

Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas Emergentes

Publicación Científica de la Asociación Argentina de Zoonosis

Volumen IX • Nº 2 • Junio 2014



“NUESTRO ÉXITO
ES EL ÉXITO DE LOS DEMÁS”

Fundación
ARGENINTA

WWW.ARGENINTA.ORG.AR



YouTube

Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas Emergentes

raZyEie

Publicación científica cuatrimestral
de la Asociación Argentina de Zoonosis

Comité Editorial

Directores

Dr. Alfredo Seijo
Hospital Muñiz - Ciudad de Buenos Aires - Argentina

Dr. Pablo Martino
*Comisión de Investigaciones Científicas -
Provincia de Buenos Aires - Argentina*

Secretaría científica

Dra. Bibiana Briguega
*Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria -
Buenos Aires - Argentina*

Secretaría de relaciones institucionales

Dr. Gabriel Capitelli
Relaciones Internacionales - Universidad de Buenos Aires - CABA

Secretaría de redacción

Lic. Karina Veliz
*Asociación Argentina de Zoonosis - Ciudad de Buenos Aires -
Argentina*

Secretaría de redacción on line

Dr. Sergio Giamperetti
Hospital Muñiz - Ciudad de Buenos Aires - Argentina

Consejo Editorial

Argentina

Dr. Miguel A. Basombrío
Universidad Nacional de Salta (UNSA) - Salta

Dr. Juan Basualdo Farjat
*Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de
La Plata - Buenos Aires*

Dr. Jorge Bolpe
Ministerio de Salud - Provincia de Buenos Aires - Azul

Dr. Marcelo Corti
Hospital Muñiz - Ciudad de Buenos Aires

Dra. Sabrina Domené
*Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y
Biología Molecular - Ciudad de Buenos Aires*

Dr. Ricardo Durlach
Hospital Alemán - Ciudad de Buenos Aires

Dra. Delia Enría
*Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas
"Dr. Julio I. Maiztegui" - Pergamino - Pcia. Buenos Aires*

Dr. Amadeo Esposto
*Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de
La Plata - Provincia de Buenos Aires*

Dr. Jorge Gordner
*Académico de Medicina. Universidad Nacional del Noreste -
Corrientes*

Dra. Marina Khoury
*Asesora del Comité de Docencia e Investigación - Instituto de
Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari"*

Dr. Olindo Martino
Academia Nacional de Medicina - Buenos Aires

Dr. Ramón Noseda
Laboratorio de Azul - Provincia de Buenos Aires

Dr. Domingo Palmero
Hospital Muñiz - Ciudad de Buenos Aires

Dr. Alberto Parma

*Universidad Nacional del Centro Laboratorio de Inmunquímica y
Biotecnología (CIC) Tandil - Buenos Aires*

Dra. Marta Rivas

*Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS
"Dr. C. G. Malbrán" - Ciudad de Buenos Aires*

Dr. Ricardo Rodríguez

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - Buenos Aires

Dr. Daniel Salomón

Instituto Nacional de Medicina Tropical - Misiones

Dr. Luis Samartino

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - Buenos Aires

Dr. Alejandro Schudel

Fundación PROSAIA - Ciudad de Buenos Aires

Dra. Cristina Salomón

*Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Cuyo -
Mendoza*

Dr. Eduardo Zerba

*Centro de Investigación en Plagas e Insecticidas (CIPEIN).
CITEFA-CONICET*

Del Exterior

Dr. Juan Arbiza

Facultad de Ciencias - Montevideo - Uruguay

Dr. Joan A. Cayla i Buqueras

Agencia de Salud Pública de Barcelona - España

Dr. César Cabezas

Instituto Nacional de Salud - Perú

Dr. José Guillermo Estrada Franco

División Medicina. Universidad de Texas - EE.UU.

Dr. Eduardo Gotuzzo

*Instituto de Medicina Tropical "Alexander von Humboldt".
Universidad Peruana Cayetano Heredia - Perú*

Dr. Marcelo Gottschalk

Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de Montreal - Canadá

Dra. María Guadalupe Guzmán

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" de la Habana - Cuba.

Dr. Yoshihisa Haschiguchi

Universidad de Kochi - Japón

Dr. Dionisio José Herrera Guilbert

*Director, Red de Programas de Formación en Epidemiología de
Campo y Salud Pública (TEPHINET) - EE.UU.*

Dr. Álvaro Hilinki

*Medicina Tropical e Infectología. Facultad de Ciencias Médicas
de Santos - Brasil*

Dr. James Le Duc

*Galveston National Laboratory. Departamento de Medicina.
Universidad de Texas - E.E.UU.*

Dr. Santiago Mas Coma

Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia - España

Dr. Christopher Paddock

*Infectious Diseases Pathology Branch. Centers for Disease
Control and Prevention - Atlanta - EE.UU.*

Dr. Hector Ratti Jaeggli

Academia Nacional de Medicina del Paraguay

Dr. Eric Martínez Torres

*Miembro del Tribunal Permanente de Infectología y Medicina
Tropical de la Comisión Nacional de Grados Científicos y miembro
de Grupo Internacional Estrategia de Gestión Integrada -
Dengue de la OPS y del Grupo de expertos en Dengue en TDR/
OMS - Cuba*

Dr. Pedro F. C. Vasconcelos

Instituto Evandro Chagas (IEC). WHOCC - Brasil

ÍNDICE

■ Acerca de la ilustración de tapa	4
■ Editorial	5
■ Artículo Original	
■ Diagnóstico molecular y serológico de leptospirosis humana en la provincia de Buenos Aires, Argentina Molecular and serologic diagnosis in human leptospirosis (Buenos Aires province, Argentina) Mariana Recavarren, et al.	6
■ Artículo especial	
■ Muñiz-Darwin y la vaca ñata Muñiz- Darwin and the “cow ñata” Alfredo Seijo	13
■ Artículo de revisión	
■ Evidencias sobre el uso del freezer como riesgo potencial para la infección con <i>Escherichia coli</i> verotoxigénico Use of the freezer as a verotoxigenic <i>Escherichia coli</i> potential risk Mariana Alejandra Rivero, et al.	17
■ Comunicaciones breves	
■ Utilización de la PCR en el diagnóstico de bartonelosis en pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos Bartonellosis diagnosis by PCR in immunodeficient and immunocompetent patients Jorge Correa, et al.	20
■ Aislamientos de <i>Campylobacter spp.</i> de localización extraintestinal Falta título en ingles Alicia Hoffer, et al.	21
■ Reexaminación paleoparasitológica de coprolitos de roedores procedentes de la Patagonia argentina considerando información parasitológica actual Paleoparasitological reexamination of rodent coprolites from Argentinean Patagonia, considering current parasitological data Martín H. Fugassa, et al.	23
■ 15 años de formación en Salud Pública Veterinaria 15 Years of Veterinary Public Health Training Cecilia González Lebrero, et al.	24
■ <i>Bartonella spp.</i> en murciélagos <i>Tadarida brasiliensis</i> de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires Bartonella spp. in <i>Tadarida brasiliensis</i> bats, Buenos Aires city Gabriel L. Cicuttin, et al.	26
■ Diagnóstico serológico de brucelosis en perros del conurbano sur bonaerense Serological diagnosis of Brucellosis in dogs from southern Greater Buenos Aires Diego Eiras, et al.	27
■ Desarrollo de un método para producir vacuna antirrábica en cultivo de células Vero Rabies vaccine development in Vero cell culture María Rosario Tubio, et al.	29
■ Distribución espacial y prevalencia de geohelminthos en humanos de la región del Litoral Argentino Spatial distribution and prevalence of Soil-Transmitted Helminths in human in the Argentinean Litoral Silvia Grenóvero, et al.	30
■ Leishmaniasis visceral canina en el Área Metropolitana de Buenos Aires Canine visceral leishmaniasis in the Metropolitan Buenos Aires Area Gabriel L. Cicuttin, et al.	32
■ Leptospirosis asociada a nuevos escenarios epidemiológicos. Descripción de dos brotes en Santa Fe, Argentina Leptospirosis associated new epidemiological settings. Description of two outbreaks in Santa Fe, Argentina Carolina Cudós, et al.	33
■ AMPK and calcineurin are cellular master regulators with opposite activity during reverse vesicular development in <i>Echinococcus granulosus</i> larval stage AMPK y calcineurina son reguladores celulares claves con actividad opuesta durante el desarrollo vesicular en el estadio larval de <i>Echinococcus granulosus</i> Julia A. Loos, et al.	35
■ Parásitos de interés zoonótico y parasitosis intestinales humanas: situación y gestión de soluciones a escala local en una ciudad de Patagonia (Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina) Parasites of zoonotic interest and human bowel parasitosis: situation and solution Management on a local scale in a Patagonian city (Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina) Torrecillas C, et al.	36
■ Monitoreo del virus de la fiebre amarilla y otros arbovirus de importancia sanitaria en mosquitos de la ciudad de Puerto Iguazú, Misiones Surveillance of yellow fever virus and others arboviruses in mosquitoes in Puerto Iguazú, Misiones Silvina Goenaga, et al.	39
■ Factores de virulencia y multiresistencia en cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> aisladas de infecciones invasivas humanas Virulence factors and multidrug resistance in <i>Enterococcus faecalis</i> strains isolated from human invasive infections Celia Schell, et al.	40
■ Detección de leptospiras patógenas mediante PCR usando los iniciadores LigBF y LigBR Detection of pathogenic leptospires by PCR using LigBF and LigBR primers Mara Martínez, et al.	42

■ **Genes de *Leishmania infantum* asociados a visceralización en el desarrollo de vacunas recombinantes**

Leishmania infantum visceralization-related genes for the development of recombinant vaccines
Adriana M. C. Canavaci, et al. 43

■ **Vigilancia epidemiológica de la rabia en animales silvestres de Tierra del Fuego**

Epidemiological surveillance of rabie in wild animals of Tierra del Fuego
Vilma Disalvo, et al. 44

■ **Vigilancia laboratorial del virus Chikungunya (CHIKV) en la Argentina**

Laboratory surveillance Chikungunya (CHIKV) virus in Argentina
Victoria Luppo, et al. 45

■ **Informe institucional**

■ **Trichinellosis: evolución post brote epidémico (2010) en Mendoza, Argentina**

Trichinellosis: Evolution post outbreak (2010) in Mendoza
María Cristina Marsano, et al. 47

■ **Caso clínico**

■ **Aislamiento de *Leptospira interrogans*, de líquido cefalorraquídeo, en un paciente coinfectado con VIH/HVC**

Falta título inglés
Humberto Metta, et al. 51

■ **Imágenes en Zoonosis**

■ **Megavisceras en la enfermedad de Chagas**

Megavisceras in Chagas disease
Arturo Franco Garcés, et al. 54

■ **Reglamento de Publicación** 55

A la memoria del cacique tehuelche Orkeke

Réquiem para un rey patagónico

“Al desembarcar en La Boca se acentuó el enojo del patagón ante la mirada absorta o de suficiencia de los parroquianos. Sentía que se lo observaba como si se tratara de un animal salvaje. Tan luego a él, al heredero político de Casimiro Biguá, el gran amigo de los argentinos a quien Mitre presidente había premiado con un sello de plata que decía “Casimiro Biguá, gobernador de San Gregorio” y que desde la muerte de aquél conservaba como lo más preciado; a él que había renunciado a las prebendas propuestas por la milicia chilena para colaborar con la Gobernación de Punta Arenas, retirándose de un despacho a los gritos jurando lealtad a la Argentina; al acompañante del inglés Musters en su viaje de 1869, del que cosechó los más honrosos elogios, luego publicados por el marino en su ‘At home with the Patagonians’; al amigo fiel de Moyano, de Moreno, de Piedrabuena, de Lista y al anfitrión de todos los viajeros a quienes se les había presentado como una luz en el desierto”.

Este pasaje escrito por Jorge Carman, en la publicación citada, aparece aportando datos a modo de prólogo, sobre Ramón Lista, y un episodio triste e indignante de nuestra historia. El título de la obra de Lista, es premonitorio de lo que acabará pasando poco después y del martirio sufrido por Orkeke, que merece ser conocido por los argentinos.

Ramón Lista.
“Los indios tehuelches, una raza que desaparece”.
Buenos Aires, Patagonia Sur, 2006. 128p.

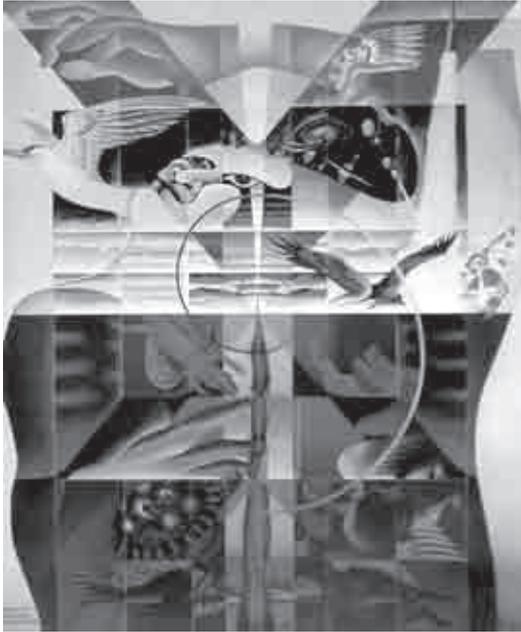
La Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas Emergentes (raZ y Eie) forma parte de la Asociación Argentina de Editores Biomédicos y es indizada por SIIC Data Bases

Registro de Propiedad Privada: DNDA N° 5083300
Asociación Argentina de Zoonosis: Chile 1856 (1227) CABA

Tirada: 1100 ejemplares.

Impreso por: 
Perón 935 (1038) C.A.B.A.
ideografica@netizen.com.ar

Acerca de la ilustración de la tapa



“América, la Elección del Despertar” (1975),
Pérez Celis (1939-2008)

Una de las premisas impuestas en estos últimos años, por la AAZ, es conformar, con otras asociaciones similares, una entidad latinoamericana. El objetivo de sumar esfuerzos que concurran a metas similares, es el motor que anima la idea. El espectro es amplio: desde el intercambio científico, hasta la planificación de programas de control y prevención para aquellos problemas sanitarios comunes a la región. RaZ y Eie, puede contribuir a definir ese perfil, y aglutinar a los grupos de trabajo, dispersos en la dilatada geografía americana. La obra que presentamos en la tapa, resume este sentir. Es un acrílico sobre lienzo, que data de 1975, “América, la Elección del Despertar”, de uno de los grandes artistas nacionales contemporáneos: Pérez Celis (1939-2008). Nació y falleció en Buenos Aires y se crió en el barrio de Liniers, al oeste de la ciudad, en las conocidas “mil casitas”. Población de una clase media trabajadora, que logró, en la década del 60, que muchos de sus hijos tuvieran acceso a la universidad, o bien que poseyeran, gracias a la escuela pública primaria y secundaria, una formación integral, por desgracia catalogada luego de “enciclopedista” y sin objetivos y denostada por no ser “práctica”. Desvalorizaciones y conceptos erróneos, que contribuyeron, junto a otros factores, a la decadencia educacional y cultural, por la que atraviesa la Argentina. Incluso, alguno de esos hijos de obreros, como es el caso del mismo Pérez Celis o el de Alfredo Alcón, reciente-

mente fallecido, ambos del mismo barrio, llegaron a los máximos reconocimientos por sus actividades culturales. Uno como artística plástico, el otro en el fascinante mundo del teatro y la tragicomedia. Su gran compañera, tanto en los primeros pasos, y luego ya reconocido como gran artista plástico, fue Sara Fernández, vecina de Villa Luro, a quien dicen conoció caminando por la avenida Rivadavia. Lo acompañó desde fines de la década del 50 hasta mediados de los 70, cuando falleció en un accidente automovilístico. Pérez Celis transitó por diversos espacios y tiempos. Desde sus primeras exposiciones: Museo de Arte Moderno, Salón Nacional, Galerías Rubbers y Witcomb, sus vivencias en Uruguay, hasta su periplo por las tierras incaicas, fueron conformando una línea estética relacionada con la cultura precolombina y con el sentimiento americano. Esta época existencial, se plasmó en obras como El Sol Nuestro, Retablo del Sol, El Templo o Rey América, que muestran, o mejor sugieren, formas que fueron comunes en casi todas las culturas “de montaña”, desde los pueblos diaguitas hasta el imperio incaico. Algo similar sucedió cuando a su regreso de Perú, recorrió las inmensidades de nuestras llanuras y desiertos pampeanos, estudiando sus culturas. De este período, surgió otro tipo de pintura, como De la Pampa al Sur, El Gran Cacique, Pampa Roja y otros. Existió una constante en su obra, y fue la de no alinearse con ninguna escuela o tendencia artística, que también fue una forma de vivir y comprender la vida. *“Más importante que el país que recibimos es el que tenemos que dejar”*. Esta percepción dialéctica de la vida, en tiempos tumultuosos de nuestra historia reciente, le permitieron pensar: *“Existe una América real, desordenada, cruel, llena de connotaciones podríamos decir sociales, económicas, políticas. Pero esa América sufre transformaciones, y el tiempo dice que existe (porque debe existir dado que la evolución es un rasgo de la raza) una América ideal, profunda, desconocida. En ese umbral, donde dos Américas, la que veo y la que presiento, se unen, creo, nace mi pintura”*. Y así, vuelven a surgir formas y expresiones distintas y más complejas: Ascenso y Descenso Indoamericano, Pájaro de la Fertilidad y la obra elegida para la tapa de este número: la Elección del Despertar, donde conjuga elementos geométricos con el ambiente animal y vegetal americano. Es en esos días fructíferos y plenos de su vida, que muere Sara, y en 1976 se radica en Venezuela y México. Luego vendrá Europa y Nueva York, para ya consagrado, entrar y salir de Buenos Aires, volver a transformar en nuevas modalidades, formas y colores su pintura... pero esa es otra historia.

Editorial

25° aniversario de la Asociación Argentina de Zoonosis

Tenemos una sólida reputación que data de hace mucho tiempo. Somos una entidad líder en la región para profesionales de las zoonosis. La AAZ, como organismo sin fines de lucro, resume su filosofía de responsabilidad social en su compromiso con la comunidad de la salud pública en general, y desde luego, con la transparencia y custodia de sus recursos financieros y editoriales a través de *raZyEie* y el libro '*Temas de Zoonosis*'. Nuestro modelo ha superado la prueba del tiempo y por eso en pocos días cumpliremos 25 años de servicio a la comunidad científica. La Asociación y su Revista transitaron por tiempos difíciles. Hoy tenemos menos excusas, aunque ahora enfrentemos factores como aislamiento geográfico, infraestructuras públicas pobres y exorbitantes gastos de impresión. Con respecto al futuro, preparémonos llevando a cabo un análisis sincero de nuestra Asociación. Preguntémonos, por ejemplo, si nuestros proyectos siguen siendo significativos, sostenibles y relevantes, y si nuestras reuniones o eventos siguen siendo agradables y productivas.

¿Qué esperanzas incumplidas no supimos satisfacer en estos 25 años? Ahora es el momento de concentrar nuestra energía ratificándole a nuestra comunidad que la AAZ y *raZyEie* no responden a ideas preconcebidas, sino que son un vehículo para establecer relaciones, lograr más y ser más. Cada vez es 'tarde' 'más temprano', dijo alguien. El poder de nuestro esfuerzo combinado no conoce límites. En definitiva, es la AAZ y sus órganos impresos los que nos permiten convertir nuestra visión en realidad.

El accionar de un grupo, pequeño o grande, requiere de la participación de líderes capacitados. Tenemos filiales que participan con gran entusiasmo y dedicación. Este liderazgo en la AAZ, lo llevan adelante exitosamente las personas que reúnen las cualidades de 'inteligencia racional' para el cumplimiento de metas y de 'inteligencia emocional' para entender y motivar al grupo de profesionales. Enorme ejemplo de esto han sido y son los Presidentes de la entidad desde su fundación hasta el presente (Aníbal Franco, Olindo Martino, Roberto Cacchione, Ricardo Durlach, María I. Farace y José Luis Molfese).

Nuestras páginas de *raZyEie*, asimismo, cumplen en estos días un año desde su reaparición impresa. Una obra que, si todavía es modesta en el orden material, es grande espiritualmente porque son nobles los principios sostenidos, y adquiere paulatinamente más forma, crece y se materializa, a la vez que pretende ampliar y vigorizar nuestro servicio al profesional.

Dentro de los grandes problemas que debemos enfrentar quienes estamos interesados en mantener viva la historia de las instituciones en general, están la pérdida de documentación, el fallecimiento de los que contribuyeron a su desarrollo y supervivencia, o simplemente, la carencia de un lugar físico donde conservar todo el material que constituye su patrimonio. Este es, entonces, otro de los mandatos de *raZyEie* en este 25° aniversario de la Asociación: homenajear a los grandes hombres que hicieron la historia de las zoonosis de nuestro país y poner esto al alcance de las generaciones que no tuvieron oportunidad de tomar contacto con estas trayectorias.

Los Editores



Anibal Franco



Olindo Martino



Roberto Cacchione



Ricardo Durlach



María I. Farace



José Luis Molfese

Diagnóstico molecular y serológico de leptospirosis humana en la provincia de Buenos Aires, Argentina

Mariana Recavarren¹, Exequiel Scialfa², Mariana Rivero³ y Silvina Quintana⁴

Resumen: El objetivo del presente trabajo fue aplicar la técnica de PCR en tiempo real para detectar ADN de los serovares más comunes de leptospirosis que infectan humanos a partir de cultivos puros de referencia, y de sueros de pacientes en distintas etapas de infección. Se realizó extracción, amplificación y cuantificación del ADN de cultivos puros de *Leptospira interrogans* serovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes y Hardjo; *Leptospira borgpeterseni* serovares Tarassovi, Wolffi y Castellonis y *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa. La sensibilidad de la PCR en tiempo real *in vitro* fue en promedio de 8 genomas. A partir de 23 muestras de sueros de pacientes con sospecha clínica de leptospirosis se determinó por la técnica de aglutinación microscópica (MAT) la presencia de anticuerpos, y por PCR en tiempo real con dos pares de cebadores diferentes, la presencia de ADN bacteriano. En el período agudo de la enfermedad (1 a 7 días) MAT fue positivo en 9/10 muestras y PCR en tiempo real en 8/10. Fue llamativo que 3/4 muestras de período tardío (superior a 14 días) fueran PCR positivas, lo cual no concuerda con la patogenia aceptada para la leptospirosis. Debido a estas consideraciones, por el momento, y en nuestro medio, la utilidad de la técnica de PCR es complementaria a la MAT y no debe reemplazarla.

Palabras claves: Leptospirosis humana, MAT, PCR en tiempo real.

Molecular and serologic diagnosis in human leptospirosis (Buenos Aires province, Argentina)

Abstract. The aim of this study was to apply the technique of real-time PCR to detect DNA of the most common *Leptospira* serovars that infect humans from pure cultures of reference, and sera from patients at different stages of infection. Extraction, amplification and quantification of DNA from pure cultures of *Leptospira interrogans* serovars *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona*, *Hardjo* and *Pyrogenes* performed; *Leptospira* serovars *borgpeterseni* *Tarassovi*, *Wolffi* and *Castellonis* and *Leptospira* serovar *kirschneri* serovar *Grippotyphosa*. The *in vitro* sensitivity of real-time PCR averaged 8 genomes. From 23 serum samples from patients suspected of leptospirosis the presence of antibodies was determined by microscopic agglutination technology (MAT), and the presence of bacterial DNA by real-time PCR with two different primer pairs. In the acute stage of the disease (1-7 days) MAT was positive in 9/10 samples and real-time PCR in 8/10. It was interesting that 3/4 of late period samples (over 14 days) were PCR positive, which is inconsistent with the accepted pathogenesis for leptospirosis. Because of these considerations, for the moment, and in our field, the usefulness of the PCR technique is complementary to the MAT and should not replace it.

Key words: Human Leptospirosis, MAT, Real Time PCR.

Introducción

La prueba de referencia recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el diagnóstico serológico de la leptospirosis es la técnica de aglutinación microscópica con antígenos vivos de leptospirosis (MAT). Esta prueba es altamente específica pero presenta una sensibilidad limitada en la fase aguda, debido a que los anticuerpos son detectables alrededor de los 7-10 días de la aparición de los síntomas y en general se requiere una segunda muestra de suero (convaleciente) para confirmar el caso. El urocultivo es de utilidad en pacientes con más de una semana de evolución de la enfermedad, no obstante la técnica de siembra es dificultosa y

compleja por requerir semanas de desarrollo², por su bajo pH, y por ser una muestra que generalmente se contamina dificultando el desarrollo de leptospirosis o la observación de las mismas por microscopía de campo oscuro³.

El desarrollo de técnicas de biología molecular juega un papel importante en el diagnóstico temprano de las enfermedades infecciosas, el cual está enfocado en la detección directa de secuencias blanco del ADN que se quiera detectar en distintas muestras clínicas. Los métodos moleculares, como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), emplean secuencias específicas que han permitido la identificación de especies de bacterias así como el diagnós-

1. Área de Veterinaria del Instituto de Análisis Bioquímicos Fares Taie.

2. División Zoonosis Rurales Azul, Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires.

3. Escuela Superior de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

4. Área de Biología Molecular del Instituto de Análisis Bioquímicos Fares Taie.

veterinaria@farestaie.com.ar

Enviado: 3-01-14
Aprobado: 15-04-14

tico de infecciones agudas. La PCR en tiempo real, es una amplificación selectiva de una región elegida dentro de una molécula de ADN que se va cuantificando con marcadores fluorescentes a lo largo de la reacción; además, permite la detección directa del agente en etapa aguda de la enfermedad con alta especificidad y sensibilidad en forma rápida (2 horas), y a gran escala.

El presente trabajo tuvo por objetivo aplicar la técnica de PCR en tiempo real para detectar ADN de los serovares más comunes de leptospira que infectan humanos, a partir de muestras de suero de pacientes con diferentes estadios de evolución. Además, se compararon los resultados de la PCR en tiempo real con los obtenidos por la serología convencional.

Materiales y métodos

Muestras de sueros de pacientes con sospecha de leptospirosis: se estudiaron 23 muestras de suero de pacientes con sintomatología y epidemiología de leptospirosis provenientes de diferentes municipios de la provincia de Buenos Aires. Estas muestras pertenecían a pacientes con 1-19 días de evolución de la enfermedad. Las muestras se conservaron a -20°C previo a su análisis para la detección de anticuerpos por la reacción de MAT y del ADN por PCR en tiempo real.

Diagnóstico serológico (MAT): Se utilizaron cepas de referencia de *Leptospira interrogans* serovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes y Hardjo; *Leptospira borgpeterseni* serovares Tarassovi, Wolffi y Castellonis y *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa, vivas desarrolladas a 28-30°C en medio EMJH y con no más de 15 días de crecimiento. Toda muestra con resultado positivo a títulos mayores a 1:50 fue considerada positiva; a los positivos se les realizaron diluciones al doble hasta su negativización.

Se consideró como caso probable a aquellos pacientes con clínica y epidemiología compatible con leptospirosis, y con un resultado positivo a MAT. Definición de caso confirmado: toda primera muestra positiva con MAT donde se observaron títulos elevados (mayor e igual a 1:400) para uno o más serovares, donde no fue posible demostrar la conversión serológica por situarse la muestra en la meseta de la respuesta inmune. Pacientes en donde se demostró la conversión serológica en muestras pareadas (aumento cuádruple en la tasa de anticuerpos para un serovar). Sueros positivos a uno o dos serovares con títulos de 1:50 a 1:200 donde no se demostró seroconversión, fueron considerados por infección pasada.

Puesta a punto de la técnica de PCR: Se utilizaron cultivos de cepas de referencia de *Leptospira interrogans* serovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes y Hardjo; *Leptospira borgpeterseni* serovares Tarassovi, Wolffi y Castellonis y *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa, siendo los más frecuentes en el diagnóstico serológico de muestras de pacientes humanos en nuestra región⁴.

Extracción de ADN: Se realizó la extracción de ADN mediante el *kit comercial AxyPrep Multisource Genomic DNA Purification* (Axygen, Tewksbury MA, USA) a partir de cultivos puros y de las muestras de suero de pacientes. Se cuantificó la cantidad de ADN presente en cada extracción mediante el *kit Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Estudios moleculares

Todas las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en un termociclador Rotor Gene Q (Qiagen, Hilden, Alemania), en un volumen final de 20 µl, utilizando Eva Green como intercalante fluorescente (KAPA HRM FAST, Biosystems, Woburn, USA). En las reacciones de amplificación se usaron 4 µl del ADN extraído, con 10 µl de mezcla KAPA HRM FAST 2X, con una concentración final de cebadores de 0.8 µM.

Para el control interno de la PCR y a fin de corroborar la correcta extracción de ADN y la ausencia de inhibidores en las muestras, se efectuaron amplificaciones por PCR en tiempo real de un fragmento de 99 pb del gen de la beta actina humana (Tabla 1). El programa de ciclado para la detección del gen de la beta actina consistió en una desnaturalización inicial de 3 minutos de 95°C y 40 ciclos de 10 segundos a 95°C, 15 segundos a 54°C y 20 segundos a 72°C. Una vez finalizada la amplificación se efectuó una curva de melting, siendo la temperatura de melting (Tm) del amplicón específico de 84.5 °C, según se determinó empíricamente en el presente trabajo. Se consideraron aptas para el estudio sólo aquellas muestras cuyo valor de Ct (del inglés *Cycle Threshold*) de beta actina fuera menor a 35.

PCR para la detección de ADN leptospira: Se llevaron a cabo reacciones de PCR en tiempo real para detectar ADN de leptospira, utilizando los cebadores LipL32-270F y LipL32-692R que amplifican un fragmento de 423 pb y los cebadores Lepto F y Lepto R que generan un amplicón de 87 pb a partir de ADN de *Leptospira spp* (Tabla 1). El programa de ciclado para la detección de *Leptospira* con los cebadores LipL32-270F y LipL32-692R descriptos por Levett et al⁵ consistió en una desnaturalización inicial de 3 minutos de 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C,

20 segundos a 64°C y 30 segundos a 72°C. Una vez finalizada la amplificación se efectuó una curva de melting, siendo la Tm de 86 °C. El programa de ciclo para la PCR en la cual se emplearon los cebadores Lepto F y R consistió en una desnaturalización inicial de 3 minutos de 95°C y 45 ciclos de 10 segundos a 95°C, 20 segundos a 50°C y 20 segundos a 72°C. Una vez finalizada la amplificación se efectuó una curva de melting, siendo la Tm específica del amplicón de 87°C. En ambas reacciones de detección se consideraron positivas aquellas muestras con valores de Ct <40, en las cuales se corroboró la amplificación específica del amplicón por el análisis de melting.

