboratorio y del perfil etiológico de las diarreas bacterianas. La organización de las Redes en las Provincias

responde a la complejidad y necesidades de cobertura de las respectivas jurisdicciones y los recursos físicos, humanos y capacidad operativa disponible. Del intercambio de opiniones entre todos los participantes del GT, se consensuaron las siguientes recomendaciones: Cada una de las redes utiliza una nomenclatura diferente para designar a los laboratorios de acuerdo a la complejidad de las tareas que realiza, por lo cual surgió la necesidad de unificar criterios con las redes de otras patologías de manera de utilizar una forma única de denominación. Se coincidió en la necesidad de contar con un marco legal que avale la formación, el funcionamiento e integración de cada Red. En Bs. Aires si bien no existe como tal, en el año 1999 se designó al Hptal. San Juan de Dios como Referencia Provincial mediante resolución Ministerial. En Mendoza se creó la Red de Laboratorios de Salud por Resolución Ministerial 1971/98 y en Santa Fe el Programa Provincial Red de Laboratorios. Cada Jurisdicción tiene implementada la compra y distribución de insumos. Se enfatizó en la necesidad de contar con presupuesto propio a fin de facilitar la operatoria en red. Las actividades de capacitación se realizan en forma continua en los distintos niveles como así mismo la elaboración y distribución de manuales de procedimientos. En las distintas Jurisdicciones al menos los laboratorios referenciales participan en el Programa Nacional de Control de Calidad en Bacteriología y surgió como necesidad la implementación interna del mismo en todas las jurisdicciones. Se avaló la necesidad de contar con una ficha única de pedido de análisis y la implementación de la planilla L2, consensuada con otras patologías, como herramienta de recolección de resultados para la vigilancia epidemiológica. La Pcia. de Mendoza utiliza la L2 con buenos resultados, la Pcia. de Santa Fe lo hará a la brevedad, debiendo contar con softwares que faciliten el consolidado de datos y el análisis de los mismos. Se enfatizó en la necesidad de mantener el flujo de información dentro de cada Red, con los Departamentos de Epidemiología provinciales y con el LRN y la Dirección de Epidemiología Nacional. Se remarcó la necesidad de incorporar nuevas técnicas diagnósticas para incrementar el porcentaje de detección, conocer el perfil de patógenos asociados a diarreas ambulatorias y hospitalizadas y por grupo etéreo.

GT7. Manejo de patologías a través de Programas y Redes Lepra - Brucelosis. LUCERO NE^{1*}, FERRARA E², MONTEROS M³, GILLI MI², FRANCO R¹, ANTOLA MC^{4*}.

¹ANLIS "Dr. C.G. Malbrán", ²Programa Provincial Red de Laboratorios, M SP y M A, Av. Blas Parera 8260, 3000 SANTA FE, ³Programa de Zoonosis y Control de Vectores, M S P y A S, Centro Cívico Grand Bourg, SALTA, ⁴INP "Dr. M.F. Chaben" Dpto. Control Lepra, Paseo Colón 568, 1063-Bs As. ^aCoordinadoras.

Aunque Lepra y Brucelosis son antiguas enfermedades infecciosas de difusión mundial, a la primera se le atribuyen orígenes Bíblicos. Sin embargo el primer caso de Lepra en el mundo, confirmado con aislamiento, data de 1873 y el de Brucelosis de 1887. Hoy, mientras la Organización Mundial de la Salud plantea la meta de eliminación de Lepra en la primer década del año 2000, llama la atención la adaptación del género *Brucella* a modernos desafíos y su emergencia en nuevas especies de animales. En Argentina las primeras notificaciones de Lepra se recibieron en Buenos Aires, cabecera de programa, en 1906 y de Brucelosis en Mendoza en 1930. En la actualidad, si bien ambas enfermedades son de notificación obligatoria, Brucelosis permanece subregistrada. Mientras Lepra cuenta con un Programa Nacional de Control desde 1958 y hoy presenta una prevalencia nacional con valores inferiores

