

REVISTA PARASITOLOGÍA LATINOAMERICANA

Vol. 67/N° 1 – JUNIO 2018

Versión: On-Line: 0719-6326

Artículos originales

- Anticuerpos anti-B13 en infectados crónicos por *Trypanosoma cruzi* y su asociación con la cardiopatía chagásica
- *Levantamento sobre o conhecimento da toxoplasmose pelas gestantes do município de Breves, Ilha do Marajó, Brasil*
- Primer Registro de *Phyllobothrium delphini* (Cestoda: Phyllobothridae) en el delfín chileno *Cephalorhynchus eutropia* (Cetacea: Delphinidae) en aguas de la costa centro-sur de Chile
- *Echinococcosis cerebral multiple intraventricular por Echinococcus ortleppi: abordaje integral de un caso clínico*
- Cultivo de *Acanthamoeba* spp. en presencia *Escherichia coli*, para el diagnóstico de cuadros de queratitis
- Instrucciones a los autores a partir del volumen 67 (1) 2018



Órgano Oficial de la SOCHIPA



Órgano Oficial de la Federación
Latinoamericana de Parasitólogos



Órgano Oficial de la Red de Zoonosis

REVISTA
**PARASITOLOGÍA
LATINOAMERICANA**

REVISTA
**PARASITOLOGÍA
LATINOAMERICANA**

Volumen 67 N° 1-2018

On-Line: 0719-6326



Órgano Oficial de la SOCHIPA



Órgano Oficial de la Red de Zoonosis

Editor

Mauricio Canals (Chile)

Editores Asociados

Werner Apt (Chile)
Pedro E. Cattán (Chile)
Fernando Fredes (Chile)
Catalina Muñoz (Chile)
Marisa Torres (Chile)
Inés Zulantay (Chile)
Renzo Tassara (Chile)
Jorge Gonzalez (Chile)

Editores Adjuntos

Guillermo Denegri (Argentina)	Arturo Ferreira (Chile)
Benjamín Cimerman (Brasil)	Ana Fliser (México)
David Botero (Colombia)	Luis Gil (Chile)
Rodrigo Zeledón (Costa Rica)	David Gorla (Argentina)
Jorge Sapunar (Chile)	Alejandro Llanos-Cueto (Perú)
Ramón Lazo (Ecuador)	Santiago Mas-Coma (España)
Raúl Romero (México)	Patricia Muñoz (Chile)
César Náquira (Perú)	Isabel Noemí (Chile)
Oswaldo Ceruzzi (Uruguay)	Chris Schofield (Inglaterra)
George Hillyer (Puerto Rico)	Aldo Solari (Chile)
Alejandro Schijman (Argentina)	Patricio Torres (Chile)
Anne Petavy (Francia)	Daniel González (Chile)
Michel Tivarenck (Francia)	Thomas Weitzel (Alemania)
Naftale Kats (Brasil)	Michael Miles (Alemania)
Ives Carlier (Bélgica)	Claudio Lazzari (Argentina)
Paulo Coelho (Brasil)	Felipe Guhl (Colombia)
Telmo Fernández (Ecuador)	Liliana Semenas (Argentina)
Hector Alcaíno (Chile)	Mario George-Nascimento (Chile)

Secretaria

Ana Zulantay

Editorial

Después de FLAP XXIV, Santiago de Chile 2017

Entre el 10 y el 14 de Diciembre de 2017, se realizó en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, el XXIV Congreso de la Federación Latinoamericana de Parasitólogos (FLAP). En 4 días de Congreso y un día de cursos pre-congresos nos reunimos estudiando y compartiendo ideas abarcando todos los temas relevantes hoy en parasitología. Contamos con la asistencia de destacados parasitólogos de todo el mundo, con una fuerte participación de especialistas latinoamericanos, con más de 40 simposios y gran cantidad de trabajos libres presentados en paneles. Contemplamos no sólo la dimensión clínica sino también aspectos de laboratorio, Zoonosis, Ecología de parásitos, animales ponzoñosos, Epidemiología etc., tratando de abarcar el parasitismo en todas sus dimensiones. Dictamos 4 cursos pre-congreso dictados por reconocidos especialistas en temas de alta relevancia: Parasitosis del viajero y migrantes, Hidatidosis, Entomología Médica y Enfermedad de Chagas.

A través de este medio agradecemos a todos los participantes al congreso que acudieron en gran número y con gran entusiasmo, especialmente a nuestros expositores invitados y a los estudiantes e investigadores jóvenes que son el futuro de la parasitología.

Los invitamos a seguir con el mismo entusiasmo y a participar de la reunión **FLAP XXV, Panamá 2019**.

Mauricio Canals Lambarri (M.D., PhD.)
Editor
Parasitología Latinoamericana

Anticuerpos anti-B13 en infectados crónicos por *Trypanosoma cruzi* y su asociación con la cardiopatía chagásica

VERÓNICA OLIVERA^{1*}, MARÍA L. BIZAI¹, EVELYN ARIAS¹, SANTIAGO SUASNABAR¹,
IVAN MARCIPAR², DIANA FABBRO¹

¹ Centro de Investigaciones sobre Endemias Nacionales (CIEN). Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe. Argentina.

² Laboratorio de Tecnología Inmunológica. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe. Argentina.

* Autor de correspondencia: Centro de Investigación sobre Endemias Nacionales. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria, CC242, 3000 Santa Fe, Argentina. Tel: 0342-4575206 Interno 152. Correo electrónico: veronicaolivera@yahoo.com.ar
Conflicto de intereses: Ninguno
Financiación: El presente trabajo ha sido financiado por UNL para proyectos CAI+D

Recibido: 25/09/2017 Aceptado: 09/04/2018

Summary

La proteína B13 inmunodominante de *Trypanosoma cruzi*, presenta una secuencia homóloga (AAAGDK) a la cadena pesada de miosina cardíaca humana (AAALDK) asociada a mimetismo molecular, posible mecanismo patogénico en la enfermedad de Chagas. El objetivo de este trabajo fue analizar, en adultos infectados crónicos con *Trypanosoma cruzi*, la asociación entre los niveles de anticuerpos anti-B13 y desarrollo de cardiopatía chagásica.

Se realizó un estudio transversal en 89 pacientes con infección crónica por *Trypanosoma cruzi* distribuidos en: 34 infectados sin patología demostrable (grupo A); 42 infectados con cardiopatía chagásica crónica de diferente severidad (grupo B) y; 13 infectados con miocardiopatía chagásica y factores de riesgo cardiovasculares asociados (grupo C). Como grupo control se estudiaron 46 personas no infectadas con *Trypanosoma cruzi*: 16 con cardiopatía (grupo D) y 30 sanas (grupo E). Además en 13 pacientes del grupo B, edad promedio de $43,3 \pm 13,2$ años, se realizó un estudio de cohorte retrospectivo con seguimiento de $12,6 \pm 6,5$ años, a fin de correlacionar el nivel de respuesta anti-B13 y la progresión de la cardiopatía. Estos pacientes no presentaron cambios en los niveles de anticuerpos anti-B13 a través del tiempo, independientemente de la evolución clínica.

No se observaron diferencias significativas entre los grupos A, B y C tanto en la presencia de anticuerpos anti-B13 (A=91,1%, B=80,8% y C=84,6%), como en el nivel de respuesta de los mismos. Sin embargo, en los pacientes del grupo B con alto compromiso cardíaco los niveles de anticuerpos anti-B13 fueron más elevados.

Los pacientes del grupo control con cardiopatía, 50% fueron positivos para anticuerpos anti-B13 aunque con muy escasa reactividad, mientras las personas sanas no presentaron respuesta a esta proteína.

Si bien no se encontró asociación entre el nivel de anticuerpos anti-B13 y cardiopatía chagásica, se observaron valores más altos en los infectados con compromiso cardíaco severo, sin variación en el tiempo.

Estos resultados sugieren que los anticuerpos anti-B13 podrían ser utilizados como marcadores de progresión clínica en los pacientes con cardiopatía chagásica crónica.

Introducción

La enfermedad de Chagas es una afección parasitaria crónica causada por el *Trypanosoma cruzi*. Es endémica en el continente americano, pero se ha transformado en un problema global debido fundamentalmente a las migraciones. Se estima que se encuentran infectados aproximadamente 6 a 7 millones de personas solo en el continente americano (OMS 2017), y se plantea como una importante carga de morbilidad, mortalidad y discapacidad en muchas regiones.

Aproximadamente un tercio de los infectados desarrollan las lesiones del período crónico: Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC) y/o alteraciones del aparato digestivo (megavisceras), con diferentes grados de severidad (Storino 1994).

En cuanto a los mecanismos fisiopatogénicos, se han planteado diferentes hipótesis, basadas principalmente en dos grandes ramas: mecanismos autoinmunes (mimetismo molecular, presentación de epitopes crípticos, activación de células no específicas, etc.) y mecanismos no autoinmunes (acción directa del parásito, alteraciones del Sistema Nervioso Autónomo, lesión microvascular, persistencia parasitaria) (Leon & Engman 2003, Cunha-Neto et al. 2006, Marin-Neto et al. 2007, Kierszenbaum 2007, Pereyra 2015).

Hay evidencias que involucran a los anticuerpos (Ac) de reactividad cruzada y a infiltrados de células T en el daño tisular cardíaco. Aunque también en estos tejidos se han encontrado antígenos y ADN de *T. cruzi* mediante técnicas inmuno-histoquímicas y de amplificación por PCR (Higuchi et al. 1993, Jones et al.

1993). La presencia del parásito también se ha evidenciado en infectados sin cardiopatía (Añez et al. 1999).

Numerosos trabajos han encontrado autoanticuerpos de reacción cruzada con antígenos de *T. cruzi* (Proteínas ribosómicas P0, P1, P2, Cruzipaina, B13, etc.) (Girones et al. 2005, Cunha-Neto et al. 2006). No está claro si estos surgen como respuesta a moléculas parasitarias con las que existe mimetismo molecular, o se generan como consecuencia de la exposición de antígenos propios por el daño al tejido infringido por el parásito.

La cadena pesada de la miosina cardíaca humana es el principal componente proteico del miocardio, representando el 50% del peso de todas las proteínas cardíacas. La proteína B13 inmunodominante de *T. cruzi*, presenta una secuencia homóloga (AAAGDK) a la cadena pesada de miosina cardíaca humana (AAALDK) (Cunha-Neto et al. 1995).

Cuando se produce daño miocárdico de cualquier tipo se expone la miosina intracelular, la cual es antigénicamente activa. Ac anti-miosina se han encontrado en varias situaciones clínicas en las que existe una injuria miocárdica (Nussinovitch & Shoenfeld 2013).

El reconocimiento de miosina por células T CD4+ y la presencia de Ac anti-cadena pesada de miosina cardíaca se asocian con la CCC (Rizzo et al. 1989, Tibbetts et al. 1994, Cunha-Neto et al. 1995, Cunha-Neto et al. 1996, Iwai et al. 2005, Abel et al. 2005, Girones et al. 2007, Duranti et al. 2012). Los Ac anti-miosina tienen reacción cruzada con una secuencia de la proteína B13, por lo que se podría especular que el

reconocimiento de antígenos parasitarios *in situ* podría ser el último efector del daño al tejido cardíaco.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el presente trabajo evalúa la respuesta humoral contra la proteína B13 de *T. cruzi* en pacientes adultos chagásicos crónicos, sin y con patología demostrada, con el objetivo de analizar si el nivel de estos Ac anti-B13 se relaciona con CCC.

Material y métodos

En un estudio transversal se evaluaron las muestras de suero de 89 adultos infectados crónicos por *T. cruzi*. Estos pacientes fueron seguidos clínica y serológicamente en el Centro de Investigación sobre Endemias Nacionales de la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

El control clínico fue realizado por un médico especialista en cardiología, mediante examen físico complementado con Electrocardiograma (ECG) de 12 derivaciones y, en los casos requeridos, ergometría, holter y ecocardiografía. Las Radiografías (Rx) de tórax se realizaron en los hospitales públicos más próximos.

La población en estudio se clasificó en: grupo A) 34 infectados sin patología demostrable; grupo B) 42 infectados con CCC de diferente severidad; grupo C) 13 infectados con alteraciones compatibles con CCC y otros factores de riesgo cardiovasculares (FRC) asociados (Diabetes, Obesidad, Hipertensión).

Como controles no infectados por *T. cruzi*: grupo D) 16 personas con cardiopatías (post-infarto agudo de miocardio, miocardiopatía dilatada, cardiopatía isquémica y fibrilación auricular) y grupo E) 30 sujetos sanos.

Se realizó un estudio de cohorte retrospectivo en 13 de los 42 infectados con CCC, durante un tiempo promedio de 11,7±5,9 años y una mediana de 9 años. Se analizaron 32 sueros en buen estado de conservación, almacenados en la seroteca del CIEN: 13 muestras correspondientes al primer control del paciente, al inicio del seguimiento; 6 muestras intermedias y 13 sueros correspondiente al último control de los infectados.

Caracterización clínica de los infectados por *T. cruzi*: Se utilizó la clasificación propuesta por Kuschnir (Kuschnir et al. 1985).

- Grupo 0 (G0): Pacientes asintomáticos (sin signos de insuficiencia cardíaca), ECG normal y Rx de tórax con área cardíaca normal (RTC < 0,50).

- Grupo 1 (G1): Pacientes asintomáticos (sin signos de insuficiencia cardíaca), con alteraciones en el ECG sugerentes de CCC y Rx de tórax con área cardíaca normal.

- Grupo 2 (G2): Pacientes con ECG alterado atribuible a CCC. Rx de tórax con área cardíaca aumentada, clínica con capacidad funcional conservada para esfuerzos leves y moderados.

- Grupo 3 (G3): Pacientes sintomáticos desde el punto de vista clínico (signos de insuficiencia cardíaca en reposo o en esfuerzos leves), ECG alterado y Rx de tórax con cardiomegalia importante (grado III o IV), con redistribución de flujo pulmonar.

A fin de cuantificar el daño cardíaco según esta clasificación (Kuschnir), se definió:

G1: infectados con cardiopatía chagásica leve; G2: infectados con cardiopatía chagásica moderada y G3: infectados con cardiopatía chagásica severa.

Se analizaron los FRC en cada uno de los grupos a fin de evaluar si eran comparables: tabaquismo, hipertensión, dislipemia, diabetes y obesidad (Mele et al. 2012).

Serología Convencional: se realizaron 3 tests serológicos convencionales (SC): Hemoaglutinación indirecta (HAI - Laboratorio Polychaco, Buenos Aires, Argentina), Enzimoimmunoensayo (ELISA - Wiener Rosario- Santa Fe, Argentina) e Inmunofluorescencia indirecta (IFI - CIEN, Centro que forma parte de un Programa de Control de Calidad. Los controles externos los realiza el Instituto Nacional de Parasitología, Buenos Aires). Se incluyeron quienes tenían los 3 tests reactivos.

Conservación de las muestras: Las muestras de sueros evaluadas en el estudio se encontraban almacenadas a -20°C y/o con igual volumen de glicerina bufferada a 4°C. Se consideraron aptas para el estudio las que presentaban una respuesta serológica similar al momento de recolección de las mismas.

Expresión y purificación de la proteína recombinante B13 de *T. cruzi*:

Se obtuvo la proteína recombinante según se describió previamente en Camussonne et al. (2009). Brevemente, se cultivaron células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) portadoras de la construcción plasmídica PET-32a/B13 durante 3 horas con agitación en medio LB suplementado con 0,1 mg /ml de ampicilina a 37°C. Luego se indujo la expresión proteica en 1 mM de isopropil-b-D-tiogalactopirano durante 16 horas a 16°C. Luego, las células obtenidas se suspendieron en Buffer fosfato 50mM pH 7,2 con el agregado de 20 mM de imidazol y se lisaron mediante sonicación.

La fracción soluble se separó mediante centrifugación a 10.000 g durante 20 min a 4 – 8°C y se purificó con una columna de Ni-NTA (GE) eluyendo la proteína con Buffer fosfato 50mM pH 7,2 con el agregado de 250 mM de imidazol. La calidad de la purificación se evaluó por la técnica de PAGE y la concentración proteica se midió por la técnica de Bradford (Wittig et al. 2006, Bradford 1976).