Resultados

Se logró extraer y amplificar exitosamente el ADN de los cultivos de los diferentes serovares de *Leptospira*. Los cebadores Lepto F/R (reverso y anteverso) amplifican un fragmento de 87 pb del gen 16S⁶ mientras que los cebadores LipL32-270F/LipL32-692R amplifican un fragmento de 423 pb del gen LipL32⁵. Con los cebadores descritos por Levett et al. no fue posible amplificar ADN de *Leptospira Kirschneri* serovar Grippotyphosa. Se calculó la sensibilidad analítica con ambos pares de cebadores (n° de genomas detectados a partir de los cultivos puros)⁵, siendo las mismas similares a las descritas en los trabajos originales. La sensibilidad fue calculada con algunos de los serovares estudiados, realizando diluciones seriadas de ADN de concentración conocida y analizando las mismas por PCR en tiempo real con ambos pares de cebadores. La sensibilidad calculada para los serovares Canicola, Pomona, Pyrogenes, Ballum e Icterohaemorrhagiae fue en promedio de 8 genomas. Las eficiencias de reacción para todos los serovares fueron semejantes (>90%). En la Figura 1 se muestran a modo de ejemplo todas las realizadas, (A) curvas de sensibilidad de los cebadores que amplifican un fragmento de 423pb con el serovar Canicola y (B) de los cebadores que generan un amplicón de 87pb con el serovar Pomona, respectivamente.

Asimismo se estudió la especificidad de ambos pares de cebadores con ADN de otras bacterias (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus*

pneumoniae, *Salmonella enterica*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus sp*, *Bacillus cereus*, *Rhodococcus sp*, *Brucella abortus*) en la cual en ninguno de los casos se amplificó el fragmento específico de 87 y 423 pb, respectivamente (Figura 1C).

En las Tablas 2 y 3 se muestran los resultados del total de las muestras analizadas (Tabla 2) y la frecuencia de positividad de cada una de las técnicas de acuerdo al período de evolución de la enfermedad (Tabla 3). En la etapa aguda de la enfermedad MAT fue positiva en el 90 % contra 80% de PCR en tiempo real, con los cebadores que amplifican un fragmento de 87pb. Dos muestras de esa etapa correspondían a pacientes cursando el sexto día de evolución de la enfermedad y fueron MAT positivas y PCR negativas. Todas las PCR positivas lo fueron con el cebador que amplifica 87 pb, excepto la número 22 (Tabla 2).

Las muestras número 9 y 10 corresponden a la misma persona tomada la 9 en período agudo de la enfermedad (día 1, bacteriemia) con resultado de MAT negativa y PCR positiva y la 10 en el día 16 (período convaleciente), siendo positiva a MAT y PCR. Una de las muestras (N°:14) no fue apta para el estudio de detección de ADN dado que el valor de Ct para la beta actina humana fue mayor a 35.

Discusión

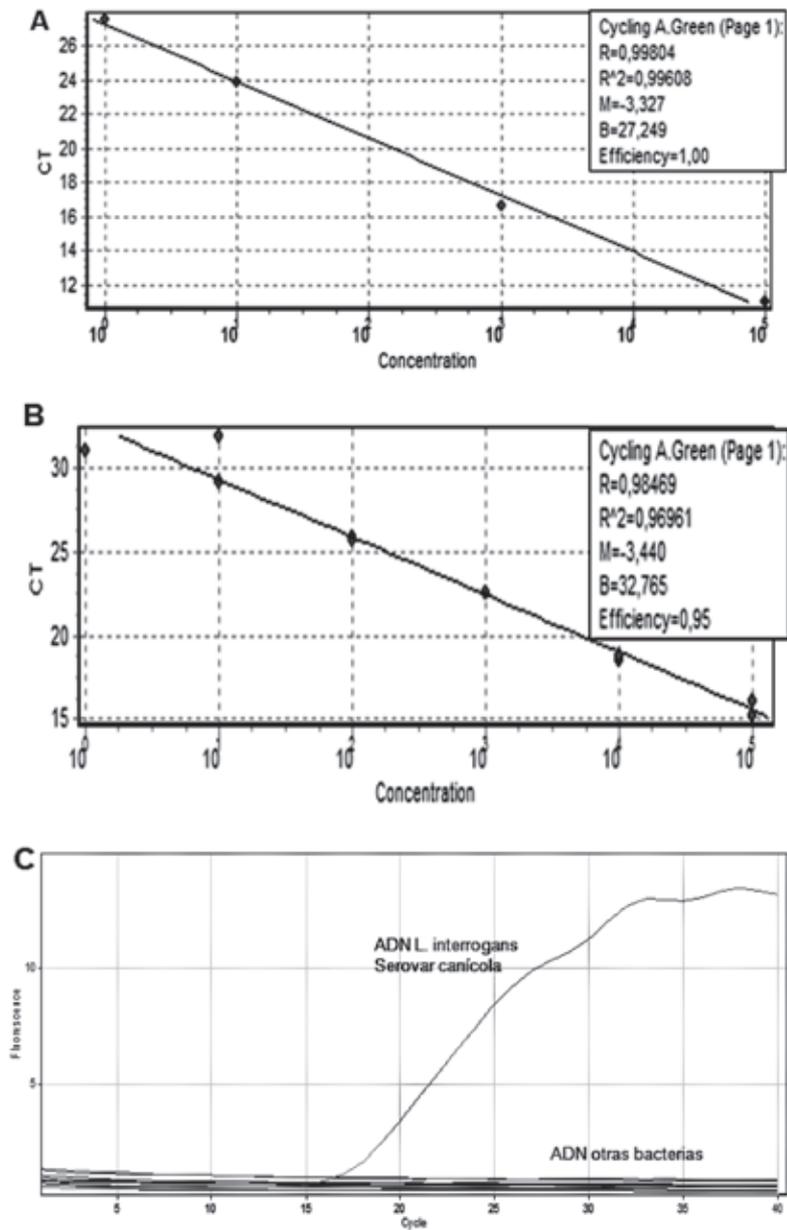
La sensibilidad obtenida por la PCR en tiempo real *in vitro*, calculada a partir de los cultivos puros, fue en promedio menor a 8 genomas con ambos pares de cebadores. Estos resultados se asemejan a los de Levett et al⁵ quienes encontraron límites de detección de 3 genomas a partir del cultivo puro de *Leptospira interrogans*. En muestras de suero y orina de pacientes hallaron límites de detección de 2 y 10 genomas, respectivamente⁶. Es posible que utilizando sangre total o plasma mejore la sensibilidad de la técnica, de acuerdo a Bourhy et al¹⁰.

Las técnicas de PCR descritas previamente para la detección de ADN de *Leptospira* carecen de un control interno de amplificación para detectar inhibición de la PCR⁵⁻⁷. Sin embargo está descrito que los controles de amplificación interna son mandatorios cuando se realizan pruebas diagnósticas basadas

Tabla 1. Cebadores utilizados en este estudio, secuencia, gen blanco, tamaño del amplicón

Primer	Secuencia 5'-3'	Gen blanco	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
Lepto F	CCC GCGTCCGATTAG	16S	87	Smythe y col, 2002
Lepto R	TCCATTGTGGCCGRACAC	16S		
LipL32-270F	CGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATT	LipL32	423	Levett y col, 2005
LipL32-692R	CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTT	LipL32		
beta actina 99 fw	TGCGTGACATTAAGGAGAAG	beta actina	99	diseñados en este estudio
beta actina 99 rv	GCTCGTAGCTCTCTCCA	beta actina		

Figura 1. Validación de las técnicas de PCR en tiempo Real con cultivos puros



A. Curva standard del serovar *Canicola*, amplificación por PCR en tiempo real con los cebadores que amplifican un fragmento de 423 pb a partir de diferentes cantidades de genomas del serovar canícola 8×10^6 , 8×10^4 , 8×10^2 , 8. **B.** Curva standard del serovar *Pomona*, amplificación por PCR en tiempo real con los cebadores que amplifican un fragmento de 87 pb a partir de diferentes cantidades de genomas del serovar *Pomona* 8×10^6 , 8×10^4 , 8×10^2 , 8 y 0,8. **C.** La especificidad de la PCR en tiempo real con los cebadores amplifica un fragmento de 423 pb para la detección de ADN de *Leptospira spp.* Reacciones de PCR en tiempo real utilizando como molde de ADN del serovar *Canicola* y ADN de otras bacterias (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus spp*, *Salmonella enterica*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus sp*, *Bacillus cereus*, *Rhodococcus equi*, *Brucella abortus*). La fluorescencia normalizada (delta Rn) se representa en función del número de ciclos para la amplificación de ADN de *Leptospira spp.*

en PCR⁸. Dado que el suero es una fuente conocida de inhibidores de la PCR, es importante que las pruebas basadas en la PCR incluyan un control interno, ya que una respuesta negativa (no se genera amplificación), puede significar que no está presente ninguna secuencia diana en la reacción; pero también podría

significar que la misma se inhibe debido al mal funcionamiento del termociclador, mezcla de PCR inadecuada, pobre actividad de la polimerasa o por la presencia de sustancias inhibitoras en la matriz de la muestra⁹. Esto permitió descartar 1 muestra de las 23 analizadas.

Tabla 2. Comparación de muestras de suero de pacientes por MAT y PCR en tiempo real en distintas etapas de la enfermedad

Muestra	Días de evolución	MAT	PCR 423 pb	PCR 87 pb
1	5 (1° muestra del 1)	1:50 Taras.	Positiva	Positiva
2	9 (2° muestra del 2)	1:100 Sejr, 1:200 Canic-Ictero, 1:800 Taras.	Negativa	Negativa
3	10	1:100 Bal-Canic-Sejr, 1:800 Taras.	Negativa	Negativa
4	9	1:50 Bal-Ictero-Canic, 1:100 Sejr-Grip, 1:400 Taras.	Positiva	Positiva
5	6	1:50 Ictero, 1:100 Bal-Grip, 1:400 Taras, 1:200 Canic.	Negativa	Negativa
6	8	1:100 Canic, 1:200 Taras.	Negativa	Negativa
7	4	1:50 Grip-Ictero 1:100, Sejr, 1:200 Canic, 1:400 Taras.	Negativa	Positiva
8	8	1:200 Grip-Bal, 1:400 Canic-Taras.	Negativa	Negativa
9	1 (1° muestra del 9)	negativo	Negativa	Positiva
10	16 (2° muestra del 9)	1:50 Hard, 1:400 Ictero.	Positiva	Positiva
11	6	1:200 Bal-Canic-Ictero.	Negativa	Negativa
12	4	1:100 Taras, 1:200 Canic-Grip, 1:400 Bal.	Positiva	Positiva
13	7	1:50 Canic-Grip-Ictero-Bal, 1:100 Pyr, 1:400 Taras.	Positiva	Positiva
14	8	1:100 Bal-Grip-Ictero-Pyr, 1:50 Can, 1:400 Taras.	No apta	No apta
15	19	1:200 Bal-Can-Grip-Taras.	Negativa	Positiva
16	19	1:50 Sejr, 1:200 Bal-Canic-Taras, 1:400 Grip.	ND	Positiva
17	12	1:50 Bal.	Negativa	Positiva
18	7	1/50 Ictero-Taras.	Positiva	Positiva
19	6	1/200 Sejr, 1/400 Canic, 1/800 Bal-Grip-Taras.	Negativa	Positiva
20	5	1/200 Pyr-Sejr, 1/100 Pom, 1/800 Taras, 1/50 Ictero. 1/1600 Bal-Grip-Canic.	Negativa	Positiva
21	15	1/200 Taras, 1/100 Canic-Ictero, 1/400 Bal.	Negativa	Negativa
22	Desconocido	1/800 Hard, 1/400 Sejr, 1/200 Taras.	Positiva	Negativa
23	Desconocido	1/100 Ictero, Canic-Taras, 1/50 Bal.	Negativa	Positiva

ND: No determinado; No Apta: negativa al control interno (Ct beta actina humana < 35).

Canic: *Canicola*, Grip: *Grippotyphosa*, Ictero: *Icterohaemorrhagiae*, Bal: *Ballum*, Pyr: *Pyrogenes*, Taras: *Tarassovi*, Hard: *Hardjo*, Sejr: *Sejroe*.

Tabla 3. Comparación de los resultados entre MAT y PCR en tiempo real y discriminando dos pares de *primes*, en 23 muestras de sueros, según período de evolución

Período de evolución y número de muestras	Muestras MAT	CR positivas utilizando P fragmento de 432bp	PCR positivas utilizando fragmento de 87bp	Muestras PCR positivas
1-7 días (n=10)	9 (90%)	4 (36.4%)	8 (80%)	8 (80%)
8-14 días (n=7)	7 (100%)	1 (14.3%)	2 (28.6%)	3 (28.6%)
14 o más (n=4)	4 (100%)	1 (25%)	3 (75%)	3 (75%)
sin datos (n=2)	2 (100%)	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)

Siete de las muestras clínicas analizadas resultaron positivas con la PCR de 87 pb y negativas por la PCR de 423 pb (muestras 7, 9, 15, 17, 19, 20 y 23, Tabla 2). Se atribuye esta falta de amplificación con los cebadores de 423 pb a los altos niveles de degradación que suelen presentar este tipo de muestras que son almacenadas y transportadas desde centros de salud lejanos, en muchos casos sin la refrigeración adecuada. Por esta razón es importante, para la realización de un correcto diagnóstico molecular, la utilización de cebadores que amplifiquen fragmentos menores a 300 pb para no tener resultados falsos negativos debido a la alta degradación del ADN de la muestra. En el caso de la muestra 22 (cuyo período evolutivo desconocíamos), la PCR con los cebadores que amplifican un fragmento de 423 pb, fue positiva, mientras que no hubo amplificación con los cebadores que generan un amplicón de 87pb, lo cual destaca la importancia de la utilización de combinaciones de cebadores que amplifiquen diferentes regiones genómicas, para su correcto diagnóstico molecular, como se ha descripto anteriormente¹⁰.

Si bien se detectó por PCR 1 paciente que fue negativo en el período agudo con MAT, dos muestras pertenecientes a pacientes cursando el sexto día de evolución de su enfermedad fueron MAT positivas y PCR negativas. Es claro que el MAT fuera negativo, ya que por la evolución (un día) no existen anticuerpos detectables, no así la negatividad de la PCR, que era de esperar positiva, no concordando estos resultados con los de Brown¹¹ y Gravekamp¹² los cuales afirman que el principal valor de la PCR es la habilidad de obtener un diagnóstico definitivo durante el estadio agudo de la enfermedad. Sin embargo, fue llamativo que 3/4 muestras de período tardío (superior a 14 días) fueran PCR positivas, lo cual no concuerda con la patogenia aceptada para la leptospirosis, sobre lo que no tenemos explicación, pero abre interesantes interrogantes a investigar. Debido a estas consideraciones, por el momento, y en nuestro medio, la utilidad de la técnica de PCR es complementaria a la MAT y no debe reemplazarla. Es necesario estudiar más muestras, mejorando los procedimientos empleados, teniendo en cuenta las dificultades del envío y conservación de los materiales clínicos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Centro de Zoonosis Rurales de Azul, Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires por la cesión de los cultivos puros de bacterias y los sueros de pacientes. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica mediante su instrumento FONTAR por la financiación de proyecto.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés respecto al trabajo de investigación, a la autoría, a la publicación, a la financiación de trabajo ni conflictos personales que podrían influenciar de forma negativa al presente trabajo.

Bibliografía

- Cardona M, Moros R, López E, Pérez J, Hernández R. Diagnóstico de leptospirosis mediante la PCR en pacientes con síndrome febril icterohemorrágico. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2008; 28: 24-30.
- Merien F, Baranton G, Perolat P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *The Journal of infectious diseases*. 1995; 172: 281-5.
- McDonough P. Leptospirosis en caninos-estado actual. In: Carmichael L (Ed.): *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*, IVIS, Ithaca, New York: International Veterinary Information Service, 2001, p 6.
- Scialfa E, Gallicchio O y Benitez M. Leptospirosis humana en la provincia de Buenos Aires, Argentina, período 2000-2009. I Congreso Internacional de Zoonosis y Enfermedades Emergentes, Asociación Argentina de Zoonosis, Bs. As. 8 al 10 de Junio de 2011, LR p160.
- Levett P, Morey R, Galloway R, Truner D, Steigerwalt A, Mayer L. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *Journal of Medical Microbiology*. 2005; 54: 45-9.
- Smythe, L, Smith, I, Smith, G, Dohnt, M, Symonds, M, Barnett, L and McKay, D. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *Infectious Diseases*. 2002; 2: 13.
- Ahmed A, Engelberts M, Boer K, Ahmed N and Hartskerl R. Development and validation of a Real-Time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* Species in clinical materials. *Plos One* 2009; 4 (Issue 9), e7093.
- Hoofar J, Cook N, Malorny, Wagner M, De Medici D, Abdulmawjood A, Fach P. Making Internal Amplification Control Mandatory for Diagnostic PCR. *J Clinical Microbiol*. 2003; 41: 5835
- Burd, E. Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2010; 23(3): 550-76.
- Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of Real-Time PCR Assays for Detection of Pathogenic *Leptospira* spp. in Blood and Identification of Variations in Target Sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; 49: 2154-60.
- Brown P, Gravekamp C, Carrington H et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of Medical Microbiology* 1995; 43: 110-14.
- Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M et al. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of cebadores. *Journal of General Microbiology* 1993; 139: 1691-1700.

Muñiz-Darwin y la vaca ñata

Alfredo Seijo¹



Resumen: En forma contemporánea, pero independiente, tanto Muñiz como Darwin, habían hecho observaciones sobre una especie de vacuno que abundaba en las pampas rioplatenses. Charles Darwin, en su recorrida por la Banda Oriental tomó conocimiento de estos especímenes y los denominó “vaca ñata”, por la configuración prognática del macizo facial y la deformación nasal consecuente. Debido a la correspondencia que mantuvo con Francisco Javier Muñiz sobre diversos tópicos, desde paleontológicos hasta geológicos, le solicitó información al respecto.

Muñiz le envió sus apreciaciones, pero a su vez realizó un análisis sobre aspectos evolutivos relacionados con la alimentación, que fueron previos a la publicación del Origen de las Especies. Domingo Faustino Sarmiento, rescató los borradores del informe Muñiz-Darwin, además de otra documentación de valor producida por Muñiz, valorando como nadie lo había hecho, su papel fundacional en la Ciencia Argentina.

Palabras claves: Muñiz, Darwin, Sarmiento, vaca ñata.

Muñiz- Darwin and the “cow ñata”

Abstract: In contemporary form, but independent, both Muniz as Darwin had made comments on a kind of cow that abounded in the River Plate pampas. Charles Darwin, in his tour of the Eastern Band took cognizance of these specimens and called “cow ñata” (*nata oxen*) for configuration prognathic facial skeleton and consequent nasal deformity. Due to the correspondence with Francisco Javier Muñiz, on topics ranging from geology to paleontology, requested information. Muñiz sent his findings, but in turn gave an analysis of evolutionary aspects of food, which were prior to the publication of the Origin of Species. Domingo Faustino Sarmiento, rescued drafts of Muñiz-Darwin report, plus other documentation produced by Muñiz value, valuing as nobody had done, his foundational role in the Argentina Science.

Key words: Muñiz, Darwin, Sarmiento, cow ñata (*nata oxen*).

En el artículo anterior de *raZ y Eie* (Volumen IX(1), Abril 2014), analizamos y comentamos algunos aspectos de la vida de Francisco Javier Muñiz, en especial la soledad intelectual en la que desarrolló sus tareas, la relación científica que mantuvo con Charles Darwin, y enfatizamos los estudios realizados sobre el *Smilodon bonaerensis* Muñiz, conocido vulgarmente como “tigre diente de sable”. El caso de la “vaca ñata” fue utilizado probablemente por Darwin, en forma posterior a tomar conocimiento de su existencia, para sumarlo a distintas observaciones sobre las que cimentó su teoría de la selección natural. Estos artículos están realizados con el propósito de dar a conocer las ideas y las realizaciones del hombre que originó en la Argentina el pensamiento y la actividad científica, tal como la entendemos actualmente. La figura de Muñiz, no ha sido, a nuestro juicio, valorada más allá del anecdotario histórico o de aquellos que sentimos una particular atracción por sus ideas y realizaciones.

Por el contrario, no es propósito de estos artículos, entrar en controversias sobre las teorías evolu-

tivas, planteadas entre evolucionistas, materialistas y creacionistas, sobre la postura que aparenta ser irreconciliable, entre evolucionismo y religiosidad. No hemos adoptado posiciones neodarwinistas ni sostenemos la imposibilidad que el azar haya creado moléculas y organismos complejos; no discutimos la falta de gradualidad de los registros geopaleontológicos, ni por otra parte defendemos las teorías integracionistas de modelos complejos, en sistemas más complejos, donde la selección natural no tendría el papel relevante del darwinismo y como consecuencia, la fuerza de la evolución no estaría en la competencia sino en la maduración en conjunto de nuevas formas de vida. Sin embargo, el hecho de que estas cuestiones no estén resueltas, y que se sigan discutiendo, a más de ciento cincuenta años de la publicación del Origen de las Especies, hablan por sí solas, y con elocuencia, de la fuerza de las mismas. *Ex profeso*, evitamos esta discusión, no por falta de interés, que abunda. Estas discusiones, que esperamos planteen otros colaboradores de *raZ y Eie*, opacarían el objetivo principal, que es analizar el desarrollo del

1. Servicio de Zoonosis, Hospital FJ Muñiz, GCBA.
ceijo@intramed.net

pensamiento científico argentino y una de sus figuras más importantes y quizá más querida y querible de nuestra historia.

La correspondencia que mantenía Muñiz con Darwin era realizada a través de un comerciante inglés, afincado en la Ciudad de Buenos Aires: Enrique Lumb. Como también ya dijimos en el mencionado estudio, ambos científicos coincidieron, pero sin verse ni tener encuentro, en la Villa del Luján, asiento de Muñiz, y uno de los lugares por los que pasó Darwin en su viaje por territorio argentino. Sobre este desencuentro, se han realizado especulaciones más teñidas de anglofobia, que de hechos verificables. Considerar actitudes esquivas a algunos de los personajes, es no conocer la pasión que tenían por sus investigaciones, y de seguro los deseos de poder intercambiar información (Muñiz) y especies fósiles (Darwin). Hasta la actualidad, desconocemos el porqué de ese desencuentro. En noviembre de 1833, Darwin sale de Buenos Aires, que en ese momento sufría el bloqueo naval, y se dirige hacia la Banda Oriental (Uruguay), pasando por Montevideo, Colonia y es en el Río San Juan, en una estancia, donde encontró los vacunos que denominó raza ñata (chata).

La "raza ñata"

Considerada hoy como una alteración de la función hipofisaria, de origen genético recesivo, que produce prognatismo, de modo tal que el maxilar inferior sobresale respecto del superior. En el siglo XIX, ambos científicos aceptaban la teoría de una regresión hereditaria a estadios evolutivos inferiores. El nombre de ñata deriva de la descripción que hace Darwin: *"Tienen con los otros bovinos, poco más o menos, que las mismas relaciones que los perros de presa, dogos y alanos, con los otros perros. Su frente es deprimida y amplia, la extremidad de las ventanas de la nariz levantada, el labio superior se retira hacia atrás; la mandíbula inferior avanza más que la superior y se curva también de abajo arriba, de tal forma que los dientes están siempre al descubierto. Las ventanas de la nariz las tienen muy arriba y muy abiertas, y sus ojos se proyectan hacia adelante. Cuando andan lo hacen con la cabeza muy baja; el cuello es corto; las patas traseras son un poco más largas que las delanteras, cosa nada corriente. Sus dientes al descubierto, su corta cabeza y sus ventanas de la nariz, tan altas, les dan un aire batallador y cómico al mismo tiempo"* (Figuras 1 y 2).

Darwin obtiene un cráneo que luego es depositado en el Colegio Médico de Londres y posteriormente le solicita a Muñiz, a través del comerciante mencionado arriba (Lumb), informes más detalla-

dos, ya que Muñiz se había interesado en el asunto. Era interés de Darwin que *"le comunique los nuevos hechos que observe, en caballos, cerdos, y sobre todo, si los hijos de los cimarrones vueltos a la vida civilizada se muestran reacios contra la domesticidad"*. El borrador del estudio que Muñiz le remite a Darwin, fue encontrado por Sarmiento, entre los papeles custodiados por los hijos de Muñiz, bajo el

Figura 1. Esqueleto de un ejemplar de vaca ñata, que se encuentra en exhibición en el Museo de Ciencias Naturales de La Plata. Obsérvese el prognatismo y la disposición del macizo facial



Figura 2. A la izquierda cráneo de vaca normal (*Bos taurus*) y a la derecha el ejemplar de vaca ñata. En esta fotografía pueden observarse las diferencias del macizo facial



nombre de *"Contestación a las siete cuestiones que en consulta se ha servido dirigir al infrascripto el señor don Enrique Lumb, sobre la vaca ñata"*. En estos considerandos, Muñiz realiza algunas observaciones: la "raza" era infrecuente a mediados del siglo XVIII y comienzos del XIX; surgieron en territorios indios al Sur del Plata –sic– y fueron introducidos por el intercambio comercial hacendados-indios. *"A más de las mantas, jergas, plumas de avestruces, riendas, botas de potro, sal, ceñidores, tejidos, etc., que los indios cambiaban por tabaco, aguardiente, bayetas, espuelas, frenos y otras piezas de montura, cuchillos, etc., daban también ganado. Rara vez pequeño o en cría, lo más general grande y gordo como lo exigían los cambalachistas. Por este medio, el ganado ñato, que componía según la unánime disposición de los antiguos hacendados de la Provincia (negociadores con los bárbaros) una gran parte, sino la mayor de sus rodeos, se introdujo primero en los partidos más en contacto por el comercio con los indígenas. Así fue que del Pergamino, Rojas, Areco, Guardia del Luján, Navarro, se propagó el ganado ñato del Sur, al Norte y hasta el interior de la campaña de Buenos Aires"*.

Sarmiento también realiza una interpretación evolutiva, considerando que el ganado ñato, que fue habitual a mediados del siglo XIX, era ganado degradado en procesos de *"degeneraciones adquiridas gradualmente a causa del abandono del ganado a sus propios instintos, en la dilatada extensión de las pampas, sin cercado ni redil"*. Estas afirmaciones, hoy discutibles y desechadas, a la luz de la genética actual, deben ser leídas en el contexto en que fueron realizadas. Caracteres fenotípicos distintos a los de la raza original*, aparecen porque están determinados en el genotipo y por lo tanto son heredables. Luego la selección natural, sin intervención humana, producirá o no individuos con capacidad de reproducirse y mantener esos caracteres. De hecho, se tiene conocimiento por el propio Muñiz que: *"Cuando en las grandes sequías que experimenta esta Provincia, como fueron en este siglo la mortífera del año 6 y las de los años 30 y 31*, en que perecieron más de dos millones de vacunos por la absoluta falta de pasto más que del agua, entonces el ganado se sirve de los labios para rastrillar como el caballo las ramitas más pequeñas y cualquier pajita que, por insuculenta y terrosa que sea, le puede procurar una miserable refacción"*.

* Se refiere a las sequías de 1806, 1831 y 1836. Entre los estudios que interesan a Muñiz, debemos mencionar los ambientales y los geológicos, plasmados en dos escritos: *"Apuntes Topográficos"* y *"Descripción del Terremoto de 1845"*.

El ganado ñato por la conformidad de sus maxilares, estaba impedido de realizar este tipo de alimentación, y ha sido, según la mayoría de los autores, una de las causas primarias que produjo su desaparición. Muñiz había realizado una síntesis de la supervivencia del más apto, sin conocer la obra que revolucionó la biología: El Origen de las Especies!

La influencia de la alimentación en la selección natural, fue tomada por Darwin de autores como Malthus, cuyos trabajos sobre población tuvieron repercusión hasta mediados del siglo XX.

Según las observaciones de Muñiz: *"Es desechada (la vaca ñata) del mercado por defecto en el cuero, pues siendo la cabeza tan corta en estos animales, el cuero sale redondo y corto en las quijadas, haciéndole perder su valor"*. Coexistiendo con el ganado ñato, Muñiz describe el ganado mocho, *"también inferior al común, pues a más de carecer de cuernos que tienen siempre su valor, no son útiles para bueyes, ni casi para lecheras, siendo difícil de manejarlos del cuello para estos servicios"* y agrega: *"Es constante que en las haciendas pampas de aquellos tiempos, estos animales y los ñatos eran más numerosos que los comunes"*.