a 1 caso cada 10000 habitantes, cifra compatible con planes de eliminación, la segunda planifica la estandarización del diagnóstico. Con ese fin en 1994 fue creado en la ANLIS "Dr. C. G. Malbrán", el Laboratorio Nacional de Referencia de Brucelosis, con apoyo del Centro Argentino Brasileño de Biotecnología (CABBIO). Capacita y suministra información en prevención, diagnóstico, tratamiento y control de la enfermedad estimulando la notificación de los casos. La organización en Red le permite optimizar el uso de los recursos y llegar con rapidez a zonas endémicas. Hoy cuenta con Laboratorios Provinciales de Referencia en Santa Fe, Salta, Mendoza, Catamarca, Córdoba, Chaco, La Rioja y profesionales capacitados en San Luis y diferentes jurisdicciones de Ciudad Autónoma y provincia de Buenos Aires. Su meta es incluir paulatinamente a la totalidad de las provincias, realizar control de calidad externo al diagnóstico y transferir tecnología con mayor celeridad. Por tratarse de una enfermedad zoonótica, cada Red Provincial tiene una dinámica particular y características diferentes relacionadas con la clase y tipo de explotación animal, el asentamiento de industrias que procesan derivados de ese origen, los hábitos de la población, la existencia de otras redes en funcionamiento y metas orientadas a la recuperación de los pacientes. La prov de Santa Fe, donde su condición de pampa húmeda privilegia la producción de bovinos, comenzó a estructurar su Red en 1995. Está compuesta de 89 laboratorios de distintos niveles relacionados entre sí y con el laboratorio central, que actúa como referencia provincial. Su estrategia para alcanzar la normatización del diagnóstico se basa en la distribución de un manual de procedimientos, capacitación por medio de cursos y boletines informativos, provisión de reactivos estandarizados y el control de calidad externo. Hoy planifica incorporar a los servicios de hemoterapia, centralizando la distribución de insumos. La evaluación estadística de la información enviada por los laboratorios, permite conocer la situación actual de la brucelosis en Santa Fé que oscila entre 1.5-3.0%. La provincia de Salta, con Deptos donde la explotación caprina se utiliza como medio de subsistencia, comenzó con el armado de su Red en 1996. Hubo que sortear dificultades como el difícil acceso a las áreas endémicas localizadas en las zonas sanitarias del Centro, Norte y Sur. Se puso énfasis en la capacitación distribuyendo una cartilla informativa y reactivos estandarizados, además de estimular el envío de información sobre los casos para suministrar tratamiento gratuito a las personas infectadas. Hoy se planifica desarrollar el diagnóstico bacteriológico y continuar con los programas de educación sanitaria que se encuentran en marcha. El Programa Nacional de Lepra comenzó paulatinamente el proceso de descentralización operativa, fortaleciendo a los programas provinciales. Actualmente integran el área endémica las provincias de Buenos Aires, Chaco, Córdoba, Corrientes, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santa Fé, Sgo. del Estero y Tucumán. En todas ellas se encuentra instalada la descentralización operativa manteniendo el Programa Nacional sus propios referentes que actúan de manera coordinada con los provinciales en Buenos Aires, Chaco, Córdoba, Corrientes, Formosa y Tucumán. Todos los centros referenciales cumplen las Normas Nacionales relacionadas con el diagnóstico clínico y bacteriológico precoz, el tratamiento oportuno y regular de todos los casos conocidos y la prevención de las discapacidades. Las estrategias de control aplicadas actualmente y las perspectivas para el futuro inmediato se basan en la consolidación de este proceso en todas las jurisdicciones. Resta profundizar las acciones en las áreas regionales que aún mantienen altas tasas, trabajando sobre el estudio de la prevalencia oculta y optimizando procedimientos diagnósticos, de los cuales la bacteriología es pilar fundamental. El G T Lepra -

Brucelosis concluye que: *Asegurar la calidad del diagnóstico redundará en la correcta administración del tratamiento, *Priorizar y extender la capacitación básica mediante cursos, talleres o pasantías destinados al personal de laboratorio es uno de los beneficios más concretos para la integración de la Red, *Desarrollar el control de calidad a los procedimientos diagnósticos y supervisar a los referentes provinciales garantiza la calidad de la prestación, *Incorporar el diagnóstico bacteriológico en el primer nivel de atención permitirá conocer la fuente de infección en el caso de brucelosis y lograr el 100% de cobertura en el caso de lepra *Garantizar la disponibilidad de insumos del laboratorio de referencia provincial permite la continuidad de las líneas de acción desarrolladas.

Enfatizamos que para el control de una enfermedad es de importancia contar con un Programa y una Red de laboratorios. Teniendo en cuenta la definición de red: conjunto sistemático de hilos conductores o de vías de comunicación y aplicando este concepto a un programa de control, concluimos que del cruce entre la información epidemiológica producida por los efectores asistenciales y la suministrada por los referentes de los laboratorios, resulta un calificado diagnóstico de situación.

GT8. Diagnóstico de Toxoplasmosis. GRIEMBERG G¹, ARCAVI M¹, KAUFER F³, CORALLINI JC²

¹Laboratorio de Inmunología Htal de Clínicas J. de San Martín, Buenos Aires; ²Htal San Juan de Dios, La Plata, Buenos Aires; ³Htal Alemán, Buenos Aires. ⁴Coordinadora.