Determinación de anticuerpos específicos anti-B13:

Los sueros se procesaron mediante una técnica de ELISA utilizando placas sensibilizadas con proteína B13 de *T. cruzi*. Se recubrieron placas de microtitulación con 0,5 mg del antígeno específico en tampón de carbonato-bicarbonato 0,05 M, a pH 9,6, y se incubaron over night a 4-8°C. Se bloquearon las placas con leche descremada al 5% y se incubaron con

una dilución 1:100 de suero humano. Para evidenciar la reacción se utilizó una anti-IgG humana conjugada con peroxidasa. Las placas se leyeron a 450 nm en un lector de ELISA (BioRad). Todas las muestras de suero se evaluaron por duplicado y se tomó como resultado la media del valor de densidad óptica de estas determinaciones simultáneas. En cada placa se analizaron simultáneamente 6 controles negativos (individuos aparentemente sanos seronegativos para *T. cruzi*). Se calcularon valores de corte estándares con ELISA negativo tomando la media de la densidad óptica de las muestras de suero negativas más 2 desviaciones estándares. Valor del cut-off: 0,365.

Normas Éticas: se siguieron los estándares éticos establecidos por el Ministerio de Salud de la Nación, la Universidad Nacional de Litoral y las Guías internacionales de regulación para la investigación en humanos. Los pacientes fueron informados de los objetivos del estudio y firmaron su consentimiento informado para participar del mismo. Dicho formulario fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral,

Análisis estadístico: se aplicaron las pruebas T de student, Chi-cuadrado de Pearson, Test de Fisher, Prueba de Kruskal-Wallis, ANOVA, según correspondiera. Para todas las pruebas se fijó un nivel de significación menor a 0,05.

Resultados

Los infectados crónicos por *T. cruzi* del grupo A sin patología demostrada, y B con CCC fueron comparables en la distribución de edad, sexo y FRC. Tabla 1.

Grupo	Sexo F/M	Edad ‡	FRC *
A	24/10	48,7 ± 14,7	14
B	21/21	46,8 ± 14,2	11

Tabla 1. Población en estudio: sexo, edad y factores de riesgo cardiovascular de infectados con *T. cruzi* sin patología demostrada (grupo A) y con Cardiopatía Chagásica Crónica (grupo B).

Sexo: Chi-cuadrado de Pearson, p=0,069.

‡ Edad al momento de la muestra. Test de student, p=0,5724.

* FRC Factor de Riesgo Cardiovascular: tabaquismo, hipertensión, dislipemia, diabetes y obesidad. Chi-cuadrado de Pearson, p=0,167

La reactividad anti-B13 en los diferentes grupos fue la siguiente: grupo A, infectados sin patología demostrada, 31/34 (91,1%); grupo B, infectados con CCC 34/42 (80,9%) y grupo C, con CCC y FRC asociados 11/13 (84,6%). Al comparar el porcentaje de positividad anti-B13 entre los grupos A, B y C no se encontraron diferencias significativas (Test de Fisher,

p>0,05).

Del mismo modo, el nivel de respuesta de los Ac anti-B13 entre los grupos de infectados no presentó diferencias significativas (grupo A 1,19±0,64 D.O, grupo B 1,06±0,73 D.O y grupo C 0,96±0,64 D.O) (ANOVA, p>0,05). (Fig.1).

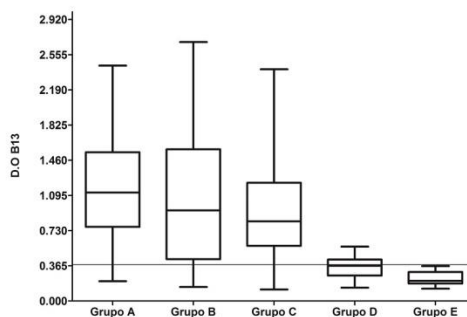


Figura 1. Nivel de anticuerpos anti-B13 en los diferentes grupos estudiados. Valor de cut-off=0,365 D.O. grupo A) Infectados sin patología demostrable; grupo B) Infectados con Cardiopatía Chagásica Crónica; grupo C) Infectados con Cardiopatía Chagásica y factores de riesgo asociados; grupo D) Personas no infectadas con cardiopatía y grupo E) Sujetos sanos no infectados con *T. cruzi*.

En los pacientes cardiopatas no infectados con *T. cruzi* (grupo D), 8/16 (50%) presentaron reactividad anti-B13, pero a diferencia de los infectados el nivel de respuesta fue muy bajo cercano al valor de corte (0,345±0,12 D.O). Mientras en las personas sanas, no infectadas y sin cardiopatía, no hubo respuesta anti-B13. Figura 1. Al analizar el nivel de reactividad de los Ac anti-B13 en el grupo B (n=42), infectados por *T. cruzi* con CCC, estratificados según la clasificación de Kuschnir (G1 n=27, G2 n=11, y G3 n=4) mediante un modelo de asociación no paramétrico, se encontró una tendencia de mayor reactividad anti-B13 a medida que aumentaba la severidad de la cardiopatía. (Prueba de Kruskal-Wallis, p=0,07) (Fig. 2).

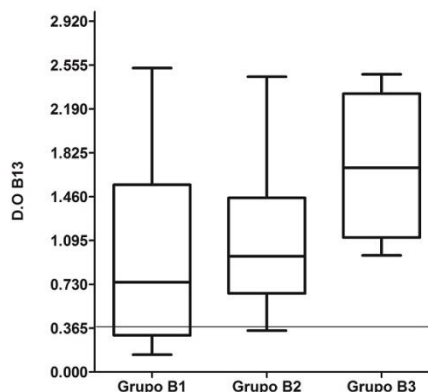


Figura 2. Nivel de Anticuerpos anti-B13 en el grupo B, infectados con Cardiopatía Chagásica Crónica, de acuerdo a la severidad de la cardiopatía clasificada según Kuschnir. Valor de cut-off: 0,365 D.O. G1: infectados con patología chagásica leve; G2: infectados con patología chagásica moderada y G3: infectados con patología chagásica grave.

Los 4 pacientes infectados crónicos que se encontraban en el grupo G3 de la clasificación de Kuschnir, cuyas edades oscilaban entre 46 y 54 años, presentaron alteraciones electrocardiográficas compatibles a CCC, cardiomegalia grado III/IV y signos y síntomas clínicos de insuficiencia cardíaca.

De los 13 infectados del grupo B que se incluyeron para el estudio de cohorte retrospectivo, con un seguimiento de 9 años promedio, 2 de ellos no presentaron Ac anti-B13. Estos pacientes, con 25 y 33

años de edad al ingreso del estudio, se encontraban en estadio G1 de Kuschnir. El paciente de 25 años evolucionó a G2 mientras que el otro permaneció en G1, ambos con un seguimiento de 8 años.

Los otros 11 infectados con CCC, mantuvieron valores constantes de Ac anti-B13 en el tiempo. Seis de ellos evolucionaron a un compromiso cardíaco más severo y los restantes permanecieron sin cambios. (Tabla 2)

Tabla 2. Descripción de los 13 infectados con seguimiento en el tiempo contemplando edad, electrocardiograma (ECG), radiografía de tórax (Rx) y severidad de la Cardiopatía Chagásica Crónica según la clasificación de Kuschnir.

Edad de diagnóstico de CCC	Edad primer muestra‡	ECG y Rx en la primer muestra‡	Kuschnir primer muestra‡	Edad última muestra*	ECG y Rx en la última muestra*	Kuschnir última muestra*
25	37	BS + HBAI + Cardiomegalia grado 1	G2	45	BS + HBAI + BCRD + Cardiomegalia grado 1	G2
49	40	Eje izq -10	G0	54	HBAI	G1
25	33	HBAI + BCRD	G1	58	HBAI + BCRD + Cardiomegalia grado 1	G2
30	56	BS + HBAI	G1	65	BS + HBAI + BCRD + Cardiomegalia grado 1	G2
33	39	BCRD	G1	46	BCRD	G1
25	34	EV monofocal frecuente	G1	48	EV monofocal frecuente	G1
22	27	HBAI	G1	32	HBAI	G1
39	41	Eje izq -30 + Cardiomegalia grado 1	G2	60	MCP + Cardiomegalia grado 1	G2
50	53	EV aislada + T(-)V3 a V6	G1	60	Fibrosis septal T(-)V2aV6 + EV aislada	G1
38	46	HBAI + BIRD	G1	64	HBAI + BCRD + Cardiomegalia grado 1	G2
26	44	EV monofocal frec	G1	53	Trastorno de Repolarización Ventricular + Cardiomegalia grado 1	G2
45	69	FA de baja respuesta ventricular + HBAI + BIRD + Cardiomegalia grado 1	G2	78	MCP + Cardiomegalia grado 1	G3
47	69	Fibrosis septal	G1	77	Fibrosis septal	G1

‡primer muestra de suero en la que se determinaron Ac anti-B13

*última muestra de suero en la que se determinaron Ac anti-B13

BS: bradicardia sinusal, HBAI: hemibloqueo anterior izquierdo, BCRD: Bloqueo completo de rama derecha, EV: extrasístole ventricular, BIRD: bloqueo incompleto de rama derecha, MCP: marcapaso cardíaco, FA: fibrilación auricular.

En los 13 infectados del grupo B con seguimiento, los niveles promedios de Ac anti-B13 fueron: inicial 0,77±0,43 D.O, intermedio 0,69±0,33 D.O y final 0,76±0,42 D.O. Al realizar un ANOVA, que contempla todas las medidas en el tiempo realizadas en estos 13 pacientes, no se encontraron diferencias significativas entre las mismas (p=0,7840). (Fig. 3).

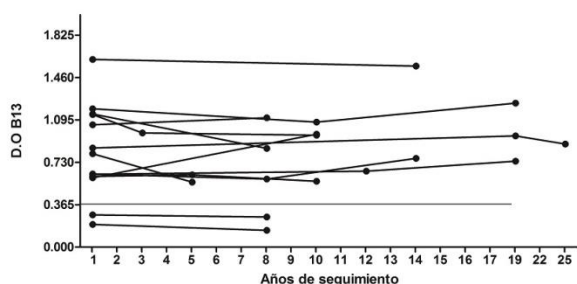


Figura 3. Lecturas inicial, intermedia y final en el seguimiento de 13 infectados por *T. cruzi* con Cardiopatía Chagásica Crónica, mediana de 9 años. Valor de cut-off: 0,365 D.O

Discusión

La presencia de anticuerpos con reactividad cruzada entre la proteína B13 de *Trypanosoma cruzi* y regiones aminoacídicas de la miosina humana ha sido referida en muchos reportes previos (Cunha-Neto et al. 1995, Vicco et al. 2013, Rodeles et al. 2016). En este estudio evaluamos la asociación entre el nivel de respuesta de dichos anticuerpos y la CCC. Si la similitud antigénica entre la cadena pesada de miosina cardíaca humana y la proteína B13 de *T. cruzi* estuviera involucrada en el desarrollo o progreso de la patología, se esperaría la presencia de Ac-anti B13 en un mayor porcentaje de infectados con cardiopatía respecto de los infectados sin patología, o al menos mayor nivel de respuesta de estos anticuerpos.

Investigaciones previas (Cunha-Neto et al. 1995) han descrito la presencia de Ac anti-B13 en todos los individuos infectados con CCC mientras, en los infectados sin patología solo estuvo presente en un bajo

porcentaje.

A diferencia de estos resultados, otros trabajos (Duranti et al. 1999, Vicco et al. 2013, Rodeles et al. 2016) observaron la presencia de Ac anti-B13 en el 100% de los pacientes infectados con *T. cruzi* independientemente de la condición clínica, pero el nivel de respuesta de los mismos mostró asociación con el grado de compromiso cardíaco.

En relación a estos últimos resultados, en el presente trabajo tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos de pacientes infectados con *T. cruzi* sin y con CCC. Otro resultado coincidente fue la observación de mayor reactividad anti-B13 entre los infectados con lesiones cardíacas más severas.

A diferencia de los estudios antes mencionados, no se observó reactividad anti-B13 en el 100% de los infectados con *T. cruzi*, si bien los porcentajes de positividad anti-B13 fueron elevados (91,1% en los infectados sin patología demostrable; 80,9% en quienes presentaban CCC y; 84,6 % de los pacientes con CCC y FRC asociados). Se podría especular que en aquellos infectados con *Trypanosoma cruzi* que no presentaron respuesta anti-B13 hubo una respuesta inmune diferente, propia de la genética del huésped en la expresión de estos anticuerpos. Por otro lado en el grupo control conformado por individuos no infectados con *T. cruzi*, las personas sanas no presentaron Ac anti-B13, mientras 50% de los cardiopatas fueron positivos aunque con muy baja reactividad. Se podría suponer que la miosina está expuesta por la patología cardíaca de base de estos individuos, generando Ac anti-miosina que se unen a B13 por la similitud antigénica. Hay patologías cardíacas donde se generan estos anticuerpos por la exposición a antígenos propios (Ramos 2001). Si la similitud antigénica entre miosina cardíaca humana y la proteína B13 de *T. cruzi*, permitiera a los Ac anti-B13 unirse a miosina, podrían explicar la perpetuación o el agravamiento de los focos inflamatorios que ocurren en la necrosis miocárdica que se produce no solo en la CCC, sino también en otras miocarditis. La presencia de estos anticuerpos con capacidad de unirse a miosina cardíaca podrían perpetuar o agravar la patología (Ramos 2001, Basilio et al. 2000). El análisis longitudinal realizado en un grupo de pacientes infectados con *T. cruzi*, a pesar del pequeño número de individuos estudiados, brinda información acerca del comportamiento evolutivo de los Ac anti-B13 en infectados con CCC. Según los resultados obtenidos, los niveles de estos anticuerpos no tuvieron variaciones en el tiempo, independientemente de la evolución clínica. Esta permanencia de reactividad anti-B13 permite suponer que los niveles elevados de estos Ac que se encontraron en los infectados con *T. cruzi* con lesiones cardíacas más severas, estaban presentes con anterioridad. Para ratificar estos resultados, es preciso realizar estudios de cohorte con mayor número de infectados con *T. cruzi* que permitan validar la utilidad de estos Ac anti-B13 como marcadores de progresión clínica en los pacientes con Cardiopatía Chagásica Crónica.

Referencias

Abel LC, Iwai LK, Viviani W, Bilate AM, Faé KC, Ferreira RC, et al. T cell epitope characterization in tandemly repetitive *Trypanosoma cruzi* B13 protein. *Microbes and Infection*. 2005; 7(11):1184-1195.

Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C, et al. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999; 60(5):726-732.

Basilio EG, Manterola FA, Rodés MB, Beiras AC, De Soria Pantoja RF, Lado MP, et al. "Guías de práctica clínica de la Sociedad Española de Cardiología en miocardiopatías y miocarditis. *Revista Española de Cardiología*. 2000; 53(3):360-393.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976; 72(1-2):248-254.

Camussone C, González V, Belluzo MS, Pujato N, Ribone ME, Lagier CM, et al. Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus mul-tiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2009; 16:899-905.

Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stolf N, et al. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995; 92(8):3541-3545.

Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca, SG, Kalil J, Engman DM, et al. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity*. 2006; 39(1):41-54.

Duranti MA, Franzoni L, Sartor G, Benedetti A, Iwai LK, Gruber A, et al. *Trypanosoma cruzi*: conformational preferences of antigenic peptides bearing the immunodominant epitope of the B13 antigen. *Experimental Parasitology*. 1999; 93(1):38-44.

Duranti M, Camargo L, Victora G, Ianni B, Buck P, Mady C, et al. Evidence for T Cell Help in the IgG Response against Tandemly Repetitive *Trypanosoma cruzi* B13 Protein in Chronic Chagas Disease Patients. *Journal of Parasitology Research*. 2012; 2012.

Girones N, Cuervo H, Fresno M. *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease. En *Molecular Mimicry: Infection-Inducing Autoimmune Disease*. Springer Berlin Heidelberg. 2005; 89-123.