Con posterioridad, la selección de razas para el mejoramiento del ganado, iniciada a partir de mediados del siglo XIX, terminó con el vacuno ñato.**

Son interesantes dos observaciones de Sarmiento: la primera se sitúa en una visita que realizara en 1867 a corrales cercanos a la ciudad de Chicago, la mayor concentración de ganado de los Estados Unidos. Allí, al describir el ganado ñato de la Argentina, que en ese entonces era abundante, le informan que una porción de ganado en Texas, era similar, al cual denominaban *Spanishcattle*, de cría extensiva. *"No se fabricaba mantequilla y se manejaba a caballo el ganado con lazo por rancheros o gauchos, como en la república Argentina"*. La frase *"no se fabricaba*

** El origen de la ganadería en el Río de la Plata se produce en el siglo XVI, por tres vías, una procedente del Virreinato del Perú, otra del Paraguay, donde están involucrados portugueses y la tercera desde Chile. Este ganado reconocido como overo, era originario de los Países Bajos (Holanda) y se caracterizaba por la producción de leche y carne. Se multiplicó en los vastos pastizales de las llanuras y valles y en muchos casos se convirtió en ganado salvaje o cimarrón. Debido a su cantidad, el Virreinato del Perú, permitió la caza del ganado salvaje, organizado en las denominadas "vaquerías", origen de las estancias. Este ganado era de mala calidad y se comercializaba en forma de charque. En 1826 fue introducida la raza Shorthorn, dando origen a la ganadería moderna, de carnes y cueros apreciados por todo el mundo. Este proceso fue lento y se complementó en 1860 con la importación de ejemplares de la raza Hereford, en 1879 de Aberdeen Angus y en 1917 de Polled Hereford.

mantequilla”, es muy conceptual. Se consideraba que el origen del ganado en las pampas, era overo de origen holandés, traído por los españoles, y buen productor de leche. El ganado *ñato*, considerado una degeneración de ese overo primitivo, no producía leche y por lo tanto...no se fabricaba manteca. La otra observación de Sarmiento debe contextualizarse en la realidad de mediados del siglo XIX, donde la carne vacuna de las pampas no era de buena calidad y poco apreciada en los mercados internacionales. Es por ello que propone la cría intensiva de la raza Durham (origen del Shorthorn), que había comenzado en 1826.

Al poco tiempo, con la introducción de las nuevas razas, la carne producida en la Argentina, es valorada en todo el mundo***. Al mismo tiempo propone “*emparvar los pastos de reserva que ya observan los criadores inteligentes de ganados finos*”, para enfrentar los períodos de seca “*sin que podamos levantar empréstitos de lluvia en el mercado de Londres, a pagarlos nuestros descendientes*”, interesante razonamiento de alguien cuestionado por su liberalismo.

*** Charles Tellier, ingeniero francés, especializado en mecánica y procesos de enfriamiento, desarrolló un método de conservación de la carne refrigerándola a 0°C, que publicó como “*Conservation de la viande par le froid*”. En 1874 fleta por su cuenta y cargo el vapor *Frigorifique* desde el puerto de Le Havre hacia Buenos Aires, demostrando la posibilidad de transportar carne sin que esta entre en descomposición. Hasta ese momento la carne se comercializaba salada (charque), por lo cual la Argentina no tenía posibilidades de exportar a los mercados más exigentes, como eran los europeos o los Estados Unidos. El largo viaje de más de 100 días y problemas de la navegación, hicieron no rentable el viaje, con lo cual Tellier quebró su empresa. Sin embargo, había demostrado la factibilidad del comercio de ultramar de carnes, lo cual cambió radicalmente la estructura económica, comercial, social, política y cultural de la Argentina. En 1883 se realizó la primera exportación latinoamericana de carne refrigerada desde el puerto de Campana (provincia de Buenos Aires) a Londres. Se iniciaba la larga, rica y azarosa historia de los frigoríficos en la Argentina, que merecería un tratamiento especial en RAZyEIE.

En el barrio de Liniers, en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, nace una calle que se adentra hasta el barrio de Mataderos, llamado así porque aún hoy funciona el Mercado Central de Hacienda, ex matadero, desde su traslado a principios del siglo XX, desde Parque de los Patricios. Esa calle llamada Tellier, fue rebautizada Lisandro de la Torre, como se la conoce actualmente. Ciertamente, que Lisandro de la Torre fue un luchador incansable e ineludable contra la corrupción generada en el comercio y exportación de carnes, y merece llevar una calle su nombre, particularmente en ese barrio tan emblemático, y aún una escultura que lo recuerde. Pero sin olvidar a Tellier, punto de inflexión en el comercio de alimentos, que disparó el desarrollo que tuvo la Argentina a fines del siglo XIX y que transformó el comercio mundial.

En 1868, Darwin publica *La Variación de los Animales y las Plantas bajo Domesticación*, donde hace clara referencia a Muñiz “*quien con gentileza reunió información para mí*”, en diversos aspectos relacionados con la vaca *ñata*, desde una perspectiva más científica que las menciones en *Diario del Viaje de un Naturalista alrededor del Mundo* publicado en 1839, que es la crónica de la expedición del Beagle. Como expresamos en el artículo anterior, no hemos encontrado la mención de Muñiz en *El Origen de las Especies*, publicado el 24 de noviembre de 1859, lo cual nos ha resultado curioso, ya que la vaca *ñata* es un argumento importante para haber sido utilizado en los cinco primeros capítulos: Variación en el estado doméstico; Variación en la naturaleza; Lucha por la existencia; Selección natural o supervivencia de los más aptos y Leyes de la variación.

Agradecimiento

Al Museo de Ciencias Naturales de La Plata, donde obtuvimos las fotos que ilustran este artículo.

Bibliografía

1. Darwin C La variación de los animales y las plantas bajo domesticación. Biblioteca darwiniana. CSISC; Academia Mexicana de Ciencias; Universidad Nacional Autónoma de México. Madrid, Los Libros de la Catarata 2008. Traducido y prologado por Armando García González. Consultado mayo 2014. <http://books.google.com.ar/books?id=ir76PGKKObIC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>.
2. Darwin C. Origen de las Especies, por Medio de la Selección Natural o Conservación de las Razas en su Lucha por la Existencia. 3 tomos. Valencia, F Sempere y Cª Editores. 711 páginas. No figura año de impresión, pero la traducción la estimo anterior a 1872, ya que el título es el original de la primera edición (1859), que se mantuvo hasta la sexta edición de 1872, cuando fue cambiado por El origen de las Especies. Es probable que fuera editado en la primera década del siglo XX.
3. Darwin C. Viaje de un naturalista alrededor del mundo. Buenos Aires, El Ateneo, Primera edición 1951. 555 páginas.
4. Krebs M. Historia del ganado vacuno y los frigoríficos en la Argentina <http://www.historiacocina.com/paises/articulos/argentina/vacuno.htm>. 2011
5. Pérgola F. Francisco Javier Muñiz: el primer investigador argentino. *Revista Argentina de Salud Pública* 2010; 1(2): 46-7.
6. Sarmiento DF. Escritos Científicos, seis ensayos de Francisco Xavier Muñiz, publicados con introducción y comentarios de Domingo F Sarmiento y con juicios críticos de Bartolomé Mitre y Florentino Ameghino. Buenos Aires, La Cultura Popular, Talleres Gráficos Argentinos, LJ Rosso. Sin año de edición.

Evidencias sobre el uso del *freezer* como riesgo potencial para la infección con *Escherichia coli* verotoxigénico

Mariana Alejandra Rivero^{1,2}, María Bernarda Ballesteros¹, Juan Antonio Passucci^{1,2}

Resumen: *Escherichia coli* verotoxigénico (VTEC) es el principal agente etiológico del síndrome urémico hemolítico. Argentina presenta la mayor incidencia de esta enfermedad, que no tiene un tratamiento específico. La prevención es fundamental para disminuir su incidencia. La mayoría las infecciones causadas por cepas de VTEC están asociadas al consumo de carne vacuna insuficientemente cocida, productos lácteos no pasteurizados o vegetales posiblemente contaminados con heces de animales. VTEC sobrevive la temperatura de conservación en *freezer* por largo tiempo con sólo pequeñas reducciones en el número de bacterias totales. También, al congelarse, pueden pasar a un estado denominado viable no cultivable, conservando su patogenicidad. En un estudio previo realizado en niños menores de 6 años de edad con diagnóstico de diarrea aguda, el hábito de conservar los alimentos en *freezer* se identificó como asociado con la infección por VTEC. Esta asociación podría deberse a una incorrecta manipulación de los alimentos durante la conservación, la descongelación y la cocción. Debido a que el *freezer* reduce la carga bacteriana, pero no la elimina y que muy pequeña cantidad de bacterias son suficientes para causar la enfermedad, sería lógico pensar que si no se informa sobre la modalidad correcta de congelar y descongelar los alimentos, esto podría constituir un riesgo más para la infección. El uso de prácticas higiénicas apropiadas en el manejo de los alimentos congelados, particularmente los de origen animal y la cocción adecuada de estos alimentos antes de su consumo son medidas de control importantes para la prevención de la infección por VTEC.

Palabras claves: síndrome urémico hemolítico, *Escherichia coli* verotoxigénica, enfermedades transmitidas por alimentos, alimentos cárnicos.

Use of the freezer as a verotoxigenic *Escherichia coli* potential risk

Abstract: Verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) are the principal etiological agent of hemolytic uremic syndrome. Argentina presents the highest incidence of this disease. Because there is no specific treatment for VTEC infection, preventive measures are essential to reduce its incidence. Most infections caused by VTEC strains are associated with consumption of undercooked meat, unpasteurized dairy products or vegetable potentially contaminated with animal feces. VTEC survive in food during frozen storage with only minor reductions in the number of total bacteria. Also, when frozen, VTEC can enter to the viable but non culturable state, maintaining its pathogenicity. In a previous study performed in children under 6 years of age diagnosed with acute diarrhea, the habit of storing frozen food was identified as associated with VTEC infection. This association could be due to improper handling of food during storing, defrosting and cooking. Because freezing reduces the bacterial load, but does not eliminate, and very small amount of bacteria are enough to cause disease (low Infectious dose), It would be logical to think that if the proper way of freezing and thawing is not reported, this could be a risk for infection. The use of appropriate handling hygiene practices of frozen food, particularly those of animal origin, and the proper cooking of these foods before consumption are important measures for prevention of VTEC infection.

Keywords: hemolytic uremic syndrome, verotoxigenic *Escherichia coli*, food diseases, foodborne diseases.

Escherichia coli verotoxigénico (VTEC) es uno de los principales patógenos emergentes transmitidos por alimentos y el principal agente etiológico del síndrome urémico hemolítico (SUH), reconocido como prioritario en el campo de las zoonosis y la salud pública¹⁻⁴. El serotipo O157:H7 es el más frecuente, aunque otros serotipos también se encuentran asociados a esta enfermedad^{1, 2, 4-7}. No existe un tratamiento específico para la infección por VTEC, aunque actualmente ensayos clínicos se encuentran en fase de experimentación. Una vez desarrollado

el SUH el tratamiento se orienta al manejo de la insuficiencia renal aguda, la anemia y la trombocitopenia, es por esto que la prevención primaria de la infección por VTEC es esencial para disminuir su incidencia⁸. Las medidas de prevención se basan en el conocimiento generado sobre VTEC, su patogenia y epidemiología²⁻⁵.

La Argentina es el país con mayor incidencia a nivel mundial de SUH. En la última década, aproximadamente 400 casos anuales fueron notificado; la incidencia anual estimada varió de 10 a 17 casos por

1. Facultad de Ciencias Veterinarias, Área de Epidemiología Básica, Tandil, Argentina. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

2. Escuela Superior de Ciencias de la Salud, Departamento de Metodología de la Investigación, Olavarría, Argentina. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

mrivero@vet.unicen.edu.ar.

Enviado: 12-02-14
Aprobado: 7-05-14

100 000 niños menores de 5 años^{4,7}. Actualmente, la letalidad en la fase aguda del SUH es inferior al 5%, debido a que se efectúa un diagnóstico oportuno de la enfermedad, se instaura de manera temprana la diálisis peritoneal en los casos con oliguria grave o anuria y se realiza un adecuado manejo de la anemia hemolítica. Sin embargo, un 5% de los niños desarrolla una insuficiencia renal crónica terminal que, en pocos años, requerirá de procedimientos de hemodiálisis permanente o de trasplante renal. Otro 30% permanece con microhematuria y grados variables de proteinuria que pueden durar décadas^{3,7}.

La mayoría de los brotes o infecciones esporádicas causadas por cepas de VTEC están asociados al consumo de carne vacuna insuficientemente cocida. También, se asoció esta infección con el consumo de productos lácteos no pasteurizados o de vegetales posiblemente contaminados con heces de animales^{2,4,8-10}. El número de bacterias requerido para causar enfermedad es variable, pero puede ser muy bajo. La mínima dosis infectiva no se conoce, pero se informó que puede ser tan baja como 10 unidades formadoras de colonias^{4,8,9,11}. VTEC puede sobrevivir la acidez del estómago y con un pequeño número de bacterias es capaz de causar enfermedad, la infección puede ocurrir aunque no haya crecimiento de la bacteria en los alimentos⁹. En los últimos 15 años, varios brotes fueron asociados con productos de bajo pH, como embutidos, jugo de manzana sin pasteurizar, mayonesa y yogur. Esto puso de manifiesto la tolerancia de VTEC al pH ácido y su capacidad para sobrevivir a los procesos de fermentación y secado. También se encontró que VTEC sobrevive en alimentos almacenados a temperaturas de mantenimiento en *freezer* comercial (aproximadamente -20°C) entre 10 a 12 meses, con sólo pequeñas reducciones en el número de bacterias totales, mientras que en las mismas condiciones las cepas de *E. coli* no patógenas decrecen^{9,12}. Si existiera la posibilidad de supervivencia de un mínimo número de bacterias, como la dosis infectiva es extremadamente baja, esto representaría un problema de seguridad alimentaria¹³. Esto es significativo, debido a que la mayor parte de las hamburguesas que se consumen en restaurantes y locales de comidas rápidas se transportan congeladas y varios brotes de infección por VTEC se debieron al consumo de este tipo de alimentos^{9,14}. La sobrevivencia a bajas temperaturas se ve influenciada por características propias del alimento, como humedad, pH, etc. En un estudio realizado en huevos de salmón, publicado por Makino et al. (2000)¹⁵, *E. coli* O157 sobrevivió en condiciones de congelamiento a -20°C durante 9 meses y en altas concentraciones de cloruro de sodio, en un estado

denominado viable no cultivable (VNC). *E. coli* tiene la capacidad de pasar a este estado cuando se encuentra en un ambiente estresante¹⁶. Las bacterias en estado VNC son células metabólicamente activas incapaces de multiplicarse y formar colonias en los medios habitualmente utilizados en los laboratorios y el uso de métodos tradicionales de identificación de VTEC basados en el cultivo de una muestra podría dar resultados falsos negativos^{17,18}. Esto debe ser considerado en el momento de tomar decisiones en salud pública, ya que las bacterias conservarían su patogenicidad luego de revertir el proceso¹⁶. De acuerdo a Dykes (2000)¹⁷, la incapacidad para eliminar las *E. coli* O157: H7 que todavía son infecciosas, pero indetectables en medios selectivos, hacen que el *freezar* alimentos sea un método poco fiable para garantizar la inocuidad de los mismos. Solamente la pasteurización y la cocción adecuada inactivan las VTEC, por lo que se considera que son los únicos procedimientos que reducen notablemente el riesgo de contraer SUH⁹.

En un estudio realizado en niños menores de 6 años de edad con diagnóstico de diarrea aguda, el hábito de conservar los alimentos en *freezer* se identificó como asociado estadísticamente con la infección por VTEC (Rivero y col., estudio realizado entre 2005 y 2010, no publicado). En la Argentina, el SUH se describe en la gran mayoría de los casos en niños eutróficos de clase media alta¹⁹. La utilización del *freezer* podría considerarse un indicador de buen nivel socioeconómico, y esto explicaría la asociación encontrada. A su vez, podría ser que el riesgo de infección por VTEC no se deba al "consumo de alimentos conservados en *freezer per se*, sino a una incorrecta manipulación de los mismos durante la conservación, la descongelación y la cocción. Sería frecuente la creencia en el común de la población que los productos mantenidos en *freezer* no implican un riesgo (estarían estériles), lo que llevaría a un descuido en la manipulación de este tipo de alimentos, comparado con otros. Descongelar los alimentos a temperatura ambiente y cocinarlos previo a una completa descongelación, y congelar y descongelar los alimentos en sucesivas oportunidades (romper la cadena de frío) son, lamentablemente, prácticas comunes. Entre los peligros asociados a la descongelación figuran la contaminación cruzada por el agua de goteo y el crecimiento de microorganismos en el exterior, antes de que se haya descongelado el interior²⁰. Debido a que el *freezer* reduce la carga bacteriana, pero no la elimina y que muy pequeña cantidad de bacterias son suficientes para causar la enfermedad, sería lógico pensar que si no se informa sobre la modalidad correcta de congelar y descon-

gelar los alimentos, esto podría constituir un riesgo más para la infección. En función de la evidencia presentada se concluye que la correcta manipulación de los alimentos congelados disminuiría el riesgo de infección por VTEC. El uso de prácticas higiénicas apropiadas en el manejo de los alimentos, particularmente los de origen animal y la cocción adecuada de estos alimentos antes de su consumo son medidas de control importantes para la prevención de la infección por VTEC.

Las recomendaciones de la FAO para una correcta descongelación de los alimentos son las siguientes:

“Los productos congelados, en especial hortalizas, podrán cocinarse sin necesidad de descongelación previa. Sin embargo, los pedazos grandes de carne o las canales de aves de corral grandes suelen tener que descongelarse antes de la cocción. Cuando la descongelación se efectúe separada de la cocción, deberá realizarse únicamente:

- a. en un refrigerador o un armario de descongelación mantenido a una temperatura de 4°C, o
- b. en agua potable corriente a una temperatura no superior a 21°C durante no más de cuatro horas, o
- c. en un horno comercial de microondas sólo cuando el producto vaya a transferirse inmediatamente a unidades de cocción convencionales como parte de un proceso de cocción continuo, o cuando la totalidad del proceso de cocción se desarrolle de manera ininterrumpida en el horno de microondas.

Los productos cárnicos descongelados deberán controlarse frecuentemente para cerciorarse de que la descongelación se haya completado antes de proseguir la elaboración; en caso contrario, la duración del proceso se aumentará según la temperatura de la carne”²⁰.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Bibliografía

1. Karmali M, Gannon V, Sargeant J. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol* 2010; 140: 360-70.
2. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 2005; 365: 1073-86.
3. Repetto HA. Long-term course and mechanisms of progression of renal disease in hemolytic uraemic syndrome. *Kidney Int* 2005; 68:102-6.
4. Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, y col. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. *Medicina (Buenos Aires)* 2006; 66: 27-32.
5. Reilly, A. Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections: memorandum from a WHO meeting. WHO Consultation on Prevention and Control of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Infections. *Bull World Health Organ.* 1998; 6: 245-55.
6. Rivero MA, Passucci JA, Rodriguez EM, Parma AE. Role and clinical course of verotoxigenic *Escherichia coli* infections in childhood acute diarrhoea, Argentina. *J Med Microbiol* 2010; 59: 345-52.
7. Ibarra C, Goldstein J, Silberstein C, y col. Síndrome urémico hemolítico inducido por *Escherichia coli* enterohemorrágica. *Arch Argent Pediatr* 2008;106: 435-442.
8. Karch H, Tarr P, Bielaszewska M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol* 2005; 295: 405-18.
9. Meng J, Doyle MP. Microbiology of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. En: Kaper JB; O'Brien AD (editores) *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin producing *E. coli* strains. Washington D.C., USA: ASM Press; 1998, p. 92-108.
10. Goldwater PN, Bettelheim KA. Treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection and hemolytic uraemic syndrome (HUS). *BMC Medicine* 2012; 10:12.
11. Ansay SE, Darling KA, Kaspar CW. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in ground-beef patties during storage at 2, -2, 15 and then -2 degrees C, and -20 degrees C. *J Food Prot* 1999; 62:1243-7.
12. Bell C. Approach to the control of entero-haemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Int J Food Microbiol* 2002; 78: 197-216.
13. Archer DL. Freezing: an underutilized food safety technology? *Int J Food Microbiol* 2004; 90: 127-38.
14. Delignette-Muller ML y Cornu M; AFSSA STEC. Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in frozen ground beef patties consumed by young children in French households. *Int J Food Microbiol* 2008; 128: 158-64.
15. Makino SI, Kii T, Asakura H, Shirahata T, Ikeda T, et al. Does enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 enter the viable but nonculturable state in salted salmon roe? *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 5536-39.
16. Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2010; 34: 415-25.
17. Dykes GA. The effect of freezing on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 on beef trimmings. *Food Res Int* 2000; 33: 387-92.
18. Douglas BK, Kaprelyants A S, Weichart D H, et al. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *A Van Leeuw* 1998; 73: 169-87.
19. Rivero M, Passucci J, Lucchesi P, et al. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en dos regiones de la Provincia de Buenos Aires. *Medicina (Buenos Aires)* 2013; 73: 127-35.
20. FAO. Manual de procedimientos Comisión del Codex Alimentarius. Programa Conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Sección 7 - preparación de los alimentos; 1998. <http://www.fao.org/docrep/w6419s/w6419s0t.htm#sección>.

Utilización de la PCR en el diagnóstico de bartonelosis en pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos

Bartonellosis diagnosis by PCR in immunodeficient and immunocompetent patients

Jorge Correa¹, Sergio Giamperetti¹, Yamila Romer¹, Natalia Ricardo¹,
Ornela Trucco¹, Gladys Poustis¹, Alfredo Seijo¹

Bartonella spp. es un bacilo Gram negativo, intracelular obligado; perteneciente al grupo Proteobacterias α_2 , emparentados filogenéticamente con el género *Brucella* spp. La patogenia está relacionada con la proliferación vascular a través de la liberación de factores antiapoptóticos y de crecimiento vascular, teniendo como células *target* a los glóbulos rojos y al endotelio vascular. Las especies más importantes, que afectan al ser humano, son: *B. henselae*, agente de la enfermedad por arañazo de gato (AG) y síndrome linfangítico nodular (SLN); *B. quintana*, causa de bacteriemias agudas y crónicas; *B. bacilliformis*, productor de la fiebre de Oroya, y enfermedad de Carrión o verruga peruana. En pacientes inmunosuprimidos, principalmente VIH positivos, con un recuento de linfocitos T CD4⁺ menor a 100 células/ μ l, las infecciones por *B. henselae* y *B. quintana*, producen granulomas vasculares denominados angiomas bacilar (AB) y la peliosis hepato-esplénica (PHE) y ganglionar, formación de quistes con contenido hemático en el parénquima de estos órganos. El diagnóstico es dificultoso: la histopatología es muy útil y de gran ayuda aunque no es patognomónica, la tinción de Warthin Starry evidencia la presencia de bacilos sólo en un 30% de los casos. La serología, es el método más difundido, sin embargo, presenta serorreactividad cruzada con otras bacterias intracelulares (*Coxiella burnetti*, *Brucella* spp., *Chlamydia* spp.) y no establece el diagnóstico de especie. Los cultivos deben realizarse durante periodos prolongados, con subcultivos o cultivos en linajes celulares. Debido a las dificultades planteadas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica ventajosa para el diagnóstico de bartonelosis. Los objetivos planteados son:

1. Descripción de variantes clínicas de pacientes afectados por *Bartonella* spp.
2. Analizar el riesgo epidemiológico como impulsor de la sospecha clínica.

Materiales y métodos

Se estudiaron 12 pacientes con sospecha de *Bartonella* spp. El diagnóstico se estableció luego de la presunción epidemiológica e infectológica y se confirmó mediante PCR. Los materiales clínicos se obtuvieron por punción de lesiones de piel o adenopatías o a partir de sangre entera. Para el diagnóstico molecular por PCR fueron realizadas extracciones de ADN con el kit de extracción NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel). Con el ADN extraído se realizó una PCR multiplex con 2 conjuntos de cebadores: un cebador F (directo) PAPn1 y uno R (indirecto) PAPn2, los cuales generan bandas de 275 pb. y los cebadores PAPn1 y el R PAPn2 que generan bandas de 209 pb. y amplifican regiones del gen *pap31*. La PCR fue llevada a cabo con termociclador Bio-Rad MyCycler. Para la electroforesis se utilizó colorante intercalante de bases GelRed.

Resultados

Tuvieron diagnóstico de bartonelosis por PCR, 12 pacientes, seis fueron de sexo masculino y la mediana de edad fue de 28 años (rango 4-73). Todos pro-

venían de zonas urbanas. Ocho tuvieron contacto previo con gatos, 3/12 refirieron contacto con gatos y perros mientras que un paciente presentó sólo con perros. Una paciente era médica veterinaria. Los motivos de consulta observados fueron: lesiones en piel 9/12 pacientes, adenopatías 9/12, SLN 5/12. Los índices hematimétricos y el perfil bioquímico no mostraron alteraciones significativas.

Cinco presentaron serología reactiva para VIH con mediana de recuento de linfocitos T cd4: 54 cels./ μ l (7-120), 4/5 recibían TARGA, 4/5 recibían profilaxis para *P. jirovecii* (PJP) con trimetoprima sulfametoxazol (TMS) y 4/5 pacientes presentaron infecciones concomitantes: tres sarcoma de Kaposi (SK) y uno histoplasmosis diseminada (HD). Todos los VIH positivos presentaron AB y 4/5 PHE.

7/12 fueron VIH no reactivos: 4/7 presentaron arañazo de gato (1/4 asociado a tuberculosis ganglionar) y 3/7 SLN.

Discusión

El diagnóstico de bartonelosis se pudo vincular con la exposición a gatos parasitados y/o perros con-

comitantemente en 11/12 pacientes y un paciente manifestó sólo contacto con perros. Los motivos de consulta más frecuentes fueron las lesiones de piel y el compromiso adenopático. En la coinfección con VIH, la forma clínica más frecuente fue la AB asociada a PHE, y el 80% tuvieron un recuento de linfocitos T cd4 menor a 100cel/µl. Coincidiendo con otras series la profilaxis con TMS no es suficiente para evitar la bartonelosis, así como, la infección concomitante con otras entidades (en nuestro caso la más frecuente fue el sarcoma de Kaposi), no es suficiente para descartar la presencia de *Bartonella* spp., incluso por la semejanza de las lesiones. En inmunocompetentes también observamos coinfección con otras entidades (TBC), ya señalado en la literatura (como para otras micobacterias), lo cual puede plantear

tanto el diagnóstico diferencial entre ambas entidades y la discusión sobre la coinfección.

Bibliografía

1. Gazineo JLD, Trope BM, Maceira JP, May SB, O Coelho JMC de, Lambert JS, et al. Bacillary Angiomatosis: Description of 13 cases reported in five reference centers for AIDS treatment in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2001; 43(1):1-6.
2. Rolain JM, Brouqui P, Koehler JE, Maguina C, Dolan MJ, Raoult D. Recommendations for Treatment of Human Infections Caused by *Bartonella* Species. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(6): 1921-33.
3. Rolain JM, Lepidi H, Zanaret M, Triglia JM, Michel G, Thomas P-A, et al. Lymph Node Biopsy Specimens and Diagnosis of Cat-scratch Disease. *Emerging Infectious Diseases* 2006; 2(9): 1338- 44.

Palabras claves: *Bartonella* spp., PCR y enfermedad por arañazo de gato, angiomatosis bacilar, peliosis.

1. Servicio de Zoonosis, Hospital de Infecciosas "Francisco Javier Muñiz", CABA, Argentina.
jercorrea@gmail.com, ceijo@intramed.net

Aislamientos de *Campylobacter* spp. de localización extraintestinal

FALTA TÍTULO EN INGLES

Alicia Hoffer¹, Maria Farace¹, Anabella Della Gaspera¹, Florencia Rocca¹, Cristina Correa¹

El género *Campylobacter* se asocia tradicionalmente a las gastroenteritis agudas, ya que es uno de los principales agentes de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). Es por ello que su búsqueda se realiza principalmente en materia fecal. Sin embargo, en los últimos años comenzaron a obtenerse aislamientos a partir de otras muestras clínicas. La intensa capacitación en su diagnóstico en muchos laboratorios ha permitido este logro. Se obtuvieron aislamientos de *Campylobacter* spp. en materiales distintos de materia fecal en los laboratorios de la Red Nacional de gastroenteritis y en la Red Whonet, los que son enviados al laboratorio de referencia para la realización de vigilancia epidemiológica, de la resistencia antibiótica y estudios específicos.

En el presente trabajo se describen las características clínico-epidemiológicas de estos hallazgos a fin de promover su investigación a nivel nacional.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio retrospectivo descriptivo a partir de aislamientos recibidos desde el año 2006, hasta el marzo de 2014. Los mismos fueron tipificados por métodos bioquímicos y moleculares, a los que se incorporó en el año 2013 el método de espectrometría de masas (Maldi-tof).

Los estudios bioquímicos incluyeron examen en fresco y tinción de Gram, oxidasa, catalasa, indoxylacetato, crecimiento a 37 y 25°C. Las técnicas moleculares empleadas fueron multiplex PCR para

tipificación de *C. jejuni/coli*, PCR de especies termotolerantes de *Campylobacter* y PCR de especie para *C. fetus*. Se realizó (PFGE) de las cepas de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus* utilizando la técnica estandarizada para PulseNet para *C. jejuni* y *C. coli* y con adaptaciones para *C. fetus*.

Se realizaron estudios de resistencia a antibióticos. Se utilizó Maldi-tof para confirmar los aislamientos, especialmente *C. fetus* donde se trató de discriminar las subespecies fetus y venerealis, de muy difícil ejecución por otras técnicas.

Resultados

Se obtuvieron un total de 12 aislamientos, 10 fueron aislados de hemocultivos, uno de un líquido de lavado broncoalveolar y uno de punción de un hematoma que estuvo relacionado con una cepa aislada del hemocultivo del mismo paciente. De las 10 cepas aisladas de hemocultivo 3 correspondieron a *C. fetus*, 3 a *C. coli*, y 4 a *C. jejuni*. Las cepas aisladas del lavado broncoalveolar y del hematoma fueron *C. fetus*.

Discusión

Desde el año 2006 se reciben aislamientos de *Campylobacter* spp. Con los años se ha incrementado el número de laboratorios que incorporaron la investigación de este germen de gran importancia en el estudio de las diarreas por su alta incidencia a nivel mundial. No en todos los casos las diarreas se autolimitan, algunas requirieron antibiótico y es conocida la resistencia a quinolonas y a eritromicina. Además existe el riesgo de que algunos pacientes desarrollen luego de la diarrea el síndrome de Gui-

llén Barré como patología asociada. Considerando las características y requerimientos particulares de este microorganismo para su diagnóstico, catalogado dentro de los "gérmenes fastidiosos", resulta imprescindible intensificar la capacitación con el fin de incrementar su búsqueda. A partir del año 2009 se comenzó a recibir cepas de orígenes distintos a la materia fecal. Esto nos dio el indicio de que era una tendencia en aumento y que es necesario insistir sobre la importancia de buscar la presencia de *Campylobacter* en otros materiales por observación directa en fresco, de formas compatibles. El *C. fetus* posee un mecanismo de evasión a la respuesta inmune debido a su cápsula siendo uno de los factores de virulencia S layer que explica su ubicación extraintestinal.