El diagnóstico de la toxoplasmosis está estrechamente relacionado con las siguientes situaciones clínicas: A) control de embarazo por el riesgo de primoinfección, B) infección congénita, C) inmunocomprometidos con posible infección aguda o reactivada, D) inmunocompetente en el diagnóstico diferencial de la infección aguda y de la ocular. No existe un método de laboratorio ideal para el diagnóstico de la primoinfección, por lo tanto debe seleccionarse una combinación de técnicas para cada instancia. Objetivos: 1.- seleccionar la metodología de estudio. 2.- reforzar la necesidad de realizar controles de calidad interno y externo. 3.- evaluar el interés de participación en una red de laboratorios. 1.- Metodología de estudio e interpretación de resultados: La situación óptima sería implementar técnicas que detecten tres isotipos de inmunoglobulinas: IgG, IgM e IgA. Las de elección para detectar IgG son inmunofluorescencia indirecta (IFI) e inmunoensayo enzimático (EIA), en el caso de no poder realizar ninguna de ellas deberá recurrirse a la aglutinación directa con 2-mercaptoetanol (AD-2ME). No se recomienda realizar hemaglutinación indirecta como única técnica. Para IgM e IgA se pueden utilizar ensayos de captura como EIA-doble sandwich (EIA-DS), ISAGA o IFI previa absorción del suero con absorbente anti IgG humana. Otra posibilidad, también por IFI, es la detección conjunta de ambas inmunoglobulinas como screening inicial (M. Arcavi et al. Journal of Clinical Microbiology, 35, N° 6, 1997). La seroconversión o el ascenso significativo de título en muestras pareadas tomadas con tres semanas de diferencia indican infección activa. La detección de anticuerpos (Ac) IgM y/o IgA específicos no certifican por sí solos infección aguda, debido a que estos Ac pueden perdurar en algunos casos hasta dos años después de producida la infección. A) Embarazo: a) Procesar una única muestra para detectar por lo menos IgG (o Ig total) e IgM. b) Procesar dos muestras pareadas, tomadas con tres semanas de diferencia, con una misma técnica para detectar IgG (o Ig totales). Si se obtiene serología negativa la paciente debe ser estudiada cada 2 ó 3 meses. Si presenta serología IgG positiva que se mantiene constante en el tiempo

con IgM e IgA negativas, indica infección crónica, por lo tanto no requiere controles posteriores. B) Infección congénita: a) Detección de IgM y de ser posible IgA. Sólo tiene valor diagnóstico cuando se demuestra la integridad placentaria. Un resultado negativo no excluye la infección. b) Detección de IgG. Debido al pasaje transplacentario sólo es significativa cuando perdura con igual o mayor concentración más allá del 6º mes de vida. Un valor negativo a partir del año excluye el diagnóstico de infección congénita. C) Inmunocomprometidos: Proceder igual que en el screening a) de la embarazada. Se debe tener en cuenta que en las reactivaciones la IgG puede mantenerse en niveles bajos y las IgM e IgA pueden no detectarse. En encefalitis toxoplásmica actualmente el método de elección es la PCR en LCR. D) Inmunocompetentes: Proceder igual que en el screening a) de la embarazada. Si el paciente presenta toxoplasmosis ocular como consecuencia de una infección crónica los niveles séricos de IgG pueden estar bajos y los de IgM e IgA ausentes o no detectables. 2.-Control de calidad: Es necesario que cada laboratorio implemente un control de calidad interno para que los resultados informados sean precisos. Cuando los resultados serológicos se expresan en valores de corte (cut off, UI) en general en los EIA, se debe trabajar con los estadísticos comunes a las reacciones cuantitativas. Para las metodologías semicuantitativas cuyos resultados se expresan en diluciones (IFI, AD-2ME), debe aplicarse la transformación logarítmica y utilizar los estadísticos correspondientes. Para poder establecer la exactitud de los resultados y que éstos sean comparables con otros laboratorios es necesario participar en un programa de control de calidad externo. 3.-Red de laboratorios: En la reunión del Grupo de Trabajo sobre Toxoplasmosis se expresó el interés por implementar una red de laboratorios con el objeto de definir pautas de trabajo, establecer criterios de interpretación y promover el intercambio de experiencia.

GT9. Contaminación parasitaria del agua y del suelo. BASUALDO JA¹, LURA C², FIGUEROA E³.

¹Cat. de Microbiología y Parasitología Fac. Cs Médicas. UNLP, ²Dpto de Microbiología Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, ³Bioquímica, Oran Salta. *Coordinador.

- 1.-Se destaca la importancia del control parasitológico en aguas de consumo.
- 2.-Se recomienda revisar y optimizar los procesos de tratamiento de agua a la luz de los nuevos conocimientos de parasitología ambiental.
- 3.- Se aconseja ampliar los estudios de contaminación parasitaria del agua y del suelo.
- 4.- Determinar el riesgo para salud humana de la presencia de Giardia, Cryptosporidium y Amebas y otros parásitos que se detecten en agua superficial, subterránea y tratada.