- Girones N, Carrasco-Marin E, Cuervo H, Guerrero NA, Sanoja C, John S, et al. Role of *Trypanosoma cruzi* autoreactive T cells in the generation of cardiac pathology. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007; 1107(1):434-444.
- Higuchi ML, Brito TD, Reis M, Bellotti G, Pereira-Barreto AC, Pileggi F. Correlation between *T. cruzi* parasitism and myocardial inflammation in human chronic chagasic myocarditis. Light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc Pathol*. 1993; 2(2):101-6.
- Iwai LK, Juliano MA, Juliano L, Kalil J, Cunha-Neto. T-cell molecular mimicry in Chagas disease: identification and partial structural analysis of multiple cross-reactive epitopes between *Trypanosoma cruzi* B13 and cardiac myosin heavy chain. *Journal of Autoimmunity*. 2005; 24(2):111-117.
- Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *The American journal of tropical medicine and Hygiene*. 1993; 48(3):348-357.
- Kierszenbaum F. Mechanisms of pathogenesis in Chagas disease. *Acta Parasitologica*. 2007; 52(1):1-12.
- Kuschnir E, Sgammini H, Castro R, Evequoz C, Ledesma R, Brunetto J. Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy. *Arq Bras Cardiol*. 1985; 45:249-56.
- Leon JS, Engman DM. The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease. *Front Biosci*. 2003; 8:315-322.
- Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*. 2007; 115(9):1109-1123.
- Mele, E., Charask, A., Esteban, E., Kazelian, L., Litwak, L., Puchulu, F., & Stutzbach, P. Diabetes. Consenso de Prevención Cardiovascular. Sociedad Argentina de Cardiología. *Revista Argentina de Cardiología*. 2012; 80(2):59-68. <https://www.sac.org.ar/wp-content/uploads/2014/04/Consenso-de-Prevencion-Cardiovascular.pdf>
- Nussinovitch U, Shoenfeld Y. The clinical and diagnostic significance of anti-myosin autoantibodies in cardiac disease. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2013; 44(1):98-108.
- OMS La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) Nota descriptiva Marzo de 2017. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>
- Pereira CA. Autoinmunidad en la enfermedad de Chagas. *Medicina (Buenos Aires)*. 2015; 75(4):262-263.
- Ramos A. Miocarditis. *Rev CONAREC*. 2001; 17(64):240-250.
- Rizzo LV, Cunha-Neto E, Texeira AR. Autoimmunity in Chagas' disease: specific inhibition of reactivity of CD4+ T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*. 1989; 57(9):2640-2644.
- Rodeles LM, Vicco MH, Bontempi IA, Siano A, Tonarelli G, Bottasso OA, et al. Combined analysis of cross-reacting antibodies anti-β1AR and anti-B13 in advanced stages of Chagas heart disease. *Tropical Medicine & International Health*. 2016; 21(12):1545-1551.
- Storino, Rubén Alberto, and José Milei. *Enfermedad de Chagas*. Doyma Argentina, Division Mosby, 1994.
- Tibbetts RS, McCormick TS, Rowland EC, Miller SD, Engman DM. Cardiac antigen-specific autoantibody production is associated with cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *The Journal of Immunology*. 1994; 152(3):1493-1499.
- Vicco MH, Ferini F, Rodeles L, Cardona P, Bontempi I, Lioi S, et al. Valoración de anticuerpos con reactividad cruzada patógeno-huésped en pacientes con diferentes estadios de cardiopatía chagásica crónica. *Revista Española de Cardiología*. 2013; 66(10):791-796.
- Wittig, I., Braun, H. P., & Schägger, H. Blue native PAGE. *Nature protocols*. 2006; 1(1):418

Levantamento sobre o conhecimento da toxoplasmose pelas gestantes do município de Breves, Ilha do Marajó, Brasil

JEFFERSON BALIEIRO RAMOS¹, JULIANA SOUZA RIBEIRO²,
FRANCISCO CARLOS RODRIGUES DE OLIVEIRA³, NICOLE BRAND EDERLI⁴

¹ Discente de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Campus de Breves, Pará, Brasil – jeramos@gmail.com

² Doutoranda do curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Laboratório de Sanidade Animal, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil – ribeiro.ju.14@gmail.com

³ Professor Titular de Parasitologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Laboratório de Sanidade Animal, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil – oliveirafr@gmail.com

⁴ Professora Adjunta IV, Universidad Federal Fluminense (UFF), Instituto do Noroeste Fluminense de Educação Superior (INFES), Av. João Jásbick, s/n, Bairro: Aeroporto, Santo Antônio de Pádua, RJ, Brasil – nicole.ederli@gmail.com

Endereço para Correspondência: Nicole Brand Ederli, Universidad Federal Fluminense (UFF), Instituto do Noroeste Fluminense de Educação Superior (INFES), Av. João Jásbick, s/n, Bairro: Aeroporto, Santo Antônio de Pádua, RJ, Brasil, Telefone: +55 (22) 2739-7359, email: nicole.ederli@gmail.com

Survey on the knowledge of toxoplasmosis by pregnant women in the municipality of Breves, Marajó Island, Brazil

Recibido: 13/11/2017 Aceptado: 5/4/2018

Resumo

Toxoplasma gondii é o agente causador da toxoplasmose, uma das infecções parasitárias mais comuns mundialmente. Diante do exposto percebeu-se a necessidade de formular uma pesquisa para saber o nível de conhecimento das gestantes acerca da toxoplasmose no município de Breves, Ilha do Marajó, Pará. Para tanto, formulou-se um questionário contendo dez perguntas fechadas, cujas respostas eram SIM e NÃO e 30 gestantes foram entrevistadas. Com os resultados obtidos através da pesquisa pode-se constatar o baixo índice de conhecimento das gestantes sobre a doença, apenas 37% sabiam o que era toxoplasmose e como ela é transmitida e 33% conhecem os métodos de prevenção da doença.

Palavras-chave: Toxoplasmose, Gestantes, Gravidez.

Abstract

Toxoplasma gondii is the causative agent of toxoplasmosis, one of the most common parasitic infections worldwide. Given the above it was realized the need to develop a survey to know the level of knowledge of pregnant women about toxoplasmosis in Breves, Marajó Island, Pará. Formulated a questionnaire containing ten closed questions whose responses were YES and NO and 30 pregnant women were interviewed. The results obtained from the research can be seen the low level of knowledge of pregnant women about the disease, only 37% knew what it was toxoplasmosis and how it is transmitted and 33% know methods of preventing disease.

Key-words: Toxoplasmosis, Pregnant women, Pregnancy.

Introdução

Toxoplasma gondii é um protozoário, agente causador da toxoplasmose, uma das infecções parasitárias mais comuns mundialmente (Dubey & Beattie 1988, Mordue et al. 2001). Seu ciclo de vida é heteroxeno facultativo, onde todos os animais homeotérmicos podem ser hospedeiros intermediários e os membros da família Felidae hospedeiros definitivos (Tenter, Heckeroth & Weiss 2000).

A toxoplasmose, se adquirida antes ou durante a gravidez pela mãe, pode trazer sérios riscos à saúde da própria gestante e/ou do feto, uma vez que durante a gestação a mulher encontra-se suscetível a diversas infecções patológicas (Brasil 2010). Estima-se que 40% a 80% da população adulta já foi infectada pelo protozoário *T. gondii*. A incidência da toxoplasmose aguda varia de 0,2 a 1% e, quando ocorre durante a gestação, representa um risco em mais de 40% de infecção fetal, podendo levar as diversas complicações (Paul 2010).

Aproximadamente 85% dos recém-nascidos com toxoplasmose congênita não apresentam sinais clínicos evidentes, contudo uma avaliação mais detalhada pode mostrar alterações de restrição do crescimento intrauterino, prematuridade, anormalidades líquóricas e cicatrizes de retinocoroidite (Brasil 2011). Cerca de um terço da população mundial pode estar infectada por *T. gondii*, especialmente, em sua forma crônica, ocorrendo variações conforme o aumento da idade e entre os sexos (Paho & Who 2008). Embora a maioria dos recém-nascidos com infecção congênita não apresentem sinais no momento do nascimento, até 85% irão desenvolver deficiência visual na fase adulta e 55% irão apresentar distúrbios neurológicos.

O pré-natal, quando feito de forma adequada e a partir do início da gravidez, possibilita o diagnóstico

precoce de infecção, permitindo que os médicos tenham mais tempo e recursos para tratar o feto e evitar ou reduzir tais danos (Silva et al. 2011).

O presente trabalho teve como objetivo realizar um levantamento sobre o conhecimento sobre a toxoplasmose entre as gestantes residentes na zona urbana do município de Breves, na Ilha do Marajó, Estado do Pará.

Material e Métodos

A pesquisa com gestantes sobre o conhecimento de toxoplasmose foi realizada no município de Breves, localizado na Ilha do Marajó, Estado do Pará, Brasil. Um total de 30 gestantes residentes e domiciliadas nesse local foram abordadas, a fim de responderem um questionário constituído de 13 perguntas fechadas sobre toxoplasmose, onde as respostas eram apenas SIM e NÃO. (1) você sabe o que é a toxoplasmose?; (2) você sabe como ela é transmitida?; (3) você sabe como se prevenir?; (4) você possui gatos em casa ou possui contato com eles?; (5) já se consultou com um obstetra/ginecologista durante a gravidez?; (6) está realizando o acompanhamento pré-natal periodicamente?; (7) seu médico solicitou exames para detecção de infecção por *T. gondii* (Toxoplasmose)?; (8) você realizou os exames sanguíneos para toxoplasmose?; (9) caso a resposta seja afirmativa, qual foi o resultado?; (10) seu médico lhe informou a importância da realização do exame para detecção da toxoplasmose durante a gravidez?; (11) se seu exame foi positivo, seu médico lhe explicou os riscos da doença durante a gravidez?; (12) você entendeu todas as explicações do seu médico?; (13) caso positivo, seu médico já iniciou o tratamento?.

Nesse questionário, as entrevistadas se identificaram

e responderam também perguntas pessoais, tais como: idade, estado civil, tempo de gestação e número de filhos.

Resultados e Discussão

Todas as gestantes abordadas responderam o questionário (n=30), dessas 18 eram casadas e 12 solteiras. A faixa etária das entrevistadas variou de 16 a 35 anos e com relação ao grau de escolaridade, cinco estavam cursando o ensino superior, nove possuíam apenas o ensino médio completo, quatro estavam cursando o ensino médio, duas cursando o ensino fundamental, e as demais abandonaram os estudos, sendo que três destas tinham concluído o ensino fundamental.

Com relação aos dados coletados, 63% das gestantes entrevistadas responderam não ter conhecimento sobre a toxoplasmose, o que é um dado preocupante devido as consequências que a doença pode trazer para o feto durante a gestação. A toxoplasmose é uma das zoonose mais temidas durante a gravidez, devido ao risco de acometimento fetal, podendo resultar em distúrbios do sistema nervoso central e má formação fetal, fato que torna fundamental o seu diagnóstico precoce durante o acompanhamento pré-natal, com o intuito de reduzir tais distúrbios (Isabel, Da Costa & Simões 2007).

A segunda pergunta identificou que apenas 37% das gestantes sabiam como a toxoplasmose é transmitida, um percentual muito baixo. Esse dado permite inferir que o sistema de saúde não dá a devida importância a uma doença que pode ser perigosa durante a gestação, já que há a falta de informação. Esta pesquisa, assim como a elaboração de ações de orientações para gestantes sobre o protozoário *T. gondii* são extremamente necessários para prevenção da doença, pois segundo Branco, De Araújo e Falavigna-Guilherme (2012), um estudo realizado na Bélgica mostrou que a educação em saúde acarretou uma redução de 63% na soro conversão materna da doença. Na Polônia, constatou-se que a realização de atividades de educação em saúde durante quatro anos praticamente dobrou o conhecimento sobre a toxoplasmose e seus meios de transmissão (Branco, De Araújo & Falavigna-Guilherme 2012).

Sobre a forma de prevenção da toxoplasmose, 67% não sabem como se prevenir da doença, o que é um grave problema, pois a prevenção é essencial contra infecções durante a gravidez. As entrevistadas que sabem se prevenir refletem no baixo percentual de grávidas que conhecem a doença. Desse modo, a educação em saúde nessa região é carente e coloca em zona de risco suas gestantes. Tal educação ou prevenção primária consiste na disseminação do conhecimento sobre a doença e seus meios de prevenção. Portanto, as grávidas necessitam saber sobre hábitos desejáveis durante a gestação como: evitar a

ingestão de carne crua ou mal cozida, consumir apenas água tratada e leite pasteurizado, não deixar alimentos expostos a insetos, higienizar adequadamente frutas e verduras e se proteger com luvas e calçados ao entrar em contato com areia e materiais potencialmente contaminados por fezes de gatos (Amendoeira & Camilo-Coura 2010).

Embora o número de casas com gatos como animais de estimação vem crescendo mundialmente, 60% das entrevistadas não possuíam o animal em casa ou mantinham contato com os mesmos. Os gatos atuam como reservatórios do parasito para os seres humanos e animais, uma vez que eliminam os oocistos do protozoário *T. gondii* nas fezes. Quando os oocistos estão no meio ambiente, levam de um a cinco dias para ficarem infectantes (Garcia et al. 1999), podendo assim infectar outros animais. Nesse sentido, verifica-se que os principais meios de transmissão da toxoplasmose são a ingestão de oocistos infectantes oriundos das fezes de gatos e o consumo de carne crua ou mal cozida contaminada com cistos teciduais (Amendoeira & Camilo-Coura 2010).

Como as fezes de gatos são importantes disseminadoras da toxoplasmose, uma série de cuidados deve ser adotada com o objetivo de evitar qualquer contato com tais dejetos. Entre as precauções, vale citar: o uso de luvas para manusear as caixas higiênicas dos felinos, areia ou terra, pois podem estar contaminadas com oocistos de *T. gondii*; o descarte adequado das fezes dos felinos; a higienização adequada das mãos após o contato com as fezes dos gatos; o cuidado de evitar que os gatos domésticos tenham contato com o meio externo, com o intuito de reduzir os riscos de infecção dos mesmos por *T. gondii*; o cuidado de evitar que gestantes tenham contato com as caixas dos gatos, areia, terra ou com quaisquer objetos que possam estar contaminados com fezes dos felinos (Dubey 1988 apud Dias & Freire 2005).

Mais da metade das gestantes entrevistadas (67%) já havia se consultado com um médico obstetra/ginecologista. Tal fato é considerando importante, porque o acompanhamento de profissionais adequados durante a gravidez pode evitar futuros transtornos à mãe e ao feto.

O pré-natal é a oportunidade para medidas de prevenção do contágio de doenças, entre elas a toxoplasmose. A primeira consulta deve ocorrer o mais precocemente possível e o número de consultas considerado como mínimo pelo Ministério da Saúde são de seis (Carellos, De Andrade & De Aguiar 2008). Esta pesquisa esclarece que a falta de conhecimento sobre a toxoplasmose e das medidas de prevenção não está associada a falta de acompanhamento pré-natal, já que cerca de 97% das gestantes entrevistadas estão realizando esse acompanhamento. O fato da percentagem de mulheres grávidas com acompanhamento pré-natal ser superior ao número de mulheres que afirmaram ter se consultado com um médico obstetra/ginecologista pode ser explicado pelo fato do município de Breves não ter disponibilidade de

médicos nos postos de saúde, sendo o acompanhamento pré-natal realizado por enfermeiras e/ou técnicas de enfermagem.

Das 30 gestantes entrevistadas, 57% foram aconselhadas a realizarem o exame sorológico para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, e destas, todas afirmaram ter feito os exames solicitados e obtiveram resultados negativos. No entanto, não foi solicitada para 13 gestantes (43%), durante o acompanhamento pré-natal, a realização de exames para detectar infecção por *T. gondii*. Tal fato remete a fragilidade do sistema de saúde em tratar de um tema tão relevante para as gestantes como é o caso da infecção por *T. gondii*.

O exame para a detecção da toxoplasmose é muito importante, quando perguntadas se o médico teria informado a respeito da importância do exame, apenas 43% responderam que sim. Em conversa particular com uma técnica de enfermagem que realiza o acompanhamento de gestantes em um posto de saúde do município de Breves, a mesma informou que não tinha conhecimento sobre a doença, além de afirmar que a doença não possui importância na saúde das gestantes. Estas informações demonstram o despreparo dos agentes de saúde do município, localizado no interior da Ilha do Marajó, carente de assistência médica.

As demais perguntas do questionário mantinham correlação com as respostas das perguntas anteriores tais perguntas como: “Se seu exame foi positivo, seu médico lhe explicou o risco da toxoplasmose durante a gravidez?”. Como todos os resultados foram negativos, as respostas em sua totalidade foram não.

Nas duas perguntas subsequentes do questionário: “Você entendeu todas as explicações do seu médico?” e “Seu médico já iniciou o tratamento?”, foi obtida em sua totalidade a resposta “não”.

Conclusão

Com o desenvolvimento desta pesquisa foi possível identificar que apesar das gestantes entrevistadas não serem positivas para a toxoplasmose, a maioria não possui conhecimento sobre a doença, e nem da biologia do agente etiológico, transmissão, prevenção ou tratamento.

Conflitos de Interesse

Informamos que não há conflitos de interesse.

Referências Bibliográficas

Amendoeira MR, Camillo-Coura LF. Uma breve revisão sobre Toxoplasmose na gestação. *Sci Med*. 2010; 20: 113-119.

Branco BHM, De Araújo SM, Falavigna-Guilherme AL. Prevenção primária da toxoplasmose: conhecimento e atitudes de profissionais de saúde e gestantes do serviço público de Maringá, estado do Paraná. *Sci Med*. 2012; 22:185-190.

