

REVISTA PARASITOLOGÍA LATINOAMERICANA

Vol. 68/N° 1 – JUNIO 2019

Versión: On-Line: 0719-6326

Artículos originales

- Comportamiento de la Leptospirosis en el Área de Salud Matina durante el periodo 2015 al 2017.
- Immune response to the *Neospora caninum* recombinant proteins NcROP2 and NcSRS2 in a murine model.
- Análisis parasitológico en hojas de alface (*Lactuca sativa*) e agrião (*Nasturtium officinale*) comercializadas no Município de Cachoeiro de Itapemirim, es, Brasil.
- Ectoparásitos en *Gallus gallus domesticus* en zonas rurales de la región de la Araucanía, Chile.
- Infestación por *Otodectes cynotis* en felinos domésticos (*Felis catus*) de Temuco, Chile.

Artículos originales - Incorporaciones SOCHIPA

- Clonaje y caracterización de factores de crecimiento en el patógeno humano *Trichomonas vaginalis*.
- Señalización intracelular mediada por fosfolipasas D del veneno de *Loxosceles laeta*: el papel de los microdominios de balsas lipídicas.
- Prevalencia de la infestación por *Demodex spp* en la ciudad de Antofagasta.
- El clon C8C3 H510 como modelo de estudio de la virulencia de *Trypanosoma cruzi*



Órgano Oficial de la SOCHIPA



Órgano Oficial de la Federación
Latinoamericana de Parasitólogos



Órgano Oficial de la Red de Zoonosis

REVISTA
**PARASITOLOGÍA
LATINOAMERICANA**

Volumen 68 N° 1-2019

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 Tivarenk (Francia)	Thomas Weitzel (Alemania)
Naftalé Kats (Brasil)	Michael Miles (Alemania)
Ives Carlier (Bélgica)	Claudio Lazzari (Argentina)
Paulo Coelho (Brasil)	Felipe Guhl (Colombia)
Héctor Alcaíno (Chile)	Liliana Semenas (Argentina)
Mario George-Nascimento (Chile)	

Secretaria

Ana Zulantay

Editorial

Entre las 20 enfermedades tropicales declaradas como desatendidas, 11 de ellas corresponden a infecciones parasitarias. Dentro de ellas, destacan las infecciones causadas por helmintos las cuales afectan a 1 billón de personas en el mundo siendo las helmintiasis transmitidas por el suelo, las más predominantes. Dentro de las infecciones producidas por protozoos, *Leishmania* infecta a 12 millones de personas, reportándose anualmente entre 200.000 y 400.000 nuevos casos de Leishmaniasis visceral y entre 700.000 y 1.200.000 nuevos casos anuales de leishmaniasis cutánea. Por otro lado, *Trypanosoma cruzi* infecta entre 6 a 8 millones de personas en el mundo, siendo responsable de 10.000 muertes anuales. No menos importantes, resultan ser las infecciones intestinales por *Entamoeba histolytica*, donde se reportan 50 millones de casos anuales, de los cuales 100.000 mueren, mientras que entre 2,9 a 4,7 millones de casos de diarrea por *Cryptosporidium*, se reportan en niños menores de 2 años, especialmente en África sub-sahariana y regiones de Asia, donde 202.000 niños mueren a causa de esta infección. Finalmente, aunque no se considera dentro de las infecciones desatendidas, *Plasmodium* sp el agente causal de la malaria, infecta a 219 millones de personas, según estadísticas del año 2017 y 435.000 personas murieron ese año a consecuencia de la infección, especialmente niños africanos, menores de 5 años.

De esta manera, transcurridos casi 20 años del siglo XXI, en la era de la tecnología y las comunicaciones, cuando el hombre ya sueña con explorar Marte, los parásitos aún son causa de infecciones, enfermedades y muerte. En la mayoría de los casos, existe un denominador común, ya que estas infecciones afectan a las poblaciones más vulnerables y olvidadas del planeta, donde el acceso a la salud, al agua potable y a la educación es escaso o no existe. Tampoco existe la posibilidad de prevenir estas infecciones, porque no existen vacunas para ninguna de ellas y en algunos casos los tratamientos distan de ser óptimos al existir pocas opciones terapéuticas y múltiples efectos colaterales.

Por ello, en el año 2015, la relevancia de las parasitosis y la búsqueda de soluciones terapéuticas, fue reconocida por la Real Academia Sueca de Ciencias, al conceder el Premio Nobel de Medicina y Fisiología a William Campbell y Satoshi Omura por sus descubrimientos acerca de una nueva terapia contra infecciones causadas por parásitos, especialmente por el descubrimiento de la Ivermectina y a Tu Youyou por su descubrimiento acerca de una nueva terapia para la malaria, la Artemisina.

En esta perspectiva, la Sociedad Chilena de Parasitología (SOCHIPA), Sociedad Científica encargada de velar por el desarrollo y fortalecimiento de la Parasitología Nacional, realiza un permanente y sostenido programa de cursos, jornadas y actividades de difusión de nuestra disciplina

En esta oportunidad, SOCHIPA ha encomendado a la Unidad de Parasitología Molecular, de la Universidad de Antofagasta, organizar el “II Congreso Chileno de Parasitología, XVIII Jornadas Anuales de Parasitología y II Workshop en Control de la enfermedad de Chagas”. Estos eventos científicos se desarrollarán en San Pedro de Atacama, los días 6 y 7 de Diciembre próximo, comenzando con un curso pre congreso a desarrollarse el día 5 de Diciembre.

Esperando que sean días de fructífera discusión científica que permitan fortalecer nuestros conocimientos y establecer lazos de amistad y colaboración, en nombre del Comité Organizador, los invito muy cordialmente a encontrarnos en San Pedro de Atacama para disfrutar de un excelente programa científico en un entorno natural de inigualable belleza.

Prof. Jorge González D.Sc
Presidente del Comité Organizador
II Congreso Chileno de Parasitología



Carlos Francisco Pavletic Brevis (1950-2019), Médico Veterinario titulado de la Universidad de Chile con un total de 43 años de trayectoria, dedicó su ejercicio profesional al ámbito de la salud pública, inicialmente en el área de la inocuidad alimentaria y posteriormente en la prevención y control de zoonosis.

Gracias a su compromiso y esfuerzo se fortalecieron capacidades humanas y técnicas, participando en procesos de modernización relevantes como la implementación de los principios de aseguramiento de la calidad y buenas prácticas en los programas de vigilancia de alimentos. En el área de zoonosis participó en la elaboración de políticas públicas, planes y programas que han permitido alcanzar y mantener importantes logros en la salud pública nacional, tales como la eliminación de la rabia canina, la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas, también participó en la implementación de los programas de vigilancia de mosquitos vectores, entre otras múltiples actividades. Promovió a nivel nacional el concepto de una salud integrando diversos organismos públicos del sector agricultura, ambiente y la academia.

Sus méritos fueron reconocidos internacionalmente y participó como representante nacional en iniciativas de vigilancia, prevención y control de zoonosis de organismos de cooperación técnica internacional como la Organización Panamericana de la Salud, Panaftosa, Mercosur, entre otras.

Su partida significa una gran pérdida para sus colegas y compañeros de trabajo, sin embargo su legado constituye un aliciente para continuar trabajando en el mejoramiento de las condiciones de salud y bienestar de nuestra comunidad.

“Como médicos veterinarios, no debemos olvidar que nuestro quehacer está directamente relacionado con la salud pública, porque tiene que ver con la salud de las personas, independientemente del ámbito en que nos desempeñamos” Carlos Pavletic.

Alonso Parra Garcés, M.V.

Oficina de Zoonosis y Vectores

División de Políticas Públicas Saludables y Promoción

Subsecretaría de Salud

Ministerio de Salud

Comportamiento de la Leptospirosis en el Área de Salud Matina durante el periodo 2015 al 2017

ROGER CAMPOS ROBLES¹, LESLIE CARAZO CHANTO¹, LAURA ALBUROLA CARVAJAL¹,
YERLIN HERNÁNDEZ CHINCHILLA¹, KIMBERLY BOLAÑOS CÉSPEDES¹,
ANA LUCÍA MATEUS VARGAS¹, JEYSON ANTONIO ÁLVAREZ CAMPOS¹,
LLIRA BONILLA HERRERA¹, DAMASO HERNÁNDEZ DÍAZ¹, BRYAN DÍAZ BADILLA¹,
MARÍA FERNANDA SOTO EDUARTE¹, ISABEL SOLÍS GUZMÁN,
YOSSELIN MORALES RODRÍGUEZ

1 Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS).

Correspondencia: Leslie Carazo. lescarazo@gmail.com

Recibido: 29/05/2019 Aceptado: 18/06/2019

Resumen

La Leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial, causada por la bacteria *Leptospira spp*, está estrechamente relacionada a condiciones ambientales como inundaciones, agua contaminada con orina de animales infectados dentro de los que figuran principalmente roedores y animales domésticos; además de actividades agrícolas y trabajos de campo. La bacteria puede ingresar a través de la piel por pequeños cortes, mucosas o conjuntiva; el cuadro prodrómico característico abarca fiebre de inicio súbito que puede estar acompañada de cefalea, escalofríos, mialgia, dolor abdominal, irritación conjuntival, náuseas y erupción cutánea.

La incidencia de Leptospirosis en América se ha estimado en 12,5 casos por 100.000 habitantes para el 2017; su incidencia es más importante en poblaciones rurales de climas tropicales y subtropicales, en áreas inundables. Para el diagnóstico el laboratorio de referencia emplea las técnicas MAT y PCR.

Este trabajo busca determinar la situación epidemiológica de la Leptospirosis en el Área de Salud Matina durante el periodo 2015-2017.

Palabras Clave: Leptospirosis, Matina, *Leptospira spp*, Incidencia, prueba de microaglutinación (MAT), reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Abstract

Leptospirosis is a worldwide distribution zoonosis, caused by the bacterium *Leptospira spp*, is closely related to environmental conditions such as floods, water contaminated with urine of infected animals within those that are mainly rodents and domestic animals; In addition to agricultural activities and field work. The bacterium can enter through the skin by small cuts, mucous membranes or conjunctiva. The characteristic prodromal box includes sudden onset fever that may be accompanied by headache, chills, myalgia, abdominal pain, conjunctival irritation, nausea, and skin rash.

The incidence of leptospirosis in America has been estimated at 12.5 cases per 100,000 inhabitants for 2017; its incidence is more important in rural populations of tropical and subtropical climates, in floodable areas. For the diagnosis The Reference laboratory uses the techniques MAT and PCR.

This work seeks to determine the epidemiological situation of leptospirosis in the area of health Matina during the period 2015-2017.