Por otro lado, la presencia de otras especies hace pensar en la pérdida de la integridad de la mucosa intestinal y la posibilidad de la existencia de una patología subyacente que siempre se debe descartar cuando se obtiene un hallazgo de *Campylobacter* spp. en hemocultivos.

Figura 1. Aislamientos de *Campylobacter* spp. de localización extraintestinal

Año	Procedencia	Edad	Sexo	Características	T. de muestra	Tipificación
2009	Bariloche	55	Masculino	Politraumatizado	Hemocultivo	<i>C. fetus</i>
2010	CABA	15	Femenino	LLA y varicela	Hemocultivo	<i>C. jejuni</i>
2012	Córdoba	10m	Femenino		Hemocultivo	<i>C. coli</i>
2012	CABA	40	Femenino	trasplantada	Hemocultivo	<i>C. coli</i>
2012	Córdoba	27	Masculino	Diarrea sanguinolenta	Hemocultivo	<i>C. coli</i>
2013	CABA	12	Masculino		Hemocultivo	<i>C. jejuni</i>
2013	CABA	74	Masculino	Flogosis-Válvula cardíaca	Hemocultivo	<i>C. fetus</i>
2013	CABA	74	Masculino	Flogosis- Válvula cardíaca	Hematoma	<i>C. fetus</i>
2013	Chaco	11m	Femenino	Sepsis	Hemocultivo	<i>C. jejuni</i>
2013	CABA	48	Femenino	Artritis reumatoidea	Hemocultivo	<i>C. jejuni</i>
2013	CABA	63	Masculino		Lavado broncoalveolar	<i>C. fetus</i>
2014	CABA	53	Femenino	Enf oncohematol. Diabetes	Hemocultivo	<i>C. fetus</i>

Palabras claves: *Campylobacter* en hemocultivos, *Campylobacter* en hemocultivos, *Campylobacter* en hemocultivos.

1. Instituto Nacional de enfermedades Infecciosas ANLIS Carlos G. Malbran, Argentina.
ahoffer@anlis.gov.ar

Reexaminación paleoparasitológica de coprolitos de roedores procedentes de la Patagonia argentina considerando información parasitológica actual

Paleoparasitological reexamination of rodent coprolites from Argentinean Patagonia, considering current parasitological data

Martín H. Fugassa¹, Romina S. Petri¹, María del Rosario Robles²

Previous paleoparasitological studies were developed in Alero Mazquiara an archaeological site located in the south of Chubut Province, Argentina. In those studies, coprolites from Cricetidae rodents (don't identified) were examined and three species of parasites were found (*Pterygodermatites* spp., *Trichosomoides crassicauda* and *Monoecocestus* spp.). Among these parasites, the trichosomoidids are zoonotic nematodes and, in this sense, the paleoparasitological studies will allow to understand the distribution of parasites in time and space.

Currently, new parasitological studies in sigmodontine rodents are being carried out in Santa Cruz Province, in an area near to that mentioned archaeological site. In this context, it is interesting to contrast the previously obtained results with the new information presented in the current study, to contributing to the interpretation of epidemiological models. This paper reexamines the identity of a nematode assigned to the family Trichosomoididae using morphological and molecular studies.

Materials and methods

Archaeological sample: coprolites were found in the archaeological site Alero Mazquiara Chubut Province, Argentina. This deposit, associated with human occupation, was dated with a radiocarbon date of 212 ± 35 years before present. The samples were rehydrated in phosphate trissodium solution and submitted to spontaneous sedimentation as previously described.

Modern samples: feces from *Abrothrix olivacea* specimens and feces of other rodent species from the same region were studied. All samples were measured with a digital vernier caliper (± 0.1 mm). Three measurements were taken and compared with those obtained in the coprolites. Incomplete specimens of Trichosomoididae were isolated of the gastric mucosa from *A. olivacea*. The eggs were isolated from the female. Aliquots of the pellet were used for measuring and photographing mature eggs under an optical microscope.

The DNA extraction was performed according to Gasser et al., (1993) with modifications. For the molecular identification of adult stage, a fragment of cytochrome c oxidase subunit I mitochondrial gene (*co1*) was amplified by PCR. Negative PCR controls were added. The triplicates of the specific fragment were sequenced and the consensus was compared with the GenBank sequences by using the BLASTN algorithm of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Results

The comparative study of feces (archeological and modern samples) from sympatric species of rodents indicated that the coprolites obtained could belong to *Abrothrix* spp. From archeological samples, eggs from Trichosomoididae and Rictularidae nematodes as well as from Anoplocephalinae cestodes were confirmed. However, the current study also reports the presence of *Trichuris* spp.

From modern samples of *A. olivacea*, Trichosomoididae nematode was found. The partial morphological study of adult specimens allowed the identification of generic level *Anatrichosoma* spp. In addition, the measurements of *Anatrichosoma* spp. eggs showed a similar morphological pattern to that of the archaeological sample.

The sequence here obtained (GenBank database AN: KF581196) showed 76% of identity with the only nucleotide sequence of *co1* available, *Anatrichosoma haycocki*, using BLAST. This result corroborates the generic belonging of the samples of Trichosomoididae studied (incomplete adult, and ancient and modern eggs) from a sigmodontine rodent in Patagonia.

Discussion

The reexamination of the coprolite samples corroborated previous findings and allowed to observe the presence of *Trichuris* spp.

Through morphological analysis of *A. olivacea*

modern samples, *Anatrichosoma* spp. (Trichosomoididae) were identified. And this result was supported by molecular analysis.

The molecular studies provide a new tool to integrate information obtained from modern samples and paleoparasitological data. Due to the conservation of archaeological sample, here we were unable to perform molecular analyzes from obtained eggs in coprolites.

The comparative analysis from archaeological and modern samples, considering the morphological and molecular data from specimen adults and eggs, suggest that the Trichosomoididae eggs found in the archaeological sample belonging to *Anatrichosoma* spp. previously attributed to *T. crassicauda*.

Since, the trichosomoidids are zoonotic nematodes the understanding about their correct identification and distribution in time and space will contribute to the interpretation of epidemiological models. The paleoparasitology contributes to know the history of parasite-host relationships and opens a new page to study the spatial and temporal dimension of parasitism. The emergence and reemergence of infectious diseases over time can be better understood with paleoparasitological studies

References

1. Gasser RB, Chilton NB, Hoste H, Beveridge I. Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nucl Acids Res* 1993, 21:2525-6.

Key words: Archaeology, Zoonoses, *Trichosomoididae*.

1. CONICET, Laboratorio de Paleoparasitología y Arqueología Contextual, Universidad Nacional de Mar del Plata.
2. Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) (CCT-CONICET-La Plata) (UNLP). La Plata, Argentina.

15 años de formación en Salud Pública Veterinaria

15 Years of Veterinary Public Health Training

Cecilia González Lebrero¹; Noelia Stefanic²; Gabriel L. Cicuttin³; Fernando M. Siccardi⁴

La Residencia de Veterinaria en Salud Pública (RVSP) es un sistema de postgrado de capacitación en servicio creado en el año 1999 como parte de las Residencias del Equipo de Salud de la Dirección General de Docencia e Investigación del Ministerio de Salud del Gobierno de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, siendo su única sede de formación el Instituto de Zoonosis Luis Pasteur (IZLP). De esta manera, la RVSP constituyó la primera experiencia del país en un sistema de capacitación en servicio para la formación de veterinarios en el área de salud pública.

La RVSP trabaja en la prevención y control de distintas zoonosis urbanas utilizando como ejes de trabajo, la atención primaria de la salud, la vigilancia epidemiológica y la educación para la promoción de la salud. Siguiendo estas líneas de acción se capacita al veterinario residente en diferentes áreas de la salud pública incluyendo diagnóstico laboratorial de zoonosis, técnicas quirúrgicas de esterilización, desarrollo de proyectos comunitarios y de investigación, epidemiología, y diagnóstico y seguimiento de zoonosis urbanas.

Durante el proceso de formación se espera la sensibilización social del profesional, logrando que aspectos sociales no explorados en la formación de grado, sean abordados de manera interdisciplinaria y desde la visión de la salud como un proceso complejo y no sólo como la ausencia de enfermedad. Por otra parte, se promueve la integración de los residentes a equipos interdisciplinarios, articulando con distintos profesionales de la salud (médicos, enfermeras, nutricionistas, trabajadoras sociales, entre otros) y con la comunidad. El trabajo compartido con otras disciplinas requiere que el residente aprenda a trabajar de otro modo, redefiniendo problemáticas desde perspectivas que desde nuestra disciplina no se suelen plantear.

Se espera que, al completar su formación, el egresado de la RVSP cuente con un nivel de capacitación que le permita formar parte de centros o departamentos de zoonosis, de vigilancia epidemiológica o de programas específicos de temáticas sanitarias, ya sea en el ámbito oficial como en el privado.

El objetivo del presente trabajo fue describir la RVSP respecto a los ejes de acción y la inserción laboral al finalizar la residencia, relevando la capacidad formadora del mismo a través de 15 años de historia.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio descriptivo cuali-cuantitativo, para ello se utilizaron los registros históricos de la RVSP en el período 1999-2014 para determinar la cantidad de ingresantes por año.

Las acciones centrales se describen para el período 2010-2013 y las actividades profesionales actuales de los egresados se obtuvieron de fuentes primarias.

Resultados

En estos 15 años de trayectoria de la RVSP, ingresaron 28 profesionales veterinarios que se especializaron en salud pública, a razón de 1.9 profesionales por año.

Las acciones centrales se enmarcaron en el trabajo con poblaciones en condiciones de vulnerabilidad social de distintos barrios de la ciudad. Se trabajó en el área de cobertura de los Centros de Salud y Acción Comunitaria: N° 5 (2001-2004), N° 30 (2001-2004), N° 14 (2004-2011), N° 24 (desde el año 1999 a 2004 y 2009-actualidad) y N° 18 (2004-actualidad).

Las acciones se realizaron en el marco de los tres ejes centrales de la RVSP: *vigilancia epidemiológica de zoonosis urbanas* que incluye la prevención y control de enfermedades zoonóticas de ciclo urbano, junto con el desarrollo y ejecución de investigaciones epidemiológicas; *educación para la promoción de la salud*, enfatizando la adopción de prácticas saludables en la convivencia humano-animal, fomentando la higiene alimentaria y promocionando la generación de prácticas para el cuidado del ambiente; y *prevención de zoonosis a nivel comunitario* mediante el control del crecimiento poblacional canino y felino, la vacunación antirrábica y la desparasitación de animales domésticos.

De la RVSP egresaron 28 profesionales, de ellos, 23 se encuentran desarrollando su actividad profesional en el ámbito público, 1 en el privado y 4 egresaron recientemente en el mes de mayo de 2014. La tasa de incorporación de residentes al personal permanente del IZLP es del 50%. El 37.5% se insertaron en dependencias del estado nacional (tales como ProTenencia, SENASA, INTA, CONICET, FCV-UBA y ACUMAR) y el 8.3% en dependencias provinciales de zoonosis.

Discusión

En los barrios vulnerables donde la RVSP desarrolla sus actividades existe una numerosa y creciente población de animales que conviven estrechamente con humanos, en condiciones de hacinamiento, con un mayor riesgo de contraer enfermedades zoonóticas. Es en este contexto donde cobra importancia el rol del veterinario especializado en salud pública, con capacitación para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de zoonosis, constituyendo un eslabón fundamental del equipo de salud.

El veterinario de la RVSP se forma con una visión amplia del proceso salud-enfermedad. De esta manera, el egresado está preparado para abordar dichos procesos de manera integral, desde un aspecto clínico, laboratorial, epidemiológico, ambiental y social, enriquecidos por el aporte de las disciplinas que conforman los equipos de salud.

La inversión que realiza el sector salud en este programa de capacitación es aprovechada al incorporar, al plantel, profesionales con una mirada y experiencia forjada en el mismo servicio público. Además, su incorporación a la institución formadora es sumamente importante para revitalizar a la misma, como se demuestra en el hecho de que cada dos egresados de la RVSP, uno ha sido incorporado al IZLP. Por otra parte, este sistema de formación aporta profesionales capacitados para todo nuestro país, ya que casi el 100% de los egresados se encuentran dedicados a la salud pública, ejerciendo en el sector público a nivel municipal, provincial o nacional.

Bibliografía

1. Castiello V, Madariaga MJ. Veterinaria en el primer nivel de atención. Un nuevo escenario para una vieja profesión. *Revista Salud y Población* 2006; 5:35-8.
2. Marcos E. El sistema de residencias, las ciencias veterinarias y la salud pública. Una nueva opción de formación de posgrado para veterinarios. *Revista de Medicina Veterinaria* 2001; 82(3):175-80.
3. Organización Panamericana de la Salud, Secretaría de Salud (GCABA) e Instituto Gino Germani (Fac de Ciencias Sociales – UBA). Las residencias del equipo de salud: desafíos en el contexto actual. CABA (Argentina): Gráfica Laf; 2003.
4. Stefanic N. Traspasando fronteras: la importancia de la interdisciplina para el veterinario. *Revista Salud y Población* 2012; 7:14-7.

Palabras claves: Residencia, veterinaria, salud pública.

1. Jefa de Residentes.
2. Ex residente.
3. Coordinador Local.
4. Coordinador General.

Residencia de Veterinaria en Salud Pública, Instituto de Zoonosis Luis Pasteur,
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
residenciavetpasteur@gmail.com

Bartonella spp. en murciélagos *Tadarida brasiliensis* de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Bartonella spp. in *Tadarida brasiliensis* bats, Buenos Aires city

Gabriel L. Cicuttin¹, M. Nazarena De Salvo¹, Eduardo J. Boeri¹, Fernando J. Beltrán¹, Federico E. Gury Dohmen¹

Los murciélagos son los mamíferos que presentan mayor diversidad de especies y se encuentran ampliamente distribuidos en todo el mundo. Su distribución geográfica, alta movilidad, comportamiento y longevidad los transforman en reservorios ideales de distintos microorganismos. Pueden transmitir patógenos virales y bacterianos (incluyendo transmitidos por vectores como *Borrelia*, *Bartonella* y *Neorickettsia risticii*).

En Argentina se reconocen cuatro de las nueve familias de murciélagos registradas para Sudamérica: Phyllostomidae, Noctilionidae, Vespertilionidae y Molossidae. En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA) existen registros de 10 especies, pertenecientes a las dos últimas familias nombradas.

El moloso común o murciélago cola de ratón (*Tadarida brasiliensis*, Molossidae) es un murciélago pequeño, cosmopolita, abundante y ampliamente distribuido en nuestro país. Presenta hábitos gregarios y se lo encuentra en todo tipo de ambientes, colonizando edificios y estructuras de uso humano con muy altas concentraciones, siendo un habitante típico de centros urbanos. Representa aproximadamente el 90% de los murciélagos que ingresan al IZLP para el diagnóstico de rabia.

El género *Bartonella* se compone de bacterias gram-negativas intracelulares que presentan un ciclo complejo, incluyendo la participación de hospedadores animales: domésticos (como perros y gatos), silvestres (roedores, murciélagos y aves) y distintos vectores hematófagos (pulgas, piojos, entre otros). Otra forma de transmisión es por contacto directo, tal como mordeduras y arañazos. Sin embargo, la mayoría de los ciclos epidemiológicos aún presentan puntos oscuros.

El papel de los murciélagos como portadores de *Bartonella* spp. solo se encuentra descrito en cinco estudios y de reciente data en la bibliografía mundial. Se ha detectado en murciélagos de las familias Vespertilionidae (Reino Unido, Kenia, Perú y Taiwán), Hipposideridae (Kenia), Mormoopidae (Guatemala), Emballonuridae (Kenia), Phyllostomidae (Guatemala y Perú) y Pteropodidae (Kenia).

El objetivo del presente trabajo fue detectar el género *Bartonella* en murciélagos de la especie *Tadarida brasiliensis* de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA).

Materiales y métodos

Se seleccionaron 23 murciélagos de la especie *T. brasiliensis* procedentes de CABA, remitidos al IZLP para diagnóstico de rabia durante el año 2011. Los ejemplares fueron necropsiados y se recolectó un grupo de órganos por ejemplar: hígado, bazo y pulmón.

La extracción del ADN se realizó mediante el AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA). Como control negativo de extracción se utilizó agua libre de nucleasas.

Para la detección de *Bartonella* spp. se utilizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, según sus siglas en inglés) simple para un fragmento del gen codificante del ARN ribosomal 16S de 396 pb, siguiendo las indicaciones de los autores. A la muestra positiva se le realizó también una PCR anidada específica para un fragmento de 300 pb del gen de la citrato sintasa *gltA* del género *Bartonella*. Como control positivo se utilizó *B. henselae* y como

control negativo agua libre de nucleasas.

Los productos de la PCR fueron purificados mediante PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y secuenciados en el secuenciador 3500 Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) en el Servicio de Neurovirosis (Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán).

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias disponibles en GenBank, mediante la utilización del software BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

Resultados

La amplificación por PCR del fragmento del gen codificante del ARNr 16S del género *Bartonella* detectó positividad sólo en un murciélago (4,3%). Esta muestra también fue positiva para la PCR anidada del fragmento *gltA*.

La secuencia obtenida del fragmento codificante del ARNr 16S resultó en un 100 % de similitud con *Bartonella* spp. 1160/1 (KF003123) detectada en murciélagos *Myotis daubentonii* de Europa, así como con *Bartonella* spp. 094 (KF792121), *Bartonella* spp. OE5-1 (AB602538) y *Bartonella* spp. FG3-1 (AB602537) halladas en distintas especies de roedores en África, y *Bartonella japonica* (AB440632) hallada en una especie de roedor de Japón. Por otra parte, la similitud fue del 99,5 % con *Bartonella* spp. No.05 (JF500555) hallada en murciélagos *Miniopterus schreibersii* de Asia.

Discusión

Nuestro trabajo presenta el primer antecedente de presencia de *Bartonella* en murciélagos *T. brasiliensis* a nivel mundial y también el primer indicio de circulación de dichos patógenos en murciélagos de Argentina.

La secuencia obtenida presenta una elevada similitud con otras detectadas en quirópteros en distintas regiones del mundo, sin embargo, es necesario caracterizar molecularmente para poder establecer la relación filogenética existente entre estos hallazgos.

Las bartonelosis son importantes enfermedades emergentes, debido al incremento en su incidencia y en su expansión geográfica. El número de especies asociadas con enfermedad humana se encuentra en continuo crecimiento, y cualquier especie de *Bar-*

tonella podría ser un patógeno humano potencial. En Argentina se han notificado casos humanos por *B. henselae* (enfermedad por arañazo de gato) y *B. quintana* (fiebre de las trincheras), mientras que en animales solo se ha detectado *B. henselae* en gatos y en perros con valvulopatía cardíaca.

La detección de *Bartonella* spp. circulando en murciélagos en un área urbana como CABA es de suma importancia para el conocimiento de estos patógenos en reservorios silvestres, con un posible impacto en salud pública. De todas formas, se deberá continuar profundizando el papel de estos animales silvestres en el ciclo de transmisión en ambientes urbanos.

Bibliografía

1. Cicuttin GL, Brambati DF, De Gennaro MF, Carmo F, Isturiz ML, Pujol LE, et al. *Bartonella* spp. in cats from Buenos Aires, Argentina. *Vet Microbiol* 2014; 168(1):225-8.
2. Harms A, Dehio C. Intruders below the radar: molecular pathogenesis of *Bartonella* spp. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25(1):42-78.
3. Mühldorfer K. Bats and bacterial pathogens: a review. *Zoonoses Public Health* 2013;60(1):93-103.
4. Varela EA, Vaccaro OB, Trémouilles ER. Quirópteros de la ciudad de Buenos Aires y de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Parte II. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales* 2004;6(1):183-90.

Palabras claves: *Bartonella*, murciélagos, Buenos Aires.

1. Instituto de Zoonosis Luis Pasteur, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
gcuttin@gmail.com

Diagnóstico serológico de brucelosis en perros del conurbano sur bonaerense

Serological diagnosis of Brucellosis in dogs from southern Greater Buenos Aires

Diego Eiras^{1,2}, Carla Scodellaro^{1,3}, Darío Vezzani^{4,5}, Gustavo López^{6,7}, Carlos Boero⁸, Ricardo Sánchez⁸

La brucelosis canina es una enfermedad zoonótica causada principalmente por *Brucella canis*. Los animales afectados pueden ser asintomáticos y transmitir la infección durante el coito o manifestarse clínicamente con muerte embrionaria, aborto, linfadenitis, esplenitis, orquitis, dermatitis del escroto, epididimitis y prostatitis. Ocasionalmente, los perros pueden infectarse y actuar como portadores de cepas lisas de *Brucella*, como *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*, principalmente cuando conviven con sus hospedadores habituales (bovinos, caprinos y cerdos, respectivamente). La enfermedad en estos casos suele transcurrir de manera subclínica, pero en ocasiones la sintomatología es severa con presencia de fiebre, emaciación y artritis, orquitis en los machos, anestro y ocasionalmente aborto en las hembras. Las diferencias asociadas a la estructura de la pared bacteriana, hacen que el diagnóstico serológico de la enfermedad producida por *B. canis* deba realizarse de manera específica, ya que no poseen un antígeno superficial de naturaleza lipopolisacárida presente en las cepas lisas de *Brucella* ya mencionadas.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la seroprevalencia de brucelosis canina por aglutinación rápida (RSAT) en caninos provenientes de la zona sur del gran Buenos Aires y evaluar la presencia de anticuerpos contra cepas lisas de *Brucella* en la misma población.

Materiales y métodos

Durante el período marzo 2013 - enero 2014 se procesaron 489 sueros de perros con propietario (zona sur del gran Buenos Aires), ingresados al Laboratorio DIAP para el diagnóstico de brucelosis canina por RSAT con 2 Mercapto-etanol (2-ME). Para la evaluación de la presencia de anticuerpos contra cepas lisas, se realizó complementariamente la prueba de aglutinación en placa con antígeno brucélico bufferado (BPA). Los sueros positivos a BPA se procesaron con las técnicas de aglutinación lenta de Wright y 2-ME y fluorescencia polarizada (FPA). Estas pruebas se realizaron e interpretaron según los procedimientos descritos por SENASA para el diagnóstico de brucelosis bovina. El porcentaje de sueros positivos a RSAT se comparó entre sexos y edades mediante un test para dos y múltiples proporciones independientes, respectivamente.

Resultados

Entre los 489 sueros, 42 fueron positivos a RSAT (8.6%), sin observarse diferencia significativa ($X^2 = 3.121$, $p = 0.07$) entre machos (20/172 = 11.6%) y hembras (22/317 = 6.9%). Tampoco hubo diferencias significativas ($X^2_{(3)} = 1.44$, $p = 0.697$) entre diferentes categorías de edad (hasta 1 año: 9/78 = 11.5%; 1 a 3 años: 22/266 = 8.3%; 3 a 6 años: 9/107 = 8.4%; >6 años: 2/38 = 5.3%). Respecto a la prueba de BPA, 13 de los 489 sueros (2.7%) fueron positivos, de los cuales 5 (1%), habían resultado positivos a la prueba de RSAT. Utilizando los criterios de interpretación para bovinos no vacunados en las pruebas confirmatorias, los resultados fueron: 1 suero (0.2%) positivo a Wright (1/200), 2-ME (1/200) y FPA (mP = 229) y 1 suero (0.2%) positivo sólo a FPA (119 mP). Por último, 1 suero (0.2%) con aglutinación incompleta en Wright (i1/50), negativo a 2-ME y FPA = 99 mP, fue considerado sospechoso.

Discusión

El presente estudio sugiere una elevada seroprevalencia de los perros del sur del Gran Buenos Aires a RSAT, y en consecuencia, que la brucelosis canina por *B. canis* representa un riesgo potencial para la salud pública en la región. Respecto de las comparaciones entre sexos y edades, nuestros resultados

sugieren que ambos sexos y todos los grupos de edades tienen similar riesgo de infección.

Un solo perro con serología negativa a RSAT proveniente de la zona periurbana de Guernica y con antecedentes de vagabundeo, arrojó resultados positivos a todas las pruebas complementarias para la confirmación de cepas lisas de *Brucella*. La posibilidad de migración de perros de áreas periurbanas o rurales donde existen viviendas con animales de granja, podría explicar la presencia de títulos positivos en perros del área de estudio. Considerando que la brucelosis bovina y caprina es endémica en algunas áreas de nuestro país, y existiendo la posibilidad de transmisión al perro y de este último al humano, destacamos la importancia del hallazgo en áreas urbanas. En un estudio sobre 224 sueros en Lomas de Zamora, se encontró que un perro positivo a RSAT y BPA resultó luego negativo a las pruebas confirmatorias. En el presente trabajo, 5 de los 13 sueros positivos a BPA también eran positivos a RSAT, 1 de los cuales resultó positivo a FPA y otro sospechoso a las pruebas confirmatorias. La posibilidad de reacción cruzada en pruebas de screening entre cepas lisas y rugosas ha sido previamente sugerida pero resultan necesarias investigaciones adicionales. No poseemos antecedentes sobre el uso de FPA para la serología en perros y en el futuro podría constituir una herramienta útil en estos casos si se establece el punto de corte y la concordancia con las pruebas clásicas de Wright y 2-ME en la especie canina.

Bibliografía

- Xavier MN, Paixão TA, den Hartigh AB, Tsois RM, Santos RL. Pathogenesis of *Brucella* spp. *The Open Veterinary Science Journal* 2010;4:109-18.
- Lucero NE. Brucelosis canina: Una zoonosis urbana emergente. XIX Reunión Científico Técnica. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico (AAVLD). Buenos Aires, Argentina. 2012; 43-44.
- Boeri E, Escobar GI, Ayala SM, Sosa-Estani S, Lucero NE. Brucelosis canina en perros de la ciudad de Buenos Aires. *Medicina* 2008;68:291-7.
- López G, Ayala SM, Efron AM, Gómez CF, Lucero NE. A serological and bacteriological survey of dogs to detect *Brucella* infection in Lomas de Zamora, Buenos Aires Province. *Revista Argentina de Microbiología* 2009;41: 97-101.

Palabras claves: *Brucella canis*, *Brucella abortus*, perros.

1. Laboratorio DIAP (Diagnóstico en Animales Pequeños). Argentina.
2. Departamento de Epizootiología y Salud Pública. La Plata. Buenos Aires. Argentina. diegoeirias@diap.com.ar
3. Laboratorio Central. La Plata. Buenos Aires. Argentina. luain2@hotmail.com
4. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.
5. Unidad de Ecología de Reservorios y Vectores de Parásitos. Dto. Ecología, Genética y Evolución. Argentina. vezzani@ege.fcen.uba.ar
6. Facultad de Ciencias Agrarias. UNLZ. Llavallol.
7. Centro de Zoonosis. Municipalidad de Lomas de Zamora, Argentina. dr.gustavo.lopez13@hotmail.com
8. Laboratorio Mesopotámico de Diagnóstico Veterinario. Concordia, Entre Ríos, Argentina. laboratorio@labmesopotamico.com.ar

Desarrollo de un método para producir vacuna antirrábica en cultivo de células Vero

Rabies vaccine development in Vero cell culture

María Rosario Tubio¹, Santiago Chiappini¹, Analía López Díaz¹, Analía De Nichilo¹, Andrés Hernando Insúa¹, Carlos Palacios¹, Oscar P. Larghi y Alejandro Daniel Parola^{1,2}

La rabia es una enfermedad zoonótica aguda del sistema nervioso central, causada por virus del género *Lyssavirus*, que es letal en casi el 100% de los casos, luego de la aparición de signos clínicos. Este virus se encuentra difundido a nivel mundial, e infecta a mamíferos tanto domésticos como salvajes, incluyendo al ser humano. Anualmente más de 15 millones de personas reciben tratamiento con vacunas antirrábicas, sin embargo, 55 000 individuos mueren en el mundo por no recibir el tratamiento adecuado. Las necesidades de esta vacuna en Argentina son atendidas, en parte, por el Ministerio de Salud de la Nación. Sin embargo, en nuestro país aún se producen 140 000 dosis anuales de vacunas a partir de cerebro de ratón lactante y rata lactante, a pesar de que la OMS las desaconseja desde 1984. En Latinoamérica existen empresas de productos veterinarios que producen vacunas antirrábicas, pero ninguna de ellas ha abordado la producción de vacuna antirrábica para humanos. La única experiencia conocida es la del instituto Butanatan en Brasil cuya producción cubre necesidades internas. El objetivo de este trabajo fue producir vacuna antirrábica para humanos empleando virus cultivado en células Vero purificado por métodos cromatográficos e inactivado.