Brasil. Manual Técnico: Gestação de Alto Risco. 5. Ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 302 p.

Brasil. Atenção à Saúde do Recém-Nascido: Guia para os Profissionais de Saúde. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2011. 192 p.

Carellós EVM, De Andrade GMQ, De Aguiar RALP. Avaliação da aplicação do protocolo de triagem pré-natal para toxoplasmose em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: estudo transversal em puérperas de duas maternidades. *Cad. Saúde Pública*. 2008; 24: 391-401.

Dubey JP, Beattie CP. *Toxoplasmosis of animals and man*. Boca Raton, FL: Crc Press, 1988. 220 p.

Garcia JL, Navarro IT, Ogawa L, De Oliveira RC. Soroepidemiologia da Toxoplasmose em gatos e cães de propriedades rurais do município de Jaguapitã, Estado do Paraná, Brasil. *Ciênc. Rural*. 1999; 29: 99-104.

Isabel T, Da Costa PI, Simões MJS. Toxoplasmose em gestantes de Araraquara/ SP: análise da utilização do teste de avididade de IgG anti- *Toxoplasma* na rotina do pré-natal. *Sci Med*. 2007; 17: 57-62.

Mordue DG, Monroy F, La Regina M, Dinarello CA, Sibley LD. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J Immunol*. 2001; 167: 4574-84.

Paho, Who. Perinatal infections: Transmitted by mother to her infant. Uruguay: CLAP Scientific Publication 1567.02, 2008. 57 p.

Paul LM. Toxoplasmose: incidência fetal. Red Book, Illinois, 2010.

Silva BD, De Oliveira RVC, Da Silva MP, Bueno WF, Amendoeira MRR, Neves ES. Knowledge of Toxoplasmosis among Doctors and Nurses Who Provide Prenatal Care in an Endemic Region. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 2011; 2011: 1-6.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*. 2000; 30: 1217-1258.

Primer Registro de *Phyllobothrium delphini* (Cestoda: Phyllobothridae) en el delfín chileno *Cephalorhynchus eutropia* (Cetacea: Delphinidae) en aguas de la costa centro-sur de Chile.

First record of *Phyllobothrium delphini* (Cestoda: Phyllobothridae) in the chilean dolphin *Cephalorhynchus eutropia* (Cetacea: Delphinidae) in waters of the central-south coast of Chile.

ITALO FERNANDEZ F.¹, MARCO LOYOLA B.², MIGUEL MANSILLA C.³,

¹ Laboratorio de Parasitología. Departamento Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. itfern@udec.cl

² Escuela de Tecnología Médica, Universidad San Sebastián, Concepción.

³ Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad San Sebastián, Concepción

Autor de Correspondencia: Italo Fernández. Laboratorio de Parasitología. Departamento Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. itfern@udec.cl

Recibido: 28/1/2018 Aceptado 19/3/2018

Summary

El delfín chileno, *Cephalorhynchus eutropia* (Bosc, 1802), es un cetáceo endémico de Sudamérica. En este estudio, se presenta el hallazgo de larvas de *Phyllobothrium delphini* (Cestoda, Tetraphyllidea) en el tejido adiposo de un ejemplar de delfín chileno que fue encontrado varado y muerto. El hallazgo ocurrió en aguas de la costa centro-sur de Chile. Además, se revisan aspectos del ciclo de vida de este parásito enfatizando en las probables causas de infección de *C. eutropia* en aguas de Chile. Quistes de *P. delphini* han sido reportados previamente en numerosos mamíferos marinos pero no en *C. eutropia*. De esta forma, este hallazgo constituye el primer registro de *P. delphini* en el delfín chileno.

Palabras claves: Parásitos, *Phyllobothrium*, delfín, *Cephalorhynchus eutropia*, Chile

The Chilean dolphin *Cephalorhynchus eutropia* (Bosc, 1802), is an endemic cetacean of South America. In this study, the finding of *Phyllobothrium delphini* larvae (Cestoda, Tetraphyllidea) in the subcutaneous blubber of a stranded and dead specimen of Chilean dolphin, is presented. The finding occurred in waters of the central-south coast of Chile. In addition, aspects of the life cycle of this parasite causing the infection of *C. eutropia* in Chilean waters are emphasized. Cysts of *P. delphini* have been previously reported in several marine mammals but not in *C. eutropia*. Thus, this finding constitutes the first report of *P. delphini* in a Chilean dolphin.

Key words: Parasites, *Phyllobothrium*, dolphin, *Cephalorhynchus eutropia*, Chile

Introducción

El delfín chileno *Cephalorhynchus eutropia* (Gray, 1846) es un cetáceo endémico de Sudamérica, cuya distribución comprende la costa del Pacífico Sur, desde Concón (32°56'S) al sur hasta el área del Cabo de Hornos (55°14'S), incluido el lado oriental del Estrecho de Magallanes y, recientemente, en la costa atlántica (1-4). Si bien algunos aspectos de su biología han sido estudiados previamente (5-9) aún no se cuenta con antecedentes suficientes que, por ejemplo, estimen el tamaño de su población. Se sabe, sin embargo, que frecuenta zonas costeras bajas y que pueden acceder a zonas estuarinas y ríos (10, 11).

Hasta ahora, la fauna parasitaria registrada en *C. eutropia* está constituida por los trematodos *Braunina cordiformis* y *Synthesium tursionis*, los nematodos *Pseudoterranova* sp. y *Anisakis* sp., y por los acantocefalos *Corynosoma cetaceum* y *Polymorphus cetaceum* (12-16).

La captura directa o incidental, contaminación y deterioro de hábitats costeros y sobre-explotación de recursos pesqueros que forma parte de su alimentación constituyen las principales amenazas a la conservación de *C. eutropia* (7), a tal punto que esta especie ha sido catalogada como casi amenazada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), además de estar enlistada en el Apéndice II CITES (17).

Debido a que el parasitismo en mamíferos marinos puede aportar valiosa información respecto de su ecología trófica (18) consideramos de interés informar sobre el hallazgo de una larva correspondiente a un cestodo tetrafilideo en la necropsia de un ejemplar de delfín chileno. De esta forma, el presente estudio tuvo como objetivo el identificar y caracterizar histopatológicamente el

parásito encontrado con el fin de aportar información que contribuya al conocimiento biológico de *C. eutropia*.

Materiales y métodos

El 11 de agosto de 2015, un ejemplar de *C. eutropia* fue encontrado varado y muerto recientemente en la costa centro-sur de Chile, específicamente en la playa de Colcura, al sur del puerto de Lota (37°06' S, 73°08' W), por el Servicio Nacional de Pesca de Chile (SERNAPESCA), entidad que lo derivó a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad San Sebastián, Concepción.

La identificación del mamífero marino se hizo en base a las características morfológicas señaladas en la literatura disponible (19, 20) registrándose, además, las características biométricas y reproductivas del animal, que permitieron caracterizarlo como un ejemplar adulto macho. Se realizó una exhaustiva inspección externa, que evidenció herida craneal atribuible a choque con embarcación o golpe con elemento contundente. Posteriormente, se efectuó necropsia al ejemplar según protocolo de rutina (21), procedimiento que permitió visualizar numerosas lesiones en el tejido adiposo sobretodo del área perigenital, no relacionadas con la causa de muerte del mamífero. Estas correspondieron a lesiones nodulares de diversos tamaños (3-9 mm de diámetro) distribuidas asimétricamente dentro en el tejido mencionado (Fig. 1).

Para observar su contenido, se hizo disección de las lesiones para posteriormente examinar mediante lupa estereoscópica (Zeiss Stemi DR; 4x) procedimiento que permitió revelar la presencia de larvas parásitas en el interior de cada nódulo. Se tomó muestras de este tejido las que fueron fijadas en

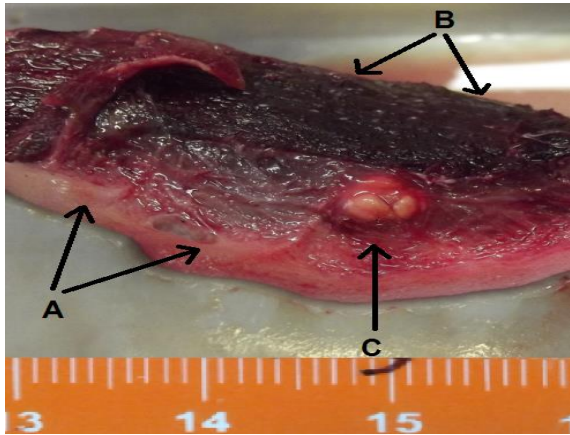


Figura 1. Necropsia de *Cephalorhynchus eutropia*. A) Tejido adiposo subcutáneo; B) Epidermis; C) Quistes larvales de *Phyllobothrium delphini*.

Formalina neutra al 10% por 48 horas a temperatura ambiente e incluidas en parafina histológica (Histosec, Merck, Alemania), realizándose cortes seriados de 3 µm de espesor, los cuales fueron adheridos a portaobjetos silanizados. La observación de estas preparaciones se llevó a cabo mediante el uso de microscopía óptica (Motic, BA 310, 10x y 40x) en cortes teñidos con Hematoxilina y Eosina. La determinación taxonómica de los ejemplares parásitos se hizo en el Laboratorio de Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, mediante el análisis de características morfológicas señaladas en la literatura disponible (22, 23).

Resultados y discusión

Se analizó 62 quistes presentes en el tejido adiposo perigenital del animal. Al hacer disección de cada uno se encontró en su interior un ejemplar larval blanquecino, con aplanamiento dorso-ventral, 2 a 11.3 mm de longitud por 1 a 7.5 mm de ancho y aspecto piriforme (Figs. 2 y 3).

Las características morfológicas y la revisión de la literatura de referencia permitieron determinar que estos elementos corresponden a larvas plerocercoides del cestodo tetrafilideo *Phyllobothrium delphini* (Bosc, 1802).

Al examen microscópico se observó que la cavidad quística-dérmica que rodeaba a la larva medía hasta 8 mm de diámetro en algunos casos, y estaba constituida por tejido fibroblástico colagenoso, con signos de atrofia por compresión y sin signos de inflamación territorial.

Las larvas presentaron una membrana cuticular externa y epitelio interior con escólex firmemente adherido al cuerpo larval y esbozos de cuatro botridios doblados sobre sí mismos (Figs. 4 y 5).

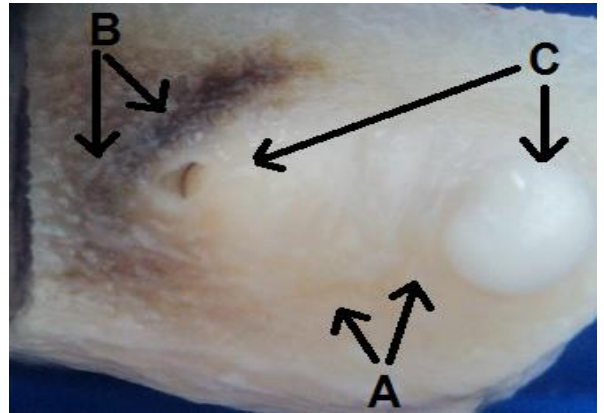


Figura 2. Corte macroscópico de quiste tisular de *Phyllobothrium delphini*; A) Tejido adiposo subcutáneo; B) Tejido adiposo con proliferación fibrocolágeno; C) Afloramiento de Larva *P. delphini*. (Aumento de 4x)

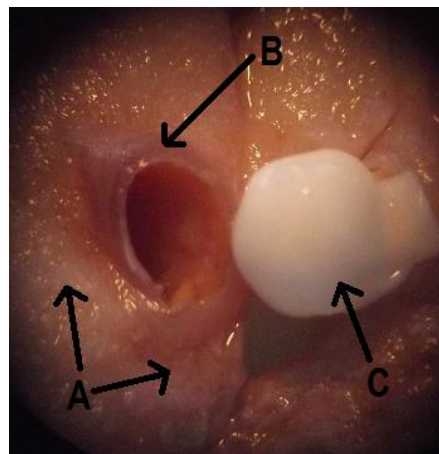


Figura 3. Vista microscópica de quiste tisular de *Phyllobothrium delphini*; A) Tejido adiposo subcutáneo B) Quiste larval; C) Larva desenquistada de *Phyllobothrium delphini*. (Aumento de 4x)

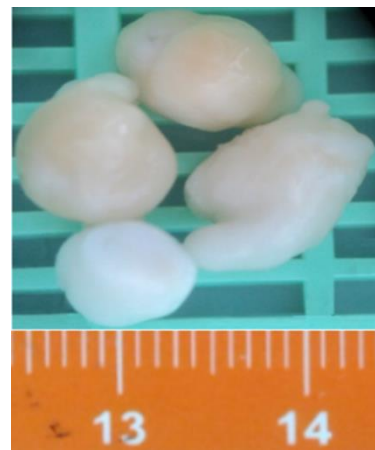


Figura 4. Vista macroscópica de larvas de *Phyllobothrium delphini* fuera de su envoltura quística.



Figura 5. Corte histológico de quiste tisular de *Phyllobothrium delphini*; A) Cutícula; B) Tejido fibrocolágeno de tipo reparativo delimitante; C) Scolex invaginado de *P. delphini*. (Aumento de 40x).

Nuestros quistes se encuentran depositados en el Museo del Laboratorio de Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción a la espera de someterlo a métodos moleculares que ratifiquen o aclaren el diagnóstico.

Discusión

Phyllobothrium delphini (Bosc, 1802) es un cestodo tetrafilideo cosmopolita que parasita, tanto el estado adulto como sus etapas larvales, animales de ambientes marinos (23-25). Sin embargo su ciclo de vida, al igual que el de los cestodos marinos en general, es escasamente conocido (26) debido a que al no haber similitud morfológica entre los estados adultos y las larvas -a menudo con escasos rasgos taxonómicos diferenciados- dificulta la identificación y la filiación parasitaria. Más allá de estas limitaciones, se sabe que los estados adultos habitan las válvulas espirales de elasmobranquios y peces holocéfalos, los que se infectarían al consumir el tejido parasitado de mamíferos marinos, que actuarían como hospedadores intermediarios o accidentales de, al menos, una de las etapas larvales de este cestodo (23, 27). Estos, a su vez, se infectarían al consumir los huevos del cestodo, previamente liberados desde los elasmobranquios, mediante vía oral por ingestión de agua o alimentación a partir de otros hospederos parasitados. Los quistes larvales se encuentran ubicados comúnmente concentrados en la grasa de la región perigenital de mamíferos marinos y la infección de los hospederos definitivos sería mediante la ingesta directa de estos animales (28). De esta forma, la interacción de estos hospederos ocurriría en el contexto de la cadena depredador-presa, aunque se ha esgrimido que la conducta carroñera de algunas especies de tiburones sería un factor que favorecería en mayor medida la

ingestión de los quistes larvales del parásito. Esto se apoyaría en la prolongada sobrevivencia que presentan las larvas de *P. delphini* en cadáveres de mamíferos marinos (22). Además, no se debería descartar la existencia de otros hospederos, en calidad de definitivos, intermediarios, paraténicos o “trampa”, aún no identificados en el ambiente marino y que pueden aumentar el riesgo de transmisión parasitaria al participar en la cadena trófica.

Mención aparte constituye la dificultad que presenta la identificación taxonómica de este parásito en su etapa larval, dada su elevada heterogeneidad morfológica, en la que intervendrían factores como edad de los quistes, intensidad de infección y técnicas de fijación histológica. Se han descrito hasta once morfotipos larvales, aunque las diferencias entre estos no están del todo claras debido a la carencia de antecedentes en algunas descripciones (23) e, inclusive, la asignación taxonómica de algunos a otras especies de cestodos marinos (29). Recientemente, se han hecho aproximaciones para aclarar estos aspectos mediante el análisis de ejemplares parásitos y sus hospederos basados en la morfología y biología, integrados a métodos filogenéticos y moleculares, estableciendo quince tipos larvales de cestodos marinos. De acuerdo a esta clasificación, correspondería asignar los estadios larvales de *P. delphini* a las larvas tipo XV, sin embargo, es necesario seguir incorporando antecedentes que complementen o reevalúen esta clasificación debido a que la información disponible aún es escasa e incompleta (28, 30-31).

En nuestro hallazgo existe concordancia en la morfología y tamaño, tanto de quistes y larvas, con las descripciones disponibles de *P. delphini* y, aunque evidencian elevada variabilidad morfológica, es consistente con lo observado en investigaciones anteriores (22, 23, 32).