Introducción

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial, la cual representa un importante problema de salud pública, se ha encontrado una asociación con condiciones ambientales, agrícolas, ganaderas, mineras y de trabajo.¹ Es una enfermedad infecciosa bacteriana, producida por varios serotipos de *Leptospira spp*; los seres humanos pueden adquirirla al tener contacto con orina de un hospedero infectado, suelo, agua contaminada, o bien tejido de un animal igualmente infectado. Dentro de los reservorios principales figuran los roedores; sin embargo, se incluyen animales salvajes y domésticos como perros, bovinos, equinos, porcinos, mapaches, ciervos y zorros; el hombre también puede actuar como reservorio por un tiempo limitado. La bacteria ingresa al cuerpo a través de las membranas mucosas, conjuntiva, pequeños cortes en la piel, abrasiones y posiblemente la piel húmeda.^{2,3}

Existen dos presentaciones clínicas, anictérica e icterica; siendo la más común la leptospirosis anictérica, ésta se presenta generalmente de forma subclínica o de severidad moderada, con fiebre de inicio súbito que puede estar acompañada de cefalea, escalofríos, mialgia, dolor abdominal, irritación conjuntival, náuseas y erupción cutánea. La forma icterica suele ser de mayor severidad y letalidad, presenta trombocitopenia, está asociada a falla renal y en algunos casos puede observarse compromiso pulmonar hemorrágico.⁴ La leptospirosis humana se

encuentra distribuida en todos los continentes (exceptuando Antártida), se ha determinado que su incidencia es más importante en poblaciones rurales de climas tropicales y subtropicales, en áreas inundables, sin embargo; un número mínimo de casos se han diagnosticado en climas áridos o desérticos y en naciones desarrolladas, generalmente en personas que han viajado a países endémicos. Estudios revelan que la leptospirosis al parecer representa del 20-40% de las enfermedades febriles de etiología desconocida en seres humanos, siendo en países endémicos alrededor del 10% de las admisiones a hospitales por ésta causa.⁵ La incidencia de leptospirosis en América se ha estimado en 12,5 casos por 100.000 habitantes para el 2017.⁶ En Costa Rica los antecedentes históricos datan de la época de 1947 cuando se describe un brote de leptospirosis en San José por primera vez.⁷ El diagnóstico definitivo de leptospirosis se realiza mediante el aislamiento e identificación de la bacteria en los tejidos o fluidos corporales del enfermo, teniendo como inconveniente que los periodos de incubación son prolongados, además de ser complejo ya que se requieren antisueros para determinar la serovariedad de la cepa. Por lo anterior y en aras de obtener un resultado en un menor tiempo se utiliza como técnica de referencia diagnóstica la prueba de microaglutinación (MAT), y en algunas ocasiones se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).⁸ Este trabajo tiene como objetivo describir la situación epidemiológica de la Leptospirosis humana en el Área de Salud Matina durante el periodo 2015 al 2017.

Metodología

Se realizó un estudio descriptivo de la leptospirosis del Área de Salud Matina en los años 2015 al 2017.

Para recopilación de información se utilizaron datos contenidos en las bases de datos de los Sistemas de información (SISVE), Actuarial Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS), resultados del Laboratorio Nacional de Referencia (INCIENSA).

Las variables que se analizaron: edad, sexo, distrito de procedencia, año en que se presenta el caso e inclusión en el grupo con mayor tasa de incidencia.

En la definición de caso se consideró: todo caso febril de inicio súbito con temperatura mayor de 38°C, con menos de siete días de evolución y en el que no se detectó ningún foco de infección, el cual fue muestreado para descartar la enfermedad por leptospirosis, además de ser registrado con boleta VE-01 y código A27 durante el 1 de enero de 2015 y el 31 de diciembre de 2017.⁹

Como criterio de inclusión se consideró todo paciente adscrito al Área de Salud Matina que presentó dos exámenes de laboratorio por leptospirosis uno en la fase aguda de la enfermedad y otro en fase convaleciente, o cualquier contacto de un caso confirmado, cualquier paciente que por clínica y sospecha epidemiológica fue diagnosticado por leptospirosis.

Se calcularon medidas de tendencia central y correlación: frecuencia, tasa de incidencia, tablas de contingencia, estadístico Chi-cuadrado y pruebas de significación estadística como intervalo de confianza 95%. Se consideró un nivel de significación $p < 0,05$.

Además, se realizaron análisis de correlación y de tendencia entre las variables anteriormente mencionadas. Se utilizó Microsoft Excel para el análisis de datos, además de los programas estadísticos IBM SPSS Statistics y Epiinfo 7.2.

Para el análisis de la información se realizó búsqueda bibliográfica de fuentes como PUBMED, MEDLINE, SCIELO, entre otras, para determinar cuál es el comportamiento de la enfermedad tanto en Costa Rica como otras regiones.

Resultados

Durante el periodo en estudio cumplieron con la definición de caso 208 pacientes.

Se encontró una tasa de incidencia acumulada del periodo en estudio por diez mil habitantes de 47,1; siendo en 2017 la más alta con 26,6 y en 2015 la más baja con 3,8 casos/ 10000habs.

El sexo masculino presentó una tasa de incidencia acumulada de 40,1 por 10.000 habitantes (N=177), y 7,0 por 10.000 habitantes (N=31) en el caso del sexo femenino. De ellos fueron confirmados por laboratorio de INCIENSA 38 casos. Ver Cuadro 1.

La distribución de casos de leptospirosis por semana epidemiológica en el periodo en cuestión arroja casos

aislados durante todos los años, y variabilidad importante durante el período 2015 al 2016.

Se realizó una tabla de contingencia para los variables sexo y año en que se presenta el caso (Cuadro 1). Tras aplicar el estadístico Chi-cuadrado se obtuvo una $p = 0,138$ lo cual indica que existe evidencia estadística para aceptar la hipótesis nula, por lo que se puede deducir que no existe correlación entre las variables sexo y año en que se presenta el caso.

Recuento

		Año			Total
		2015	2016	2017	
Sexo	Masculino	13	67	97	177
	Femenino	3	6	22	31
Total		16	73	119	208
Pruebas de chi-cuadrado					
Valor		gl		Sig. asintótica (bilateral)	
3,964 ^a		2		0,138	

Cuadro 1. Tabla de Contingencia entre variables sexo/año

Los grupos etarios con mayor riesgo comprenden las edades entre los 15 años a los 44 años, aunque hay reporte de casos en todas las edades hasta los 79 años. La mayor tasa de incidencia la presenta el grupo de 25 a 34 años, mientras que la menor el grupo de 0 a 5 años. Tras establecer el grupo con la mayor tasa de incidencia se analiza la correlación de las variables: sexo, distrito de procedencia o año en que se presenta el caso y la inclusión en el grupo con mayor tasa de incidencia. Se empleó el estadístico Chi-cuadrado. (Cuadro 2)

Variables analizadas	Significancia (p)
Sexo	0,031
* Inclusión en rango de 25-34 años	
Distrito	0,591
* Inclusión en rango de 25-34 años	
Año	0,740
* Inclusión en rango de 25-34 años	

Cuadro 2. Correlación estadística para variable de Inclusión en rango de 25-34 años respecto a sexo, año y distrito.

La $p = 0,031$ presenta evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula y establecer que sí existe correlación entre estar dentro del rango de edad con mayor tasa de incidencia y el sexo.

Las significancias obtenidas $p < 0,05$ tras la correlación con año y distrito permiten aceptar la hipótesis nula, por lo que se interpreta que no existe correlación entre estar incluido en el rango de edad con mayor tasa de incidencia y el distrito de procedencia o año en que se presenta el caso.

Al realizar análisis porcentual de los 208 casos el 31,6% de los masculinos realizan actividades agrícolas, mientras que el 16,1% de las 31 femeninas igualmente realizan actividades de ese tipo, el restante 52% son menores de edad, pensionados, amas de casa o no reporta ocupación.

Se empleó una tabla de contingencia con obtención del estadístico Chi-cuadrado para el análisis de correlación de las variables año en que se presenta el caso y distrito de procedencia (Cuadro 3).

Recuento

		Año			Total
		2015	2016	2017	
Distrito	Batan	8	43	87	138
	Matina	6	11	21	38
	Carrandi	2	19	11	32
	Total	16	73	119	208
Pruebas de chi-cuadrado					
Valor		Gl			Sig. asintótica (bilateral)
14.126 ^a		4			.007

Cuadro 3. Tabla de Contingencia entre variables Distrito y Año.

Se obtuvo una $p=0,007$ lo cual indica que no existe evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, por lo que se puede deducir que sí existe correlación entre las variables año en que se presenta el caso y distrito de procedencia. La incidencia de casos de leptospirosis según el EBASIS de procedencia refleja una mayor incidencia de casos provenientes de los EBASIS de Bataán y Matina.

Discusión

La incidencia de Leptospirosis en el periodo de estudio para el Área de Salud Matina varía entre 3,8 para 2015 y 26,6 para 2017, ambas por 10.000 habitantes; dicha incidencia es más alta en comparación con la reportada por el Instituto Nacional de Salud de Colombia el cual reporta una incidencia en América de 12,5 por 100.000 habitantes.⁶

La distribución de los casos por semana epidemiológica demuestra que existe variabilidad durante todos los años en estudio, esto puede deberse a que en el Área de Salud Matina las lluvias son frecuentes y el clima cálido favorece la permanencia de la bacteria en el ambiente, siendo éstos factores asociados a la permanencia y diseminación de la enfermedad como lo señala el Centro Nacional de referencia en Leptospirosis de INCIENSA en el Informe de vigilancia trimestral, Enero a Marzo de 2015. Costa Rica.⁹

Al observar el comportamiento de las tasas de incidencia de 2015 al 2017 la tendencia es al aumento.

A pesar de que se puede contraer leptospirosis a cualquier edad, solamente se necesita el contacto con la bacteria. En éste trabajo se evidencia que tener entre 15 años y 44 años aumenta en 14 veces el riesgo de contraer la enfermedad; según Pulido y colaboradores existe una diferencia en la prevalencia de leptospirosis según el género, siendo mayor en los hombres, lo mismo propuesto por Johnson et al en 2004 y Agudelo-Flórez et al en 2007, quienes han encontrado en sus

estudios que los hombres tienen mayor prevalencia debido a los trabajos específicos del género que desempeñan, lo que sustenta los hallazgos de este estudio ya que de los 177 hombres enfermos, el 31,6% realizan actividades relacionadas con trabajos agrícolas, mientras que de las 31 mujeres se reporta un 16,1%.¹⁰

El Ministerio de Salud en Boletín Estadístico de Enfermedades de Declaración Obligatoria en Costa Rica del año 2015, señala que el mayor riesgo lo presentan el género masculino con edades entre los 15 a 34 años, siendo los hombres el género con mayor incidencia.¹¹ La literatura relaciona el perfil ocupacional como uno de los factores de riesgo atribuibles para contraer la enfermedad, lo cual es consistente con lo encontrado en éste estudio, ya que alrededor de la tercera parte de los enfermos por leptospirosis en el periodo en cuestión se dedican a trabajos agrícolas, como se mencionó anteriormente. Las condiciones ambientales que prevalecen en la mayoría de los países tropicales y subtropicales como lo son lluvias abundantes, el desbordamiento de las aguas residuales, altas temperaturas, se consideran otros de los factores que favorecen la transmisión de la enfermedad, factores que están presentes en la mayoría de las localidades del Área de Salud Matina, además de la presencia de fincas bananeras y los trabajos de campo que representan dichas industrias.^{12, 13}

Conclusiones

La leptospirosis es una enfermedad reemergente que está estrechamente ligada a la ocupación y el sexo masculino, siendo más frecuente en la población en edad productiva en términos económicos.