Materiales y métodos

El banco maestro de células se elaboró con la línea celular Vero provista por el American Type Cell Collection (ATCC-CCL81), y se controló de acuerdo con las recomendaciones de la Farmacopea Europea, de la OMS y las guías ICH. El banco viral se elaboró con la cepa PV-2061 y su título se estableció en células Vero. Para los cultivos celulares se empleó medio base M199 (Life Technologies), suplementado con L-glutamina 4 mM, gentamicina 50 µg/ml, fungizona 2.5 µg/ml y suero fetal bovino 10% (SFB; Internegocios). Para la infección, se utilizó medio base M199 con HEPES 25 mM y albúmina sérica bovina (ASB) 0.2%, sin SFB. Las células se cultivaron en botellas de 25 a 870 cm² (Greiner Bio One) a 37 °C con 5% de CO₂. Una vez alcanzado una confluencia de 70-90% las células se tripsinizaron y transfirieron a frascos *spinners* con 3-6 g/l de microesferas (Cytodex 1, General Electric), a una densidad inicial de 2.0 a 2.5 × 10⁵ cel/ml. Cuando se alcanzó una densidad de 1 a 2 × 10⁶ cel/ml, se extrajo el medio de cultivo y las microesferas se lavaron tres veces con PBS. Las células se infectaron con multiplicidades de infección (MOI) de 0.1 a 1 dosis infectivas 50 por ml (DI₅₀/ml), en medio de infección a 34 °C siguiendo una metodología de perfusión discontinua. Las cosechas se clarificaron por filtros de 0.45 µm (Millipore), se diafiltraron y concentraron por membranas de filtración tangencial (MFT). El concentrado se purificó por cromatografía de intercambio catiónico, seguido de cromatografía de exclusión molecular, luego se inactivó con beta proliolactona (1:3 500),

se diafiltró por MFT de 10 kDa (Pellicon-Millipore) y finalmente se filtró por 0.22 µm (Millipore). Las cosechas, las etapas de purificación y el producto final se analizaron según correspondiera: glicoproteína viral (ELISA), ASB mediante ELISA (Bethyl Laboratories, Inc.), ADN residual (Qubit 2, Life Technologies), esterilidad, concentración de proteínas (Bradford) e integridad y pureza por SDS PAGE y *Western Blot*. El título y la presencia de virus infectivo residual se determinaron por Inmunofluorescencia.

Resultados

La identidad de la línea celular Vero se corroboró por amplificación y secuenciación de un fragmento específico de DNA mitocondrial, de 301 pb. El control del banco aseguró la ausencia de bacterias, micoplasmas, hongos y virus adventicios. La identidad de las cepas virales se confirmó por secuenciación de la Glicoproteína viral. El título del banco de virus de la cepa PV fue de 3.3 × 10⁹ DI₅₀/ml. Las densidades celulares alcanzadas en frascos *spinners* en condiciones de perfusión discontinua fueron de 2 × 10⁶ cél./ml. El título máximo de las cosechas fue de 3.3 × 10⁹ DI₅₀/ml y se alcanzaron valores máximos de glicoproteína de 19 UI/ml. Se cosechó el virus hasta los 16 días de cultivo, siendo el rendimiento volumétrico de 53 UI de glicoproteína por ml de volumen inicial de trabajo. Los sistemas cromatográficos ensayados permitieron purificar el virus rábico con niveles de contaminantes menores con lo establecido por la Farmacopea Británica: ASB menor a 50 ng/dosis y ADN menor a 10 ng/dosis.

Discusión

En el presente trabajo se desarrollaron métodos para la optimización de cultivos, infecciones, y controles de calidad de cada proceso, que permitieron producir altas cantidades de antígeno viral. La caracterización del banco de células aseguró que el mismo fuera apto para la producción de vacunas de acuerdo con estrictos requisitos regulatorios. El recambio de medio de cultivo permitió alcanzar densidades celulares altas. Las condiciones de infección resultaron en cinéticas de producción viral lentas que prolongaron la cosecha de virus durante más tiempo que los reportados por otros autores. El método de purificación basado en la combinación de diafiltración seguida de cromatografías de intercambio iónico y exclusión molecular no se ha reportado. La estrategia empleada permitió concentrar antígeno viral y mantener un nivel de impurezas por debajo de lo establecido en la Farmacopea Europea. Los

métodos presentados aquí permiten la producción efectiva de vacuna antirrábica para humanos, de acuerdo con estándares internacionales.

Bibliografía

- Organización Mundial de la Salud. OMS | Rabia [Internet]. Nota descriptiva N° 99. World Health Organization; 2013 [cited 2014 Mar 25]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/es/>.
- Smith JS, Yager PA, Baer GM. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull World Health Organ* 1973;48(5):535-41.
- Ono K, Satoh M, Yoshida T, Ozawa Y, Kohara A, Takeuchi M, et al. Species identification of animal cells by nested PCR targeted to mitochondrial DNA. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2007;43(5-6):168-75.
- Rourou S, Van Der Ark A, Van Der Velden T. A microcarrier cell culture process for propagating rabies virus in Vero cells grown in a stirred bioreactor under fully animal component free conditions. 2007;25:3879-89.

Palabras claves: Rabia, vacuna antirrábica, células Vero.

1. Fundación Pablo Cassará, Saladillo 2452, Buenos Aires, Argentina.
2. Instituto de Ciencias y Tecnología Dr. César Milstein – CONICET. Saladillo 2468, Buenos Aires, Argentina. aparola@fundacioncassara.com.ar

Distribución espacial y prevalencia de geohelminthos en humanos de la región del Litoral Argentino

Spatial distribution and prevalence of Soil-Transmitted Helminths in human in the Argentinean Litoral

Silvia Grenóvero¹, Evangelina Bertucci², Nora Molina², Juan Basualdo²

Los geohelminthos son helmintos transmitidos por suelo que afectan más de dos mil millones de humanos en todo el mundo. Las especies de geohelminthos más frecuentes son *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, Uncinarias (*Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*) y *Strongyloides stercoralis*. Estos nematodos pertenecen a la lista de Enfermedades Tropicales Desatendidas (NTD) y presentan elevadas tasas de infección en América, China, Sudeste asiático y África subsahariana. Estimaciones recientes indican que 875 millones de niños en el mundo requieren quimioprofilaxis para estas geohelminthosis (OMS). En Latinoamérica y el Caribe existen más de 49 millones de niños en riesgo, de los cuales, el 50% pertenecen a Brasil, Colombia y México. Nuestro país presenta dos áreas endémicas de estos parásitos (Noreste y Noroeste) en las que residen cerca de 3 millones de niños en riesgo de infección. La Organización Mundial de la Salud ha estratificado el riesgo de infección según la prevalencia de infección humana, en riesgo leve (menor de 20%), moderado (20 a 50%) y alto (mayor de 50%). La estrategia global para el control de estas geohelminthosis consiste en la eliminación de las infecciones de riesgo moderado y alto mediante la administración periódica de antihelmínticos (QP, quimioterapia preventiva) a la población en riesgo de infección. Esta intervención sanitaria requiere información actualizada sobre prevalencias parasitarias y la aplicación de mapas de riesgo que indiquen las zonas geográficas donde la prevalencia excede el umbral de intervención (20%). El uso de nuevas metodologías basadas en sistemas de información geográfica (SIG) contribuye al análisis espacial y temporal de la información epidemiológica parasitaria y por lo tanto, favorece la implementación de programas integrados de control de geohelminthosis. El objetivo de este trabajo fue determinar la distribución espacial y la prevalencia de geohelminthos en humanos, a partir de la información documental como producción de conocimiento en el Litoral Argentino, durante el período 1988-2011.

Materiales y métodos

El estudio se contextualizó en el área de influencia geográfica referenciada en la producción científica asociada a la presencia de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, Uncinarias (*Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*) y *Strongyloides stercoralis* en el Litoral Argentino (Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Chaco y Santa Fe) durante el período 1988-2011. Dicho estudio se realizó desde una perspectiva metodológica cuantitativa, con la aplicación de un diseño no experimental exploratorio, retrospectivo y de corte transversal de la información científica como producción de conocimiento. La información asociada a la presencia de geohelminos en el área de estudio se obtuvo a partir de una revisión bibliográfica realizada en sitios web de PAHO y OPS, bases de datos: MEDLINE, LILACS, SciELO y DOAJ y comunicaciones presentadas en congresos. La presencia de dichos geohelminos se determinó a través de datos de frecuencia y prevalencia citados en la producción científica. Posteriormente, estos datos se unificaron y categorizaron en escalas indicadores de riesgo (OMS). La distribución espacial de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, Uncinarias (*Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*) y *Strongyloides stercoralis* fue realizada a partir de la georreferenciación de las localidades citadas en las publicaciones incluidas en este estudio. El estudio analítico se llevó a cabo mediante la aplicación de técnicas estadísticas epidemiológicas descriptivas (SPSS v. 19). El análisis espacial de los datos se realizó con un instrumento de Sistemas de Información Geográfica (SIG) (ArcMap® v.10).

Resultados

En el proceso de revisión bibliográfica se hallaron 80 citas que hacían referencia a la presencia de geohelminos desde 1988 hasta 2011. Los trabajos publicados correspondieron a 4/6 (67%) provincias del Litoral (Misiones, Corrientes, Chaco y Santa Fe) y relevaron la situación parasitaria de 67.511 humanos. Las prevalencias promedio halladas en la zona de estudio fueron Uncinarias (36%), *Ascaris lumbricoides* (14%), *Strongyloides stercoralis* (14%) y *Trichuris trichiura* (4%). Los trabajos científicos asociados a la provincia de Misiones mostraron los valo-

res más elevados de prevalencia de Uncinarias (62%) y *Strongyloides stercoralis* (27%), mientras que Santa Fe presentó la mayor prevalencia de *Ascaris lumbricoides* (20%). Las provincias de Formosa y Entre Ríos no presentaron ningún estudio sobre estos parásitos.

Conclusiones

Las Enfermedades Tropicales Desatendidas producen un gran impacto en los individuos, familias y comunidades de países en desarrollo, en términos de carga de enfermedad, calidad de vida y pérdida de productividad, así como el aumento en el costo de atención médica a largo plazo. Este es el primer reporte de distribución espacial de geohelminos en el Litoral Argentino, registrándose prevalencias de infección de Uncinarias superiores a 60% de la población. El análisis espacial reveló la presencia de zonas endémicas del Litoral Argentino con riesgo de infección elevado para Uncinarias y riesgo moderado para *Ascaris lumbricoides* y *Strongyloides stercoralis*. A diferencia de ello, el riesgo para *Trichuris trichiura* fue bajo en toda el área estudiada. La información referida en este estudio provee las bases para estimar la población en riesgo de infección y el número de humanos que requiere tratamiento antihelmíntico en el Litoral Argentino.

Bibliografía

- Saboyá MI, Catalá L, Ault SK, Nicholls RS. Prevalence and intensity of infection of Soil-transmitted Helminths in Latin America and the Caribbean Countries: Mapping at second administrative level 2000-2010. *Pan American Health Organization*, 2011.
- Brooker S, Michael E. The potential of geographical information systems and remote sensing in the epidemiology and control of human helminth infections. *Adv Parasitol* 2000;47:245-88.
- Hotez P, Bottazzi M, Franco-Paredes C, Ault S, Periago M. The Neglected Tropical Diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;2:e300.
- Brooker S, Singhasivanon P, Waikagul J, Supavej S, Kojima S, Takeuchi T, Luong TV, Looareesuwan S. Mapping soil-transmitted helminths in Southeast Asia and implications for parasite control. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003;34:24-36.

Palabras claves: Geohelminos, distribución espacial, Argentina.

1. Cátedra de Bioestadística. Facultad de Bromatología. Carrera de Nutrición. Universidad Nacional de Entre Ríos. Entre Ríos. silviagrenovero@gmail.com
2. Cátedra de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata. La Plata Buenos Aires. nbmolina@med.unlp.edu.ar

Leishmaniasis visceral canina en el Área Metropolitana de Buenos Aires

Canine visceral leishmaniasis in the Metropolitan Buenos Aires Area

Gabriel L. Cicuttin¹, M. Nazarena De Salvo¹, Noelia S. Stefanic², Federico E. Gury Dohmen¹

La leishmaniasis visceral canina (LVC) es producida por *Leishmania infantum* (sinonimia *chagasi*) (familia Tripanosomatidae, orden Kinetoplastida) y transmitida en Argentina principalmente por el díptero flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. Los perros son los reservorios urbanos siendo la principal fuente de infección para los vectores. La incidencia en los perros es superior a la humana y la aparición de casos caninos antecede a los brotes en humanos. Por otra parte, si bien el tratamiento mejora la condición clínica, el canino permanece infectante para el vector. Por ello, el diagnóstico certero y oportuno es de suma importancia para la salud pública.

La enfermedad puede cursar de forma sintomática, oligosintomática o asintomática. El período de incubación en los perros varía de 2 a 12 meses. El Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (módulo Vigilancia por Laboratorio, SNVS-SIVILA) define como Caso Canino Sospechoso a "Todo perro sospechoso proveniente de área endémica o donde esté ocurriendo un brote, o cría de una perra positiva para LV, que presente manifestaciones clínicas compatibles con la enfermedad: fiebre irregular, apatía, pérdida de peso y del apetito, descamación furfurácea y úlceras en piel, en general en hocico, orejas y extremidades, conjuntivitis, paresia de tren posterior, heces sanguinolentas y crecimiento exagerado de las uñas" y detalla que "la zona de transmisión activa de Leishmaniasis canina en la Argentina comprende las provincias de Salta, Jujuy, Catamarca, Tucumán, Formosa, Chaco, Santiago del Estero, Misiones y Corrientes". Seguidamente un Caso Canino Probable es "Todo perro sospechoso de LV que presente serología reactiva para LV, por una prueba distinta de rk39 (ELISA, Inmunofluorescencia indirecta)" y un Caso Canino Confirmado por Laboratorio es "Todo perro sospechoso de LV que presente serología reactiva a través de tiras inmunocromatográficas rk39 o parasitología positiva" (incluyendo PCR desde muestras de tejidos, entre otras técnicas detalladas). El Área Metropolitana de Buenos Aires (AMBA) ocupa un territorio de aproximadamente 2 400 km², que concentra 13 000 000 de habitantes (44 % de la población nacional), formada por la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y 40 municipios de la provincia de Buenos Aires. El AMBA abarca grandes conglomerados urbanos, incluyendo poblaciones en condiciones de pobreza estructural. En este marco, nuestro objetivo es presentar la casuística de diagnóstico de LVC de nuestro laboratorio en el período 2012-2014 con muestras procedentes del AMBA.

Materiales y métodos

A partir del 2012 nuestro laboratorio comenzó a realizar el diagnóstico de LVC a demanda. Las muestras remitidas al laboratorio fueron suero, hisopado/raspaje de lesiones, punción-aspiración de médula ósea, bazo y otros órganos. El tipo de muestra varió según el análisis solicitado y el estado clínico del animal, incluyendo muestras tomadas post-mortem. Los métodos diagnósticos utilizados fueron serológicos y detección del agente.

Para el diagnóstico serológico se utilizó inmunocromatografía Anigen Rapid Leishmania Ab Test Kit (Bionote, Gyeonggi-do, Corea) o ELISA Test SNAP Leishmania (IDEXX Laboratories, Westbrook, EEUU) e inmunocromatografía con antígeno rk39 Kalar Detect Rapid Test (InBios International, Seattle, EEUU). A partir de 2013, se comenzó a realizar la detección del agente etiológico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, según sus siglas

en inglés) para detectar un fragmento de los minicírculos del kinetoplasto del parásito. Los controles positivos fueron gentilmente cedidos por el Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatała Chaben (INP).

Resultados

Entre mayo de 2012 y marzo de 2014 se estudiaron 21 caninos con signología compatible y/o procedencia o viaje a zonas endémicas. La edad de los animales fue desde los 6 meses a los 12 años (promedio 5.3), 52.4 % de los animales fueron hembras, 47.6 % de raza indefinida, 71.4 % residentes en CABA y el 42.8 % con antecedentes de procedencia o viaje a zona endémica. De los 21 animales, 17 caninos se estudiaron solamente por métodos serológicos, 1 canino sólo por PCR (post-mortem) y 3 por los dos métodos. Siete caninos resultaron positivos al diagnóstico de LVC.

La edad promedio de los animales positivos fue de 6.7 años, el 85.7 % fueron machos y 42.8 % de raza indefinida. En cuanto al lugar de residencia, 4 vivían en CABA y el resto en provincia de Buenos Aires (Olivos, Vicente López y Glew). En cuanto al nexo epidemiológico, 4 procedían o habían viajado a área endémica: 2 animales procedían de España (uno con diagnóstico realizado en ese país), 1 procedía de Paraguay (con madre originaria de Misiones) y el restante viajó a Oberá (Misiones). Por otra parte, los 3 caninos positivos restantes incluyeron un canino de raza Caniche Toy comprado en un criadero (sin más datos), un animal procedente de EEUU y el restante con el único antecedente de convivencia con otro animal encontrado en la calle y que murió con signos compatibles (aunque sin diagnóstico).

Discusión

El AMBA presenta una numerosa población canina con diversas condiciones sanitarias y una afluencia constante de animales de zonas endémicas nacionales y extranjeras, tanto como animal de compañía o para reproducción en criaderos. La utilización de las técnicas serológicas confirmatorias y especialmente la incorporación de la técnica de PCR en nuestra institución, representan herramientas fundamentales para el diagnóstico gratuito de LVC en el AMBA. La casuística mostrada en nuestro estudio representa a animales que han sido derivados por sospecha clínica o por demanda del propietario dada su procedencia o viaje a zona endémica.

La rápida dispersión del vector de LVC que proyecta su diseminación en el corto plazo al área del

delta del Paraná (incluida en el AMBA), la migración de animales desde zonas endémicas, así como la ocurrencia de formas secundarias de transmisión de LVC (transfusional, venérea y transplacentaria) plantean un futuro e inminente problema en salud pública.

Por ello, es necesario sensibilizar a los efectores veterinarios privados para que incluyan a la LVC en su diagnóstico diferencial, realizando una correcta anamnesis que permita establecer un nexo epidemiológico y logrando prevenir la dispersión de la enfermedad por transmisión secundaria en ausencia de vector. Por otra parte, también se deberá monitorear los animales procedentes de áreas endémicas y fundamentalmente promover una tenencia responsable de animales para concientizar a la población de los riesgos de poseer caninos infectados con leishmaniasis visceral.

Bibliografía

- Dirección de Epidemiología; Ministerio de Salud de la Nación. Enfermedades Infecciosas. Leishmaniasis visceral. Diagnóstico de Leishmaniasis Visceral. Guía para el equipo de salud. Argentina: Ministerio de Salud de la Nación; 2010.
- Dirección de Epidemiología; Ministerio de Salud de la Nación. Leishmaniasis humana y canina: normativa y tutorial para la notificación a través del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS C2 y SIVILA). CABA (Argentina): Ministerio de Salud de la Nación; 2013.
- Gould IT, Perner MS, Santini MS, Saavedra SB, Bezzi G, Maglianese MI, Antman J, Gutiérrez JA, Salomón OD. Leishmaniasis visceral en la Argentina. Notificación y situación vectorial (2006-2012). Medicina (Buenos Aires) 2013;73(2):104-10.

Palabras claves: Leishmaniasis, perros, diagnóstico, Buenos Aires.

1. Laboratorio de Diagnóstico - Instituto de Zoonosis Luis Pasteur (IZLP)
2. Residencia de Veterinaria en Salud Pública - IZLP. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
gicuttin@gmail.com

Leptospirosis asociada a nuevos escenarios epidemiológicos. Descripción de dos brotes en Santa Fe, Argentina

Leptospirosis associated new epidemiological settings. Description of two outbreaks in Santa Fe, Argentina

Carolina Cudós^{1,2}, Andrea Uboldi², Fernanda Schmeling¹, Paulina Jacob¹, Yosena Chiani¹, Noelia Landolt¹, Silvia Fusco³, Mariana Maglianese⁴, Dovis Natalia⁵, Bibiana Vanasco¹

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial. Nuevos escenarios clínicos y epidemiológicos sitúan a la leptospirosis como enfermedad reemergente, de importancia en salud pública. Este estudio tiene como fin describir dos brotes de leptospirosis en un nuevo contexto epidemiológico: jugar con barro durante festejos.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio descriptivo de dos brotes de leptospirosis, asociados al juego con barro con motivo de dos festejos, ocurridos en la provincia de Santa Fe. Se incluyeron todos los expuestos que enfermaron y a los cuales se les pudo obtener muestra. Se evaluó la exposición a las probables fuentes de infección, se investigó la aparición de enfermedad en personas expuestas a la misma fuente y las características clínicas de los enfermos. Se tomaron muestras de agua sólo en el primer brote, pues al momento del estudio del segundo brote la tierra estaba seca. Los sueros se analizaron con aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente (TR) y microaglutinación (MAT). En un caso de evolución rápidamente fatal se realizó PCR en tiempo real para el diagnóstico. Como criterio de definición de casos se utilizó la normativa actual del Sistema Nacional de Vigilancia Laboratorial (SIVILA) del Ministerio de Salud de la Nación. Las muestras de agua se sembraron en medio EMJH y se incubaron durante 60 días.

Resultados

El primer brote ocurrió en Larrechea (Santa Fe). Catorce adolescentes fueron expuestos en enero de 2013 al barro de un criadero de cerdos al jugar durante un cumpleaños. Doce de 14 expuestos presentaron sintomatología compatible con leptospirosis en los 15 días posteriores a la exposición (11/12 cefalea, 10/12 fiebre y mialgias, 4/12 dolor retroocular), y 5/12 fueron hospitalizados. Todos consultaron a los servicios de salud regionales, pero en ninguno ellos, salvo en el caso índice, se sospechó inicialmente leptospirosis. La incubación promedio de los enfermos fue de 10 días y la edad promedio de 16.3 años. Se confirmaron 7 casos (tasa de ataque 50%) por serología. Las muestras de agua cultivadas fueron negativas. Se educó a la población sobre la enfermedad para prevenir futuros casos.

El segundo brote sucedió en Santa Fe capital. Quince personas se expusieron al barro, a modo de entretenimiento, el día 5 de enero de 2014 con motivo de un cumpleaños. Doce de los 15 expuestos enfermaron (12/12 fiebre, 12/12 síntomas gastrointestinales, 4/12 cefalea, 6/12 mialgias, 1/12 hemorragia pulmonar). El período de incubación promedio

fue de 11 días y la edad promedio 18 años. Se destaca que todos los pacientes presentaron un importante compromiso gastrointestinal que marcaba el cuadro, confundiendo con gastroenteritis viral. El caso índice presentó luego de cinco días de fuerte compromiso abdominal, una hemorragia pulmonar masiva con evolución rápidamente fatal, confirmando este caso mediante PCR en tiempo real. Del resto de los enfermos se confirmaron 5 casos por serología (MAT).

Discusión

La leptospirosis es considerada como enfermedad reemergente principalmente debido al síndrome de hemorragia pulmonar grave, como nueva forma de presentación clínica, y a la urbanización de la enfermedad. El presente trabajo describe dos brotes en la provincia de Santa Fe de leptospirosis posteriores al juego con barro. En Argentina las inundaciones y actividades rurales son los principales factores de riesgo de leptospirosis. Sin embargo, en estos brotes se describe una nueva actividad de riesgo de infección, jugar con barro como parte de un festejo. Los nuevos escenarios epidemiológicos de la leptospirosis obligan al equipo de salud a estar alertas ante la aparición de pacientes con síndrome febril compatible con leptospirosis en contextos diferentes a los clásicamente descriptos, y a tener presente a la enfermedad ante presentaciones clínicas no clásicas pero que presenten un fuerte antecedente epidemiológico de riesgo.

Bibliografía

- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, and Vinetz JM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 2003; 3:757-771.
- Vinetz JM. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 2001; 14:527-538.
- Ministerio de Salud de la Nación. Sistema de Vigilancia Laboratorial. Leptospirosis: Normativa y Tutorial para la vigilancia a través del Sistema Nacional para la Vigilancia Laboratorial (SIVILA-SNVs), 2011. En: <http://www.snvs.msal.gov.ar>. Consultado el 30 de enero de 2014.
- Vanasco NB, Schmeling MF; Lottersberger J, Costa F, Ko AI, Tarabla HD. Clinical Characteristics and Risk Factors of Human Leptospirosis in Argentina (1999-2005). *Acta Trop* 2008; 107(3):255-58.

Palabras claves: leptospirosis, epidemiología, emergente.

1. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias INER "E. Coni", ANLIS "C. Malbrán", Santa Fe, Argentina. carolinacudos@gmail.com
2. Dirección Provincial de Prevención y Promoción de la Salud, Ministerio de Salud de Santa Fe. Santa Fe, Argentina. andreauboldi@gmail.com
3. Laboratorio Central de Santa Fe. D Santa Fe, Argentina. laboratoriocentral@arnetbiz.com.ar
4. Programa de Zoonosis, Ministerio de Salud de Santa Fe. Santa Fe, Argentina. zoofe9@hotmail.com
5. Sanatorio Santa Fe, Belgrano 3049. Santa Fe, Argentina. contacto@sanatoriosantafe.com

AMPK and calcineurin are cellular master regulators with opposite activity during reverse vesicular development in *Echinococcus granulosus* larval stage

AMPK y calcineurina son reguladores celulares claves con actividad opuesta durante el desarrollo vesicular en el estadio larval de *Echinococcus granulosus*

Julia A. Loos^{1#}, María Celeste Nicolao^{1#}, Andrea C. Cumino¹

Cestodes are platyhelminth parasites causing chronic infections to humans and domestic animals worldwide. *Echinococcus granulosus* life cycle includes two mammalian hosts. The intermediate hosts (ungulates and humans) ingest eggs that develop into a hydatid cyst containing larvae or protoscoleces (PTS) both long-lived larval forms. The hydatid cyst is limited by a cyst wall (CW), consisting of an inner germinal layer of metabolically active parasite cells and an outer carbohydrate-rich laminated layer, which restricts the host contact. Infection in the definitive host (canid) arises from ingestion of PTS encysted in the viscera of the intermediate host, and the consequent development into adult worms, which eliminate eggs to the environment completing the cycle. Additionally, *E. granulosus* shows an alternative development. When PTS are liberated into the circulation from a ruptured cyst located on an intermediate host, these are able to differentiate asexually into secondary hydatid cysts. For the larval stage development, it is widely accepted that glucose is the major respiratory substrate and glycogen the main energy storage molecule. On the other hand, the germinal layer constituted by totipotent cells, possesses a high metabolic activity due to being involved in the synthesis of the laminated layer (towards the outside of the cyst) and the generation of brood capsules containing PTS (towards the inside). Thus, energy and intermediate metabolites are the major metabolic demand for the germinal layer. These conditions generate a controlled management of energy and a caloric restriction in the parasite, and consequently a high autophagic activity during the larval stage. In search of therapeutic solutions for the cystic echinococcosis, our research group has determined that the pharmacological modulation of two cellular master regulators such as calcineurin (CaN) and AMPK showed anti-echinococcal effect against this cestode. In this study, we analyzed the expression and localization of both proteins during the development process in the parasite.

Materials and methods

Echinococcus granulosus protoscoleces were removed under aseptic conditions from hydatid cysts of infected cattle obtained from abattoirs of the province of Buenos Aires, Argentina. Incubation of protoscoleces with insulin and fetal bovine serum (FBS) for several days induces a progressive de-differentiation towards the metacestode stage or microcyst. Microcysts represent the phase in which the protoscolex is completely transformed into a miniature cyst (loosing suckers, rostellum and hooks, and showing a laminated layer) and a pre-microcyst, a vesicle-like structure, is a completely vesicularised protoscolex with suckers and rostellum vestiges, without a laminated layer and almost devoid of movement. In order to obtain vesicularised protoscoleces and pre-microcysts, protoscoleces (n= 1,500/25-cm² growth area per bottle) were cultured in medium 199 supplemented with antibiotics (penicillin, streptomycin and gentamicin; 100 µg/ml), glucose (4 mg/ml), insulin (2 Uml⁻¹) and

15% FBS. Cultures were maintained at 37 °C for 50 days and the medium was changed every 5-7 days. Meanwhile, the number of developed pre-microcysts was determined by observation under an inverted light microscope at different time points. In order to evaluate Eg-AMPK- α and Eg-CaNA expression during the *in vitro* de-differentiation of protoscoleces into microcysts, *in toto* immunolocalization assays were carried out from samples collected from the same culture at different times. Protoscoleces and pre-microcysts developed were fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde in 0.1 M PBS (pH 7.4) for 4 h at 4 °C, and then washed for 24 h at 4 °C in permeabilizing solution (PBS at pH 7.4 containing 0.3% v/v Triton X-100, 0.2% w/v sodium azide and 0.5% w/v BSA). Parasites were incubated for 3-5 days at 4 °C with different human primary antibodies (phospho-AMPK α rabbit monoclonal Ab -Cell Signalling #2535, total AMPK rabbit monoclonal Ab -Cell Signalling #5832- and calcineurin α rabbit polyclonal Ab -Sigma #C1956- at 1:200 dilutions), and washed with PBS

for 24 h at 4 °C. Finally, protoscolecocytes were incubated with goat anti-rabbit IgG conjugated with Alexa 488 or anti-mouse IgG conjugated with FITC for 24 h at 4 °C, washed and counterstained with 2 µg/ml propidium iodide (Molecular Probes P-3566). They were observed with an inverted confocal laser scanning microscope (Nikon, Confocal Microscope C1). Negative controls consisted of omission of primary antibody for all experiments. The intensities of fluorescence were analyzed for 10 individual parasites and images were analyzed using Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Data within experiments were compared and significance was determined using the student's t test and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

We detected Eg-AMPK α expression (total and phosphorylated forms) in tegument, posterior bladder and surroundings the calcareous corpuscles of control protoscolecocytes, and Eg-CaNA expression in protoscolecocyte cytoplasm. In addition, both Eg-AMPK α forms could be observed in both the nucleus and the cytoplasm, in agreement with its direct involvement in the transcriptional regulation. Furthermore, under controlled *in vitro* conditions, protoscolecocytes of *E. granulosus* can develop in either the cystic or the strobilate direction. Several developmental pathways have been involved in cyst development during *in vitro* culture. These include from evaginated or invaginated protoscolecocytes, from free posterior bladders or even from everted brood capsules. We were able to detect different morphological

types involved in cyst development such as intact or everted brood capsules, protoscolecocytes with posterior bladders, vesiculated protoscolecocytes and microcysts developed from vesiculating protoscolecocytes. An Eg-AMPK α increased expression and Eg-CaNA decreased its expression in the structures formed during the de-differentiation process from protoscolecocytes were observed.

Discussion

In this study, we describe the changes of Eg-AMPK and Eg-CaNA expressions during the *in vitro* de-differentiation process of protoscolecocytes to microcysts. The development plasticity of *Echinococcus* larvae is also evident when PTS grow into an adult worm inside the gastrointestinal tract of the definitive host. Since activating AMPK and inactivating calcineurin slows ageing in *Caenorhabditis elegans* and given the evolutionary conservation of this pathway from helminth to mammals it will be interesting to determine the role of downstream signal pathways of both proteins as potential drug targets for primary and secondary hydatidosis.