Por otra parte, aunque los datos no son completamente comparables, la intensidad de infección encontrada en nuestro ejemplar coincide en relación a lo registrado en otras especies (27, 32) lo que probablemente sea el reflejo de la ontogenia del ejemplar, la abundancia de eventuales hospedadores definitivos y características propias del hábitat. Además, existe coincidencia en una mayor concentración de los quistes en la grasa de la región perigenital lo que guardaría relación con la transmisión del parásito. Por ejemplo, basándose en observaciones de campo, se ha concluido que las mordidas de dos especies de tiburones sobre un mamífero muerto expuesto al ataque comenzaron, preferentemente, en el abdomen posterior o cerca de la hendidura genital, por lo que la ubicación preferente de las larvas de *P. delphini* en la grasa perigenital favorecería una transmisión exitosa de este parasitismo (22, 27).

En este contexto, la participación de *C. eutropia* como hospedero intermediario en el ciclo de *Phyllobothrium* es incierto debido a la escasez de antecedentes, principalmente los referidos a la abundancia y ecología trófica de este mamífero, además

de la dificultad que presenta efectuar estudio parasitológicos en estos animales (dependiente de eventualidades como captura accidental y varamientos). No obstante, se plantea que su dieta, al igual que en otros delfines habitantes de aguas chilenas, estaría compuesta de peces, cefalópodos, crustáceos y algas (1, 7, 16) y que podrían potencialmente ser sujetos de depredación por parte de orcas (*Ursinus orca*), focas leopardo (*Hydrurga leptonyx*) y tiburones (*Carcharodon carcharias*, *Somniosus pacificus*, *Isurus oxyrinchus*). A pesar de que estas especies -potenciales hospederos definitivos de *P. delphini*- presentan preferentemente hábitos pelágicos, en ninguna se ha reportado la presencia del parásito en aguas chilenas. Sin embargo, aunque la información aportada en este trabajo proviene de un solo ejemplar, el hallazgo de *P. delphini* confirma la presencia de este delfín en ambientes pelágicos como parte de su estrategia individual de alimentación.

El estado larval de *P. delphini* ha sido registrado en diferentes cetáceos de ambos hemisferios (23-25, 27, 32-40). En aguas de Chile, *P. delphini* solo había sido previamente reportado en el lobo marino común *Otaria flavescens* (41) y en el delfín *Lagenorhynchus obscurus* (42), incluyendo otro ejemplar de esta especie de delfín que llegó a necropsia en nuestro hospital en 2014 (datos no publicados). Este hallazgo constituye el primer reporte de quistes larvales de *P. delphini* en el delfín *C. eutropia* constituyendo, por lo tanto, un nuevo hospedero para este cestodo.

Considerando la escasez de antecedentes biológicos sobre *C. eutropia*, creemos que es necesario seguir realizando estudios de tipo parasitario ya que pueden aportar evidencia y datos relevantes que faciliten el desarrollo de estrategias destinadas a proteger sus poblaciones.

Referencias

1. Goodall RN, Norris KS, Galeazzi AR, Oporto JA, Cameron IS. On the Chilean Dolphin, *Cephalorhynchus eutropia* (Cray, 1846). In: R. L. Brownell RL, Donovan CP. editors. Biology of the genus *Cephalorhynchus*, Reports of the International Whaling Commission. 1988. p. 197-257.
2. Aguayo-Lobo A, Torres D, Acevedo J. Los Mamíferos Marinos de Chile: I. Cetacea. Serie Científica INACH.1998; 48: 19-159.
3. Pérez-Álvarez MJ, Álvarez E, Aguayo-Lobo A, Olavarría C. Occurrence and distribution of Chilean dolphin (*Cephalorhynchus eutropia*) in coastal waters of central Chile. New Zeal J Mar Fresh Res. 2007; 41: 405-409.
4. Morgenthaler A, Fernández J, Moraga R, Olavarría C. Chilean dolphins on the Argentine Atlantic coast. Mar Mam Sci. 2014; 30: 782-787.
5. Molina D, Reyes J. Determinación de edad en el delfín chileno *Cephalorhynchus eutropia* (Cetacea: Delphinidae). Rev Chil Hist Nat. 1996; 69: 183-191.
6. Ribeiro S, Viddi FA, Freitas TR. Behavioural responses by Chilean dolphins (*Cephalorhynchus eutropia*) to boats in Yaldad bay, southern Chile. Aquat Mamm. 2005; 31: 234-242.
7. Heinrich S. Ecology of Chilean dolphins and Peale's dolphins at Isla Chiloé, southern Chile. Ph. D Thesis. University of St Andrews, USA; 2006.
8. Pérez-Alvarez MJ, Olavarría C, Moraga R, Baker CS, Hamner RM, Poulin E. Historical dimensions of population structure in a continuously distributed marine species: The case of the endemic Chilean dolphin. Scientific Reports [Internet]. 2016 Oct [cited 2016 Oct 19]; [about 11pp]. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep35507.pdf>
9. Viddi FA, Harcourt RG, Hucke-Gaete R. Identifying key habitats for the conservation of Chilean dolphins in the fjords of southern Chile. Aquat Conserv. 2016; 26: 506-516.
10. Ribeiro S, Viddi FA, Cordeiro JL, Freitas TR. Fine-scale habitat selection of Chilean dolphins (*Cephalorhynchus eutropia*): interactions with aquaculture activities in southern Chiloé Island, Chile. J Mar Biol Assoc UK. 2007; 87: 119-128.
11. Viddi FA, Hucke-Gaete R, Torres-Florez JP, Ribeiro S. Spatial and seasonal variability in cetacean distribution in the fjords of northern Patagonia, Chile. J Mar Sci. 2010; 67: 959-970.
12. Figueroa L. *Synthesium tursionis* (Marchi, 1873) Price, 1932 (Digenea: Campulidae) en *Cephalorhynchus eutropia* Gray 1846 (Cetacea: Odontoceti) en la costa chilena. Parasitol al Día. 1988; 12: 185-186.
13. Figueroa L, Franjola R. *Braunina cordiformis* Wolf, 1903 (Digenea: Brauninidae) en delfín chileno *Cephalorhynchus eutropia* Cray, 1846 (Cetacea: Odontoceti). Bol Chil Parasitol. 1988; 43: 71-72.
14. Oporto J, Torres P. First record of *Pseudoterranova* (Nematoda: Anisakidae) from

- the Chilean Dolphin, *Cephalorhynchus eutropia* (Cetacea: Delphinidae). *Bol Chil Parasitol.* 1989; 44: 92-93.
15. Figueroa L, Puga S. *Corynosoma cetaceum* Johnston and Best, 1942 (Acanthocephala) en delfín chileno, *Cephalorhynchus eutropia* Gray, 1846 (Cetacea: Delphinidae). *Bol Chil Parasitol.* 1990; 45: 93-95.
 16. Torres P, Oporto J, Brieva L, Escare L. Gastrointestinal Helminths of the Cetaceans *Phocoena spinipinnis* (Burmeister, 1865) and *Cephalorhynchus eutropia* (Gray, 1846) from the Southern Coast of Chile. *J Wildl Dis.* 1992; 28(2): 313-315.
 17. Heinrich S, Reeves, R. *Cephalorhynchus eutropia*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T4160A50351955. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T4160A50351955.en>. Downloaded on 22 January 2018.
 18. Bush A, Fernández J, Esch G, Seed R. Parasitism. The diversity and ecology of animal parasites. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 2001.
 19. Sielfeld W. Mamíferos marinos de Chile. Ediciones de la Universidad de Chile, Santiago, Chile; 1983.
 20. Jefferson T, Leatherwood S, Webber M. Marine Mammals of the World. FAO species identification Guide. United Nations Environment Programme, Rome, Italy; 1993.
 21. Pugliares K, Bogomolni A, Touhey K, Herzig S, Harry C, Moore M. Marine Mammals Necropsy: An Introductory guide for stranding responders and field biologists. Tech Doc 2007-06. Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, Massachusetts, USA; 2007.
 22. Testa J, Dailey MD. Five new morphotypes of *Phyllobothrium delphini* (Cestoda: Tetracyllidae), their relationship to existing morphotypes, and their zoogeography. *Bull South Calif Acad Sci.* 1977; 76: 99-110.
 23. Failla Siquier G, Le Bas AE. Morphometrical categorization of *Phyllobothrium delphini* (Cestoidea, Tetracyllidae) cyst from Fraser's dolphin, *Lagenodelphis hosei* (Cetacea, Delphinidae). *LAJAM.* 2003; 2: 95-100.
 24. Oliveira JB, Morales JA, González-Barrientos RC, Hernández-Gamboa J, Hernández-Mora G. Parasites of cetaceans stranded on the Pacific coast of Costa Rica. *Vet Parasitol.* 2011; 182: 319-328.
 25. Lehnert K, Randhawa H, Poulin R. Metazoan parasites from odontocetes off New Zealand: new records. *Parasitol Res.* 2017; 116: 2861-2868.
 26. Caira JN, Reyda FB. Eucestoda (true tapeworms). In: Rohde K, editor. *Marine Parasitology.* CSIRO Publishing, Collingwood, United Kingdom; 2005.
 27. Walker WA. Geographical variation of the parasite, *Phyllobothrium delphini* (Cestoda), in Dall's porpoise, *Phocoenoides dalli*, in the Northern North Pacific, Bering Sea, and Sea of Okhotsk. *Mar Mam Sci.* 2001; 17: 264-275.
 28. Jensen K, Bullard S. Characterization of a diversity of tetracyllidean and rhinebothriidean cestode larval types, with comments on host associations and life-cycles. *Int J Parasitol.* 2010; 40: 889-910.
 29. Dailey MD, Vogelbein W. *Clistobothrium carcharodoni* gen. et sp. n. (Cestoda: Tetracyllidae) from the Spiral Valve of the Great White Shark (*Carcharodon carcharias*). *J Helminthol Soc Wash.* 1990; 57(2): 108-112.
 30. Brickle P, Olson PD, Littlewood DTJ, Bishop A, Arkhipkin AI. Parasites of *Loligo gahi* from waters off the Falkland Islands, with a phylogenetically based identification of their cestode larvae. *Can J Zool.* 2001; 79: 2289-2296.
 31. Agustí C, Aznar FJ, Olson PD, Littlewood DTJ, Kostadinova A, Raga JA. Morphological and molecular characterization of tetracyllidean merocercoids (Platyhelminthes: Cestoda) of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Western Mediterranean. *Parasitology.* 2005; 130: 461-474.
 32. Loizaga de Castro R, Vales D, Degradi M, García N, Fernández M, Crespo E. First record of cestode cysts of *Phyllobothrium delphini* (Phyllobothriidae) from dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*) off Argentine coast. *Hidrobiológica.* 2014; 24 (3): 307-310.

33. Dailey MD, Perrin WF. Helminth parasites of porpoises of the genus *Stenella* in the eastern tropical Pacific with descriptions of two new species: *Mastigonema stenellae* gen. et sp. n. (Nematoda: Spiruroidea) and *Zalophotrema paczycum* sp. n. (Trematoda: Digenea). Fish B US. 1973; 71:455-471.
34. Dailey MD, Walker W. Parasites as a factor (?) in single strandings of Southern California Cetaceans. J Parasitol. 1978; 64: 593-596.
35. Van Waerebeek K, Reyes JC, Alfaro J. Helminth parasites and phoronts of dusky dolphins *Lagenorhynchus obscurus* (Gray, 1828) from Peru. Aquat Mamm. 1993; 19: 59-169.
36. Abollo E, Lopez A, Gestal C, Benavente P, Pascual S. Macroparasites in cetaceans stranded on the northwestern Spanish Atlantic coast. Dis Aquat Organ. 1998; 32: 227-231.
37. Gibson DI, Harris EA, Bray RA, Jepson PD, Kuiken T, Baker JR, Simpson VR. A survey of the helminth parasites of cetaceans stranded on the coast of England and Wales during the period 1900-1994. J Zool. 1998; 244: 563-574.
38. Moreno IB, Danilewicz D, Borges-Martins M, Ott PH, Caon G, Oliveira LR. Fraser's dolphin (*Lagenodelphis hosei* Fraser, 1956) in southern Brazil. LAJAM. 2003; 2 (1): 39-46.
39. Berón-Vera B, Crespo EA, Raga JA. Parasites in Stranded Cetaceans of Patagonia. J Parasitol. 2008; 94: 946-948.
40. Loizaga de Castro R, Leonardi MS, Grandi MF, García NA, Crespo EA. Far from home: Record of a vagrant striped dolphin in Patagonia with notes on diet, parasites and age determination. Mamm Biol. 2011; 76: 521-524.
41. George-Nascimento M, Carvajal J. Helmintos parásitos del lobo marino común *Otaria flavescens* en el golfo de Arauco, Chile. Bol Chil Parasitol. 1981; 36: 72-73.
42. Fernández J. Nuevos registros de parásitos en mamíferos marinos chilenos. Parasitol al Día. 1987; 11: 120-125.

Parasitología médica y/o veterinaria: reporte de caso

***Echinococcosis cerebral multiple intraventricular
por Echinococcus ortleppi: abordaje integral
de un caso clínico***

CATTANI MARIA E.¹, COGUT SANDRA¹, BOZANO CLAUDIA¹,
KAUFMAN SARA¹, VIZCAYCHIPÍ KATHERINA A.^{2,3}

¹ Sección Microbiología Clínica, División Laboratorio, Hospital Juan A. Fernández, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

² Departamento de Parasitología, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" Ministerio de Salud de la Nación Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

³ Instituto Nacional de Medicina Tropical - Ministerio de Salud de la Nación, Puerto Iguazú, Misiones, Argentina.

Correspondencia. Email: mariaeugeniaticatt@gmail.com - kvizcaychipi@gmail.com

Palabras claves: Echinococcosis cerebral - *Echinococcus ortleppi* - caso clínico – abordaje integral

Recibido: 03/04/2018 Aceptado: 09/04/2018

Summary

La echinococcosis quística / hidatidosis es una enfermedad zoonótica desatendida a nivel mundial, presentando características endémicas en Argentina. Se presenta el caso clínico de un trabajador rural con antecedentes de hidatidosis cerebral. Una nueva resonancia magnética reveló múltiples quistes intraventriculares. El paciente fue operado con éxito y 22 quistes fueron removidos. La echinococcosis quística a nivel de nervioso central es rara, su diagnóstico diferencial requiere un mayor análisis epidemiológico, clínico- tomográfico y el tratamiento es quirúrgico.

Cerebral multiple intraventricular echinococcosis by *Echinococcus ortleppi*: integral approach of a clinical case

Cystic echinococcosis / Hydatidosis is an zoonotic disease in the world and presenting endemic characteristics in Argentina. We report a farmerman, with a previous history of cerebral cystic echinococcosis. A new magnetic resonance imaging revealed a multiple intraventricular cysts. The patient was operated and 22 cysts were removed. Cerebral echinococcosis is rare, its diagnosis is epidemiological, clinical and tomographic, and the treatment is surgical.

Key words: Cerebral echinococcosis -*Echinococcus ortleppi* - case report- integral approach

Introducción

La echinococcosis quística (EQ), por su carácter endémico, sanitario, social y económico es considerada una enfermedad zoonótica desatendida de alto impacto a escala global y un problema de salud en América del Sur (1, 2). Esta zoonosis es causada por el complejo *Echinococcus granulosus sensu lato*, cestode que necesita de dos hospedadores mamíferos para completar su ciclo de vida. Su estado adulto o estrobilar se encuentra en el intestino delgado de cánidos, que actúan como hospedadores definitivos, y su estado larval o metacestode se encuentra en diferentes órganos de una o más especies de mamíferos herbívoros u omnívoros. El hombre puede figurar en el ciclo como hospedador intermediario cuando la infección se produce mediante la ingestión de huevos del parásito como resultado de la contaminación directa o indirecta con la materia fecal de un perro infectado.

La localización humana más frecuente de la EQ es el hígado, seguido por los pulmones y otros órganos, siendo la localización en el sistema nervioso central (SNC) rara (3, 4). El presente trabajo de tipo descriptivo, tiene como objetivo dar a conocer un caso clínico de EQ cerebral múltiple intraventricular secundaria a diseminación post-quirúrgica. Abordándolo de forma integrada desde la clínica el laboratorio y la vigilancia epidemiológica.

Caso clínico

Paciente masculino de 53 años, con residencia rural en Miraflores, Municipio localizado en el impenetrable Chaqueño, provincia de Chaco, Argentina. Dedicado a

la actividad agropecuaria de subsistencia como ser cría de bovinos, ovinos, porcinos, caprinos, aves de corral y animales de caza, con tenencia de perros y gatos domésticos. Una vivienda, con deficiencia en el suministro de agua corriente, y un grupo familiar integrado por su esposa y cinco hijos, tres del género masculino y dos femenino.