Es necesario mejorar los sistemas de vigilancia, concientizar a los médicos en la elaboración de las boletas VE 01 y la importancia de la confirmación diagnóstica por parte del laboratorio mediante la realización de dos exámenes. Para confirmar un caso sospechoso de leptospirosis es necesario obtener las dos muestras, tanto en la fase aguda de la enfermedad como en la fase convaleciente, por lo que hay que educar al personal de salud en este aspecto. Es necesario educar a la población sobre la enfermedad y el aumento de la diseminación de la misma luego de períodos de lluvia, a fin de controlar su dispersión. Todo usuario que cumpla con la definición de caso debiera realizarse exámenes de laboratorio por leptospirosis y contar con la boleta VE 01, evitando el sesgo de la información por omisión en la formulación de ésta.

La ubicación geográfica en la que se encuentra el Área de Salud Matina y la frecuencia con la que ocurren las inundaciones son factores que facilitan la dispersión de la enfermedad.

La mayor frecuencia de casos lo reportan los Ebais de Bataán y Matina, los cuales cuentan con servicio de urgencias y por lo tanto donde se van a dar el mayor número de consultas por fiebre, así como la realización de boletas VE 01.

Bibliografía

1. Chavarría Joya L, Lara Gutiérrez D, Méndez Hurtado W, Moscoso Gama J. Leptospira: revisión del agente causal de una enfermedad zoonótica. *Biociencias* [Internet]. 2015 [citado 16 Oct 2018]; 10 (2):65-80. Disponible en: <https://revistas.unilivre.edu.co/index.php/biociencias/article/view/26432>.
2. Silva-Díaz Heber, Llatas-Cancino Dunalía N, Campos-Sánchez Marcos J, Aguilar-Gamboá Franklin R, Mera-Villasis Katya M, Valderrama-Ayén Mayra Y. Frecuencia de leptospirosis y características socio-demográficas en pacientes febriles del norte del Perú. *Rev. Chil. Infectol.* [Internet]. 2015 [citado 14 de Noviembre 2018]; 32 (5): 530-535. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071610182015000600006&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182015000600006>
3. Ministerio de Salud [Internet]. San José, Costa Rica: [actualizado Octubre 2018; citado 23 Nov 2018]. Leptospirrosis - Protocolo para Prevención y Control; p.16. Disponible en: <https://www.ministeriodesalud.go.cr/>
4. Sequeira-Soto Jorge, Romero-Zúniga Juan José. Evaluación de la Investigación Epidemiológica para Leptospirrosis en Cinco Regiones de Costa Rica. *Rev. Costarric. Salud Pública* [Internet]. 2015 [citado 23 Nov 2019]; 24 (1): 70-85. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-14292015000100011&lng=en.
5. Torres-Castro M, Hernández-Betancourt S, Agudelo-Flórez P, Arroyave-Sierra E, Zavala-Castro J, Puerto FI. Revisión actual de la epidemiología de la leptospirosis. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* [Internet]. 2016 [citado 7 de Oct 2018]; 54(5):620-625. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2016/im165k.pdf>
6. Instituto nacional de salud [Internet]. Colombia: Instituto nacional de salud; 2016 [citado 23 de Octubre 2018]. Vigilancia y análisis del riesgo en salud pública protocolo de vigilancia en salud Pública leptospirosis. p 30. Disponible en: <https://www.clinicamedihelp.com/documentos/protocolos/PRO%20Leptospirosis.pdf>
7. Mora RA. Leptospirrosis en Costa Rica. Técnicas diagnósticas y su tratamiento. *Rev Enf Emerg* [Internet] 2017 [citado 3 Dic 2018]; 16(1):23-29. Disponible en: http://www.enfermedadesemergentes.com/articulos/a662/ENF2017-16-01_revision-alfaro.pdf
8. Meny Paulina, Hernández Elba, Schelotto Felipe, Varela Gustavo. Valoración de un procedimiento de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos tipo IgM (IF-IgM) utilizado en el diagnóstico temprano de leptospirosis. *Rev. Méd. Urug* [Internet]. 2014 [citado 6 Nov 2018]; 30(2):88-92. Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902014000200003&lng=es.
9. INCIENSA [Internet]. Tres Ríos, Cartago: INCIENSA; [actualizado 10 septiembre 2015; citado 17 Nov 2018]. Informe de vigilancia trimestral, Enero a Marzo 2015; p. 26. Disponible en: http://www.inciensa.sa.cr/vigilancia_epidemiologica/informes_vigilancia/2015/Leptospirosis/Informe%20de%20vigilancia%20trimestral,%20Enero%20a%20Marzo%202015.pdf
10. Pulido-Medellín, M.; Díaz-Anaya, A.; Giraldo-Forero, J. Determinación de *Leptospira* spp. En humanos y bovinos pertenecientes al municipio de Toca, Boyacá. *Revista Veterinaria y Zootecnia* [Internet] 2017 [citado 5 Diciembre]; 11 (2): 55-66. Disponible en: <http://vip.ucaldas.edu.co/vetzootec/index.php/component/content/article/91-coleccion-articulos-espanol/234-determinacion-de-leptospira-spp-en-humanos>.
11. Ministerio de Salud [Internet]. San José, Costa Rica; Ministerio de Salud; [Octubre 2018; [citado 3 de Enero 2018]. Boletín Estadístico de Enfermedades de Declaración Obligatoria en Costa Rica; p. 139. Disponible en: <https://www.ministeriodesalud.go.cr/>
12. Sánchez GP. Una visión general de la leptospirosis. *Journal of Agriculture and Animal Sciences* [Internet] 2015. [Citado 16 de Oct 2018]; 4(1): 47-63. Disponible en: <http://repository.lasallista.edu.co:8080/ojs/index.php/jals/article/view/820/566>
13. Hernández Cabezas Marilys, Mauri Pérez José Luis, Vargas Yzquierdo Jorge, Hernández Cabezas Maricelys. Leptospirosis humana: un abordaje epidemiológico desde los factores ambientales. *Rev Cubana Med Gen Integr* [Internet]. 2017 [citado 4 Noviembre]; 33(1):129-138. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252017000100011&lng=es.

Immune response to the Neospora caninum recombinant proteins NcROP2 and NcSRS2 in a murine model

JESSICA LOPES BORCHARDT¹, RENATO ANDREOTTI²,
ALCEU GONCALVEZ DOS SANTOS JUNIOR³, MATHEUS COSTA DA ROSA³,
ALICE CORREA SANTOS³, RODRIGO CASQUERO CUNHA³,
FABIO PEREIRA LEIVAS LEITE^{1,3**}

¹ Department of Microbiology and Parasitology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, 96160-900 Capão do Leão, RS, Brazil.

² Department of Animal Health, Embrapa Beef Cattle, 79106-550, Campo Grande, MS, Brazil.

³ Technological Development Center, Biotechnology Division, Federal University of Pelotas, 96160-900 Capão do Leão, RS, Brazil.

Correspondencia: Jessica Lopes. lopesborchardt@gmail.com

Abstract

Neosporosis is a disease with great economic impact for the agricultural sector because it leads to high abortion rates in cattle worldwide. The causal agent is the intracellular protozoan *Neospora caninum*. An increasing number of recombinant proteins have been investigated as vaccine antigens against this disease. The studied vaccines include mainly immunodominant antigens that are functionally involved in parasite/host cell interactions. The present study evaluated, in a murine model, the immune response against two experimental vaccines containing the recombinant rNcSRS2 and rNcROP2 antigens expressed by *Escherichia coli*. The humoral response was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the cytokine transcription profile was assessed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Compared with that induced by controls, vaccines containing rNcSRS2 and rNcROP2 were able to induce significantly higher levels ($p < 0.05$) of antibodies. The rNcSRS2 protein induced lower levels of antibody production than did the rNcROP2 protein but induced a mixed Th1/Th2 response profile with higher transcription levels of interleukin (IL)-4, IL-10, INF- γ , and IL-12 mRNA in the spleen. The rNcROP2 protein stimulated a Th1 response profile, where production of higher levels of IgG2a immunoglobulins was observed and higher spleen levels of INF- γ mRNA transcription were detected. The data obtained in this study demonstrated that the rNcROP2 and rNcSRS2 proteins were able to stimulate both the cellular and humoral response in experimentally vaccinated mice.

Keywords: Neosporosis, Vaccine antigens, NcROP2, NcSRS2.

Introducción

Neospora caninum is an obligate intracellular protozoan belonging to the phylum Apicomplexa and the causal agent of neosporosis (1, 2). Neosporosis is considered the main parasitic disease responsible for bovine abortion worldwide (3), leading to high economic losses for the agricultural sector (4). To date, many compounds have been evaluated with potential for the treatment of neosporosis, but none of them has been shown to be completely effective in avoiding transmission of the protozoan. Therefore, the development of a vaccine remains as a possible alternative for neosporosis control (5). Studies of recombinant subunit vaccines have been increasing, with the goal of creating an effective, safe, and economical alternative for controlling neosporosis. These studies analyze a wide variety of targets and vaccine formulations (6-9). The main subunit vaccine antigens previously studied are the surface, rhoptry, microneme, and dense-granule proteins (10,11). Rhoptries (ROP) are secretory organelles shared by all apicomplexan invasive stages. The NcROP2 are present in the apical complex and are responsible for the penetration and formation of the parasitophorous vacuole in infected cells (12), being present in all stages of parasitic protozoa (13-15). ROP2 is the most studied rhoptry protein to date (16-18). The membrane antigens, which are important for parasite survival, are also involved in the recognition, adhesion, and invasion in host cells, as well as in the stimulation of immune responses (19, 20). The cell surface proteins previously studied include NcSAG1 and NcSRS2. The rNcSRS2 protein is an immunodominant surface protein present in *N. caninum* bradyzoites and tachyzoites (21, 22). These proteins have been considered promising candidates for vaccines that are effective for controlling the parasite because antibodies against them can block the spread of the parasite and its fetal transmission (8).

The aim of this study was to evaluate the immunogenicity and dynamics of the immune response generated by recombinant NcROP2 and NcSRS2 proteins adsorbed to aluminum hydroxide as an adjuvant in an experimental murine mode

Material and methods

Recombinant proteins

In this work, two recombinant proteins were used: rNcSRS2 and rNcROP2. rNcSRS2 was obtained following methodology described previously (23). The rNcROP2 protein was obtained following the same conditions used to obtain rNcSRS2, but the antigenic domain used consisted of a 174 amino acid (aa) sequence of the ROP2 protein described by Monney et al. (GenBank accession number: HM587954) (24). This fragment was amplified by PCR using DNA obtained from tachyzoites of the NC-1 strain of *N. caninum*, using primers with restriction sites for the enzymes *EcoRI* and *HindIII* (F1-*EcoRI* 5'-ACGAATTCCTGCGACCAGGCCA-3' and F2-*HindIII* 5'-CTCAAGCTTGGCGTGTTAGTCGGG-3'). The amplified fragment was cloned into the pET100/D-TOPO plasmid. The recombinant plasmids pET100/D-TOPO/NcSRS2 and pET100/D-TOPO/NcROP2 were used for transformation into the *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) expression strain (Invitrogen Tech, Carlsbad, CA, USA). Expression of the recombinant proteins was confirmed by SDS-PAGE and *Western blotting* using an anti-histidine monoclonal antibody (1:5.000, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) and a peroxidase-conjugated anti-mouse IgG secondary antibody (1:4.000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The proteins were purified by affinity chromatography on 1-mL HisTrap columns (GE Healthcare, UK) loaded with Ni²⁺ ions and solubilized in buffer containing 8 M urea, after which their

concentration and purity were estimated using a BCA kit (Pierce, Rockford, IL, USA) and SDS-PAGE.