References

- Loos JA, Caparros PA, Nicolao MC, Denegri GM, Cumino AC. Identification and pharmacological induction of autophagy in the larval stages of *Echinococcus granulosus*: an active catabolic process in calcareous corpuscles. *Int J Parasitol* 2014;13-387.
- Mair W, Morante I, Rodrigues APC, Manning G, Montminy G, Shaw RJ, Dillin A. Lifespan extension induced by AMPK and calcineurin is mediated by CRT-1 and CREB. *Nature* 2011; 17,470(7334): 404-8.

Key words: AMPK, calcineurin, vesicular development, *Echinococcus granulosus*.

1. Laboratorio de Zoonosis Parasitarias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Buenos Aires. acumino@mdp.edu.ar

These authors contributed equally to this work.

Parásitos de interés zoonótico y parasitosis intestinales humanas: situación y gestión de soluciones a escala local en una ciudad de Patagonia (Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina)

Parasites of zoonotic interest and human bowel parasitosis: situation and solution Management on a local scale in a Patagonian city (Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina)

Torrecillas C^{1,2}, Mellado I^{1,2}, Resser C³, Becquer S^{1,2}, Sánchez Thevenet P⁴, Catalá C⁵, Suárez F⁵, Pierangeli N⁶, Parra G⁵, Debiaggi MF⁴, Roccia I⁴, Rico M¹, Souto M^{1,2}

En estudios anteriores realizados entre 1999 y 2006, en Comodoro Rivadavia, se evidenció la contaminación por parásitos intestinales (pi) caninos de varios espacios públicos urbanos de la ciudad. Las parasitosis relacionadas a pi caninos, como la hidatidosis –endémica en esta provincia–, la toxocarosis y la anquilostomosis, tienen una profunda repercusión en el desarrollo socio-económico y productivo de las comunidades

que afectan, siendo el primer eslabón en la secuencia de adquisición –y transmisión– de algunas de estas zoonosis, la exposición del ser humano a huevos infectivos presentes en el ambiente. En la última década, se ha dado un crecimiento importante de la ciudad de C. Rivadavia, en extensión y en número de habitantes, con una estructura de desigualdades sociales y de infraestructura sanitaria; lo que implicaría un posible impacto en la sanidad ambiental, en la salud de la población y por tanto en la calidad de vida de los habitantes. El estudio a escala local de la situación ambiental y epidemiológica de parásitos que afectan la salud humana, en áreas particularmente vulnerables de un núcleo urbano, puede contribuir a monitorizar las acciones previas de control aplicadas en la ciudad, a conocer la evolución de la contaminación ambiental por pi de interés zoonótico y a identificar necesidades de infraestructura sanitaria básica tendiente a disminuir el riesgo de sufrir parasitosis en sus habitantes. Los objetivos del presente estudio fueron determinar la contaminación biológica por pi caninos en espacios públicos de uso recreacional y conocer la frecuencia de aparición de enteroparasitosis humanas y situación de tenencia de mascotas caninas, en la extensión del barrio Stella Maris de Comodoro Rivadavia.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio descriptivo transversal durante los meses de marzo y abril de 2012, en la zona extensión del barrio, de la zona sur de C. Rivadavia (Chubut, Argentina, 45° S 68° O). Este es el sector más próximo al relleno sanitario –predio de disposición de los residuos sólidos urbanos–, presenta características de semiruralidad y precariedad habitacional, con escasa cobertura de servicios sanitarios básicos –agua de red potable y/o red de cloacas–, y cuenta con 356 viviendas ocupadas por 692 habitantes, correspondiendo 271 de ellos al grupo etario de menores de 12 años. Allí, se realizaron 287 encuestas estructuradas para registrar información sobre tenencia de mascotas. Además, se estudiaron 7 espacios públicos de uso recreacional, para determinar la presencia de pi caninos. En estos sitios se recolectaron un total de 65 pooles de materia fecal canina ambiental (MFC), constituidos cada uno por 3 a 5 especímenes de MFC y 15 muestras de suelo. Todas las muestras se transportaron al laboratorio en contenedores rígidos, refrigerados y protegidos de la luz. Para su estudio cada muestra de MFC se subdividió en 2 fracciones, conservándose una de ellas en solución fisiológica formolada (SFF) al 10% para la búsqueda de pi y la otra en PBS para determinación de coproantígeno de *Echinococcus* spp. Las muestras de MFC en SFF se concentraron mediante las técnicas de Willis y Telemann modificado. Las muestras de suelo se conservaron en freezer a -4°C y se procesaron mediante técnica de Sheather y de Telemann modificado. Todas las muestras se observaron por triplicado con microscopio óptico (mo) en fresco con coloración extemporánea con lugol, en aumentos de 100X y 400X. A todas las muestras positivas para huevos de Taeniidae y a 1 de cada 5 muestras negativas para pi, se les determinó coproantígeno para *Echinococcus* spp. Para el estudio de pi en humanos, se incluyeron 30 personas, con edades comprendidas 1 y 30 años de edad. Los participantes, debieron

cumplir con los siguientes criterios de inclusión: tener DNI, dar su consentimiento informado firmado (por el tutor o responsable en caso de ser el sujeto participante un menor de edad) y completar la encuesta. Para la búsqueda de pi se recogieron muestras de materia fecal (estudio coprológico, CPS) y de mucosa perianal ambas en SFF y de 7 días de recolección. Las muestras de CPS se estudiaron mediante las técnicas de Telemann modificado, formol acetato, Sheather y Willis. Las muestras de mucosa perianal se estudiaron mediante Test de Graham. Todas las muestras se observaron por triplicado al microscopio óptico, con y sin lugol, y aumentos de 100x y 400x.

Resultados

El número de perros registrados fue de 683, resultando una relación n° perros/n° habitantes de 1:1. El 10% de los canes estaban esterilizados y el 12% desparasitados, según reporte de los dueños a la encuesta (Tabla 1).

En MFC la frecuencia de aparición de muestras positivas para pi caninos fue del 86% (56/65) y, en muestras de suelo de los espacios públicos recreacionales del 47% (7/15). El 54% (35/56) de las muestras de MFC estaban poliparasitadas. La frecuencia relativa de aparición de pi en MFC fue: *Toxocara* spp. 41% (23/56), *Toxascaris* spp. 29% (16/56), Taeniidae 11% (6/56) *Trichuris* spp. 2% (1/56), *Capillaria* spp. 2% (1/56), *Uncinaria* spp 7% (4/56), *Giardia* spp 29% (14/56), potencialmente patógenos como: *Entamoeba* spp, *Iodamoeba* spp, *Endolimax* spp 48% (27/56), *Coccideos* 36% (20/56). La prueba de coproantígeno para *Echinococcus* spp., fue negativa en todas las muestras estudiadas. La frecuencia relativa de aparición de pi en muestras de suelo, por especie, fue: *Toxocara* spp. 86% (6/7) y *Giardia* spp. 14% (1/7). En humanos, el número de casos positivos para pi fue de 26; correspondiendo al 86% de la población estudiada (Tabla 2).

Los resultados en MFC obtenidos evidencian un incremento en 1.7 veces de la frecuencia de apari-

ción de pi reportada en estudios anteriores en este mismo tipo de muestras ambientales, recolectadas de espacios públicos de uso recreacional de la ciudad (51% año 1999 vs. 86%, año 2012); y un aumento en 3.2 veces de la frecuencia de aparición de poli parasitismo en las mismas (17% año 1999 vs. 54% año 2012). Con relación a las especies de pi hallados en estas muestras se incorpora como novedad el hallazgo de *Toxascaris* spp. La diversidad y el aumento de la frecuencia de aparición de los pi hallados en MFC, evidencian la necesidad de aplicar/continuar con medidas de control tendientes a disminuir la contaminación ambiental por estos parásitos zoonóticos. La elevada tasa de parasitación por *Toxocara* spp (41%) denota una situación de poco control de la sanidad canina, en particular de las hembras. La elevada tasa de enteroparasitosis en humanos, evidencia una situación de emergencia sanitaria y social, con relación a estas patologías; considerando que las enfermedades parasitarias sumergen a la población, especialmente la de bajos recursos económicos, en un espiral de pobreza, debido a su tendencia a perjudicar el desarrollo de la población infantil, a afectar la salud de la población vulnerable/susceptible (ej.: mujeres embarazadas) y a impactar en la productividad laboral. La información recabada por el

estudio, sirvió de base para implementar acciones de control de natalidad y desparasitación canina; y para tratamiento de población humana.

Conclusiones

La situación evidenciada con relación a parásitos zoonóticos y enteroparasitosis humanas en una zona vulnerable de la ciudad patagónica de C. Rivadavia (Chubut, Argentina), permitió implementar acciones de control y saneamiento a las autoridades locales.

Bibliografía

1. Córdoba A, Ciarmela B, Pesan B, Gamboa M I, De Luca M, Basaldo JA. 2002. Presencia de parásitos intestinales en paseos públicos en La Plata Argentina. *Parásitol Latinoam* 57:25-9.
2. Sánchez Thevenet P, Ñancufil A, Oyarzo CM, Torrecillas C, Raso S, Mellado I, Flores ME, Córdoba M, Minvielle MC Basaldo Farjat JA. 2004. An eco-epidemiological study of contamination of soil with infective forms of intestinal parasites. *European Journal of Epidemiology*, 19:481-89.
3. Sánchez Thevenet P, Jensen O, Mellado L, Torrecillas C, Raso S, Flores M E. Presence and persistence of intestinal parasites in canine fecal material collected from the environment in the Province of Chubut, Argentine Patagonia. *Vet Parasitol* 2003;117:263-9.

Tabla 1. Numero de perros esterilizados y desparasitados, según sexo, en extensión de Barrio Stella Maris (Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina). Datos reportados por sus dueños. 2012

Sexo del can	N	Esterilizados (n)	Desparasitados (n)
Hembras	415	43	45
Machos	268	23	37
Total	683	66	81

Tabla 2. Frecuencia de aparición de parásitos intestinales según género y especie, en población humana de 1 a 30 años de edad. Comodoro Rivadavia (Chubut, Argentina). 2012. N= 30

Tipo de parásito	Frecuencia absoluta (n)	Frecuencia relativa (%)
<i>Giardia duodenalis</i>	9	35
<i>Entamoeba coli</i>	5	19
<i>Blastocystis hominis</i>	8	31
<i>Endolimax nana</i>	5	19
<i>Cytoisospora</i>	2	8
<i>Enterobius vermicularis</i>	10	38
<i>Hymenolepis diminuta</i>	3	11
<i>Taenia</i> spp.	1	4

Palabras claves: Parásitos zoonóticos, Patagonia, humanos.

1. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.
2. CRIDECIT (Centro Regional de Investigación Científica Tecnológica) Chubut, Argentina.
3. CERET (Centro Regional de Tecnología) Chubut, Argentina.
4. Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad CEU/Cardenal Herrera, España.
5. Municipalidad de Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.
6. Universidad Nacional del Comahue. Centro Interdisciplinario de Investigaciones Biomédicas y Clínicas (CINIByC), Argentina. torrecillas.claudia@gmail.com

Monitoreo del virus de la fiebre amarilla y otros arbovirus de importancia sanitaria en mosquitos de la ciudad de Puerto Iguazú, Misiones

Surveillance of yellow fever virus and others arboviruses in mosquitoes in Puerto Iguazú, Misiones

Silvina Goenaga¹, Manuel Espinosa², Marcelo Abril², Silvana Levis¹ y Delia Enria¹

Los arbovirus (del inglés, arthropod borne) son virus en los que diferentes especies de artrópodos hematófagos (mosquitos, garrapatas y simúlidos) actúan como vectores y algunos vertebrados (mamíferos, aves, reptiles) sirven como reservorio y/ o huéspedes amplificadores.

Dentro de la clasificación de los arbovirus existen diversos géneros con importancia sanitaria. En Argentina, hasta la actualidad, ha sido documentada la circulación del virus Oropouche (género Bunyavirus), Encefalitis Equina del Este, Encefalitis Equina Venezolana, y Encefalitis Equina del Oeste (género Alphavirus). Del género Flavivirus se ha detectado circulación del virus de Encefalitis de San Luis, Ilhéus, Dengue, el virus del Nilo Occidental y Fiebre Amarilla (FA). Particularmente, la FA es una enfermedad que ha tenido un gran impacto en la salud pública; a pesar de contar con una vacuna efectiva, en el mundo se registran alrededor de 30.000 muertes y 200.000 enfermos por año. La FA es endémica en Sudamérica y África; presenta un ciclo de transmisión selvático que se establece entre distintas especies de monos y mosquitos de los géneros *Haemagogus* y *Sabethes* en Sudamérica, y mosquitos del género *Aedes* en África. Existe un ciclo intermedio, donde la transmisión es interhumana y ocurre en el ecotono de la sabana y selva africana. En Sudamérica, este tipo de ciclo aún no ha sido documentado. El ciclo de transmisión urbano, se establece cuando las personas infectadas introducen el virus en zonas con gran densidad de población de susceptibles, a través de la picadura del mosquito *Aedes aegypti*. Los mosquitos infectados transmiten el virus de una persona a otra. En Argentina este ciclo no ocurre desde hace más de 130 años.

Durante el 2007-2009 se detectó la re-emergencia de FA selvática en la provincia de Misiones. Se aisló el virus a partir de mosquitos y 9 casos humanos fueron confirmados por laboratorio.

Este trabajo tiene como objetivo general reportar una actividad de monitoreo del virus de la fiebre amarilla, otros Flavivirus y Alfavirus en mosquitos capturados en la Ciudad de Puerto Iguazú. Cabe destacar que esta ciudad es altamente turística, con gran intercambio de personas debido a las Cataratas del Iguazú.

Materiales y métodos

Para la colecta de mosquitos adultos se utilizaron 7 (siete) trampas tipo CDC adicionadas con hielo seco como atrayente ubicadas en parches selváticos de áreas periurbanas de la ciudad de Puerto Iguazú. Se realizaron 2 capturas mensuales desde enero hasta abril de 2013; las trampas estuvieron activas desde las 17 hs hasta las 10 hs del día siguiente. Los ejemplares capturados se identificaron hasta la categoría de especie, o en su defecto a la categoría taxonómica de género, bajo una platina fría y se agruparon en *pooles* en función de la especie, fecha de muestreo y sitio de captura. Los *pooles* fueron triturados para la realización de las suspensiones y la obtención del RNA. Mediante la técnica de PCR con *primers* específicos, se amplificó una región del genoma viral que codifica para una proteína no estructural (NS5) de los géneros Alfavirus y Flavivirus. En los *pooles* positivos se cortó la banda de agarosa, se purificó el DNA, que posteriormente se secuenció a los fines de identificar el agente viral.

Resultados

Se capturaron un total de 147 ejemplares durante todos los muestreos y se armaron 68 *pooles*. Las especies más abundantes fueron *Aedes aegypti* seguida por *Culex pipiens*; ambas especies están asociadas a ambientes urbanos. Los géneros *Sabethes* y *Mansonia* tuvieron baja representatividad y no se capturaron ejemplares del género *Haemagogus*. Todos los *pooles* de mosquitos fueron negativos por PCR para Alfavirus. Cuatro *pooles* de mosquitos del género *Culex spp.* resultaron positivos para Flavivirus. El resultado de la secuenciación indicó la presencia de *Culex flavivirus*, un virus específico de mosquitos cuya relevancia sanitaria aún es desconocida.

Discusión

Los estudios de arbovirus en mosquitos brindan conocimiento acerca de su importancia sanitaria en las diferentes áreas. Estos resultados permiten conocer cuáles especies están presentes en zonas periur-

banas y podrían permitir la detección de circulación del virus de FA y otros arbovirus en estas áreas de transición. Por otra parte, estos estudios permiten obtener resultados acerca de la diversidad de mosquitos en la zona, lo cual es un aspecto a considerar para las acciones de control. Proponemos continuar con los muestreos a manera de vigilancia.

Bibliografía

- Sabattini MS, Avilés G, Monath TP. Historical, epidemiological and ecological aspects of arboviruses in Argen-

tina: *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* and *Rhabdoviridae*. In: An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighboring Countries. APA Travassos da Rosa, PFC Vasconcelos, JFS Travassos da Rosa, eds. Belem, Brazil: *Instituto Evandro Chagas*, 1998:113-4.

- Bryant JE, Holmes EC, Barrett ADT. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. *PLoS Pathogens* 2007; 3:668-73.
- Goenaga S, Fabbri C, Rondan Dueñas J, Gardenal C, et al. Isolation of yellow fever virus from mosquitoes in Misiones Province, Argentina. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*; 2012,12(11):986-93.

Palabras claves: fiebre amarilla, Alfavirus, Flavivirus, Argentina.

1. Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui". Pergamino, Buenos Aires, Argentina.
2. Fundación Mundo Sano. Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

Factores de virulencia y multirresistencia en cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas de infecciones invasivas humanas

Virulence factors and multidrug resistance in *Enterococcus faecalis* strains isolated from human invasive infections

Celia Schell¹, Mónica Sparo^{1,2}, Judith Bernstein¹, Silvia Grenóvero¹, Gastón Delpech², Gisela Pourcel², María De Luca¹, Juan Basualdo¹

Enterococcus faecalis es integrante de la microbiota intestinal habitual del hombre y de animales y es indicador de contaminación de agua y del medio ambiente debido a su excreción fecal. Aislamientos de *Enterococcus* spp. a partir de alimentos de origen animal (AOA) se han comunicado recientemente en nuestro país.

E. faecalis es la especie aislada con mayor frecuencia de muestras biológicas humanas y es considerado agente etiológico emergente de infecciones invasivas, capaz de transmitir resistencia antimicrobiana (RA). La RA se disemina a través de un sistema muy eficiente de intercambio de genes, el cual se optimiza por la presencia de feromonas sexuales. La transferencia de genes que expresan alto nivel de resistencia a gentamicina (ANRG) desde cepas de *E. faecalis* aisladas de AOA hacia la microbiota humana ha sido demostrada *in-vivo*. Este último hecho conjuntamente con la expresión de factores de virulencia (FV) aumentan la importancia de los enterococos en la patogénesis de las infecciones invasivas humanas. Su resistencia a múltiples antimicrobianos (ATM) especialmente a aquellos que se utilizan para su tratamiento, genera dificultades para seleccionar su terapéutica, la cual debe ser rápida y acertada. Los estudios sobre la importancia de la expresión y función de sus FV son escasos, no se realizan de rutina y continúan siendo controversiales. Los genes que codifican para algunos FV y que se ubican en plásmidos conjugativos, poseen dos particularidades: se transfieren y diseminan rápidamente siendo éstas desde el punto de vista clínico-epidemiológico, muy relevantes.

Hemolisina-citolisina es una proteína con actividad lítica para eritrocitos humanos y de algunas especies animales. Participa en el ingreso de los enterococos a los tejidos, contribuye al daño e invasión tisular y es tóxica para las células epiteliales intestinales. Su expresión estaría asociada a un aumento de cinco veces en el riesgo de muerte en pacientes con bacteriemia. La sustancia de agregación (SA) es una proteína asociada a la pared celular, propia de ciertas cepas de enterococos, cuya expresión es inducida a través de feromonas sexuales. Permite un contacto eficiente entre células donantes y receptoras facilitando la transferencia de material genético. La expresión de SA en *E. faecalis* se ve favorecida por un plásmido conjugativo pAD1 (uno de los más estudiados) en cuyo material genético se encuentra también la información necesaria para la síntesis de hemolisina. Gelatinasa es una metalo-endopeptidasa extracelular de codifica-

ción cromosómica con acción hidrolítica sobre diversos sustratos (caseína, colágeno, hemoglobina y otros péptidos biológicamente activos) y su producción está controlada por un sistema de regulación de expresión génica denominado *quorum sensing* en el que están involucrados tres genes del locus *fsr* de *E. faecalis*.

El objetivo del presente trabajo es determinar la expresión de FV y detectar resistencia antimicrobiana en cepas de *E. faecalis* aisladas de infecciones invasivas humanas.

Materiales y métodos

El diseño fue observacional, prospectivo y de corte transversal, con muestreo no probabilístico, intencional. El área bajo estudio se situó en el Hospital Municipal Ramón Santamarina (HMRS) de la ciudad de Tandil, Buenos Aires. La recolección de muestras se realizó entre los meses de febrero y agosto del año 2012. Se tomó una muestra por paciente, de rango etario comprendido entre 20 y 95 años y de ambos géneros. Los criterios de inclusión se definieron como: cepa identificada bioquímicamente como *E. faecalis*; aislada de muestras de líquidos de punción, obtenida de sitios normalmente estériles, de pacientes internados en el HMRS, con diagnóstico presuntivo de infección invasiva. La SA fue detectada según protocolo de Franz, et al.; hemolisina-citolisina se determinó utilizando agar cerebro-corazón (BHIA) suplementado con sangre humana al 5% (con serología negativa según Banco de Sangre) y gelatinasa en BHIA con 1,5% de leche descremada, posteriormente se colocó 5 µL de un cultivo de 18 h de cada cepa y se incubó durante 48 h a 35°C. La multirresistencia antimicrobiana se definió como "presencia de resistencia a dos o más familias de ATM" y se determinó según recomendaciones del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), 2013.

El programa SPSS-IBM v.19 se utilizó para el análisis estadístico. Se consideró estadísticamente significativo hallazgo de valores de $p < 0.05$ con la prueba Chi-cuadrado y test exacto de Fisher.

Resultados

Se recuperó un total de 36 cepas de *E. faecalis*. Se detectó la expresión de β-hemólisis (hemólisis total) en 7/36 (19.4%) cepas. SA fue detectada en 26/36 cepas (72.2%). La expresión de gelatinasa fue positiva en 17/36 (47.2%) aislamientos. Se observó un 27.8% de ANRG con CIM ≥ 1024 , un 44.4% de resistencia a eritromicina al igual que a tetraciclina. Frente a fluorquinolonas como levofloxacina y ciprofloxacina se detectó 19.4% y 25.0% de resistencia respectivamente. El análisis estadístico reveló

asociación significativa entre hemolisina-citolisina y ANRG ($p = 0.032$); hemolisina-citolisina y resistencia a eritromicina ($p = 0.049$); hemolisina-citolisina y resistencia a tetraciclina ($p = 0.029$) y entre gelatinasa y resistencia a tetraciclina ($p = 0.017$).

Discusión

E. faecalis posee un comportamiento controvertido, es flora normal del intestino humano y animal y es productor emergente de infecciones invasivas humanas, tal como se observa en el presente trabajo, hecho que lo define como un patógeno oportunista en constante evolución. Por este motivo, en este tipo de infecciones, es imprescindible caracterizar la especie para detectar RA e iniciar una terapéutica antimicrobiana rápida, eficaz y bactericida, debido a la múltiple resistencia cepa dependiente que presenta este género.

Esta investigación demuestra expresión de FV y multirresistencia en cepas de *E. faecalis* aisladas de infecciones invasivas humanas. Además comprueba la relación significativa entre hemolisina-citolisina y ANRG, hemolisina-citolisina y resistencia a eritromicina y tetraciclina y entre gelatinasa y resistencia a tetraciclina. Se destaca la importancia de realizar y continuar con estudios similares en Instituciones de Salud para conocer que especies de *Enterococcus* resistentes predominan, cual es su perfil de RA y que FV representa un mayor impacto clínico para los pacientes.

Bibliografía

- Clewell DB, Weaver KE, Dunny GM, Coque TM, Francia MV, Hayes F. Extrachromosomal and mobile elements in enterococci: transmission, maintenance, and epidemiology. In *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al., eds. Boston: *Massachusetts Eye and Ear Infirmary* 2014.
- Sparo M, Urbizu L, Solana MV, Pourcel G, Delpech G, Confalonieri A, et al. High-level resistance to gentamicin: genetic transfer between *Enterococcus faecalis* isolated from food of animal origin and human microbiota. *Lett Appl Microbiol* 2012;54(2):119-25.

Palabras claves: *Enterococcus faecalis*, factores de virulencia, infecciones invasivas, multirresistencia.

1. Centro Universitario de Estudios Microbiológicos y Parasitológicos. Facultad de Ciencias Médicas-UNLP. La Plata, Buenos Aires.

2. Laboratorio de Microbiología. Escuela Superior de Ciencias de la Salud. Olavarría.

schellcelia@med.unlp.edu.ar

Detección de leptospiras patógenas mediante PCR usando los iniciadores LigBF y LigBR

Detection of pathogenic leptospire by PCR using LigBF and LigBR primers

Mara Martínez, Sylvia Grune Loffler, Luis Samartino, Graciela Romero y Bibiana Brihuega

La leptospirosis es la zoonosis de mayor distribución mundial y es enzoótica en la Argentina. La contaminación ambiental se crea por la presencia de animales domésticos portadores y animales silvestres que contribuyen en gran medida al mantenimiento de la leptospira, por lo que esta enfermedad es difícil de erradicar, pero si puede controlarse con medidas adecuadas y profilácticas continuas. Una detección precoz del agente, ayudaría al control de la enfermedad. Nuestro objetivo fue desarrollar una herramienta molecular (PCR) para la detección precoz de leptospiras patógenas a partir de muestras clínicas provenientes de diferentes animales de producción.

Materiales y métodos

Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar un fragmento de ADN de una secuencia específica de *Leptospira* spp. (GenBank: AF534640.1) que codifica para la adhesina ligB, presente en las especies patógenas. Las amplificaciones de ADN se llevaron a cabo con los iniciadores LigBF y LigBR. Para la prueba se han usado las siguientes cepas patógenas referenciales: *L. interrogans* serovar Pomona Pomona, *L. interrogans* serovar Canicola Hond Utrecht IV, *L. interrogans* serovar Copenhageni M 20 y *L. borgpetersenii* serovar Castellonis Castellon 3 y las cepas no patógenas *L. biflexa* serovar Patoc Patoc I y serovar Andamana Andamana. También se probó la técnica con 4 cepas aisladas de casos clínicos de bovino y porcino y de animales silvestres como la rata y la comadreja. Los productos de PCR se revelaron en geles de agarosa al 2%, teñidos con Sybr® Safe DNA gel stain de Invitrogen en solución amortiguadora TAE 1X. Se corrió el gel durante 30 min a 100 V y se visualizó en un transiluminador Safe Imager™. Una muestra se consideró positiva al revelarse la banda de 1kb obtenida con los iniciadores LigBF y LigBR.

Resultados y discusión

En este ensayo, los iniciadores LigBF y LigBR, lograron amplificar el fragmento de ADN blanco en el 100% de las cepas de leptospira patógenas, mos-

trando una banda de 1kb. En las cepas no patógenas utilizadas, no hubo amplificación. En el presente estudio, se trabajó con cepas referenciales y cepas aisladas de animales de producción y silvestres; posteriormente se aplicará con extracciones realizadas directamente de órganos y de líquidos corporales. Esta herramienta molecular resultó robusta, rápida, altamente específica y de bajo costo. Estos resultados revelan que la presente técnica podría ser de utilidad para la detección precoz de animales con sintomatología compatible de leptospirosis.

Bibliografía

- Brihuega B. Leptospirosis: diagnóstico y tipificación. En Temas de Zoonosis IV. *Asociación Argentina de Zoonosis* 2008;221-7.
- Gravekamp VK, Franzen M, Schoone J, Everard C, Hartskeerl A y Terpstra W. Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. *Journal of General Microbiology* 1993;139:1691-700.
- Grune S, Romero G, Auteri C, Brihuega B. Puesta a punto de una nested PCR utilizando el gen 16S rRNA para detectar leptospiras patógenas. Congreso; XIX Reunión científica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (AAVLD); 2012.
- Sankar S, Harshan HM, Somarajan SR, Srivasta SK. Evaluation of a recombinant LigB protein of *Leptospira interrogans* serovar Canicola in an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Rev Vet Sci* 2010;88(3):375-8.

Palabras claves: Diagnóstico, leptospirosis, PCR.

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, Instituto de Patobiología, Laboratorio de Leptospirosis. Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.
brihuega.bibiana@inta.gob.ar

Genes de *Leishmania infantum* asociados a visceralización en el desarrollo de vacunas recombinantes

Leishmania infantum visceralization-related genes for the development of recombinant vaccines

Adriana M. C. Canavaci¹, Leopoldo F. M. Machado¹, Angela V. Serufo¹, Daniel H. Doro², Frederico C. Nascimento¹, Ana Paula M. M. Almeida¹, Liz R. Antonelli³, Ricardo T. Gazzinelli⁴, Santuza M. R. Teixeira⁴, Vicente P. Martins⁵, Ana Paula Fernandes¹

La leishmaniasis visceral (LV) es la presentación clínica sistémica más grave entre la leishmaniasis y debido a la carencia en su control, existe una intensa investigación en búsqueda de una vacuna. Por lo tanto, es necesario caracterizar nuevos antígenos.

Materiales y métodos

En este estudio, se seleccionaron tres proteínas de *Leishmania infantum* potencialmente asociadas con la infección y visceralización, además de la proteína A2. Se hicieron predicciones *in silico* para epítopos de células T y B de humanos y ratones. La inmunogenicidad de los péptidos predichos fue evaluada midiendo las citocinas en los sobrenadantes de cultivos estimulados. Los genes de las proteínas en estudio fueron clonados y expresados en *Escherichia coli*, siendo la proteína usada en estudios de protección en ratones BALB/c.

Resultados

Los análisis mostraron que los péptidos de Livps, Fc y Cyclo son inmunogénicos, pues hubo un aumento de los niveles de IL-4 y/o IL-5 y/o IFN- γ . La vacunación de los ratones BALB/c mostró que todas las

proteínas son inmunogénicas, induciendo una respuesta predominantemente Th1 con niveles bajos de células productoras de IL-4, citocina IL-10 y un aumento de IgG2a. Las proteínas rA2 y rLivps indujeron protección, con una reducción significativa en el parasitismo del bazo.

Discusión

Los datos generados contribuyen a una mejor comprensión de los antígenos Livps, Fc y Cyclo y sus epítopos, además demuestran la protección generada por la proteína Livps en los animales infectados con *L. infantum*, manifestando su potencial actividad como un antígeno vacunal contra LV.

Apoyo financiero

INCTV, CNPq, FAPEMIG.