Presentando antecedentes mórbidos de importancia, como ser dos resecciones de quistes hidatídicos a nivel del SNC. La primera resección ocurrió en el año 1992, localizada en el hemisferio cerebeloso derecho y la segunda en el año 2013 localizada en la región temporo-occipital derecha que contactaba con la pared posterior del atrio ventricular.

En junio de 2016 el paciente consultó al Servicio de Neurocirugía del Hospital "Juan A. Fernández" del Ministerio de Salud de la Ciudad de Buenos Aires, por cefalea crónica de intensidad máxima y convulsiones que no respondían al tratamiento médico. Se le realizó un examen físico neurológico, donde se constató una hemianopsia homónima izquierda, resto sin particularidades. Se le efectuó una resonancia magnética de encéfalo, apreciándose en la secuencia T2, el ventrículo lateral derecho excluido con múltiples quistes en su interior diseminados en todas sus porciones.

La secuencia T1 con contraste permitió ver lesiones redondeadas de diferente tamaño e intensidad mayormente distribuidas en el atrio, algunas en el asta temporal y particularmente una lesión aplastada, en forma de medialuna, en el fondo del cuerno frontal (5) (Fig. 1, A-B).

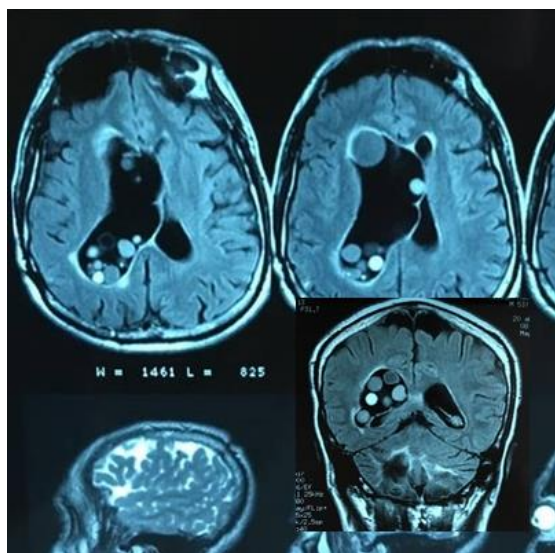


Figura 1. Resonancia magnética de encéfalo. Secuencia T2 donde se aprecia el ventrículo lateral derecho excluido con múltiples quistes en su interior diseminados en todas sus porciones y secuencia T1 con contraste, mostrando lesiones redondeadas de diferente tamaño e intensidad mayormente distribuidas en el atrio.

Los estudios complementarios (ecografía abdominal y radiografía de tórax) descartaron otras lesiones en el resto del organismo. El paciente inició tratamiento antihelmíntico pre-quirúrgico con albendazol (400 miligramos cada 12 horas vía oral) dos meses antes de la intervención.

Durante la cirugía se resecaron un total de 22 quistes (5) (Fig. 2 A-B). Remitiéndose el material obtenido al Sector de Parasitología Clínica del Hospital. Al examen macroscópico, se evidenció estructuras compatibles con quistes hidatídicos. El análisis en fresco, al microscopio óptico, mostró ganchos rostellares de protoescolices de *Echinococcus spp.* Parte de la muestra y suero del paciente fueron derivadas al Departamento de Parasitología del INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, quien realizó un examen microscópico óptico calibrado completo. Evidenciando abundantes protoescolices en diferentes estadios conteniendo algunos corpúsculos calcáreos y ganchos rostellares desarrollados (Fig. 3 A-D), cuyo estudio morfométrico (mediciones realizadas en 1000x) demostraron una longitud promedio total de ganchos grandes y pequeños de 28,6 μm (26,3 – 31,1) y 25,1 μm (23,8 – 25,9) respectivamente y una relación Hoja/Mango % 67/32. Siendo el tamaño, la forma y las proporciones de las partes de los ganchos característicos del *E. granulosus* (Fig. 3 E). Los estudios moleculares de amplificación y secuenciación del fragmento del gen mitocondrial (COX1) por PCR de la muestra presentó 100 % de identidad nucleotídica a la secuencia original

descrita en GenBank para *Echinococcus ortleppi* (genotipo G5). Por otra parte, los estudios de serología para hidatidosis mostraron test de IgG-ELISA positivo, con un valor de DO de 0,593 (valor de cut-off < 0,289 DO: negativo; entre 0,289 y 0,422 DO: indeterminado; $\geq 0,493$ DO: positivo). El ensayo de Western-blot (WB) fue positivo, visualizándose las bandas inmunogenicas de 57 y 67 kDa, características del antígeno 5.

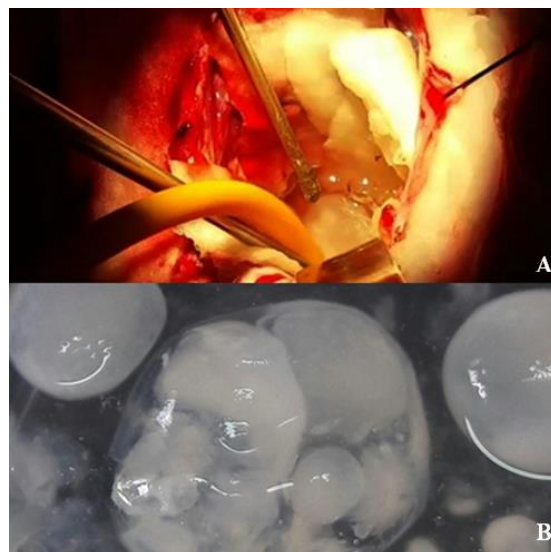


Figura 2. A. Abordaje transcortical al atrio ventricular derecho, B. Bajo visión microscópica se resecaron 22 quistes utilizando maniobras de disección roma e hidráulica (5). Los quistes uniloculares (1 a 2 cm) presentaban superficie lisa y traslúcida, con contenido líquido ligeramente opalescente en su interior.

En el control postquirúrgico no se evidenciaron lesiones residuales al estudio de resonancia magnética de encéfalo. Debido a la evolución neurológica favorable y mejoría del campo visual, es dado de alta cumpliendo 6 meses de tratamiento post-quirúrgico con albendazol 400 miligramos cada 12 horas vía oral y posteriores controles de imágenes. A febrero de 2018 el paciente ha asistido a sus revisiones médicas periódicas, no presentando recidivas ni complicaciones secundarias y encontrándose en buen estado de salud.

En paralelo al manejo clínico y laboratorio, se realizó la notificación del caso a los módulos de Vigilancia Clínica y Laboratorial del Sistema Nacional de Vigilancia de Salud, Ministerio de Salud, Argentina. Como también se evaluó al grupo familiar, esposa y dos hijos, mediante ecografía abdominal y serología resultando ambas pruebas negativas. Por otra parte, en el contexto de estudio de foco, Epidemiología de la provincia realizó la evaluación de los factores de riesgo, desparasitación canina y medidas de prevención en la comunidad.

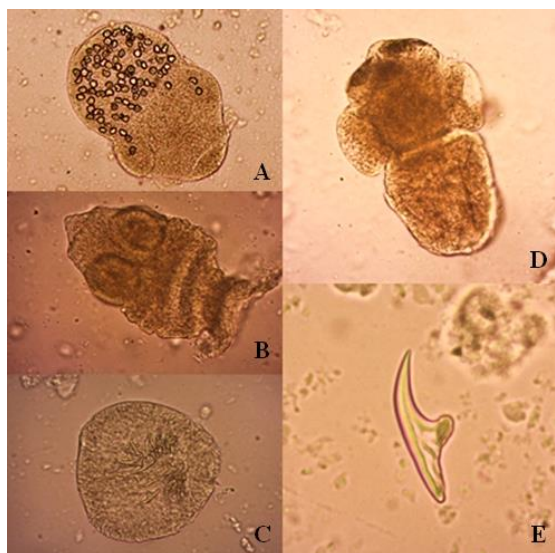


Figura 3. Análisis microscópico de los quistes hidatídicos resecados durante la cirugía. **A – D:** Protoescólices en diferentes estadios evolutivos (A, B, D: PE evaginado; C: PE invaginado) conteniendo corpúsculos calcáreos y ganchos rostellares desarrollados; **E:** Gancho rostellar de protoescólice de *E. granulosus*. (Observación en fresco).

Discusión

Esta enfermedad zoonótica desatendida a nivel mundial, tiene características endémicas en Argentina, presenta una morbilidad promedio anual en los últimos 10 años de 489 casos humanos notificados y una letalidad promedio del 3,3% representando la zoonosis parasitaria más prevalente (6). Está distribuida en todo el territorio, con una mayor ocurrencia de casos en zonas rurales de producción de ganado ovino, caprino y bovino, con infraestructura sanitaria deficiente, escaso conocimiento de la enfermedad y una población de perros sin atención veterinaria. Aunque los procesos de urbanización han trasladado el problema también a las ciudades ubicadas en las áreas endémicas. Entre los años 2013 y 2016, la provincia de Chaco, presentó una tasa de transmisión de 0,44 casos por 100000 habitantes, lo que muestra una marcada subnotificación en dicho sistema (1, 6).

La EQ en SNC es rara, variando entre 0.2 y 4 % de casos quirúrgicos totales y entre el 1.9 y 2.4% de casos revelados por autopsia (4, 7). Los quistes generalmente son primarios, supratentoriales, se localizan en el territorio de la arteria cerebral media, siendo el lóbulo parietal el más afectado. A pesar de su importancia, existe poca información disponible sobre la frecuencia de quistes localizados en otras partes del SNC, como ser la localización infratentorial que es extremadamente rara, y la intraventricular, meníngea, intraselar, del seno cavernoso, acueducto de Silvio y quistes craneales que son aún más raros. La mayor frecuencia se da en niños y adolescentes menores de 15

años, siendo infrecuentes en adultos (8). Como se mencionó los quistes son generalmente únicos pero si estos son fértiles y se rompen, sea de forma espontánea, traumatismo o cirugía como en este caso clínico, pueden resultar en la recurrencia y dar origen a quistes múltiples (9, 10).

El diagnóstico de la EQ en general se basa en tres pilares (11,12):

1. Examen físico y análisis de antecedentes epidemiológicos.

2. Diagnóstico por imágenes, que permite establecer la ubicación, estadio, número de quistes, como así también sus eventuales complicaciones.

3. Pruebas serológicas (ELISA, WB, IFI, HAI). Las técnicas de ELISA y de WB se consideran las de elección, esta última es usada como prueba de confirmación ante resultados de ELISA positivos. Las pruebas serológicas permiten un diagnóstico específico. Estas requieren de la reacción antígeno/ anticuerpo, lo que demanda la capacidad de respuesta inmunológica del huésped y el contacto de este sistema inmunocompetente con los antígenos (fisura o rotura de la capa germinativa). Una serología negativa no descarta el diagnóstico, esto se debe a que las técnicas serológicas pueden presentar resultados falsos negativos, aproximadamente un 10 - 20 % de los pacientes con quistes hepáticos y un 40 % de aquellos con quistes pulmonares no producen anticuerpos séricos detectables, lo mismo ocurre con quistes calcificados o localizados en zonas de bajo flujo sanguíneo. Estas pruebas deben ser utilizadas e interpretadas en correlación con los datos epidemiológicos, las manifestaciones clínicas y el diagnóstico por imágenes. Si una serología es positiva y la ecografía es negativa, debe efectuarse una tomografía computarizada, por la posibilidad de que no se visualicen quistes en otros órganos.

En el caso de EQ cerebral y en otras localizaciones del SNC el diagnóstico se basa principalmente en los síntomas clínicos y estudios por imágenes. Las manifestaciones clínicas son inespecíficas: hipertensión endocraneana de evolución lenta, trastornos psiquiátricos, signos neurológicos, focales, especialmente la hemianopía y convulsiones focales y/o generalizadas en función del tamaño y la localización del quiste. La angiografía puede mostrar un gran desplazamiento de vasos alrededor de una zona avascular, describiendo trayectos circunferenciales (signo de la pata de araña de Egas Moniz) sin vasos de neoformación. Por lo expuesto, la EQ de SNC es un diagnóstico diferencial de síndrome de hipertensión endocraneana en áreas endémicas (13). Las pruebas serológicas en pacientes con quistes a nivel del SNC puede dar resultados falsos negativos. Esta situación se relaciona con el hecho de que los quistes cerebrales por lo general permanecen intactos, como se comentó anteriormente las respuestas inmunológicas más fuertes ocurren en pacientes en los cuales el quiste se ha roto (11), tal lo ocurrido en el caso presentado en este informe.

Las pruebas moleculares contribuyen: 1) Al diagnóstico molecular específico de especie en situaciones donde la morfometría de los ganchos rostellares no pudo realizarse, sea el caso donde no se observen los ganchos rostellares (14); 2) Al conocimiento de la epidemiología molecular de *E. granulosus s.l.*, por medio del estudio de los genotipos y haplotipos presentes en diferentes áreas geográficas, estos últimos permiten entender la dispersión del parásito en un contexto histórico, como también en futuro permitirá poder determinar si la presencia de distintos haplotipos del parásito puede producir diferencias en los patrones de transmisión de la enfermedad (7, 15, 16). Argentina cuenta con la presencia de *E. granulosus sensu stricto (s.s)* (G1) en humanos, ovejas, cabras, vacas y cerdos; el genotipo G2 en humanos, ovejas y vacas; el genotipo G3 en ovejas; *E. ortleppi* (G5) en humanos, vacas; *E. canadensis* (G6) en humanos, cabras y vacas y el genotipo G7 en humanos, vacas y cerdos (17, 18). Los genotipos G1, G5, G6 y G7 se encontraron en perros (18). Siendo *E. granulosus s.s* (G1) y *E. canadensis* (G6) los mayormente implicados en las infecciones humanas y de animales. *E. ortleppi* (G5), con un ciclo de vida perro/bovino fue descrito por primera vez en Sudáfrica, y en nuestro país en las provincias de Misiones y Catamarca (16, 18, 19). Según se informa, tiene baja patogenicidad para los seres humanos (20) sin embargo, esto continúa siendo un tema de controversia. Este genotipo es prevalente en bovinos de América del Sur, pero sólo se han reportado esporádicamente casos humanos, siendo este caso clínico el primer reporte de infección por *E. ortleppi* a nivel de SNC, estando acorde con el contexto epidemiológico del caso presentado.

Con respecto al tratamiento de la EQ en general, deben considerarse diversos factores relacionados con el paciente, como la edad, la presencia de comorbilidades, las posibilidades de seguimiento. También se debe tener en cuenta si la parasitosis evoluciona asintomática o presenta manifestaciones clínicas, la localización y las características quísticas, como así también la experiencia del equipo médico tratante.

Actualmente, las opciones de tratamiento son las siguientes: a) Tratamiento farmacológico. El benzimidazol (albendazol) es la droga de elección a una dosis de 10-15 mg/kg/día, con un tiempo mínimo de tratamiento de 3 meses, que puede prolongarse hasta 6 meses, excepto que se presente intolerancia o alteración de los datos del laboratorio (hemograma, hepatograma, test de embarazo en las mujeres en edad fértil). b) Cirugía. Siempre que sea posible se efectuará tratamiento prequirúrgico con albendazol 10-15 mg/kg./día por ejemplo durante 7-10 días y tratamiento posquirúrgico durante 60 días, ajustable de acuerdo al criterio médico. Esto no está consensuado, pero el albendazol prequirúrgico debería ser no menos de 30 días (12). Al margen de estas opciones, en ciertos casos la recomendación profesional es la de esperar y

observar. En quistes del SNC el tratamiento temprano de elección, consiste en la exéresis intacta de la lesión; según la técnica de Dowling que es la internacionalmente recomendada. Se realiza una craneotomía amplia, posterior apertura de la adventicia e irrigación con solución fisiológica entre el parénquima cerebral y el quiste, que permita la salida intacta de la prolífera y su contenido por gravedad.

Para múltiples quistes, como fue este caso, se recomienda un cuidado especial para evitar la rotura durante la exéresis de los quistes; la única sugerencia es realizar la exéresis uno por uno con paciencia. En caso de rotura, debe realizarse una cuidadosa y rápida aspiración para eliminar el contenido del quiste. El lecho quirúrgico debe ser lavado con solución salina hipertónica, y así se minimizan las posibles complicaciones graves, como reacción anafiláctica, meningitis químicas o déficits neurológicos permanentes, llegándose a reportar estas complicaciones hasta en el 9,8%. La recidiva se reporta hasta en el 19% y la tasa de mortalidad tras cirugía oscila entre el 10 y el 12% (5, 9, 13).