Vaccination of mice

Thirty female BALB/c mice, 4 to 6 weeks old, were used. The mice were separated into 3 groups of 10 animals. Feed and water were supplied *ad libitum*. The animals were inoculated subcutaneously with 0.2 mL of vaccine formulation as follows: each animal from Group 1 received 25 µg of rNcROP2 adsorbed to 15% aluminum hydroxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); each animal from Group 2 received 25 µg of recombinant rNcSRS2 adsorbed to 15% aluminum hydroxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); and each animal from Group 3 received only PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.4) with 15% aluminum hydroxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After 21 days, vaccination was repeated in all groups using the same vaccine dose as described above. Blood samples were collected by submandibular puncture immediately before each immunization (days 0 and 21) as well as on days 7, 14, 28, and 35 after the first vaccination. Sera were separated from whole blood and stored at -20°C until analysis. The entire experiment was reviewed and approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (EAEC No. 9339 and EAEC No. 9651) of the Federal University of Pelotas (UFPel).

Evaluation of IgG dynamics

The antibody responses were evaluated by indirect ELISA as described by Pinheiro et al. with modifications (25). The recombinant rNcSRS2 and rNcROP2 proteins were used as sensitization antigens. In short, microplates (CRAL, Cotia, SP, Brazil) were sensitized with 100 µL of a suspension containing 100 ng/well of the recombinant antigens, diluted in carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6, at 4°C overnight, and subsequently washed three times with 200 µL/well of PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T). The plates were then blocked with PBS-T containing 5% fat-free milk powder at 37°C for 1 h, after which the plates were washed three times with PBS-T. The individual sera were diluted 1:100 in PBS-T and added to the wells in duplicate (100 µL/well), and the plates were incubated at 37°C for 1 hour. The plates were then washed three times with PBS-T, followed by addition of 100 µL of peroxidase-conjugated anti-mouse IgG monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluted 1:4,000 in PBS-T and incubation of the plates at 37°C for 90 minutes. After incubation, the plates were washed five times with PBS-T, followed by the addition of 100 µL of substrate solution. Each milliliter of the substrate buffer contained 0.4 mg of ortho-phenylenediamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 15 µL of H₂O₂. The substrate reaction was allowed to proceed for 15 minutes in the dark at room temperature, and then the reaction was stopped by addition of 50 µL of 2 N sulfuric acid per well. Absorption was read on a microplate reader

(ThermoPlate, Rio de Janeiro, Brazil) using a 492-nm filter. Subsequently, the same procedure was applied for the titration step using serial dilutions of the pooled sera of each experimental group from collection day 35 starting from the 1:128 dilution, where an absorbance below 0.010 for the mean of the duplicates was considered an absence of antibodies. For analysis of the IgG1 and IgG2a isotypes, the serum samples were grouped by experimental group and by collection date (days 14, 21, 28, and 35) and analyzed according to the instruction manual of the Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Splenocyte culture and RNA extraction

Thirty-five days after the first vaccine inoculation, four mice from each group were sacrificed for aseptic removal of the spleen. Splenocytes were cultured in RPMI 1640 (Cultilab, São Paulo, SP, Brazil) containing 10% fetal bovine serum (FBS). Next, the cells were seeded at a concentration of 2×10^6 cells/well in 24-well microtiter plates. Cells were incubated for 24 h at 37°C in an atmosphere with 5% CO₂. The splenocytes were stimulated with 1 mL of medium containing 10 µg/mL of rNcSRS2, rNcROP2 or concanavalin A (ConA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); one group remained unstimulated, receiving only RPMI-1640 containing 10% FBS. ConA and RPMI were used as positive and negative controls, respectively, for cellular stimuli. Cells were incubated for 18 h in the same conditions and then collected in TRIzol® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and stored at -70°C. Total RNA was extracted from the cells by the TRIzol® method according to the manufacturer's instructions. cDNA synthesis and qPCR

The cDNA synthesis was performed using 300 ng/µL RNA following the instructions provided by the manufacturer of the high-capacity reverse transcription kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) and stored at -20°C. The relative transcription levels of the mRNA of the interleukin (IL)-4, IL-10, IL-12, and INF-γ cytokine genes were quantified by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) in a STRATAGENE M × 3005P system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) according to the amplification conditions for each gene described by Avila et al. (26). All analyses were performed in triplicate, and a cDNA-free control was included to detect non-specific contamination or reactions. The cycle threshold value (C_T) was defined as the number of PCR cycles required for the fluorescence signal to cross the threshold. The β-actin and GAPDH genes were used as endogenous controls, but later, the transcription of β-actin (F: AACGCCCTTCATTGAC and R: TCCACGACATACTCAGCAC) was selected as an internal standard based on its efficiency (1.8 and 1.98 for GAPDH and β-actin, respectively). The primer sequences used to amplify the IL-4, IL-10, IL-12, and INF-γ genes have been described previously (27). The comparative cycle threshold ($\Delta\Delta C_t$) was used to determine the relative amount of mRNA for each

reference gene relative to the β -actin gene, according to the method described previously (28).

Statistical analysis

Data analysis was performed using Statistix 10.0® software. The Shapiro-Wilk test was used to assess the normality of the data. Data from total IgG levels and antibody titers were log-transformed to become parametric. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test were used to compare means since the data had a normal distribution. The significance level was set at $p < 0.05$. The graphs were generated using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)

Results

Expression of rNcROP2 and rNcSRS2

Using the *Western blot* technique, it was possible to confirm that the rNcSRS2 and rNcROP2 proteins were expressed in *E. coli* BL21 Star (DE3) and were recognized by antibodies present in positive bovine sera naturally infected with *N. caninum* (confirmed by RIFI), diluted 1:100, as visualized after incubation with peroxidase-conjugated anti-bovine IgG antibody diluted 1:6.000 (Figure 1).

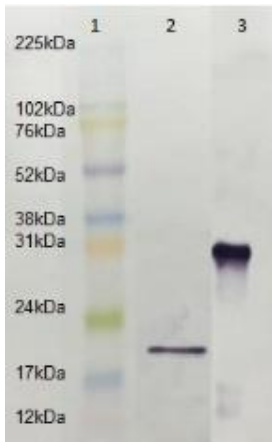


Figure 1. *Western blot* of the rNcSRS2 and rNcROP2 proteins. The figure shows proteins expressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography, incubated with bovine serum positive for *N. caninum* by IFAT, 1- Amersham ECL Full-Range Rainbow molecular weight marker, 2- rNcROP2 (20 kDa), and 3- rNcSRS2 (30 kDa).

Dynamics of total anti-rNcROP2 and anti-rNcSRS2 IgG

Specific antibodies produced in response to the rNcROP2 vaccine were detected on day 14, showing a significant difference ($p < 0.05$) relative to the control group and the group that received the rNcSRS2 vaccine and persisting until the end of the experiment. After the second vaccine inoculation (on day 21), there was an increase in total IgG on days 28 and 35. In the group vaccinated with rNcSRS2, specific antibodies exhibited a significant difference ($p < 0.05$) only relative to the

control group, from day 21 until the end of the experiment. There was a significant increase in total IgG on day 28 after the second dose of the vaccine; furthermore, the antibodies produced against rNcSRS2 were already declining on day 35. The negative control group did not react to the antigens (ELISA values below 0.003) throughout the experiment (Figure 2a).

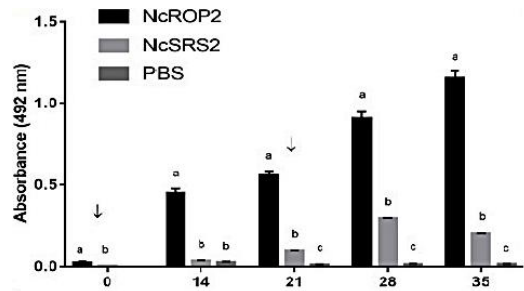


Figure 2a. Dynamics of IgGs. (a) ELISA of the dynamics of total IgG immunoglobulin induced by the recombinant vaccines NcROP2, NcSRS2 and PBS (control group).

When sera from animals that received the rNcROP2 and rNcSRS2 vaccines were titrated, the group vaccinated with rNcROP2 exhibited serum titers of 1:32,768, while the group vaccinated with rNcSRS2 had titers of 1:1,124, values that were significantly lower than those of the rNcROP2 group (Figure 2b).

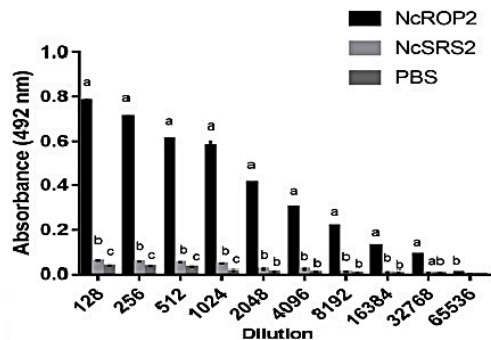


Figure 2b. ELISA of the antibody titers generated by the recombinant vaccines NcROP2, NcSRS2 and PBS (control group).

The IgG isotyping showed that the group vaccinated with rNcROP2 had higher ELISA values, with higher levels of IgG1 and IgG2a ($p < 0.05$) at all times evaluated in the experiment (14, 21, 28, and 35 days) (Figure 2c). In the evaluation of isotypes, the group vaccinated with rNcSRS2 had an IgG2a/IgG1 ratio ranging from 0.350 to 0.490, suggesting a mixed Th1/Th2 response in this group. The IgG2a/IgG1 ratio of the group vaccinated with rNcROP2 was similar to that of the rNcSRS2 group on days 14 and 21, with values of 0.390 and 0.443, respectively. After the second inoculation of antigen, the IgG2a/IgG1 ratio on days 28 and 35 increased in this group (rNcROP2), with values of 0.711 and 0.812, respectively, suggesting a change in the immune response profile towards a Th1 response (Figure 2d).

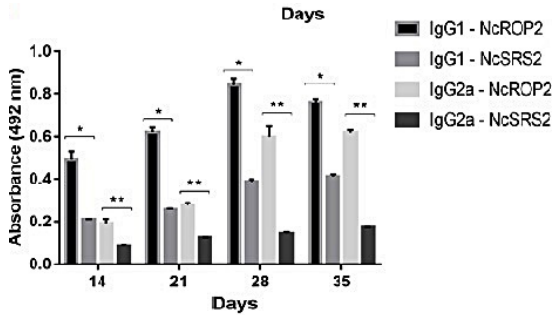


Figure 2c. Analysis of the dynamics of IgG1 and IgG2a induced by the recombinant vaccines rNcROP2 and rNcSRS2 evaluated by indirect ELISA. The data represent the mean (\pm standard error) of independent experiments. The letters a, b and c, and the single (*) and double (**) asterisks indicate statistically significant differences between the groups, at a significance level of $p < 0.05$.