Palabras claves: Antígenos, *L. infantum*, vacuna.

1. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Faculdade de Farmácia, Belo Horizonte, Brasil.
dricanavaci@hotmail.com

2. Departamento de Genética. Instituto de Ciências Biológicas – UFMG, Belo Horizonte, Brasil.
danielhdoro@gmail.com

3. Laboratório de Imunopatologia. Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ. Belo Horizonte, Brasil.
lis.fiocruz@gmail.com

4. Departamento de Bioquímica e Imunologia. Instituto de Ciências Biológicas – UFMG, Belo Horizonte, Brasil.
rtgazzinelli@ufmg.br

5. Departamento de Biología Celular. Instituto de Ciências Biológicas – UnB Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, Brasil.
vicente.p.martins@gmail.com

Vigilancia epidemiológica de la rabia en animales silvestres de Tierra del Fuego

Epidemiological surveillance of rabie in wild animals of Tierra del Fuego

Vilma Disalvo¹, Laura Novaro², Fabián Zanini³

La rabia es una enfermedad zoonótica viral que afecta el sistema nervioso central de los mamíferos y el hombre. El virus de la rabia infecta a animales domésticos y salvajes, y se propaga a las personas mediante el contacto estrecho con la saliva infectada (a través de mordeduras o arañazos). La importancia de la rabia para la salud pública no radica en el número de casos, relativamente reducidos, sino en la alta letalidad, que alcanza al 100% de los enfermos.

El perro es el principal vector de la rabia urbana, y la gran mayoría de los casos humanos que se registra en las ciudades se deben a mordeduras de perros rabiosos. La rabia silvestre se mantiene en la naturaleza en forma similar a la urbana. Dentro de un determinado ecosistema, una o dos especies de mamíferos, en especial mamíferos y quirópteros, se encargan de perpetuar la rabia.

Si bien el último caso de rabia humana en Argentina data del año 2008, aún se registran canes positivos en algunas provincias del norte y murciélagos en las ciudades, todos ellos potenciales transmisores de la enfermedad. Por eso, resulta imperioso mejorar sustancialmente la vigilancia activa y las medidas de prevención.

En Tierra del Fuego nunca se han notificado casos de rabia humana o animal, por lo que se infiere que es un área libre de la enfermedad. No obstante, el Ministerio de Salud de la Nación la caracteriza como área silente, debido a que el sistema de vigilancia no es confiable y el envío de muestras para certificar la ausencia de virus rábico (perros, gatos, y fauna) ha sido nulo hasta la actualidad.

El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de determinar la circulación de virus rábico en especies silvestres susceptibles, y comenzar a aportar información de base que permita caracterizar la vulnerabilidad del área.

Materiales y métodos

El trabajo se realizó a partir del mes de febrero y hasta diciembre del año 2013.

Se evaluaron 5 especies de animales silvestres susceptibles: perro asilvestrado (*Canis familiaris*), zorro gris (*Pseudalopex griseus*), zorro colorado fueguino (*Pseudalopex culpaeus lycooides*); visón (*Mustela vison*), y murciélago (*Myotis chiloensis* e *Histiotus montanus magallanicus*). La captura de ejemplares fue autorizada por la Secretaría de Desarrollo Sustentable y Ambiente de la provincia (Resolución S.D.S y A. N° 832/2012); y la evaluación de muestras según EXP-S01:030116292011 del SENASA.

Para obtener mayor representatividad, se contactó a establecimientos rurales y cazadores de la provincia, quienes recibieron información a cerca de los alcances del trabajo, detalles inherentes a la captura y conservación de los cráneos, y forma de contacto para retiro o entrega de los mismos. Los mismos se recibieron en el Laboratorio de Diagnóstico Tierra del Fuego, donde se realizó la extracción del encéfalo empleando técnicas estandarizadas de necropsia. Las muestras fueron acondicionadas y conservadas en freezer (a -20°C) hasta el momento del envío, realizado de acuerdo a lo estipulado en el Reglamento Sanitario Internacional (OMS).

Las muestras se remitieron al Laboratorio de Referencia Nacional DILAB-SENASA identificadas individualmente con la planilla "Protocolo de Remisión de Muestras" de dicho organismo. Todas fueron evaluadas mediante las pruebas de Inmunofluorescencia Directa (IFD) y aislamiento viral mediante Ensayo Biológico en ratones (EB) lactantes y adultos.

Las capturas se realizaron en 11 establecimientos rurales, Parque Nacional Tierra del Fuego, Lago Yehuín (Corazón de la Isla), y Estación de Piscicultura Ushuaia.

Se remitieron en total 45 muestras (perro asilvestrado: 30; visón: 6; zorro gris: 8; zorro colorado fueguino: 1). No se capturaron murciélagos.

Resultados

Todas las muestras resultaron negativas a las pruebas diagnósticas.

Discusión

Los resultados obtenidos generan importante información de base para conocer el comportamiento y la dinámica del virus rábico en las especies silvestres. El trabajo debe complementarse extendiendo las actividades de vigilancia a la población canina de las áreas urbanas. Así, el conocimiento integral

y sistematizado en estas dos poblaciones animales, permitirá certificar el estatus de la enfermedad, determinar la vulnerabilidad del área, y orientar las acciones de los responsables de la salud pública respecto de la rabia en Tierra del Fuego.

Bibliografía

- World Health Organization. Laboratory techniques in rabies. 4th ed., 1996.

- Acha P, Szyfres B. Zoonosis y Enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2da Edición. OPS. Publicación Científica N° 503, 1986.
- Ministerio de Salud de la Nación. 2007. Manual de normas y procedimientos para la vigilancia, prevención y control de la rabia.
- Organización Mundial de la Salud. 2005. Reglamento Sanitario Internacional. At. 46 Transporte y manejo de sustancias biológicas, reactivos y materiales para fines diagnósticos.

Palabras claves: Rabia silvestre, especies silvestres susceptibles, vigilancia epidemiológica.

1. Laboratorio de Diagnóstico Tierra del Fuego. Río Grande, Tierra del Fuego. Argentina. El Esquilador 138.
vilmadisalvo@hotmail.com
2. DILAB-SENASA. Martínez. Buenos Aires. Argentina.
Inovaro@senasa.gov.ar
3. Actividad Privada. Río Grande. Tierra del Fuego. Argentina.
zaninif@speedy.com.ar

Vigilancia laboratorial del virus Chikungunya (CHIKV) en la Argentina

Laboratory surveillance Chikungunya (CHIKV) virus in Argentina

Victoria Luppo¹, María Alejandra Morales¹, Cintia Fabbri¹, Silvina Goenaga¹, Silvana Levis¹ y Delia Enría¹

El virus Chikungunya (CHIKV) es un *Alfavirus* (familia *Togaviridae*), transmitido por la picadura de mosquitos del género *Aedes*, particularmente *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Ciertos vertebrados, tales como primates no humanos, roedores, aves y algunos mamíferos pequeños podrían tener un rol como reservorio en los períodos interepidémicos; pero los humanos son el reservorio principal del CHIKV durante los períodos epidémicos. La etapa aguda de la infección en el hombre es sintomática en la mayoría de los casos y cursa con fiebre de inicio súbito, polialtralgias distales y ocasionalmente rash. El cuadro clínico puede confundirse con otros síndromes febriles tales como el dengue, motivo por el cual se recomienda que la vigilancia de ambas patologías se encuentre integrada. A diferencia de éste, los infectados por CHIKV pueden desarrollar posteriormente reumatismo prolongado, fatiga y depresión, con el consecuente deterioro en su calidad de vida durante meses o años.

Para el diagnóstico etiológico se utilizan tres tipos de metodologías dependiendo de la fecha de toma de la muestra: aislamiento viral, detección de genoma viral y técnicas serológicas para la detección de anticuerpos IgM / IgG. Se requieren técnicas de Neutralización para confirmar resultados positivos de IgM, ya que se ha informado reactividad cruzada con algunos otros *Alfavirus* pertenecientes al mismo serogrupo.

El virus fue detectado por primera vez en Tanzania, África, en 1952. Posteriormente ocurrieron brotes en otras regiones de África (Kenia, Comoros,) y en Asia (India, Sri Lanka, Maldivas, Singapur, Malasia, Indonesia, La Reunión), actualmente endémico en ambas regiones. En el año 2007, se registró circulación autóctona en Italia y luego en Francia. En diciembre del 2013 se confirmó la introducción en el continente americano con circulación autóctona en la isla de Saint Martin (territorio francés), extendiéndose a la región del Caribe (Guadalupe, Islas Vírgenes Británicas, Martinica, San Bartolomé y San Martin territorio holandés).

El objetivo de este trabajo es presentar las actividades de vigilancia laboratorial realizadas en el Centro Nacional de Referencia para el Diagnóstico de Dengue y otros Arbovirus INEVH "Dr. Julio I. Maiztegui", ANLIS (CNR) en preparación a la posible emergencia del CHIKV en el país.

Materiales y métodos

Se contemplaron dos aspectos diferentes: a) Capacitación: comprendió el entrenamiento de dos profesionales del INEVH en el "Primer taller internacional de CHIKV", dictado por la División de Arbovirus (DVBD) del CDC y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en 2009. Con posterioridad, la dirección del INEVH participó por el laboratorio en la elaboración del documento "Preparación y respuesta para la introducción del virus Chikungunya en las Américas", que editó en 2011 la OPS para la región. b) Transferencia y puesta a punto de las técnicas qRT-PCR y ELISA IgM de captura con el empleo de reactivos cedidos por DVBD, CDC.

Selección de los pacientes: se incluyeron en el estudio los pacientes que cumplieran con la definición de caso y los criterios laboratoriales de diagnóstico recomendados en la guía de OPS; se contempló además que la persona tuviera nexo epidemiológico con áreas con circulación viral reconocida.

El algoritmo de diagnóstico utilizado consistió en procesar las muestras de sueros y/o líquidos cefalorraquídeos de menos de 8 días de evolución por qRT-PCR y ELISA IgM; mientras que en las muestras de mayor evolución se aplicó únicamente ELISA IgM.

Resultados

El DVBD realizó un control externo de calidad en las metodologías diagnósticas implementadas mediante el envío de un panel de muestras desconocidas, obteniéndose niveles de Sensibilidad y Especificidad del 100 % para ambas técnicas.

Se estudiaron en el período 2011 hasta la actualidad un total de 34 casos sospechosos con nexo epidemiológico de viaje a India (5), China (3), Francia (4), Pakistán (2), África (4), Tailandia (1), Caribe-Centroamérica (2), Brasil (2), Japón (1), Italia (3) y otros sin datos (7). Se procesaron 10 muestras de suero con menos de 8 días de evolución por qRT-PCR, obteniéndose resultados negativos. Por otro lado, se estudiaron 34 muestras de suero y 6 LCR por ELISA IgM. Se obtuvieron 2 / 34 (6%) muestras de suero positivas correspondientes a un mismo paciente, un caso probable con antecedentes de viaje a la India,

con un cuadro clínico caracterizado por fiebre, cefalea intensa, mialgia y artralgias. No se ha detectado positividad en las muestras de LCR estudiadas.

Discusión

Argentina posee las condiciones ecológicas necesarias para sostener la transmisión de CHIV, además de una gran cantidad de personas que se desplazan desde y hacia zonas de riesgo. La reciente introducción del CHIKV y su diseminación en la región del Caribe determinan la necesidad de contar con un sistema de Salud preparado para dar respuesta ante la emergencia de este virus en Argentina; en tal sentido el CNR ha incorporado herramientas de diagnóstico y ha iniciado la vigilancia laboratorial que permitió la detección, al presente, de un caso probable importado de la India.

El CNR posee como objetivo lograr el fortalecimiento en la capacidad de respuesta laboratorial en Argentina con la incorporación de nuevas tecnologías diagnósticas y su transferencia a los laboratorios integrantes de la Red Nacional de Dengue y otros Arbovirus.

Agradecimientos

Barbara W. Johnson, Robert Lanciotti. Diagnostic & Reference Laboratory, Arboviral Diseases Branch, CDC Division of Vector-Borne Diseases, Fort Collins, Colorado, USA.

Bibliografía

- Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas, Versión en español. Manual de la OPS y CDC, Washington, 2011.
- Robert S. Lanciotti, Olga L. Kosoy, Janeen J. Laven, Amanda J. Panella, Jason O. Velez, Amy J. Lambert, and Grant L. Campbell. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emer Infect Dis* 2007;13(5): 764-7.
- Martin DA, Muth DA, Brown T, Johnson AJ, Karabatsos N, Roehrig JT. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. *J Clin Microbiol* 2000;38(5):1823-6.

Palabras claves: Alfavirus, Chikungunya, Argentina.

1. Centro Nacional de Referencia para diagnóstico de Dengue y otros Arbovirus. Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humana, "Dr. Julio I. Maiztegui", Pergamino, Buenos Aires, Argentina.
inevhmaiztegui@anlis.gov.ar

Trichinellosis: evolución post brote epidémico (2010) en Mendoza, Argentina

María Cristina Marsano¹, José Vanucci¹, Gonzalo Vera Bello¹



Resumen: En la Argentina la trichinellosis es una enfermedad endémica, la que se presenta en humanos generalmente en forma de brotes familiares aunque también se describe en forma aislada. La principal fuente de transmisión es la ingestión de carne de cerdo infectada con parásitos viables procedente de criaderos clandestinos, provocando cuadros dispersos en forma de brotes. Estas modalidades de presentación tanto en el hombre como en el cerdo, requiere de intervenciones de los sectores responsables de la salud pública, en forma temprana, tales como identificación de casos sospechosos, tratamiento oportuno, retiro de alimentos involucrados del circuito tanto comercial como doméstico y búsqueda de la procedencia de los animales faenados, con el propósito de reducir el riesgo de enfermar la población. En Mendoza durante 2010 se registró un incremento inusual de casos de esta enfermedad sorprendiendo a los efectores provinciales, no sólo sin un adecuado entrenamiento en su manejo, tanto en los aspectos clínicos, como de laboratorio, sino también y muy especialmente, sin un

acabado conocimiento de su repercusión social. La aparición de casos no sólo generó situaciones de angustia en la comunidad, sino que por la baja prevalencia de la enfermedad hasta ese año, hizo que el cuerpo médico en un principio no la considerara dentro de los diagnósticos diferenciales. Entre las medidas que se adoptaron se destacó la creación de una comisión multidisciplinaria para enfocar este evento desde sus diferentes perspectivas. Consecuentemente todas las medidas adoptadas fueron consensuadas y sociabilizadas con un resultado óptimo que pudo evidenciarse en los años posteriores.

Palabras claves: Trichinellosis, criaderos clandestinos de cerdos, consumo de jabalí y de puma.

Trichinellosis: Evolution post outbreak (2010) in Mendoza

Abstract: In Argentina, the trichinellosis is endemic, which usually occurs in humans as family outbreaks but also described in isolation. The main source of transmission is ingestion of pork infected with viable parasites from illegal farms, causing isolated cases as outbreaks. These modes of presentation both in man and in the pig, requires interventions in the sectors responsible for public health, early, such as identification of suspected cases, prompt treatment, food recall involved the commercial and domestic circuit and search for the origin of the animals slaughtered for the purpose of reducing the risk of disease in the population. In Mendoza in 2010 an unusual increase in cases of this disease surprising provincial sanitary agents was recorded, not only without adequate training in their use, both in the clinical, and laboratory, but also and especially without a thorough knowledge of its social impact. The occurrence of cases not only generated anxiety situations in the community, but so little prevalent until this year, made the medical staff at first did not consider this disease in the differential diagnosis. Among the measures adopted, a multidisciplinary committee was created to approach this event from different perspectives is highlighted. Consequently all measures were agreed and social consented with optimal results could be evident in later years.

Key words: Trichinellosis, clandestine pig farms, consumption of wild boar and puma.

Introducción

La trichinellosis es una zoonosis producida por un parásito de vida intracelular que se aloja y vive en los músculos de animales carnívoros y accidentalmente en humanos y casualmente en herbívoros¹⁻¹². El hombre se infecta, al comer carne cruda o mal cocida de cerdo y animales silvestres como jabalí, con quistes larvales de triquinas. En la Argentina esta enfermedad es endémica y hasta el año 2010 la mayo-

ría de las notificaciones procedían de las provincias de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires. En Mendoza, en la última década se notificaron muy pocos casos, con excepción del año 2004, con 24 afectados, en un brote único ocurrido en el Departamento de Junín. En el año 2010 se notificaron al Departamento de Epidemiología² un número inusual de casos que comprometió a varios departamentos de la provincia siendo en un comienzo interpretados como

1. Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud, Mendoza
epidemiologia@mendoza.gov.ar; gonsepia@hotmail.com

Recibido: 14-05-13
Aprobado: 7-05-14

brotos aislados. Con el avance de la investigación se pudo establecer que la mayoría de ellos tenían como punto de partida cerdos provenientes del pedemonte del Departamento de Godoy Cruz donde se detectaron gran cantidad de criaderos clandestinos. En consecuencia el objetivo del presente estudio fue describir la evolución de la aparición de los casos en los años posteriores, identificar factores de riesgo relacionados y evaluar el eventual impacto de las medidas adoptadas.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio descriptivo transversal que combinó el análisis de las fichas epidemiológicas³ ingresadas al Departamento de Epidemiología de la provincia de Mendoza, entre el 1 de enero del año 2010 y el 31 de diciembre de 2012, con entrevistas a pacientes hospitalizados, a los profesionales del equipo de salud intervinientes y visitas domiciliarias a expuestos y afectados. Si bien por las características de presentación de los casos fue muy dificultoso encontrar el total de expuestos cada año, se utilizó el total de habitantes de la provincia para conocer la evolución de las tasas en el trienio. Se realizaron capacitaciones en terreno en todos aquellos lugares donde se registraron casos. Se elaboraron materiales para la difusión de medidas preventivas tanto a nivel radial, televisivo y en papel prensa. Se realizó el decomiso de aquellos *pools* de cerdo con determinación positiva para triquinosis.

A. Criterios de inclusión:

Todo paciente de cualquier edad que reuniera las siguientes condiciones:

Caso sospechoso: aquella persona con fiebre, edema facial, mialgias, conjuntivitis ocular tarsal bilateral, con o sin diarrea y antecedentes de haber ingerido carne de cerdo o de animales salvajes.

Caso probable: el caso sospechoso con eosinofilia y enzimas musculares con actividad elevada. (CPK, LDH)

Caso confirmado: paciente con seroconversión en dos muestras con intervalos entre 14 y 21 días de diferencia, o caso probable, con reacción de Western blot positiva, o todo caso probable perteneciente al grupo con un caso confirmado por laboratorio.

B. Criterios de exclusión:

Todo paciente notificado con clínica incompleta, sin datos de laboratorio o con laboratorio negativo o sin nexo epidemiológico con un caso confirmado.

Los estudios de confirmación fueron realizados en el laboratorio de referencia de Mendoza perteneciente al Área de Parasitología de la Facultad

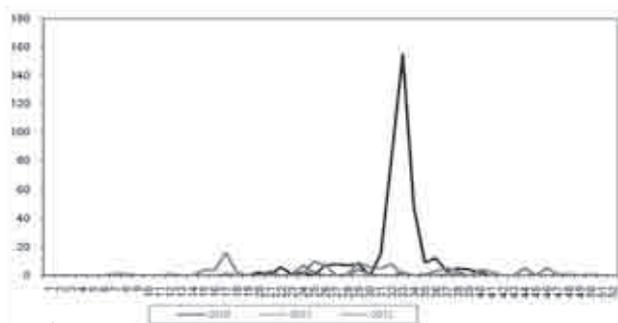
de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo (IFI) y en laboratorio Nacional de Referencia del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI), Carlos Malbrán (ELISA y Western Blot).

Resultados

Durante los tres años de estudio se notificaron 597 casos sospechosos y se analizaron el 85% de los enfermos (510 fichas) que reunían las definiciones de casos. De estos, el 50 % se pudo confirmar por: biopsia, serología y nexo epidemiológico; 47 % se definieron como probables, restando sólo el 2% como sospechosos. Los casos notificados en el año 2010 fueron 380; 99 en el 2011 y sólo 31 en el último año. Esto significó que la tasa de incidencia⁴ que en el año 2010 fue de 22 cada cien mil habitantes descendió a 1,5 en el último año analizado. El 57% de los enfermos del trienio correspondieron al sexo masculino, pero en el año 2012 las mujeres representaron el 53% de los casos. El 87% fueron mayores de 15 años con un promedio para el trienio de 31 años y un rango entre los 2 y 77 años. La mayoría de casos en el año 2010 se diagnosticaron entre los meses de julio y setiembre, constituyéndose en el brote de trichinellosis más importante en los registros de la provincia y se correlacionó con las actividades de carneos / faenas familiares. A diferencia del resto de los años donde los brotes o casos aislados se notificaron a lo largo de los meses guardando más relación con la ingesta de embutidos estacionados, salados o ahumados.

En la figura 2, pueden observarse los departamentos (partidos) involucrados en los brotes o casos aislados notificados durante el trienio lo que evidencia que la extensión del problema en el trienio afectó a casi toda la provincia.

Figura 1. Triquinosis según semanas epidemiológicas, 2010-2012



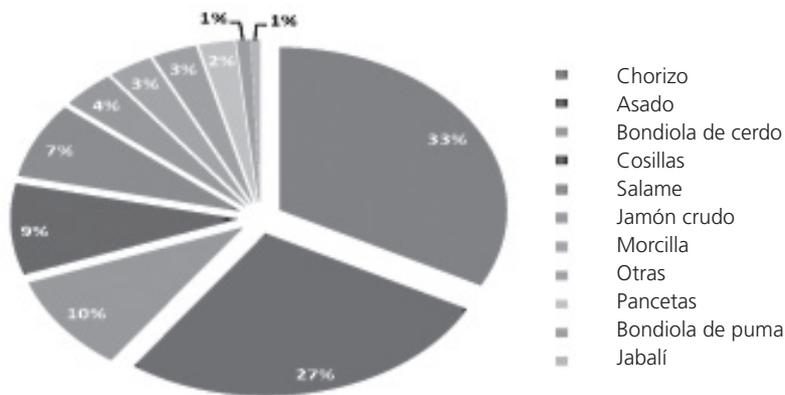
Fuente: Departamento de Epidemiología de la Provincia de Mendoza.

Con respecto al alimento involucrado, si bien en los tres años predominaron los productos frescos como el chorizo y el asado, en los casos notificados en el año 2012 se detectó una variación en el perfil de consumo de alimentos en la provincia al verificarse por primera vez el antecedente de ingestión de carnes salvajes como puma y jabalí (Figura 3).

Se realizaron capacitaciones por cada una de la regiones sanitarias en que se encuentra dividida la provincia haciendo hincapié, sobre todo, en aquel-

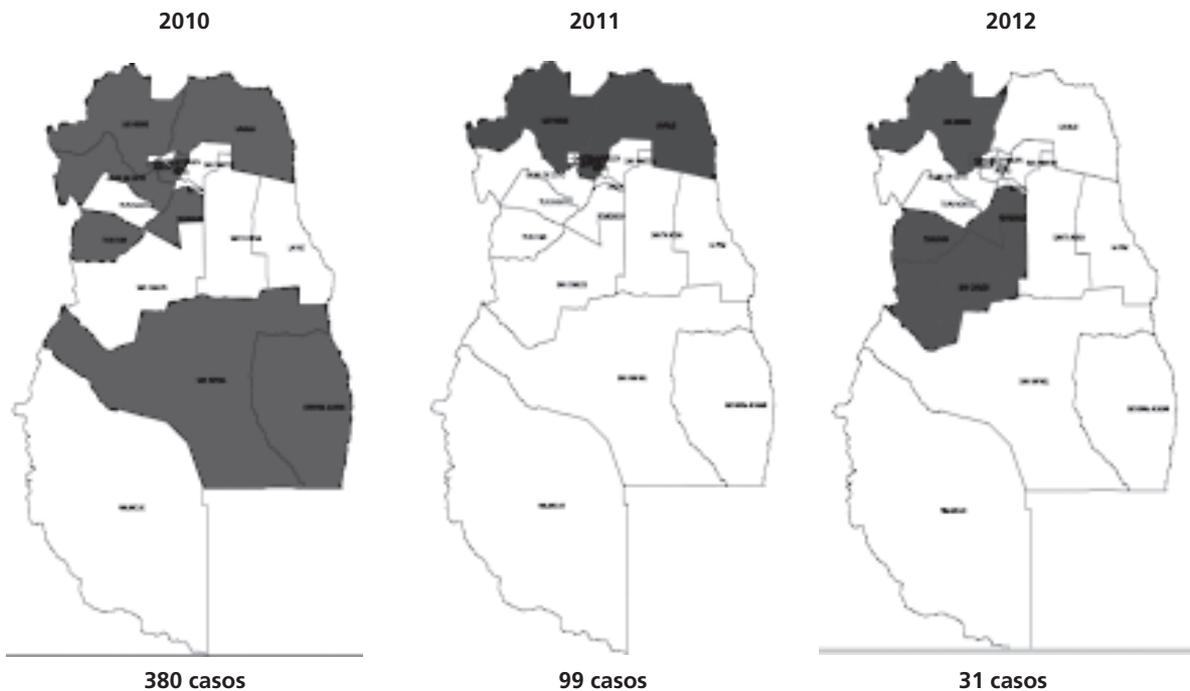
las que notificaron casos sospechosos: Metropolitana (Norte y Sur), Región del Este, Región del Valle de Uco y Región Sur. Se transmitieron numerosos "spot" publicitarios tanto en radio, televisión y papel prensa. Se decomisaron 1187 cerdos de los cuales el 28 % correspondían a lechones. Se confeccionó material informativo y sobre todo con medidas preventivas a través de folletos, autoadhesivos, reglas escolares y se entregaron al público en general y en establecimientos escolares.

Figura 3. Triquinosis, según alimento involucrado. Mendoza, Trienio 2010 - 2012



Fuente: Departamento de Epidemiología de la Provincia de Mendoza.

Figura 2. Distribución de casos según departamentos. Mendoza, Trienio 2010-2012



Fuente: Departamento de Epidemiología de la Provincia de Mendoza.

Discusión

El importante brote del año 2010 evidenció ante la diversidad de factores intervinientes: sociales, económicos, culturales la necesidad de enfocarlos desde un punto de vista multidisciplinario. Desde la Dirección de Epidemiología y Ambiente saludable dependiente de la Subsecretaría de Gestión y Control, del Ministerio de Salud se convocó a mesas de trabajo periódicas, a representantes de sectores que tenían algún tipo de responsabilidad: División Zoonosis, Departamento de Higiene de los Alimentos, Dirección de Ganadería, SENASA, Municipios, Áreas de Salud Departamentales, Hospitales y el Departamento de Epidemiología. Se contó además con la presencia de Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo, asesoramiento de la Facultad de Veterinaria "Juan A Maza" y de la Asociación de Veterinarios de Mendoza. En conjunto se acordaron la ejecución de acciones específicas de cada uno y se actuó de manera coordinada, iniciándose la investigación desde el Departamento de Epidemiología. Mediante estas reuniones periódicas, se logró acordar la elaboración y distribución masiva de mensajes de prevención y promoción a la población en general y en especial a las personas que manipulan este tipo de animales. Se realizaron capacitaciones específicas al recurso humano de todos los departamentos de la provincia y se realizaron acciones en terreno de fiscalización y decomiso coordinadas entre Ganadería, Salud y Municipios. Estas mesas de trabajo y sus acciones conjuntas se iniciaron en el año 2010 sin interrupción hasta el año 2012. Los casos que aparecieron en menor número y en otros departamentos, en los años siguientes, probablemente se debieron al ingreso ilegal desde aquellos departamentos que tuvieron casos y a la menor difusión de medidas preventivas, además de la falta de sensibilización por parte de los agentes de salud y la población. Esta patología nos aportó: tener en nuestro pensamiento epidemiológico, una enfermedad que creíamos poco usual, aprendimos además que existen dos momentos importantes en la transmisión, en especial en la faena domiciliaria o en la clandestina: uno coincidente con el consumo de los productos recientemente elaborados: chorizos, costillas, carne asada; y uno segundo, debido al consumo diferido de embutidos contaminados que han sido ahumados, salados o secados. Este último caso, es de difícil rastreo por su comercialización o distribución en diferentes lugares. Otra enseñanza que nos dejó este brote fue el perfil de consumo, que varió de productos derivados del cerdo a otros derivados de animales salvajes: jabalí y puma.

Conflicto de intereses

No existen conflictos de intereses.

Bibliografía

1. Rebicich M. ¿Cuál es la fuente de infección con larvas de trichinella en caballos? *Prensa Médica Argentina* 2002; 89(2): 22-34 Red de Helminología para América latina y El Caribe FAO-INTA.
2. Koch A, Marsano MC, Vera Bello G, Vanucci J, Pagella H y col. Triquinosis: Situación Epidemiológica Mendoza 2010. Boletín Epidemiológico Anual. MSN Edición anual 2010; p13-18.
3. Trichinosis - Fichas clínico epidemiológicas - Departamento de Epidemiología - Mendoza. INDEC. Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2010. Provincia de Mendoza.
4. Heymann DL. Triquinosis. El control de las enfermedades transmisibles. Décimo octava edición. pp. 670-3. Catalogación en la fuente Washington, DC:OPS 2005. Publicación Científica y Técnica 613.
5. Marsano MC, Vera Bello G. Análisis descriptivo de la situación de trichinellosis en los últimos 3 años. Provincia de Mendoza. III Foro provincial de investigación para la Salud-XII Jornadas de Investigación de la FC Médicas Universidad nacional de Cuyo. 2012.
6. Koch A, Marsano MC, Vera Bello G, Pagella H, Vanucci J, Salomón C. Análisis descriptivo de trichinellosis en Mendoza año 2010. I Congreso Internacional de Zoonosis y Enfermedades Emergentes. Asociación Argentina de Zoonosis. Buenos Aires, 2011. Libro de resúmenes p.220.
7. Godoy M. Posibles causas de la Epidemia de Triquinosis 2010, en Mendoza. I Congreso Internacional de Zoonosis y Enfermedades Emergentes. Asociación Argentina de Zoonosis. Buenos Aires 2011. Libro de resúmenes p.219.
8. Tejada JM, Pedrosa A, Rodríguez MB, Salomón C. Brote de triquinosis en la Provincia de Mendoza. I Congreso Internacional de Zoonosis y Enfermedades Emergentes. Asociación Argentina de Zoonosis. Buenos Aires 2011. Libro de resúmenes p.219.
9. Bolpe J, Boffi R. Human trichinellosis in Argentina. Review of the casuistry registered from 1990 to 1999. *Parasite* 2001; 8(2 Suppl): 78-80.
10. Costantino SN, Gentile T, Venturiello SM. Immunoparasitological evaluation of *Trichinella spiralis* infection during human pregnancy: a small case series. *Trans R Soc Trop Hyg* 2008; 102: 662-8.
11. Rossi L, Coca F, Cricelli C, Troncoso A. First case of trichinosis caused by consumption of undercooked horse meat. *J Infect Develop Countries* 2007; 1: 217-9.
12. CDC. Worldwide Occurrence and Impact of Human Trichinellosis, 1986-2009. Disponible en : <http://dx.doi.org/10.3201/eid1712.110896>.