GT 10. Red Nacional de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos. TOKUMOTO M¹, ROSSI A², BALBI L³, NEPOTE A⁴.

¹Instituto Universitario de Ciencias Biomédicas Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular Fundación Favaloro, ²INEI, ANLIS MALBRAN, ³Hospital Humberto Notti, Guaymallen 5539 Mendoza, ⁴INER «Dr. Emilio Coni» Blas Parera 8260, Santa Fe 3000. *Coordinadoras.

El incremento de la prevalencia de bacterias con resistencia a las drogas de primera línea para el tratamiento de las infecciones más frecuentes es una problemática sanitaria mundial y nuestro país no escapa a dicha situación. Aislamientos tales como *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la penici-

lina y a las cefalosporinas, *Staphylococcus aureus* multiresistentes, *Enterococcus faecium* vancomicino resistente, enterobacterias con β -lactamasas de espectro extendido que las protegen de las cefalosporinas de última generación, *Pseudomonas aeruginosa* con eficientes mecanismos de eflujo de drogas pertenecientes a diferentes familias de antimicrobianos y que presentan así resistencia a prácticamente todas las drogas disponibles, entre otros, merecen un seguimiento estrecho y el desarrollo de sistemas de vigilancia que permitan establecer prevalencias, patrones de diseminación y verificar la eficacia de las medidas de control que sean implementadas. El Servicio Antimicrobianos del Departamento Bacteriología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) ha desarrollado una red nacional con la participación de 33 laboratorios, tanto del área pública como privada, distribuidos estratégicamente a lo largo del país. Recibe mensualmente los resultados de las pruebas de sensibilidad de todos las bacterias involucradas en procesos infecciosos que estudia cada laboratorio, así como los resultados obtenidos en las pruebas de control interno de calidad de las pruebas de sensibilidad. Por otra parte cada laboratorio participa en dos controles de calidad externos, uno organizado por el INEI, con la colaboración del Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires, por el que se distribuyen dos encuestas semestrales y boletines de actualización y un segundo programa, impulsado por la Organización Mundial de la Salud, con el CDC de USA como centro de referencia. Los profesionales de los laboratorios miembros de la red han participado en el Curso Intensivo de Actualización en Antimicrobianos que se dicta anualmente y en Talleres específicos para la red, para la discusión de los resultados obtenidos y el análisis de las dificultades que se detectan. El conjunto de estas actividades pretende contribuir al desarrollo de instituciones que puedan asumir el rol de laboratorios referenciales para cada región. Un objetivo a largo plazo es la constitución, en cada provincia, de una red de laboratorios para el relevamiento más pormenorizado de la resistencia a los antimicrobianos. Para ello debería constituirse un grupo de trabajo conformado por el Responsables de la Red de Laboratorios Provincial, participantes de la Red WHONET Nacional y representantes de otros hospitales de importancia para la región. Este grupo podrá coordinar la recolección de los datos, analizar y confirmar los resultados obtenidos y participar en la confección de recomendaciones para el control de los niveles de la resistencia a los antimicrobianos. Son varias las provincias que han iniciado actividades en este sentido, entre ellas las de Mendoza, Misiones, Santa Fe, Neuquén y Santa Cruz. En general, una de las primeras etapas están relacionados a la implementación de programas provinciales de control de calidad que permitan aumentar la confiabilidad de los datos colectados. Estos programas de control externo de calidad están basados en los microorganismos y materiales que remite el INEI, a través de su Programa Nacional de Control de Calidad. En Santa Fe se han realizado encuestas de control de calidad de la identificación bacteriana de *V. cholerae*, *Aeromonas hydrophila* y *Pseudomonas aeruginosa*; de los 30 laboratorios encuestados contestaron 20, todos en forma correcta. Se analizaron los resultados y se elaboró un informe con sugerencias para mejorar la identificación bacteriana. Para el corriente año, se prevee la realización de un taller de capacitación sobre control de calidad, el envío de cepas de referencia y normas internacionales de interpretación del NCCLS. En Mendoza, se realizaron dos encuestas de control de calidad para 22 laboratorios, en base a los microorganismos enviados por el Programa Nacional y se elaboraron estrategias para aumentar el nivel de respuestas recibidas. La ampliación de experiencias como las descriptas permitirá el desarrollo de

estrategias para la descentralización y regionalización, con transferencias de recursos y responsabilidades, de manera de establecer una verdadera red de laboratorios para mejorar la

vigilancia de los niveles de sensibilidad y detectar tempranamente la emergencia de nuevos mecanismos de resistencia bacteriana.