IgG2/IgG1	Day 14	Day 21	Day 28	Day 35
NcROP2	0,390	0,443	0,711	0,812
NcSRS2	0,350	0,490	0,370	0,410

Figure 2d. Ratio of immunoglobulins IgG2a / IgG1 induced by the recombinant vaccines rNcROP2 and rNcSRS2 evaluated by indirect ELISA.

Quantification of cytokine transcription

Transcription levels of ex vivo cytokines from splenocytes collected on day 35 of the experiment were assessed by qPCR. Experimental vaccines demonstrated a distinct cytokine transcription profile in the spleen. Stimulation of splenocytes from rNcSRS2-vaccinated animals induced a 5-fold increase in IL-12 transcription ($p < 0.05$), a 5-fold increase in INF- γ ($p < 0.05$), a 9-fold increase in IL-4 ($p < 0.05$), and a 10-fold increase in IL-10 ($p < 0.05$), compared to the control. Stimulation of the splenocytes from rNcROP2-vaccinated animals generated a 4-fold increase in IL-12 ($p < 0.05$) transcription, an 18-fold increase in INF- γ mRNA transcription ($p < 0.05$), a 1.7-fold increase in IL-4 transcription ($p < 0.05$), and a 2-fold increase in IL-10 transcription ($p < 0.05$), compared to the control group (Figure 3).

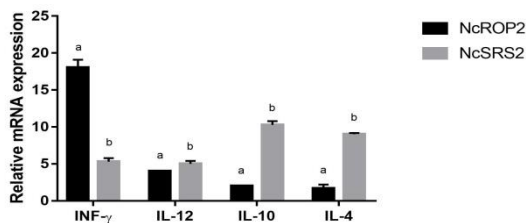


Figure 3. Cytokines transcription. Relative expression of cytokine mRNAs in splenocytes stimulated with the recombinant proteins NcROP2 and NcSRS2 from mice evaluated on day 35 of the experiment. The INF- γ , IL-12, IL-10 and IL-4 values were calculated based on cycle threshold (C_T) values normalized for the C_T values obtained from animals of the control group. The results are expressed as mean \pm standard error. The letters a, b indicates statistical difference between groups ($p < 0.05$).

Discussion

Antibodies against different antigens of *N. caninum*, including NcSRS2 and NcROP2, may inhibit binding to host cells and the invasion process (16, 17, 29-32).

Immunity to intracellular *N. caninum* is primarily cell-mediated and is usually associated with a Th1 response, dominated by the production of IgG2a antibodies, whereas a Th2 response does not promote effective protection and may lead to disease progression (33, 34). However, during pregnancy in mammals, a physiological modulation occurs that leads to a reduction in the Th1 response profile, with a prevalence of the Th2 response profile to ensure embryo viability (35, 36). In studies in which the objective of immunization was to protect against fetal infection and abortion, a Th2 immune response was able to inhibit protozoan proliferation and spread during pregnancy (16). It has been demonstrated in murine models that immunity to *N. caninum* is dependent on the effects of IL-12 and INF- γ cytokines and that host resistance seems to be correlated with the balance between Th1 and Th2 responses (32, 37-39). In the present study, we observed a greater tendency towards mixed production of IgG1 and IgG2a in mice vaccinated with rNcSRS2 and a greater tendency towards the production of IgG2a in mice vaccinated with rNcROP2. In a study conducted by DEBACHE et al. (16), the group vaccinated with rNcROP2 in incomplete Freund's adjuvant exhibited an IgG2a titer greater than the IgG1 titer. In turn, when using saponin as an adjuvant, higher IgG1 titers were obtained. This result suggests that rNcROP2-mediated protection against experimental brain infection by *N. caninum* in mice is associated with immune responses generated by IgG1 and IgG2a, indicating that both Th1 and Th2 pathways may confer protection in this infection model. In the present study, we used the adjuvant aluminum hydroxide, which is responsible for forming a long-lasting antigen deposit at the injection site and promoting the recognition of antigens by antigen-presenting cells (APCs) (40-42). This adjuvant induces antibody production and a Th2 response (humoral response) through activation of NALP3 inflammasomes (43). Aluminum hydroxide is known to be a relatively weak adjuvant as it is not effective with all antigens and stimulation of the cell-mediated response is very weak (44). Other studies have also shown a reduced ability to induce a cytotoxic response due to the inhibition of access of antigens to MHC class I (45). In this study, there was an initial stimulation of IgG1 isotype production by vaccination with rNcROP2 using aluminum hydroxide as an adjuvant, but after the second vaccination dose, the IgG2a/IgG1 ratio increased, and higher transcription levels of INF- γ mRNA were detected by qPCR, suggesting a modulation of the immune response towards Th1. Our results corroborate the findings of PASTOR-FERNÁNDEZ et al. (46), who used only NcROP2 adsorbed to the Quil-A adjuvant as the vaccine antigen

and obtained significant levels of IFN- γ . By analyzing the IgG2a/IgG1 ratio generated by the vaccine containing the recombinant NcSRS2 antigen, we observed a mixed Th1/Th2 response profile, suggesting that the transcription of IL-4, IL-10, IL-12, and INF- γ RNA played a role in modulating this response. In the study using native NcSRS2 protein, higher antigen-specific IgG1 subtype titers were observed, suggesting an immune response modulated towards a Th2 response (47). Similarly, to this work, other studies that used immunization with the rNcSRS2 protein as the single vaccine antigen did not observe the induction of high levels of total IgG antibodies, nor protection after challenge (48-50). However, when NcSRS2 was combined with other antigens, a higher protection rate was observed (49). Thus, it was assumed that recombinant NcSRS2 protein might lack relevant immuno-protective or B-cell epitopes (48). However, conversely, considering the study, this protein can maintain the same response profile despite being expressed by another expression vector, *Pichia pastoris* (51). This yeast has been shown to be useful for the expression of heterologous proteins (52) since it has the ability to promote post-translational modifications and the secretion of heterologous proteins in soluble form (53). Studies have demonstrated the advantages of using this yeast in prokaryotic-based expression systems (54,55). It is also known that this eukaryotic system preserves the characteristics of the recombinant antigen and glycosylation, which may be important in its recognition by the immune system. However, in comparison to our study utilizing the prokaryotic expression system of *Escherichia coli* bacteria, it was not possible to detect differences in the identity of the recombinant protein expressed by these two vectors, as they stimulated similar immune response intensities and profiles in the immunized animals. For maintenance of pregnancy, it is known that a predominantly Th2 environment is required at the maternal-fetal interface and that a Th1 response against the parasite may have compromising effects. Therefore, because both humoral and cell-mediated immune responses are important components of the protective immunity against *N. caninum*, immunization against *N. caninum* must stimulate a balanced Th1/Th2 immune response that is able to control the infection and does not interfere with pregnancy (39, 56). A vaccine can neutralize the effects of an intense inflammatory response to ensure fetal viability and maintain pregnancy, but it must be simultaneously effective in preventing the proliferation and spread of the parasite (57). Here, we achieved a considerable production of antibodies against the antigen rNcROP2, which also stimulated a Th1 response, accompanied by significantly higher levels of INF- γ mRNA expression. With the rNcSRS2 antigen, we obtained a low antibody production rate, but the obtained IgG2a/IgG1 ratio differed, suggesting a mixed Th1/Th2 response, accompanied by significantly higher transcription levels of IL-4, IL-10, IL-12, and INF- γ mRNA.

As a limitation of this work, it was not possible to challenge the animals vaccinated with the *N. caninum* agent. Therefore, other studies are necessary to evaluate the real action of the studied antigens in protection against the challenge of both brain and congenital infection. The results for the cytokines are based on spleen transcription and not protein quantification; however, there is evidence to suggest a good correlation between the level of mRNA and the level of its corresponding protein (58, 59).

Based on these findings, (one can suggest) that a group with both proteins might give more information. However, this was out of the scope of this study, where our interest was the study of immunogenicity of both proteins alone. The production of a vaccine combining these two recombinant antigens may be promising, as it would be an alternative for the stimulation of a more potent and mixed Th1/Th2 immune response, which is very important, aimed at the control of bovine neosporosis.

Conclusion

In conclusion, the data obtained in this study suggest that recombinant NcROP2 and NcSRS2 proteins are promising for use in vaccines against neosporosis, as they stimulated Th1 and Th2 responses in experimentally vaccinated mice. The rNcROP2 protein stimulated higher levels of antibodies than did the rNcSRS2 protein, but the latter showed a tendency towards a mixed Th1/Th2 response. Further studies are needed to better understand the mechanisms involved in the immune response and in the protection mediated by these antigens.

References

1. Pereira GR, Vogel FSF, Bohrer RC, Da Nóbrega JE, Ilha GF, Da Rosa PRA, et al. *Neospora caninum* DNA detection by TaqMan real-time PCR assay in experimentally infected pregnant heifers. *Vet Parasitol.* 2014; 199(3-4): 129–135.
2. Li W, Liu J, Wang J, Fu Y, Nan H, Liu Q. Identification and characterization of a microneme protein (NcMIC6) in *Neospora caninum*. *Parasitol Res.* 2015; 114(8): 2893–2902.
3. Dubey JP, Schares G. Neosporosis in animals-the last five years. *Vet Parasitol.* 2011; 180(1-2): 90–108.
4. Reichel MP; Ayanegui-Alcérreca MA; Gondim LFP; Ellis JT. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion-dollar question. *Int J Parasitol.* 2013; 43(2):133–142.