Caso clínico

Aislamiento de *Leptospira interrogans*, de líquido cefalorraquídeo, en un paciente coinfectado con VIH/HVC

Humberto Metta¹, Sergio Giamperetti², Norberto Trione¹, Diego Nicita¹, Jorge Correa², Gladys Poustis², Alfredo Seijo²

Caso Clínico

Se trata de un paciente masculino de 40 años de edad, VIH positivo (diagnosticado 3 años antes de la consulta), con recuento de linfocitos CD4+: 514 cél./mm³ (25%). La clasificación de su estadio (CDC 1993) fue: A1.TARV irregular adherencia. En el momento de la consulta cursaba con una cirrosis hepática. Entre los antecedentes de importancia mencionamos: coinfección con el virus de la hepatitis viral C (HVC), enolista (30 gr. de alcohol/día), adicto a drogas inhaladas (cocaína, marihuana) y benzodiacepinas (clonazepam 10 mg/día), tabaquista (20 a 30 cigarrillos/día x 25 años).

Los antecedentes epidemiológicos de relevancia eran: nacido en Wilde, Provincia de Bs. As, con domicilio en el partido de La Matanza, en la localidad de González Catán, de la misma provincia. Vivienda precaria, la cual estuvo inundada 15 días antes del ingreso hospitalario. Refirió contacto con perros y caballos, observando roedores en peri-domicilio. No manifestó viajes en los últimos meses previos a la enfermedad actual. Ocupación: cartonero.

Cuadro Clínico: comenzó en forma aguda con hipertermia, astenia, artralgias y mialgias generalizadas, cefalea frontal leve, tos seca, diarrea aguda acuosa con 3 a 4 deposiciones/día, verdosa, sin dolor abdominal, de 5 días de evolución. No presentaba afección de la vía aérea superior. En el examen físico se palpó borde hepático a 1 cm del reborde costal, indoloro; bazo no palpable; adenopatía axilar derecha móvil, indolora, de 2 cm diámetro mayor. Se encontraba vigil, orientado globalmente y no presentaba signos meníngeos. No se observó ictericia ni exantemas. Se solicitó radiografía de tórax, sin constatare infiltrados pulmonares. Se realizaron hemocultivos seriados. El examen directo de la materia fecal no reveló leucocitos, y el estudio de la toxina para *C. difficile* fue negativa. El examen directo de esputo teñido con Ziehl-Neelsen fue negativo. Laboratorio de ingreso: Leucocitos: 11400 cel./mm³ con 86% de neutrófilos, Hemoglobina: 12.2 gr%, Hematocrito: 34 %. Recuento de plaquetas: 54000 cel./mm³. Transaminasas, glutámico-oxalacética: 320 UI y pirúvica: 113 UI. Bilirrubina total 1.6 mg%, conjugada 1.2 mg%. Creatinina: 1.5 mg%. Urea: 108 mg%. Se decidió su internación con diagnóstico de síndrome febril agudo, trombocitopénico, en paciente VIH/HVC con cirrosis,

alteración de la función hepatorenal y epidemiología de riesgo para leptospirosis. Se indicó tratamiento antibiótico con ciprofloxacina 500 mg c/12 horas por vía endovenosa.

Luego de 12 hs de internación, el paciente se encontraba vigil, desorientado parcialmente en tiempo y espacio, bradipsíquico, con excitación psicomotriz. El fondo de ojo fue normal. Se solicitó TAC s/c y RM c/ gadolinio de cerebro, que no mostraron alteraciones. Se realizó punción lumbar: líquido cefalorraquídeo (LCR) incoloro, límpido, proteínas 0.45 g/l, glucosa 49 mg%, 1 cel./mm³. VDRL en LCR no reactiva. Presión de apertura: 30 cm de H₂O. Se enviaron muestras de LCR para exámenes microbiológicos directos (que fueron negativos) y cultivo bacteriológico. Se solicitaron estudios para leptospirosis: serológicos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando cebadores designados para amplificar un fragmento de 285 pares de bases del gen ARNr 16S, y cultivos en medio tween 80-albúmina bovina, serología para dengue, IgM para virus de la hepatitis A (HVA), antígeno de superficie (HBs ag), IgM anti citomegalovirus (CMV), IgM anti antígeno nuclear temprano (EA) y anti cápside (VCA) para Epstein Barr (EB) y examen de orina y urocultivo, incluida leptospirosis.

La fiebre, mialgias, cefalea y la gastroenteritis remitieron en una semana. Los síntomas neuropsiquiátricos desaparecieron a las 72 horas. La función renal se normalizó en 72 horas. Persistió con un discreto aumento de transaminasas. El recuento de plaquetas, al cabo de diez días, se mantuvo en 90000/mm³ y los leucocitos se normalizaron. Se externó a las dos semanas.

Los resultados para leptospirosis fueron: PCR de sangre y LCR negativos, cultivos de sangre negativos a los tres meses y de LCR positivo a los 45 días. La serología fue realizada por microaglutinación (MAT) con 10 serovares: *ballum*, *canicola*, *grippityphosa*, *hardjo*, *hebdomadis*, *icterohaemorrhagiae*, *tarassovi* y *wolffi*. La primera muestra al día 7 de iniciados los síntomas fue negativa, la segunda en el día 12 mostró positividad para *ballum* en dilución 1:50; y para *canicola*, *grippityphosa*, *tarassovi* y *wolffi* en 1:100. En el día 17 los mismos serovares fueron positivos 1:200.

La cepa obtenida fue inoculada a hámbsteres, para comprobar patogenicidad (Figuras 1 y 2).

1. Unidad 17, División VIH/SIDA Hospital de Infecciosas FJ Muñiz, GCBA.
norbertotrione@gmail.com

2. Servicio de Zoonosis, Hospital de Infecciosas FJ Muñiz, GCBA.
cejjo@intramed.net

Discusión

La aparición de un síndrome febril de inicio agudo, con trombocitopenia, en ausencia de afección de la vía aérea, y antecedentes de alto riesgo como: inundaciones, recolección de desechos, hábitat precario y contacto con animales, plantearon como primer diagnóstico diferencial a la leptospirosis. Esto se vio apoyado en la leucocitosis neutrofílica y las alteraciones hepatorenales, en especial las hepáticas, que no mostraron un patrón bioquímico de necrosis hepatocelular. El diagnóstico se confirmó por conversión serológica en un primer momento y luego por el aislamiento a partir del cultivo de LCR, de una cepa de *Leptospira interrogans* (aún no tipificado el serogrupo) que fue denominada "Alser".

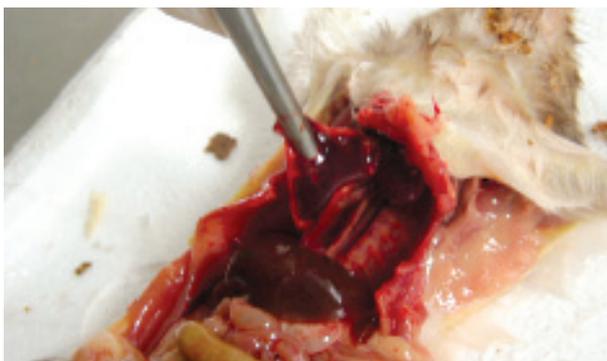
Son llamativos los siguientes hechos que se comprobaron en este paciente: 1) No es frecuente el aislamiento de leptospirosis a partir de LCR. En este caso la punción (realizada no por un cuadro meníngeo, sino por la sintomatología neuropsiquiátrica), reveló un LCR normal en ausencia de signos meníngeos, que está de acuerdo con el pasaje de leptospirosis por el sistema nervioso central, en la fase bacteriémica. Por el contrario, en la denominada fase inmunológica, no

se detectan leptospirosis, pero los pacientes presentan meningitis, debido a la formación de complejos inmunes; 2) Se puso de manifiesto la necesidad de mejorar la performance de la PCR, probablemente con la selección de otros cebadores, realizar doble *round*, ultracentrifugar previamente el LCR, etc.; y, 3) El paciente presentaba además de su infección por VIH, coinfección por HVC y cirrosis asociada no sólo a HVC sino a enolismo, además de drogodependencia a varias sustancias. Es llamativo que en ese terreno, una cepa con las características patogénicas demostradas en la inoculación a hámsteres (Figura 1 a 3) produjera un cuadro clínico anictérico, de buena evolución y encuadrado en las denominadas formas "gripales", lo cual permitiría especular sobre las relaciones leptospira/tipo de respuesta inmune, según el hospedador. Por otra parte, considerando las lesiones pulmonares en el hámster, tampoco se observaron infiltrados pulmonares en el paciente. Este comportamiento difiere del observado en otros pacientes, donde tuvimos correlación entre el cuadro clínico y la patogenicidad de la cepa. En un trabajo anterior, encontramos que las leptospirosis asociadas al enolismo, producen ictericias más intensas y prolongadas, como hubiera sido de esperar, también, en este caso.

Figura 1. Cepa de *L. interrogans* aislada de líquido cefalorraquídeo del paciente comentado. Se observa leve tinte icterico en tegumentos, sin evidencia de hemorragias en vísceras abdominales



Figura 2. Corresponde a la necropsia anterior. Se observan lesiones hemorrágicas en pulmón.



Bibliografía

1. Dolhnikoff M, Mauad T, Bethlem EP, Carvalho CR. Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in Leptospirosis. *Braz J Infect Dis* 2007; 1: 142-8
2. Luchini D, Meacci F, Oggioni MR, Morabito G, D'Amato V, Gabbrielli M, et al. Molecular detection of *Leptospira interrogans* in human tissues and environmental samples in a lethal case of Leptospirosis. *Int J Legal Med* 2008; 122: 229-33.
3. Seijo A, Fainboim H, Diaz Lestrem M. La Agresión Hepática en la Leptospirosis. *Hepatology* 1991; 1: 21-30.
4. Seijo A, Romer Y, San Juan J y col. Neumonía aguda de la comunidad y hemorragia pulmonar por leptospirosis en el Área Metropolitana Buenos Aires. *Medicina (Buenos Aires)* 2011;71:127-34.

Figura 3. Este patrón de lesión pulmonar correspondería, en el humano, a hemorragia alveolar, que cursa con ausencia de hemorragias cutáneas y viscerales



Megavisceras en la enfermedad de Chagas

Megavisceras in Chagas disease

Arturo Franco Garcés, Nora Leaño¹

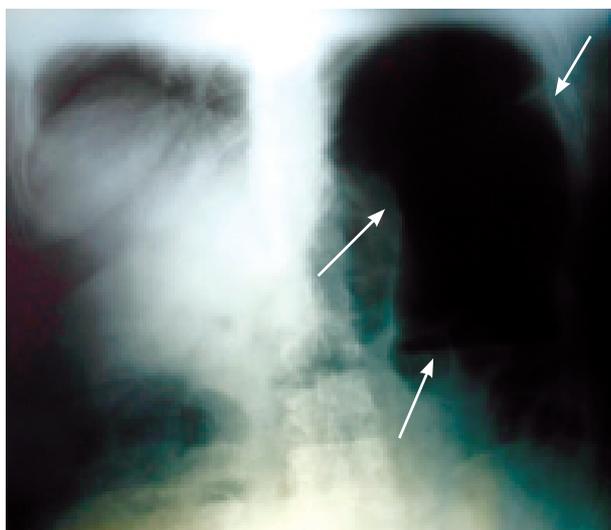


Figura 1. Rx de abdomen, que muestra una imagen hidroaérea subdiafrágica izquierda por megacolon, en paciente chagásico



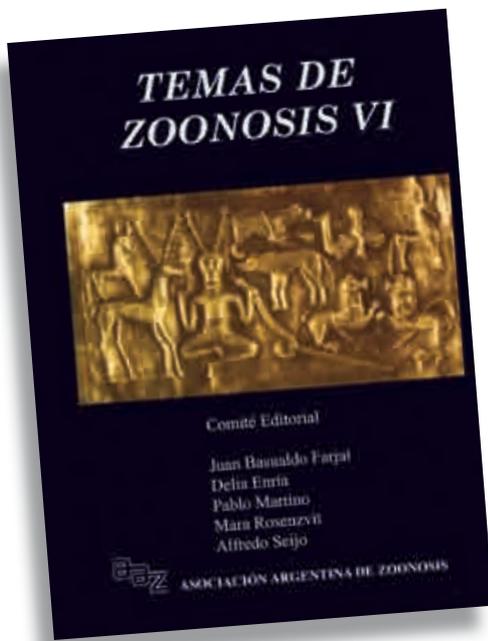
Figura 2. Tipo de construcción habitual en la región

En centros de salud de baja complejidad, en áreas endémicas de la enfermedad de Chagas, la radiografía "simple" de abdomen es una técnica valiosa para diagnosticar una de las complicaciones de la enfermedad, como es la aparición del megacolon (Figura 1). Si bien se considera que las megavisceras son más frecuentes en otras regiones de Latinoamérica, es probable que deba analizarse este concepto. En esta región, es una complicación frecuente del Chagas. La transmisión vectorial ha sido controlada en el municipio de Los Toldos, Salta, Argentina, siendo estos pacientes, la resultante de épocas de fuerte endemividad debida a la presencia de vinchucas, con condiciones propicias por el tipo de construcción tradicional en la región (Figura 2). La cercanía de la frontera con Bolivia, que aún mantiene transmisión vectorial, exige una vigilancia estricta.

Las megavisceras, se producen por disautonomía del sistema nervioso autónomo. Los tripanosomas producen alteración de las células ganglionares parasimpáticas de la submucosa. Esto lleva a trastornos de la motilidad y dilatación del esófago y el colon. En un adulto, el megacolon es diagnóstico de Chagas crónico, a diferencia del niño donde puede ser debido al síndrome de Hirschsprung. En el megacolon la constipación crónica y refractaria a la medicación con laxantes, es la causa frecuente de consulta. En nuestra experiencia la corrección quirúrgica, no mejora el cuadro a largo plazo. El megaesófago se confunde clínicamente con la acalasia y otras enfermedades esofágicas.

La localidad de Los Toldos, se encuentra ubicada en la provincia de Salta, noroeste argentino, en el departamento de Santa Victoria Oeste, coordenadas 22° 16' 51.3" sur y 64° 41' 43.78" oeste. Sus límites son al norte y este la República de Bolivia, al oeste el municipio de Santa Victoria Oeste y al sur el Parque Nacional Baritú. Se ingresa por territorio boliviano.

¹ Hospital Los Toldos. Departamento Santa Victoria Oeste, Salta, Argentina
lostoldos55@hotmail.com



Nueva edición de nuestro libro
Temas de Zoonosis VI,
conmemorativo del
25° Aniversario de la AAZ

*Precio promocional
durante
el III Congreso Panamericano*

LABORATORIOS AZUL

- Diagnóstico Veterinario
- Diagnóstico Humano
- Producción de reactivos para diagnóstico veterinario
- Animales para laboratorio
- Evaluación de productos biológicos

Facebook: LaboratorioAzul
Twitter: @LaboratorioAzul

Tel. 02281.431771 rotativas
Av. 25 de Mayo 479, B7300FXE
Azul, Buenos Aires, Argentina
www.laboratorioazul.com.ar

Grupo Laboratorios Azul
más de 30 años liderando el diagnóstico

Reglamento de publicación

Revista de la Asociación Argentina de Zoonosis

> Instrucciones para la preparación de los manuscritos

La *Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas Emergentes* (RAZ y EIE) es una publicación científica de la **Asociación Argentina de Zoonosis** (AAZ), de edición cuatrimestral, para la difusión de artículos científicos y documentos provenientes de diferentes disciplinas: medicina humana y veterinaria, bioquímica, biología, entomología sanitaria, microbiología: bacteriología, virología, parasitología, micología; epidemiología, salud pública, aspectos legales, educacionales, económicos, sociales y de investigación histórica relacionadas con las zoonosis y enfermedades emergentes.

1. Tipos de trabajos aceptados para la publicación

• Originales

Trabajos de investigación inéditos, derivados de la investigación básica, de estudios epidemiológicos y análisis de casuísticas procedentes de series clínicas, de laboratorio, farmacológicas, etc. Estos trabajos deberán ser producto de investigaciones novedosas o bien contribuyan al mejor conocimiento de un tema relevante para la salud pública. Deberán tener la estructura que se detalla más abajo en: "Presentación de los Trabajos"

• Comunicaciones breves

Presentación de resultados preliminares, que por el momento en el cual se halla el curso de la investigación, no son posibles de presentar como trabajo original, pero los autores consideran importante dar a conocer a la comunidad científica. Deberán tener la estructura que se detalla más abajo en: "Presentación de los Trabajos"

• Casos Clínicos

Descripción de uno o más casos clínicos cuya observación suponga un aporte valioso al conocimiento de la enfermedad. La extensión aconsejada del texto es de 2.000 palabras, con un máximo de 4 figuras o tablas. Deberán tener citas bibliográficas y seguir una estructura similar a la "Presentación de los Trabajos", reemplazando "Materiales y Métodos" por "Caso clínico". En general los Resultados están comprendidos en la descripción del "Caso clínico"

• Imágenes en Zoonosis y Enfermedades Emergentes

Distintos tipos de imágenes, tanto de la medicina humana como veterinaria (en el primer caso preservando la identidad del paciente), aquellas provenientes de estudios radiográficos, por ultrasonografía, tomografía computarizada, resonancia magnética o cualquier otro tipo de técnica, estudios histopatológicos, de situaciones ambientales, y todo tipo de imágenes que puedan ilustrar un aspecto novedoso, no habitual o con repercusión sanitaria.

La imagen debe tener calidad para poder ser reproducida y estar acompañada por un resumen que introduzca al tema y luego una breve actualización del mismo.

• Cartas al Editor

Comentarios de trabajos de reciente publicación, de avances en investigaciones recientes o de situaciones de emergencia. La extensión máxima será de 800 palabras.

• Artículo Especial

Es solicitado por el Comité de Redacción de la Revista. Se trata de textos de interés particular, en general revisiones o "estado del arte", realizados por expertos. Los autores que, espontáneamente deseen colaborar en esta Sección, deberán dirigirse a dicho Comité, quien evaluará la necesidad u oportunidad de su publicación. La estructura es propuesta por el autor invitado.

• Informe Técnico Institucional

Artículo proveniente de ámbitos académicos o bien de centros

municipales, provinciales o nacionales relacionados con el estudio, prevención y control de las zoonosis que informan aspectos de sus actividades.

• **Otros:** Las revisiones y actualizaciones bibliográficas, análisis de trabajos, notas de carácter institucional, crítica de libros, resúmenes de trabajos presentados a Congresos, resúmenes de tesis, información terapéutica, informes técnicos de las instituciones, información institucional de la AAZ, y los calendarios de congresos, jornadas, y todo tipo de eventos en general, son todos del interés de la Revista y no deberán superar la extensión de 2.500 palabras.

2. Presentación de los trabajos

Los trabajos aceptados serán propiedad de la RAZ y no podrán reproducirse, en parte o totalmente, sin el acuerdo del Comité Editor. Los trabajos deberán enviarse en formato digital y únicamente por vía electrónica al correo de la Secretaría de la AAZ, Lic. Karina Véliz: karina.veliz1@gmail.com, o en su defecto a los miembros del Comité Editor: ceijo@intramed.net, pemartino@fcv.unlp.edu.ar, bibianabri@hotmail.com

Para una presentación conveniente del manuscrito, se aconseja prestar atención al diagramado de los artículos correspondientes al último número impreso de la revista.

El cuerpo principal del trabajo (texto con tablas, gráficos y figuras), debe ser remitido en un único archivo rotulado con el Apellido del autor de referencia seguido de la palabra "Texto" (i.e.: González. Texto).

Los idiomas aceptados son español, el portugués y el inglés.

Los trabajos originales y casos clínicos deben ser preparados en el procesador de texto Microsoft Word, en hoja tamaño carta (21,5 X 27,9 cm) a dos espacios, con margen "normal" de 3 cm izquierdo y derecho y de 2,5 cm superior e inferior, sin justificación, con letra Arial, tamaño 14 para el título, 12 para el texto y referencias, y tamaño 10 para los nombres de los autores, instituciones y Resumen. Dicho Resumen se enviará escrito en español o portugués e inglés con sus correspondientes títulos. Cada hoja estará numerada secuencialmente en la parte superior derecha.

La primera página deberá incluir:

• **Título:** estará centrado y será breve y preciso (15 palabras o 120 caracteres en Arial 14), con una clara indicación del tema Inmediatamente después del título los nombres de los autores y las afiliaciones (Arial 10).

Se incluirá nombre(s) y apellido(s) del/los autor(es) (i.e. Valentín Aquino, Inés B Maluta, Ángela de Ávila) y con un número en superíndice que permita individualizar al pie la(s) institución(es) de pertenencia de los autores. Luego la dirección postal y electrónica del autor principal o de aquel a quien deba dirigirse la correspondencia En la segunda página se presentarán los **Resúmenes** en castellano/portugués y en inglés con sus correspondientes títulos, de hasta 250 palabras. Resumen/Resumo y Abstract en negrita y margen izquierdo. Texto a continuación.

Al pie de cada Resumen se pondrán 3 a 5 **palabras claves** en el idioma correspondiente.

En la tercera página, se comenzará el texto propiamente dicho, el cual constará de las siguientes secciones, cuyos títulos estarán sobre margen izquierda y en negrita. Con cada sección se inicia una nueva página.

• **Introducción:** donde se establecerá el problema y el propósito específico del estudio. Podrá incluir una breve revisión de la bibliografía, la que se tratará con mayor amplitud en la "Discusión".

• **Materiales y Métodos:** donde se establecerán en forma precisa los detalles de técnica y metodología utilizados, definición de áreas y periodo de estudio, tipo de diseño (prospectivos o retrospectivo; descriptivo o comparativo; observacional o experimental), la identificación de la población o muestra, el criterio de inclusión y exclusión, los métodos de muestreo, las consideraciones éticas si correspondiera, el tamaño de la muestra, la definición operativa de variables de estudio y el plan de análisis estadístico de los datos. El análisis estadístico describirá las pruebas estadísticas empleadas, con suficiente detalle como para poder ser verificado por otros investigadores. Proporcionar el nombre del programa estadístico empleado para el procesamiento de datos.

• **Resultados:** expresados en forma detallada. Deben ser una consecuencia de lo planteado en Materiales y Métodos y responder a los objetivos. Su interpretación debe ser correcta. Deben informarse como medidas sumarias (porcentajes, medias, rangos, incidencia o prevalencia, riesgos relativos, etc.), además de ser expresados en tablas o gráficos. Cuando correspondiera, expresar intervalos de confianza o significación estadística (valor de p). Deberá evitarse la repetición en el texto de lo expresado en las tablas y gráficos.

• **Discusión:** aquí se resaltarán los aspectos nuevos e importantes del estudio, además de expresar especulaciones y formular nuevas hipótesis surgidas de la investigación. No repetir con pormenores los datos presentados en la sección de resultados. Podrá incluir recomendaciones.

• **Conclusiones:** son opcionales y no debe haber contradicciones, deben estar avaladas por los resultados, no deben ser repeticiones de los resultados y siempre guardarán relación con el objetivo. En el manuscrito no se mencionarán los nombres completos o iniciales de los autores ni la institución donde fue realizado el estudio. Asimismo, debe evitarse cualquier identificación de las personas (i.e., nombres, iniciales), tanto en las ilustraciones como en el escrito.

• **Bibliografía:** Se numerará con superíndice en forma consecutiva a la inserción en el texto y en ese orden aparecerá en el listado. Se incluirán todos los autores cuando sean seis o menos; si fueran más, se escriben los tres primeros y luego "y col, e col o et al" según el idioma empleado en la cita bibliográfica.

Las Referencias se describirán según las "Normas de Vancouver" y de acuerdo a los siguientes ejemplos:

• **Publicaciones periódicas:**

Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart trasplantation is associated with an increased risk form pancreatobiliar y disease. *Ann Intern Med* 2011; 124 (11): 980-3.

- **Libros:**

Rohen JW, Yokochi C, Lütjen-Drecoll E. Atlas de anatomía humana: estudio fotográfico del cuerpo humano. 6ªed. Buenos Aires: Elsevier Science, 2007, pp. 233-45. No es necesario aclarar las páginas si el libro fue utilizado en varias citas, excepto cuando se utilizan manuales o informes técnicos. Otra variante:

Tsai TF, Vaughn DW, Solomon T. Flavivirus (fiebre amarilla, dengue, fiebre del dengue hemorrágico, encefalitis japonesa, encefalitis del Nilo Occidental, encefalitis de San Luis, encefalitis transmitidas por garrapatas). En: Mandell GI, Bennett JE, Dolin R, eds. *Enfermedades Infecciosas*. 6ª edición. Madrid: Elsevier. 2006, V2, pp. 1926-50.

- **Actas de congresos:**

Vega KJ. Formación radiológica y mercado de trabajo. XXIII Congreso de Radiología de la Asociación Latinoamericana de Enfermería Docente. Buenos Aires, Argentina. Marzo 28-30, 2010; pp. 122-9.

- **Página web, sitio web, portal:**

Briggs J. Institute JBI España [Internet]. Madrid: Centre colaborador espanyol del JBI; 2008 [consulta el 22 de julio de 2008]. Disponible en: <http://es.jbiconnect.org/index.php>

• Si correspondiera, se incluirá una sección de "Agradecimientos" al final de la bibliografía, en donde consten las fuentes de apoyo recibidas en forma de subvenciones, reconocimientos de apoyo técnico y contribuciones.

• Es requisito que se declaren si existen o no "Conflictos de interés" al final del artículo y a continuación de la Bibliografía. Si los hubiera, deberán ser aclarados.

• **Tablas y figuras** (estas incluyen los gráficos e imágenes): La presentación de estos elementos deberá ser la confirmación de lo redactado en el texto.

Las **tablas y figuras** se presentarán en hojas separadas dentro del mismo archivo principal del texto y al final de éste, deberán estar referenciadas en el texto y serán numeradas correlativamente con números arábigos, cada una con su título y con el epígrafe correspondiente en Arial 10. Los números, símbolos y siglas deberán ser claros y concisos. Las tablas serán confeccionadas en Arial 10, sin líneas verticales ni bordes. El diseño corresponde a "tablas sin formato", con borde superior, inferior y horizontal interno de la versión Office 2007 o similar, autoajustadas al contenido con las características que se muestran en el ejemplo.

Tabla 1 Sintomatología de los dos grupos de enfermos luego de utilizar

Síntomas y signos	Grupo 1		Grupo 2	
	n	%	n	%
Fiebre	60	100	30	50
Cefalea	30	50	50	25
Mialgias	15	25	7	11.6

Para separar los decimales se utilizará punto (11.6) y para separar números enteros igual o mayor a diez mil un espacio cada mil (10 000, 100 000).

Las figuras que son imágenes (i.e., fotografías, radiografías, etc.), tanto en blanco y negro como en color, no tendrán cargo alguno para el autor, aunque se reservará el derecho de publicación al Comité Editorial; las mismas deberán ser enviadas en uno o varios archivos especiales adjuntos, los cuáles se rotularán con el apellido del autor seguido del "Imágenes" y si correspondiere, la numeración sucesiva (i.e.: *Smith. Figura 1*).

Cada imagen deberá presentarse, también, en hojas separadas, en la extensión jpeg y preferentemente a 300 dpi; deben ser nítidas y cada una llevará título y epígrafe correspondiente. Las flechas, símbolos o letras incluidas, deben presentar buen contraste en el fondo. Con las fotografías obtenidas de pacientes se deberán tomar las precauciones necesarias a fin de que éstos no puedan ser identificados. Las observaciones microscópicas llevarán el número de la ampliación efectuada y tinción empleada. Si se utilizara el material de otros autores, publicados o no, deberá adjuntarse el permiso de reproducción correspondiente.

El manuscrito deberá estar acompañado de una carta de presentación dirigida por vía electrónica al correo de la Secretaria de la AAZ, y que exprese: *El contenido del manuscrito "..... presentado a la revista Argentina de Zoonosis no ha sido publicado por ningún tipo de medio gráfico o electrónico, y los autores declaran la aceptación de los contenidos del mismo".*

El Comité Editorial se reserva el derecho de rechazar trabajos que no se ajusten estrictamente al Reglamento señalado, que no posean el nivel de calidad mínimo exigido acorde con la jerarquía de la revista, que hayan sido presentados en otras publicaciones nacionales e internacionales, o bien que contengan pasajes confusos o con groseros errores gramaticales o de redacción. A todos los efectos, los trabajos presentados serán sometidos a la evaluación de árbitros externos.

Confiar en el futuro

Trabajamos con las comunidades afectadas para reducir el impacto de las enfermedades desatendidas como el Chagas, el dengue y la leishmaniasis.



Mundo Sano

(011) 4872-1333
mundosano@mundosano.org
www.mundosano.org

www.
senasa
.gov.ar

**EL SENASA CONTROLA,
INVESTIGA Y CERTIFICA PARA
PREVENIR LAS ENFERMEDADES
DE LOS ANIMALES QUE SE
TRANSMITEN A LOS HUMANOS.**