Como pudo observarse, los quistes localizados en el SNC presentan diferentes e interesantes características en cuanto a su evolución, diagnóstico y pronóstico. A la fecha no existe evidencia científica sostenible, ni circunstancias epidemiológicas especiales que predispongan la localización de quistes hidatídicos en el sistema nervioso central. La ocurrencia de casos humanos con quistes hidatídicos primarios a nivel del SNC en alguna región geográfica determinada podría deberse a una simple función de la prevalencia local de la EQ. Por tanto, en pacientes de áreas endémicas, el diagnóstico diferencial de EQ con masas tumorales, sobre todo cuando los quistes se desarrollan en sitios inusuales y atípicos, requiere un mayor análisis epidemiológico por parte de los médicos y en particular por los cirujanos (7, 13, 21).

A todo lo expuesto, hay que sumar la importancia en la notificación de los casos y la implementación de estrategias integrales de trabajo para la vigilancia de la enfermedad, esto incluye desde sistematizar la búsqueda activa de portadores asintomáticos en las zonas afectadas, hasta la desparasitación de todos los perros del área, construcción de infraestructura para la faena y educación, empoderamiento de la población expuesta para lograr cambios desde la comunidad orientados al control y erradicación de la enfermedad.

Conflicto de intereses

Los autores declaran ausencia de conflicto de interés

Agradecimientos

Los autores quieren dar las gracias al Paciente, quien con actitud de empoderamiento, agradecimiento y el deseo de prevenir esta enfermedad, presento en las Jornadas Nacionales de Hidatidosis llevadas a cabo en 2016 en Corrientes, Argentina su enfermedad y el contexto epidemiológico en el cual vive. También se agradece a: Natalia Casas del Ministerio de Salud de la Nación por su contribución a la revisión del artículo; Graciela Céspedes, Gerardo Rikoy, Sonia Sosa y Bibiana Ledesma del Departamento de Parasitología del INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”; a Martín Salas del INMeT-MSN, Iguazú, Argentina por la ayuda en las tomas fotográficas; al Dr. Mariano Ziraldo y al Servicio de Neurocirugía del Hospital “Juan A. Fernández” del Ministerio de Salud de la Ciudad de Buenos Aires Argentina.

Referencias

- Organización Panamericana de la Salud OPS/OMS, 2015. Equinococcosis. Informe epidemiológico de la Región de América del Sur 2009 – 2014. www.paho.org
- Menezes da Silva A. Cystic Echinococcosis in the Liver: Nomenclature and Surgical Procedures. *Journal of Surgery and of Surgical Research*. 2015; 1: 59-65.
- Tapia O, Vidal A, Lilia A. Hidatidosis cerebral: aspectos clínicos e imagenológicos. Reporte de 4 casos. *Rev. méd. Chile*. 2012; 140: 358-363.
- Neumayr A, Tamarozzi F, Goblirsch S, Blum J, Brunetti E. Spinal cystic echinococcosis a systematic analysis and review of the literature: part 1. *Epidemiology and anatomy*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7: e2450.
- Ziraldo M, Vega M, Ernst N, Cavagnaro M, Guevara M, Gardella J. Hidatidosis Cerebral Múltiple Intraventricular. Reporte de un Caso. *Rev Argent. Neuroc*. 2017; 31 (1): 44-46.
- Casas N. Vigilancia, prevención y control de la echinococcosis/hidatidosis bajo una mirada multidisciplinaria e intersectorial. *Revista Argentina de Parasitología - Número especial* (2017). ISSN: 2313-9862. p 14.
- Kern P, Menezes da Silva A, Akhan O, Müllhaupt B, Vizcaychipi KA, Budke et al. The echinococcoses: diagnosis, clinical management and burden of disease. *Adv Parasitol*. 2017; 96: 259–369.
- Brízuela M, Sarkis C, González R, Paulin P, Lubieniecki F, Berberian G. Hidatidosis cerebral: comunicación de seis casos pediátricos. *Rev Chilena Infectol*. 2017; 34(3): 270-275. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000300012>
- Luo K, Luo D, Zhang T, Wen H. Primary intracranial and spinal hydatidosis: a retrospective study of 21 cases. *Pathogens and Global Health*. 2013; 107 (2): 47-51.
- Madeo G, Perez M, Pujol J, Montero L, Sarti N, Torres M et al. Quiste hidatídico cerebral: A propósito de un caso. *Rev. de la fac. de Ciencias Med*. 2016; 6: 1-1.
- Ministerio de Salud de la Nación, Argentina. 2012. Diagnóstico de hidatidosis. Guía para el equipo de salud. Dirección de Epidemiología. <http://www.msal.gov.ar/images/stories/epidemiologia/pdf/guia/pdf/guia-medica-hidatidosis.pdf>
- PANAFTOSA/OPS/OMS. Prevención y Control de la Hidatidosis en el Nivel Local: iniciativa sudamericana para el control y vigilancia de la equinococosis quística / hidatidosis. Organización Panamericana de la Salud - OPS/OMS. Río de Janeiro: PANAFTOSA - OPS/OMS, 2017. 56p. (Serie de Manuales Técnicos, 18).
- Acha-Sánchez JL, Yaya-Loo HJ, Chipana-Sotomayor ME. Cerebral hydatid cyst: Clinical case and review of the literature. *Neurocirugia*. 2016; 28 (4): 207-210.
- D’Alessandro A. 2002. *Descripción morfológica, ciclo biológico y distribución geográfica de las especies del género Echinococcus*. En: Situación de la hidatidosis-echinococcosis en la República Argentina. Denegri G, Dopchiz M, Elissondo M. (Eds.). Editorial Martín. Mar del Plata. pp. 19-30.
- Romig T, Ebi D, Wassermann M. Taxonomy and molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus sensu lato*. *Veterinary Parasitology*. 2015; 213(3–4): 76-84.
- Alvarez-Rojas CA. Epidemiología molecular de *Echinococcus granulosus* en las Américas: implicaciones para el control y diagnóstico. *Revista Parasitología Latinoamericana*. 2016; 65 (3): 5-19.
- Vizcaychipi KA. 2014. Gestión Programa Provincial de Control de Hidatidosis y Fortalecimiento de la Red De Laboratorios. Misiones, Argentina. MsM, Tesis. Universidad Favaloro, Buenos Aires Argentina. 210 pág.

18. Cucher MA, Macchiaroli N, Baldi G, Camicia F, Prada L, Maldonado L, et al. Cystic echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of *Echinococcus granulosus sensu lato* in humans and natural domestic hosts. *Trop Med Int Health*. 2016; 21(2): 166-175.
19. Vizcaychipi KA, Roginski S, Gutierrez A, Santillan G, Guarnera E. 2004. Situación de Hidatidosis en el Norte de la Provincia de Misiones. FAO. Red de Helmintología para América Latina y El Caribe. XXI Jornadas Nacionales de Hidatidosis. La Pampa, Argentina. <http://cniia.inta.gov.ar/helminto>
20. Grenouillet F, Umhang G, Arbez-Gindre F, Manton G, Delabrousse E, Millon L, & Boué F. Echinococcus orteppi Infections in Humans and Cattle, France. *Emerging Infectious Diseases*. 2014; 20 (12), 2100–2102. <http://doi.org/10.3201/eid2012.140641>
21. Schantz PM. Localización de la hidatidosis en el sistema nervioso central. *Bol. Oficina Panam*. 1972; 73: 198 - 202.

Cultivo de *Acanthamoeba* spp. en presencia *Escherichia coli*, para el diagnóstico de cuadros de queratitis.

BECERRA C.^{1,2}, ESCOBAR D.¹, FERNÁNDEZ H.³, MUIÑO L.⁴, JERCIC MI.¹

¹ Sección Parasitología, Instituto de Salud Pública de Chile.

² Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.

³ Instituto de Microbiología Facultad de Medicina Universidad Austral de Chile.

⁴ Facultad de Ciencias de la Salud, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Chile, Chile.

Correspondencia:

María Isabel Jercic Lara, Sección Parasitología, Instituto de Salud Pública de Chile

E-mail: majercic@ispch.cl

Recibido: 05/04/2018 Aceptado: 30/04/2018

Summary

The genus *Acanthamoeba*, which belongs to the free-living amoeba group, has been identified as infection agents in both humans and animals. They cause various diseases such as keratitis, which is an inflammatory process that affects the cornea, causing an acute and invalidating pain. If treatment is not started in time, this condition can progress and lead to blindness. In Chile, the gold standard diagnostic technique is the culture of corneal scraping. Such technique is only performed at the Institute of Public Health of Chile (ISP) and the methodology requires an amoebic culture in the presence of a bacterial suspension. Although the literature highlights the benefits of this suspension, it is not indicated the importance of the bacterial viability in this methodology. Thus, in this work, we evaluate the growth of the amoeba in the presence of a viable bacterial suspension inactivated by heat. It is not known if having the inactivated bacterial suspension could facilitate the amoebic development and improves the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis.

Key words: *Acanthamoeba*, keratitis, cultivo.

Introducción

Las amebas de vida libre (AVL), corresponden a un grupo de protozoos ampliamente distribuidos en el medio ambiente, debido a la capacidad de adaptarse a su entorno. Se les describe también, como amebas anfitriónicas, dada la capacidad que demuestran para vivir libres en el medio ambiente externo o como parásito patógeno y oportunista (Oddó, 2006, Shokri A y col, 2016).

No todas las AVL son patógenas, distinguiéndose entre otros los géneros: *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Negleria*, *Vermamoeba*, que tienen implicancia en enfermedades humanas, siendo el género *Acanthamoeba*, el más frecuentemente aislado del medio ambiente (Visvesvara y col, 2007, Garcia y col, 2013).

Género *Acanthamoeba*

Se define el género *Acanthamoeba* como, protozoos microscópicos de vida libre que frecuentemente se encuentran en el suelo, el agua, el aire y la mucosa nasofaríngea de individuos sanos. El ciclo de vida de *Acanthamoeba* presenta dos formas evolutivas; trofozoito y quiste. Los trofozoítos (10 a 25 μm) son las formas vegetativas que se alimentan de materia orgánica y de microorganismos, principalmente de bacterias, levaduras y algas, además de células humanas, por medio de la emisión de pseudópodos y posterior fagocitosis. Se dividen por fisión binaria y de esta forma se expanden en el medio ambiente.

Sin embargo, cuando se exponen a condiciones adversas como la falta de nutrientes o temperaturas extremas, los trofozoítos se diferencian en una forma de latencia, denominada quiste (de 8 a 12 μm), el cual se caracteriza por poseer doble pared, una capa externa compuesta de polisacáridos y una interna compuesta de celulosa. Los quistes son resistentes a ciclos repetidos de congelación-descongelación y también a dosis

notablemente altas de radiación ultravioleta y gamma.

Los quistes son metabólicamente inactivos y pueden permanecer viables hasta 20 años en condiciones de falta de agua (Neelam S y Niederkorn J, 2017).

No obstante, bajo condiciones ambientales apropiadas, los quistes tienen la capacidad de volver a su estado de trofozoítos, los cuales están capacitados para sintetizar enzimas que favorecen la penetración y destrucción tisular (Goñi, 2014); lo que los habilita para infectar a mamíferos incluyendo al hombre, en el que puede producir cuadros como encefalitis amebiana granulomatosa (EGA) y queratitis amebiana (QA). La EGA se observa con mayor frecuencia en pacientes inmunocomprometidos, mientras que la QA es más común y puede afectar también a individuos inmunocompetentes, observándose en los últimos años un incrementado número de pacientes infectados (Neelam S y Niederkorn J, 2017).

Los casos de QA en los últimos se han asociado a un aumento en el uso de lente de contacto, donde los usuarios generalmente reciben una precaria educación sobre los cuidados para el uso correcto de los lentes y las cajas que los contienen (Sekhar H, 2016).

Queratitis por *Acanthamoeba*

La queratitis se define como un proceso inflamatorio que afecta la córnea, causando un dolor agudo e invalidante que, al progresar, puede originar una ulceración que puede conducir a la pérdida de visión del ojo afectado. El género *Acanthamoeba* comprende más de 24 especies sin una correlación consistente entre la clasificación binomial y la tipificación molecular (Gomes S, Magnet A. y col, 2016).

Como causantes de los cuadros de QA, se han sido descritas al menos ocho especies de *Acanthamoeba*: *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *A. rhyodes*, *A. lugdunensis*, *A. quina*, y *A. griffini*. Cada una de ellas es capaz de producir infección en la córnea

que en su prestación más grave puede requerir un trasplante, si no se inicia un tratamiento oportuno (Neelam S Niederkorn J, 2017). Es por esto que se hace necesario contar con un diagnóstico temprano, lo que no ocurre en un gran porcentaje de los pacientes con queratitis por amebas en que el diagnóstico ocurre tardíamente, lo que influye directamente en el pronóstico de la enfermedad (Prashant G. y cols., 2017). Por lo tanto, un cuadro de queratitis por *Acanthamoeba* spp. detectado precozmente, aumenta en gran medida su oportunidad de recuperación, logrando revertir en parte los daños ocasionados en el epitelio y la córnea afectados por el parásito (Landeo, 2012, Neelam S y Niederkorn J, 2017).

Diagnóstico

Ante una sospecha de queratitis por *Acanthamoeba* o simplemente para descartarla en presencia de un cuadro oftalmológico compatible y/o con antecedentes epidemiológicos sugerentes como tratamientos convencionales fallidos, antecedentes de traumatismo ocular o portador de lentes de contacto, se podrán realizar exámenes de laboratorio a partir de una muestra obtenida de la córnea la que, en la mayoría de los casos será sometida a cultivo, por ser este aún el método “gold estándar” para la pesquisa de la infección (Pérez-Irezábal, 2006).

Existen otras opciones para el diagnóstico en el laboratorio cuyo uso está restringido laboratorios de investigación o de referencias, ya que no se cuenta con reactivos comerciales disponibles para estos fines. Este es el caso de la detección molecular del parásito y la búsqueda de anticuerpos específicos (Prashant G. y cols., 2017).

Cultivo de la muestra

La muestra, ya sea raspado corneal, biopsia u otra, es sembrada en agar no nutritivo para su crecimiento aportando como nutriente un tapiz bacteriano. Sin embargo, se sabe de manera general, que las AVL interactúan con distintas especies bacterianas en el medio donde se encuentran (Pérez-Irezábal, 2006) y que además son descritas como un grupo de organismos que fagocita células enteras como su principal sustrato alimenticio. Debido a esto, diferentes estudios sugieren el uso de cultivos bacterianos, tales como *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (Eroglu F y col, 2015) con el objetivo de crear un ambiente óptimo para el desarrollo de la ameba (Rodriguez, 1994, Megha K y col, 2017), pues se ha visto que agregar al cultivo de *Acanthamoeba* spp. una suspensión bacteriana preparada en solución Page's, facilita la obtención de

un crecimiento amebiano a corto plazo, en relación con cultivos axénicos (Prashant y col, 2017).

Sin embargo, no se señala en las publicaciones el estado en el que se debe encontrar esta suspensión bacteriana, para obtener dichos resultados, que desde el punto de vista del diagnóstico clínico favorecerían la detección de la ameba en la muestra. (Xuan Y. y col, 2017).

Las principales limitantes del cultivo son que la ameba se encuentre viable y que se debe esperar hasta 8 días para entregar un resultado negativo (Prashant G. y cols., 2017). Por lo tanto, encontrar las condiciones óptimas para asegurar el crecimiento de la ameba en un menor plazo resulta en un beneficio directo para el pronóstico de los casos positivos (Montoya A y col, 2018).

Es por esto, que en este trabajo se plantea evaluar el crecimiento de la ameba en presencia de una suspensión bacteria viable y otra inactivada por calor. En la práctica diaria del laboratorio donde se realizó este trabajo se había observado previamente que se acortaban los tiempos de obtención de cultivos positivos al utilizar bacterias viables como fuente de alimentación para la ameba.

Materiales y métodos

Para realizar este trabajo fue utilizada una cepa aislada de un paciente con queratitis por *Acanthamoeba* spp, perteneciente al genotipo T4, la que fue mantenida en el laboratorio hasta su uso en caldo glicerol al 16 % a -20°C.