5. Weston JF, Heuer C, Williamson NB. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. *Prev Vet Med.* 2012; 103(2-3): 136-144.
6. Nishikawa Y, Mikami T, Nagasawa H. Vaccine Development against *Neospora caninum* Infection. *J Vet Med Sci.* 2002; 64(1): 1–5.
7. Hecker YP, Venturini MC, Campero, CM, Odeón AC, Moore, DP. Avances en el desarrollo de vacunas contra la neosporosis bovina. *Rev Argent Microbiol.* 2012; 44(3): 216–230.
8. Hemphill A, Debache K, Monney T, Schorer M, Guionaud C, Alaeddine F, et al. Proteins mediating the *Neospora caninum*-host cell interaction as targets for vaccination. *Front Biosci.* 2013; 5: 23–36.
9. Ojo KK, Reid MC, Siddaramaiah LK, Muller J, Winzer P, Zhang Z, et al. *Neospora caninum* calcium-dependent protein kinase 1 is an effective drug target for neosporosis therapy. *PLoS one.* 2014; 9(3).
10. Hemphill A, Muller J. Vaccines and drugs against *Neospora caninum*, an important apicomplexan causing abortion in cattle and other farm animals. *Rep Parasitol.* 2015; 4: 31–41.
11. Weber FH, Jackson J, Sobeck B, Choromanski L, Olsen L M, Meinert T, et al. On the efficacy and safety of vaccination with live tachyzoites of *Neospora caninum* for prevention of Neospora-associated fetal loss in cattle. *Clin Vaccine Immunol.* 2013; 20(1): 99–105.
12. Martin AM, Liu T, Lynn BC, Sinai AP. The *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: Transactions across the border. *J Eukaryot Microbiol.* 2007; 54(1): p.25–28.
13. Dubremetz JF. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cell Microbiol.* 2007; 9(4): 841–848.
14. Martin AM, Liu T, Lynn BC, Sinai, AP. The *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: Transactions across the border. *J Eukaryot Microbiol.* 2007; 54(1): 25–28.
15. Talevich E, Kannan N. Structural and evolutionary adaptation of rhoptry kinases and pseudokinases, a family of coccidian virulence factors. *BMC evolutionary biology.* 2013; 13(1): 117.
16. Debache K, Guionaud C, Alaeddine F, Mevissen, M, Hemphill, A. Vaccination of mice with recombinant NcROP2 antigen reduces mortality and cerebral infection in mice infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol.* 2008; 38(12): 1455–1463.
17. Debache K, Alaeddine F, Guionaud C, Monney T, Muller J, Strobusch M, et al. Vaccination with recombinant NcMIC1 and NcMIC3 reduces cerebral infection and vertical transmission in mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol.* 2009; 39(12): 1373–1384.
18. Debache K, Guionaud C, Alaeddine F, Hemphill A. Intraperitoneal and intra-nasal vaccination of mice with three distinct recombinant *Neospora caninum* antigens results in differential effects with regard to protection against experimental challenge with *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitology.* 2010; 137(2): 229–240.
19. Hiasa J, Kohara J, Nishimura M, Xuan X, Tokimitsu H, Nishikawa Y. ELISAs based on rNcGRA7 and rNcSAG1 antigens as an indicator of *Neospora caninum* activation. *Vet Parasitol.* 2012; 187(3-4): 379–385.
20. Dong J, Otsuki T, Kato T, Kohsaka T, Ike K, Park EY. Development of two murine antibodies against *Neospora caninum* using phage display technology and application on the detection of *N. caninum*. *PLoS One.* 2013; 8(1): 1–9.
21. Fuchs N, Sonda S, Gottstein B, Hemphill A. Differential expression of cell surface and dense granule-associated *Neospora caninum* proteins in tachyzoites and bradyzoites. *J Parasitol.* 1998; 84(4): 753-758.
22. Hemphill A, Gottstein B. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitol Res.* 1996; 82(6): 497-504.
23. Borsuk S, Andreotti R, Leite FP, Da silva PL, Simionatto S, Hartleben CP, et al. Development of an indirect ELISA NcSRS2 for detection of *Neospora caninum* antibodies in cattle. *Vet Parasitol.* 2011; 177(1-2): 33–38.
24. Monney T, Rutti D, Schorer M, Debache K, Grandgirard D, Leib SL, et al. RecNcMIC3-1-R is a microneme- and rhoptry-based chimeric antigen that protects against acute neosporosis and limits

- cerebral parasite load in the mouse model for *Neospora caninum* infection. *Vaccine*. 2011; 29(40): 6967–6975.
25. Pinheiro AF, Borsuk S, Berne MEA, Pinto, LS, Andreotti R, Roos T, et al. Expression of *Neospora caninum* NcSRS2 surface protein in *Pichia pastoris* and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection. *Pathog glob health*. 2013, 107(3): 116-121.
 26. De avila LFDC, De leon PMN, De moura MQ, Berne MEA, Scaini CJ, Leite FPL. Modulation of IL-12 and IFN- γ by probiotic supplementation promotes against *Toxocara canis* infection in mice. *Parasite Immunol*. 2016; 38(5): 326-330.
 27. Cardona PJ, Gordillo S, Díaz J, Tapia G, Amat I, Pallarés A, et al. Widespread bronchogenic dissemination makes DBA/2 mice more susceptible than C57BL/6 mice to experimental aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 2003; 71(10): 5845–5854.
 28. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-408.
 29. Hemphill A. Subcellular localization and functional characterization of Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. *Infect Immun*. 1996; 64(10): 4279–4287.
 30. Augustine PC, Jenkins MC, Dubey JP. Effect of polyclonal antisera developed against dense granule-associated *Neospora caninum* proteins on cell invasion and development in vitro by *N. caninum* tachyzoites. *Parasitology*. 1999; 119(5): 441–445.
 31. Nishikawa Y, Xuan X, Nagasawa H, Igarashi I, Fujisaki K, Otsuka H, et al. Monoclonal antibody inhibition of *Neospora caninum* tachyzoite invasion into host cells. *Int J Parasitol*. 2000; 30(1): 51–58.
 32. Hemphill A, Aguado-Martínez A, Muller J. Approaches for the vaccination and treatment of *Neospora caninum* infections in mice and ruminant models. *Parasitology*. 2016; 143(3): 245–259.
 33. Long MT, Baszler TV, Mathison BA. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. *J Parasitol*. 1998; 84(2): 316–320.
 34. Long MT, Baszler TV. Neutralization of maternal IL-4 modulates congenital protozoal transmission: comparison of innate versus acquired immune responses. *J Immunol*. 2000; 164(9): 4768–4774.
 35. Innes EA, Andrianarivo AG, Bjorkman C, Williams DJ, Conrad PA. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol*. 2002; 18(11): 497–504.
 36. Quinn HE, Ellis JT, Smith NC. *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? *Trends Parasitol*. 2002; 18(9): 391–394.
 37. Khan IA, Schwartzman JD, Fonseka S, Kasper LH. *Neospora caninum*: Role for immune cytokines in host immunity. *Exp Parasitol*. 1997; 85(1): 24-34.
 38. Baszler TV, Long MT, Mcelwain TF, Mathison BA. Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *Int J Parasitol*. 1999; 29(10): 1635–1646.
 39. Innes EA, Vermeulen AN. Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma* and *Neospora*. *Parasitology*. 2006, 133(S2): 145-168.
 40. Lambrecht BN, Kool M, Willart MA, Hammad H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr Opin Immunol*. 2009; 21(1): 23-29.
 41. Marrack P, Mckee AS, Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9(4): 287-293.
 42. Mckee AS, Macleod MKL, Kappler JW, Marrack P. Immune mechanisms of protection: can adjuvants rise to the challenge? *BMC Biology*. 2010; 8(1): 37.
 43. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*. 2008; 9(8): 847-856.
 44. Schirmbeck R, Melber K, Kuhrober A, Janowicz ZA, Reimann J. Immunization with soluble hepatitis B virus surface protein elicits murine H-2 class I-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses in vivo. *J Immunol*. 1994; 152(3): 1110-1119.

45. Harris SJ, Woodrow SA, Gearing AJ, Adams, SE, Kingsman AJ, Layton GT. The effects of adjuvants on CTL induction by V3:Ty-virus-like particles (V3-VLPs) in mice. *Vaccine*. 1996; 10(14): 971-976.
46. Pastor-Fernández I, Arranz-Solís D, Regidor-Cerrillo J, Álvarez-García G, Hemphill A, García-Culebras A, et al. A vaccine formulation combining rhostry proteins NcROP40 and NcROP2 improves pup survival in a pregnant mouse model of neosporosis. *Vet Parasitol*. 2015; 207(3–4): 203–215.
47. Haldorson GJ, Mathison BA, Wenberg K, Conrad PA, Dubey JP, Trees, AJ, et al. Immunization with native surface protein NcSRS2 induces a Th2 immune response and reduces congenital *Neospora caninum* transmission in mice. *Int J Parasitol*. 2005; 35(13): 1407-1415.
48. Cannas A, Naguleswaran A, Muller N, Eperon S, Gottstein B, Hemphill A. Vaccination of mice against experimental *Neospora caninum* infection using NcSAG1 and NcSRS2 based recombinant antigens and DNA vaccines. *Parasitology*. 2003; 126(4): 303–312.
49. Tuo W, Zhao Y, Zhu D, Jenkins MC. Immunization of female BALB/c mice with *Neospora* cyclophilin and/or NcSRS2 elicits specific antibody response and prevents against challenge infection by *Neospora caninum*. *Vaccine*. 2011; 29(13): 2392-2399.
50. Nishikawa Y, Xuan X, Nagasawa H, Igarashi I, Fujisaki K, Otsuka H, et al. Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice by recombinant vaccinia virus carrying NcSRS2 gene. *Vaccine*. 2001; 19(13-14): 1710-1716.
51. Pinheiro AF, Roloff BC, Da silveira Moreira A, Berne MEA, Silva RA, Leite FPL. Identification of suitable adjuvant for vaccine formulation with the *Neospora caninum* antigen NcSRS2. *Vaccine*. 2018; 36(9): 1154-1159.
52. Cos O, Ramon R, Montesinos JL, Valero F. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microb Cell Fact*. 2006; 5(17).
53. Cereghino GP, Cregg JM. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr Opin Biotechnol*. 1999; 10: 422–427.
54. Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, Topper MJ. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J Am Vet Med Assoc*. 1988; 193:1259–1263.
55. Cereghino GP, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol*. 2002; 13(4):329–332.
56. Hemphill A, Vonlaufen N, Naguleswaran A. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during Infection with *Neospora caninum*. *Parasitology*. 2006; 133(3): 261–278.
57. Petrovsky N, Cooper PD. Carbohydrate-based immune adjuvants. *Expert Ver Vaccines*. 2011; 10:523–537.
58. Line SR., Liu X, De souza AP, Yu, F. Translational signatures and mRNA levels are highly correlated in human stably expressed genes. *BMC genomics*. 2013; 14(1): 268.
59. Shebl FM, Pinto LA, Garcia-Piñeres A, Lempicki R, Williams M, Harro C, Hildesheim A. Comparison of mRNA and protein measures of cytokines following vaccination with human papillomavirus-16 L1 virus-like particles. *Cancer Epidemiol Biomarkers*. 2010; 19(4): 978-981.

Análise parasitológica em folhas de alface (*Lactuca sativa*) e agrião (*Nasturtium officinale*) comercializadas no Município de Cachoeiro de Itapemirim, es, Brasil

LUCAS MENDES FERREIRA¹, JANINE DE SOUZA DELLORTO², LAÍS VIGUINI VAZZOLLÉR³
VÍCTOR MENEZES TUNHOLI ALVES⁴

- ¹ Biomédico, mestrando no Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brasil.
- ² Biomédica, graduada pela Faculdade Multivix, Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, Brasil.
- ³ Biomédica, discente do curso de Medicina, Faculdade Multivix, Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, Brasil.
- ⁴ Médico Veterinário, Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rio de Janeiro, Brasil.

Correspondencia: lmendesf1@gmail.com

Resumo

A ingestão de hortaliças cruas indevidamente higienizadas configura como importante via de infecção humana, por veicular ovos e larvas de helmintos, bem como cistos e oocistos de protozoários altamente patogênicos. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a taxa de contaminação parasitária em amostras de alface (*Lactuca sativa*) e agrião (*Nasturtium officinale*) comercializadas em dois supermercados, dois hortifrúts e uma feira popular situados no município de Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, Brasil. Após a coleta, as respectivas hortaliças foram acondicionadas em sacolas plásticas previamente identificadas com etiquetas, denotando a procedência das amostras em cada estabelecimento. As mesmas foram mantidas sob-refrigeração a temperatura de 4,0 °C em um prazo curto de tempo, até o processamento laboratorial. As amostras foram destinadas ao laboratório de Parasitologia da Faculdade Multivix para análises laboratoriais, utilizando para isto o método de sedimentação espontânea e a técnica de centrifugo- flutuação simples. Após execução das técnicas, constatou-se que 78% das amostras estavam contaminadas por parasitos, dos quais larvas de nematoides (20%) e oocistos de coccídeos (38%) foram as estruturas parasitárias mais prevalentes. A contaminação de coleções hídricas utilizadas para irrigação e formas inadequadas de manejo e cultivo são os principais fatores contribuintes para a contaminação destas hortaliças. Levando em consideração os resultados obtidos neste estudo, faz-se necessário o emprego de medidas educativas de higiene no preparo das hortaliças, além do uso de métodos de cultivo apropriados e eficaz no controle de qualidade dos alimentos.

Palavras-chave: Qualidade Parasitológica. Hortaliças. Enteroparasitas

Summary

The swallowing of improperly sanitized, raw vegetables is configured as an important way of human contamination, by transferring eggs and maggots of helminths, as well as cysts and oocysts of highly pathogenic protozoa. This way, the current paper aimed to evaluate contamination rates of parasites in lettuce (*Lactuca sativa*) and watercress (*Nasturtium officinale*) samples which are commercialized in two supermarkets, two hortifrutis and one popular market located in the city of Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, Brazil. After collecting, the respective vegetables were conditioned in plastic bags previously identified with tags, betokening the precedence of the samples of each market. They were kept under refrigeration of a temperature of 4° C in a short deadline time, until laboratorial processing. The samples were intended to the Multivix's Parasitology laboratory, in order to be analyzed, using both spontaneous sedimentation and simple centrifugal-floating methods. After executing the techniques, it was verified that 78% of the samples were contaminated for parasites, of which nematodes maggots (20%) and coccids oocysts (38%) were the most prevalent parasites structures. The contamination of hydric collections used for irrigation plus incorrect ways of management and cultivation are the main contributing factors for the contamination of the vegetables. Considering the results obtained in this study, it is needed the insertion of educative measures of sanitation in the preparation of the vegetables, beyond the use of proper and efficient cultivation methods in the quality control of the foods.

Keywords: Parasitological quality. Vegetables. Enteroparasites

Introdução

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017), cerca de 23.728 toneladas de agrião e 908.186 toneladas de alface foram produzidos no Brasil em 2017, sendo 70,7% do agrião e 65,2% da alface produzidos na região Sudeste.

O alto consumo destas hortaliças pode estar associado a fatores adotados pela população global. Com a chegada do novo século percebeu-se uma preocupação nos hábitos alimentares da população, priorizando alimentos que possuem baixo teor de gordura, além da grande concentração de fibras, minerais e vitaminas, propriedades que favorecem a prevenção contra obesidade e doenças associadas aos hábitos alimentares (1,2)

Silva e Gontijo (2012; 3) afirmam que as hortaliças tornaram-se objetos de estudos investigativos em todo o mundo, uma vez que são considerados alimentos potenciais na transmissão de parasitos intestinais ao

homem, principalmente por serem consumidas na forma crua e sem tratamentos que visam à redução dos riscos microbiológicos e parasitológicos. Neste contexto, as hortaliças se mostram suscetíveis à contaminação por protozoários e helmintos, desde o cultivo até o consumo (4). Este ciclo de contaminação poderá ser atribuído a uma irrigação com água contaminada por dejeções humanas e animais, a contaminação do solo por adubo orgânico contendo estruturas pré-parasitárias infectantes, falta de higienização e educação sanitária dos manipuladores, bem como a má higienização do alimento por parte do consumidor (5-7).

Durante execução de estudo epidemiológico que avaliou a taxa de prevalência de parasitos em hortaliças comercializadas na cidade de Santos, São Paulo, Brasil, Silva e Gagliani (2007; 8) verificaram que das 90 amostras analisadas, 71 foram consideradas positivas (74%). Dentre as estruturas parasitárias encontradas, cistos de *Entamoeba coli* 28 (31%); e ovos de *Ascaris lumbricoides* 20 (21%); *Toxocara canis* 16 (17%) e de Ancylostomídeos nove (10%) foram os mais

prevalentes. Em trabalho publicado por Norberg et al. (2008; 9), a alface e o agrião apresentaram os maiores percentuais de contaminação por enteroparasitos em comparação a outras hortaliças avaliadas, apresentando grande relevância para a dispersão de várias verminoses e protozooses em humanos. Tais resultados corroboram àqueles obtidos por Frias et al. (2012; 10), os quais relataram que dentre os tipos de hortaliças analisadas, o agrião obteve maior taxa de contaminação parasitária (43,75%).

Desse modo, inúmeras são as razões que justificam as análises parasitológicas de hortaliças comercializadas em estabelecimentos públicos, uma vez que as formas de produção destes alimentos podem potencializar a disseminação de verminoses e protozooses, contribuindo para o aumento da incidência e prevalência de doenças parasitárias de origem alimentar. Ademais, pode-se considerar relativamente baixo o número de trabalhos no Brasil que relatam níveis de contaminação em hortaliças que são consumidas *in natura* (6,11). Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a taxa de contaminação por helmintos ou protozoários em alfaces (*Lactuca sativa*) e agriões (*Nasturtium officinale*) comercializados em dois supermercados, dois hortifrúteis e uma feira livre situadas no município de Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, Brasil.

Material e Métodos

Foram realizados cinco ciclos de coletas em semanas distintas, onde para cada ciclo coletaram-se cinco unidades de alface (*Lactuca sativa*) e cinco unidades de agrião (*Nasturtium officinale*), totalizando cinquenta unidades avaliadas. As coletas ocorreram a partir de cinco estabelecimentos comerciais, todos localizados na sede da cidade de Cachoeiro de Itapemirim-ES, Brasil, sendo estes representados por dois supermercados, dois hortifrúteis e uma feira livre.

Após a coleta, as respectivas hortaliças foram acondicionadas em sacolas plásticas previamente identificadas com etiquetas, denotando a procedência das amostras em cada estabelecimento. As mesmas foram mantidas sob-refrigeração a temperatura de 4°C em um prazo curto de tempo, até o processamento laboratorial. As análises laboratoriais ocorreram no Laboratório de Parasitologia da Faculdade Multivix, campus II - Cachoeiro da Itapemirim, ES.

Posterior à identificação das amostras, cada unidade de alface e de agrião foi desfolhada individualmente, em recipientes plásticos e lavadas com 450 ml de água destilada, folha a folha, com auxílio de um pincel chato nº16 e pissete (12). A água resultante do processo de lavagem das hortaliças, após passar por filtragem com gaze, foi transferida para funil de vidro onde ficou num processo de decantação por 24 horas (13). O sobrenadante foi então desprezado e os sedimentos dos cálices foram homogeneizados, sendo parte (cerca de

15mL) separado em tubos de centrífuga para realização da técnica de centrífugo-flutuação simples (CFS), e parte coletado com auxílio de uma pipeta Pasteur e colocado sobre uma lâmina para observação microscópica (14). Foi realizada a leitura de duas lâminas de cada amostra em microscópio óptico, com aumento de 10x e 40x, sendo os resultados anotados em fichas individuais.

Posteriormente, o tratamento dos dados obtidos durante as análises foi realizado por meio de cálculos de frequência simples.

Resultados

Foi avaliado um total de 50 amostras de hortaliças *in natura* coletadas a partir de dois supermercados, dois hortifrúteis e uma feira livre, situados no município de Cachoeiro de Itapemirim, ES. Dentre as verduras analisadas neste estudo, a alface (84%) apresentou maior taxa de contaminação parasitária quando comparada ao agrião (68%), conforme demonstrado nas tabelas 1, 2, 3 e 4.

Das hortaliças pesquisadas, 39 (78%) apresentaram contaminadas por estruturas parasitárias de protozoários e/ou helmintos (Tabelas 1, 2, 3 e 4). Em relação às estruturas parasitárias observadas, àquelas que se mostraram mais prevalentes foram oocistos (38%).

Em adição, a técnica de centrífugo-flutuação simples (CFS) demonstrou maior sensibilidade na recuperação de ovos, oocistos e cistos de parasitos quando comparada com o método de sedimentação natural, que se mostrou mais eficiente na recuperação de larvas de nematoides (Tabelas 1, 2, 3 e 4).

CFS					
	Ovos de Ascarídeos	Cistos De Entamoebidae	<i>Ancylostoma</i> spp.	<i>Trichuris</i> spp.	Oocistos
*EST.1	03 (7,5%)	-	05 (12,5%)	04 (10%)	28 (70%)
EST.2	-	03 (14,28%)	05 (23,80%)	01 (4,7%)	12 (57,14%)
EST.3	03 (18,75%)	04 (25%)	02 (12,5%)	-	07 (43,75%)
EST.4	05 (23,31%)	03 (15,78%)	01 (21,05%)	03 (15,78%)	07 (36,84%)
EST.5	02 (22,22%)	-	04 (44,44%)	01 (11,11%)	02 (22,22%)

*Estabelecimento.

Estabelecimento 1; Estabelecimento 5 = Hortifruti; Estabelecimento 2 = Feira livre; Estabelecimento 3; Estabelecimento 4= Supermercado.

Tabela 1. Frequência de estruturas parasitárias verificadas na hortaliça alface, de acordo com a metodologia CFS.

HOFFMAN			
	Cistos de Entamoebidae	Oocistos	Larva de nematoides
*EST.1	-	31 (88,5%)	04 (11,4%)
EST.2	-	05 (100%)	-
EST.3	-	02 (50%)	02 (50%)
EST.4	12 (75%)	03 (18,75%)	01 (6,25%)
EST.5	-	16 (100%)	-

*Estabelecimento.

Estabelecimento 1; Estabelecimento 5 = Hortifruti; Estabelecimento 2 = Feira livre; Estabelecimento 3; Estabelecimento 4= Supermercado.

Tabela 2. Frequência de estruturas parasitárias verificadas na hortaliça alface, de acordo com a metodologia de sedimentação espontânea (Método de Hoffman).

CFS					
	Ovos de Ascarídeos	Cistos de Entamoebidae	<i>Ancylostoma</i> spp.	Oocistos	<i>Giardia</i> sp.
*EST.1	-	04 (50%)	-	02 (25%)	02 (25%)
EST.2	-	05 (38,46%)	01 (7,69%)	03 (23,07%)	04 (30,76%)
EST.3	-	01 (100%)	-	-	-
EST.4	01 (7,69%)	04 (30,76%)	01 (7,69%)	-	07 (53,84%)
EST.5	04 (14,28%)	01 (3,57%)	02 (7,14%)	13 (46,42%)	08 (28,57%)

* Estabelecimento.

Estabelecimento 1; Estabelecimento 5 = Hortifruti; Estabelecimento 2 = Feira livre; Estabelecimento 3; Estabelecimento 4=Supermercado.