Para evaluar las condiciones de crecimiento la cepa fue sembrada en 30 placas Petri de 5 cm de diámetro con base de agar no nutritivo al 1,5 %, (RG-02-IT-732.00-004). Se preparó una suspensión en solución Page's de una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli* K12). Se compararon dos condiciones diferentes de trabajo para el cultivo, por un lado, la cepa de *E. coli* viable, (15 placas) y por otro lado un inóculo de la misma cepa, sometida previamente a calentamiento a 100°C, durante una hora, (15 placas). Ambos ensayos se incubaron a 37 °C, según el protocolo de cultivo axénico de *Acanthamoeba* spp. (ME-213.01-010) durante 14 días, realizando revisiones diarias por medio de observación con aumento de 10X utilizando microscopio óptico Carl Zeiss, Axio Lab.A1, y realizando un registro fotográfico con el programa Imagine software, NIS-elements marca Nikon.

Para evaluar el efecto que tiene la presencia de *E. coli*, sobre el desarrollo de un cultivo de *Acanthamoeba* spp, en agar no nutritivo se observó si se presentaban cambios morfológicos de la ameba en los cultivos, el tiempo de crecimiento y el número de células observada por campo, registrándolos en una base de dato del programa GraphPad Prism 6.

Resultados

No se observaron cambios en la morfología característica de la *Acanthamoeba*; pudiendo distinguirse sus estructuras tanto en el estado de quiste como de trofozoíto (figura 1) ya sea en los cultivos realizados con la cepa de *E. coli* viable como con la *E. coli* inactivada por calor.

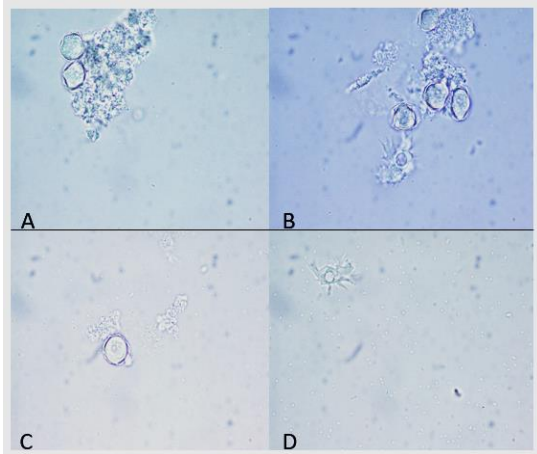
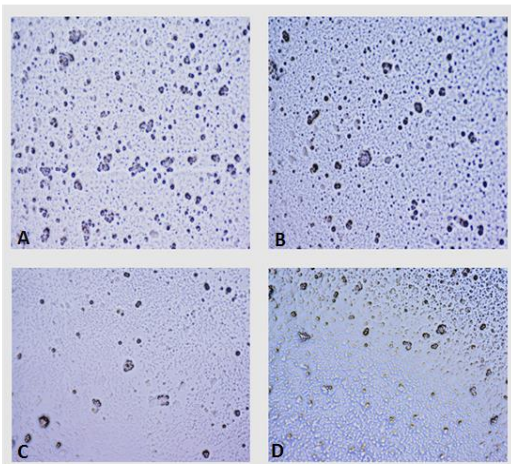


Figura 1. Estructuras Parasitarias, observadas en cultivo agar no nutritivo de *Acanthamoeba*, en presencia de *E. coli* viable (A y B) y *E. coli* inactivada por calor (C y D), tras 3 días de incubación. Fotografía tomada con microscopio Nikon Eclipse 80i, bajo el programa Imagine software, NIS-elements marca Nikon.



No obstante, al evaluar el desarrollo amebiano en el cultivo, se pudo observar un mayor número de células presentes por campo, cuando la *Acanthamoeba* se encuentra en presencia de *E. coli* viable, en relación a su crecimiento con *E. coli* inactivada por calor (Figura 2).

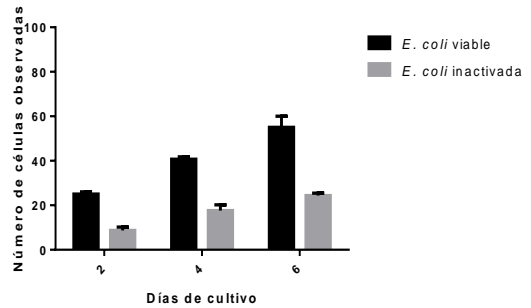


Figura 2. Número de células observadas en cultivo de *Acanthamoeba*, en presencia de *E. coli* viable con respecto a la presencia de *E. coli* inactivada por calor. En el eje de las coordenadas, se observa el promedio de células observadas por campo, en relación con los días de cultivo; en el panel superior se presentan cultivo de 6 días en presencia *E. coli* viable (A y B) y *E. coli* inactivada por calor (C y D), Fotografía tomada con microscopio Nikon Eclipse 80i, bajo el programa Imagine software, NIS-elements marca Nikon.

Discusión

En el presente estudio, y en concordancia con la revisión bibliográfica, se pudo verificar que la utilización de una suspensión bacteriana en el cultivo de *Acanthamoeba*, resulta beneficiosa para el crecimiento de la ameba. Siendo observado por medio de microscopía óptica una mejor expansión del cultivo en el agar, tanto en el cultivo de *Acanthamoeba* en presencia de *E. coli* viable como *E. coli* inactivada por calor.

Sin embargo, el número de células observadas por campo en cada uno de los días de cultivo fue diferente, entre una condición y otra. En presencia de *E. coli* viable se observa un mayor número amebas que cuando se utiliza *E. coli* inactivada como fuente de nutrientes. El menor número de amebas en la serie cultivada en presencia de *E. coli* inactivada por calor podría deberse a las modificaciones a nivel celular que pudiesen influir en la interacción de estos dos microorganismos.

Unas de las interacciones que, durante el último tiempo, han cobrado interés son modificaciones en la superficie de la célula hospedera eucarionte. Por un lado la fucosilación y por otro la sulfatación, que pudiesen favorecer o no la interacción de este parásito con bacterias con capacidad secretora y que presenten entre sus factores de virulencia un sistema de secreción tipo III (T3SS1 Y T3SS2), el cual depende directamente de distintas modificaciones en la superficie de la célula hospedera, entre ellas las modificaciones anteriormente señaladas; que permiten que actúe cada uno de los dos T3SS presente en la bacteria (Blondel y cols, 2016).

Dentro las acciones que contribuyen a la interacción ameba-bacteria, se encuentra la adherencia mediada por adhesinas presentes en la bacteria, la cual se ve directamente beneficiada por una modificación en particular experimentada en la membrana de la célula hospedera, como es la sulfatación de proteoglicanos, que promueven el reconocimiento y la unión de la célula hospedera con una variedad de patógenos virales, bacteriano y parasitarios (Kamhi, 2013).

Esto concuerda con lo señalado en estudios recientes (Krachler y cols, 2011; O'Boyle, 2013; Liu y cols, 2015), donde sugiere que la sulfatación de la superficie celular promueve el acercamiento de la bacteria a la célula hospedera por medio adhesinas bacterianas y su virulencia se vería atenuada. Ello podría beneficiar al metabolismo y desarrollo de la ameba, al reducir el periodo de adaptación al medio en el que se encuentra, ya que usaría esta sulfatación como una especie de quimiotaxis sobre las bacterias, permitiendo su acercamiento y con ello su fagocitosis como medio de alimentación.

Esto se observa también en los cultivos de *Acanthamoeba* en presencia de *E. coli* viable en relación con el inóculo de *E. coli* inactivada por calor, pues esta última podría perder la capacidad de captar modificaciones en la superficie de la célula hospedera, entre ellas la señal química de sulfatación que le permitiría acercarse en un menor tiempo a la célula, permitiendo obtener un cultivo amebiano en alrededor de 3 a 5 días.

Por lo tanto, el uso de bacterias viables, como es el caso de *E. coli* para la preparación de la suspensión bacteriana aportada como nutriente para la ameba, resultaría altamente beneficioso desde el punto de vista del diagnóstico clínico de enfermedades como QA, ya que este método de diagnóstico es el "gold standard" entre las opciones de diagnóstico actuales y los beneficios de su utilización en comparación al mismo cultivo, pero utilizando *E. coli* inactivada por calor sería determinante en relación a los días de cultivo necesarios para obtener una adecuada identificación morfológica del parásito, y poder diagnosticar la infección en el menor plazo posible. (Prashant y col, 2017).

Conclusión

A partir de los resultados obtenidos en esta investigación, es que se sugiere que para el diagnóstico clínico de laboratorio de casos de QA, mediante cultivo se utilice como fuente de alimentación para la ameba una suspensión bacteriana viable, debido a la facilidad de la metodología y al tiempo en el que se logra obtener un desarrollo amebiano tal que permita su identificación morfológica, necesaria para el diagnóstico.

Referencias

Oddó D. Infecciones por Amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anátomo-clínicos, 2006. Revista chilena de Infectología; 23(3): 200-214.

Shokri A, Sarvi S, Daryani A, Sharif M. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* spp. as neglected parasites in north of Iran, 2016. The Korean journal of parasitology, 54(4):447-53.

Visvesvara G, Moura H, Schuster F. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*, 2007. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 50: 1-26.

García A, Goñi J. Identification of free living *Amoeba* and *Amoeba* associated bacteria from reservoirs and water treatment plants by molecular techniques, 2013. Environmental science and technology. 47:3132-3140. Neelam S, Niederkorn JY. Pathobiology and Immunobiology of *Acanthamoeba* Keratitis: Insights from Animal Models, 2017. Yale journal of biology and medicine, 90(2):261-268.

Goñi, P, Fernández M, Rubio E. Identifying endosymbiont bacteria associated with free-living amoebae, 2014. Environmental Microbiology. 16(2): 339-349

Sekhar H, Satpathy G. Characterisation and expression analysis of trophozoite and cyst proteins of *Acanthamoeba* spp. Isolated from *Acanthamoeba* keratitis (AK) patient, 2016. Molecular and biochemical parasitology, (1-2):29-34.

Gomes S, Magnet A, Izquierdo F, *Acanthamoeba* spp. in Contact Lenses from Healthy Individuals from Madrid, Spain; 2016. Plos one 11(4): e0154246. Prashant G, Paavan K, Joveeta J. Non-contact related *Acanthamoeba* keratitis, 2017. Indian journal of ophthalmology; 10: 4103.

Landeo L. Diagnóstico y tratamiento de queratitis por *Acanthamoeba*, 2012. Horizonte Medico; 12(4). Pérez-Irezábal J, Martínez I. Queratitis por *Acanthamoeba*, 2005. Programa de control externo de calidad SEIMC.

Eroglu F, Evyapan G, Soner I. The Cultivation of *Acanthamoeba* Using Different Axenic and Monoxenic Media, 2015. Middle Black Sea Journal of Health Science; 1(3): 13-17.

Rodríguez-Zaragoza S. Ecology of Free-Living Amoebae, 1994. *Critical Reviews in Microbiology*; 20:225-41.

Megha K, Gupta A, Sehgal R, Khurana S. An improvised medium for axenic cultivation of *Acanthamoeba* spp, 2017. *Indian journal of medical microbiology*, 35(4):597-599.

Xuan Y, Shen Y, Ge Y. Isolation and identification of *Acanthamoeba* strains from soil and tap water in Yanji, China, 2017. *Environmental health and preventive medicine* 22:58

Montoya A, Miró G, Saugar JM. Detection and molecular characterization of *Acanthamoeba* spp. in stray cats from Madrid, Spain, 2018. *Experimental parasitology*, 188:8-12.

Blondel C, Park J. CRISPR/Cas screens reveal requirements for host cell sulfation and fucosylation in bacterial, type III secretion system-mediated cytotoxicity, 2016. *Cell Host Microbe*; 20(2): 226–237.

Kamhi E, Joo E. Glycosaminoglycans in infectious disease. 2013, *Biol Rev Camb Philos Soc*; 88:928–943.

Krachler A, Orth K. Functional characterization of the interaction between bacterial adhesin multivalent adhesion molecule 7 (MAM7) protein and its host cell ligands, 2011. *J. Biol. Chem*; 286:38939–38947.

O'Boyle N, Houeix B. The MSHA pilus of *Vibrio parahaemolyticus* has lectin functionality and enables TTSS-mediated pathogenicity. *International Journal of Medical Microbiology*, 2013. *Journal of Medical Microbiology*; 303:563–573.

Liu M, Chen S. A novel adhesive factor contributing to the virulence of *Vibrio parahaemolyticus*, 2015. *Sci Rep*; 5:14449.

Instrucciones a los autores a partir del volumen 67(1) 2018 Alcance y política editorial

Parasitología Latinoamericana (PLA), sólo acepta contribuciones originales e inéditas en las siguientes secciones:

- a) **Parasitología médica y/o veterinaria**
(reporte de casos, series de casos, revisiones, investigación original).
- b) **Biología y ecología de parásitos**
(taxonomía, revisiones, investigación original).
- c) **Zoonosis y Entomología médica**
(notas taxonómicas, revisiones, investigación original).
- d) **Artículos especiales**
(Notas Prácticas, Noticias, Crónicas, etc.)

Forma y preparación de manuscritos

Los trabajos deben ser escritos en WORD, a doble espacio, tamaño de letra 12, hoja tamaño carta (21 x 27 cm) dejando márgenes no inferiores a 3 cm. a ambos lados. Se deben enviar versión electrónica a la dirección del Comité Editorial indicada abajo*.

Los artículos podrán ser enviados en Inglés, Castellano o Portugués.

Los artículos deben constar de las siguientes partes: Título, Summary (**en inglés y en idioma original**), Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión, Agradecimientos y Referencias. Eventualmente Resultados y Discusión podrán presentarse en conjunto y según sea la sección, algunas de sus partes podrán ser omitidas.

Las Tablas, Figuras, Leyendas de las Figuras y Referencias deben agregarse en páginas aparte. Se deben enviar las figuras en archivos separados con formato TIFF o JPEG con resolución mínima de 600 dpi. Las Fotografías deben ser nítidas y bien contrastadas en blanco y negro, numeradas convenientemente. En el texto las tablas se deben citar entre paréntesis con su número (ej: Tabla 1) las figuras entre paréntesis como Fig. y su número (ej Fig. 1)

A partir del número 67(1) de 2018 las Referencias deben ser consignadas en el texto mediante **un número entre paréntesis “suprascript”** . por ejemplo: ...el parásito elude la respuesta inmune(1,3, 12-17). En el listado de referencias, estas deberán ser **por número** siguiendo el estilo Vancouver: http://library.vcc.ca/downloads/VCC_VancouverStyleGuide.pdf

Ejemplos:

Libros

1. Mason J. Concepts in dental public health. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
2. Ireland R, editor. Clinical textbook of dental hygiene and therapy. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2006.

Dos a 6 Autores/Editores

3. Miles DA, Van Dis ML, Williamson GF, Jensen CW. Radiographic imaging for the dental team. 4th ed. St. Louis: Saunders Elsevier; 2009.
4. Dionne RA, Phero JC, Becker DE, editors. Management of pain and anxiety in the dental office. Philadelphia: WB Saunders; 2002.

Más de 6 Autores/editores: agregar et al., después del sexto.

Capítulo de libro

5. Alexander RG. Considerations in creating a beautiful smile. In: Romano R, editor. The art of the smile. London: Quintessence Publishing; 2005. p. 187-210.

E-book

6. Irfan A. Protocols for predictable aesthetic dental restorations [Internet]. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2006 [cited 2009 May 21]. Available from Netlibrary: <http://cclsw2.vcc.ca:2048/login?url=http://www.netLibrary.com/urlapi.asp?action=summary&v=1&bookid=181691>

Journals

Abreviaciones según PubMed Journals Database

7. Haas AN, de Castro GD, Moreno T, Susin C, Albandar JM, Oppermann RV, et al. Azithromycin as a adjunctive treatment of aggressive periodontitis: 12-months randomized clinical trial. J Clin Periodontol. 2008; 35(8):696-704.
8. Tasdemir T, Yesilyurt C, Ceyhanli KT, Celik D, Er K. Evaluation of apical filling after root canal filling by 2 different techniques. J Can Dent Assoc [Internet]. 2009 Apr [cited 2009 Jun 14];75(3):[about 5pp.]. Available from: <http://www.cda-adc.ca/jcda/vol-75/issue-3/201.html>

El Comité de Redacción se reserva el derecho de hacer algunas correcciones de forma cuando lo estime conveniente.

Costos: A partir del número 67(1) de 2018 todos los artículos independiente del número de páginas tendrán un cargo fijo de 100 dólares que costearán el diseño y mantención de la revista en línea.

Envío de manuscritos

Envío de trabajos debe dirigirse a:

Comité Editor

Parasitología Latinoamericana

e-mail: parasitologialatinoamericana@gmail.com

REVISTA

PARASITOLOGÍA LATINOAMERICANA



Órgano Oficial de la SOCHIPA



Órgano Oficial de la Federación
Latinoamericana de Parasitólogos



Órgano Oficial de la Red de Zoonosis