Tabela 3. Frequência de estruturas parasitárias verificadas na hortaliça agrião, de acordo com a metodologia CFS.

HOFFMAN			
	Cistos de Entamoebidae	Oocistos	Larva de nematoides
*EST.1	-	01 (7,14%)	13 (92,85%)
EST.2	-	-	01 (100%)
EST.3	-	-	02 (100%)
EST.4	08 (42,10%)	-	11 (57,89%)
EST.5	-	-	10 (100%)

* Estabelecimento.

Estabelecimento 1; Estabelecimento 5 = Hortifruti; Estabelecimento 2 = Feira livre; Estabelecimento 3; Estabelecimento 4= Supermercado.

Tabela 4. Frequência de estruturas parasitárias verificadas na hortaliça agrião, de acordo com a metodologia de sedimentação espontânea (Método de Hoffman).

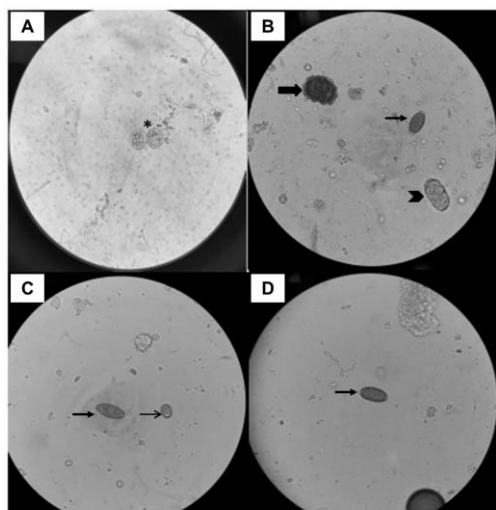


Figura 1. Estruturas parasitárias recuperadas e identificadas de ambas as hortaliças analisadas. A) Cisto de *Entamoeba coli* (*), aumento de 40x. B) Ovo de Ascarídeo (➤➤), ovo de *Trichuris* spp. (➤), oocistos de coccídeo e ovo de *Ancylostoma* spp. (➤➤), aumento de 10x. C) Ovo de *Trichuris* spp. e oocisto de coccídeo (➤➤), aumento de 10x. D) Ovo de *Trichuris* spp., aumento de 10x.

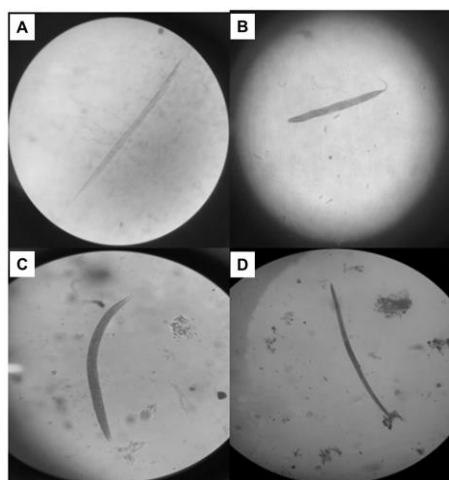


Figura 2. Estruturas parasitárias recuperadas e identificadas de ambas as hortaliças analisadas. A) Larva de nematoide, aumento de 40x. B) Larva de nematoide, aumento de 40x. C) Larva de nematoide, aumento de 40x. D) Larva de nematoide, aumento de 40x.

Discussão

Mesquita et al. (1999) (15) afirmam que tanto em áreas rurais quanto urbanas de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, em virtude à falta de saneamento básico, baixas condições higiênic-sanitárias e precariedade em políticas de educação sanitária, as parasitoses intestinais são amplamente difundidas, sendo que o consumo de hortaliças *in natura* é tido como um dos principais veículos de infecção.

Em estudo recente (14), verificaram que das 50 unidades de agrião avaliadas para a presença de estruturas parasitárias e comercializadas no município de Alegre, Espírito Santo, Brasil, 38% foram consideradas positivas. Dentre os parasitos encontrados, 4% eram compatíveis para ovos de Ascarídeos, *Taenia* e Oxyuridae e 6% para larvas de *Strongyloides*. Segundo tais autores, a contaminação de coleções hídricas com conteúdo fecal das mais diversas espécies de animais e do homem é tida como um dos principais fatores para o alarmante número de amostras positivas, chamando a atenção para a necessidade de implantação de medidas educacionais, de fiscalização e de saneamento básico por parte das autoridades locais.

O presente estudo tem constatado a partir de técnicas laboratoriais, presença de uma ampla variedade de ovos, larvas, cistos e oocistos de parasitos com potencial patogênico, em hortaliças (alface e agrião) comercializadas em cinco estabelecimentos localizados no município de Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, Brasil. Após processamento, verificou-se que 78% das amostras estavam contaminadas por parasitos, dos quais larvas de nematoides (20%) e oocistos de coccídeos (38%) foram às estruturas parasitárias mais prevalentes.

Dentre os métodos utilizados nas análises das hortaliças, a técnica de Centrifugo-flutuação simples (CFS) apresentou maior sensibilidade na recuperação de ovos, oocistos e cistos de parasitos quando comparada com o método de sedimentação natural. Tais resultados corroboram com estudos previamente realizados por outros autores (16) Para Bica; Dillenburg; Tasca (2011) (17), a maior sensibilidade verificada na técnica CFS pode em parte ser justificada uma vez que, a centrifugação favorece maior concentração de estruturas parasitárias presentes nas amostras analisadas. Em contra partida, o método de sedimentação espontânea apresentou maior sensibilidade na recuperação de larvas de nematoides, ratificando resultados obtidos por Cavalcante e Corrêa (2010) (18).

Durante as análises parasitológicas observou-se maior contaminação parasitária em folhas de alface (*Lactuca sativa*) quando comparada com o agrião (*Nasturtium officinale*). Mesma condição tem sido observada em outros estudos (14,19). Falavigna et al. (2005) (20), avaliando a frequência das principais enteroparasitoses veiculadas por hortaliças comercializadas em feiras livres na cidade de Maringá, PR, observou que, de um total de 181 amostras, 63% estavam contaminadas por ovos, oocistos e/ou cistos de parasitos. Em adição, dentre as hortaliças avaliadas por tais autores, a alface obteve maior índice de contaminação, seguida pelo agrião, contrapondo os resultados demonstrados por Santos (2007)(4), o qual observou maior tendência de contaminação no agrião.

A maior frequência de enteroparasitoses observada em folhas de alface (*Lactuca sativa*) pode ser explicada devido a sua maior susceptibilidade a contaminação,

verificada desde o cultivo até o consumo (4,5). Ademais, em virtude de apresentarem folhas largas e justapostas, a alface acaba por oportunizar maior adesão de estruturas parasitárias, a partir do solo ou da água de irrigação, favorecendo à sua contaminação (20,21). Segundo Silva e Gontijo (2012) (3), a contaminação das hortaliças pressupõe ocorrência de adubação por dejetos fecais de animais e/ou humanos parasitados, bem como a precariedade em programas de saneamento básico e princípios relativos a higiene pessoal.

Paralelamente, verificou-se maior frequência de larvas de nematoides em folhas do agrião. Tal achado fornece indícios de que há uma possível fonte de contaminação humana ou animal, estabelecida mediante utilização indevida de adubo orgânico contaminado. Outro aspecto interessante observado nesse estudo foi o aumento no número de larvas de nematoides encontradas no agrião após períodos chuvosos. Uma possível hipótese que justifica essa condição é baseada em função das características de cultivo da hortaliça. O agrião dispõe de característica semiaquática, sendo cultivado majoritariamente em regiões úmidas, situadas próximos a rios e córregos, condição que contribui para a taxa de contaminação parasitária (22).

Outra possível explicação que justifica maior recuperação de larvas de nematoides em *N. officinale* é dada em função ao comportamento atribuído a estes estágios parasitários. Sabe-se que tais larvas apresentam comportamento baseado em tropismos próprios, dentre os quais se destacam o hidrotropismo e o tigmotropismo positivos (23,24). O hidrotropismo é um fator fundamental, caracterizado pela afinidade das larvas a locais úmidos ou alagado. Já o tigmotropismo se fundamenta na associação das larvas em superfícies sólidas, caso estejam nadando na água (24). Assim, os tropismos demonstrados pelas larvas, associados aos períodos de alta pluviosidade que antecederam a coleta, bem como ao método de cultivo corroboram para o aumento de larvas obtidas no agrião. Devido à similaridade morfológica observada entre os estágios larvais dos diferentes gêneros de helmintos, optou-se por denominá-los como de larvas de nematoides.

Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo demonstram alta taxa de contaminação nas hortaliças analisadas, com 78% das verduras apresentando potencial índice de transmissão de protozoários e/ou helmintos ao homem. Tais resultados evidenciam baixo padrão higiênico-sanitário durante o cultivo destes alimentos, bem como a necessidade de se realizar uma higienização correta destas hortaliças por parte dos consumidores. Ressalta-se ainda a importância de uma fiscalização mais eficiente por parte dos órgãos sanitários competentes, dada à importância que tais alimentos apresentam para a saúde pública.

Referências

1. Heiss C, Kenn C, Kelm M. Flavonols and cardiovascular disease prevention. *Eur. Heart. J.*, 2010; 31(21): 2583-2592.
2. Reetz R, Kist B, Santos C, Carvalho C, Drum M. Anuário brasileiro de hortaliças. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2014.
3. Silva M, Gontijo E. Avaliação parasitológica de alfaces (*Lactuca Sativa*) comercializadas em supermercados e feiras livres do município de Gurupi, Tocantins. *Rev. Cien. ITPAC.* 2012; 5(4): 1-10.
4. Santos A. Investigação epidemio - parasitológica em hortaliças comercializadas em feiras livres, mercados e restaurantes do Distrito Federal. 2007. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.
5. Mattos L, Moretti C, Moura M, Maldonade I, Silva E. Produção segura e rastreabilidade de hortaliças. *Hortic. bras.*, 2009; 27(4): 408-413.
6. Melo, ACFL et. al. Contaminação parasitária de alfaces e sua relação com enteroparasitoses em manipuladores de alimentos. *Rev. Tróp. Cienc. Agr. Biol.*, 2011; 5(3):47.
7. Forsythe S. Infecções e intoxicações de origem alimentar. Porto Alegre: Artmed; 2013.
8. Silva T, Gagliani L. Prevalência de enteroparasitas em hortaliças na cidade de Santos –SP –Brasil. *Rev UNILUS Ensino e Pesquisa.* 2007; 4(7): 6-22.
9. Norberg A, Ribeiro P, Gonçalves J, Sanches F, Silveira V, Oliveira M, Ferreira G. Prevalência de ovos, larvas, cistos e oocistos de elementos parasitários em hortaliças comercializadas no município de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 2008; 8(1):12-21.
10. Frias A, Silva J, Tozato C. Ocorrência de ovos de helmintos em hortaliças comercializadas na cidade de Apucarana (PR). *Semina Cienc. Biol. Saude*, 2012; 33(1): 35-42.
11. Nolla AC, Cantos GA. Relação entre a ocorrência de enteroparasitoses em manipuladores de alimentos e aspectos epidemiológicos em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 2005; 21: 641-645.

12. Takayanagui O, Capuano D, Oliveira C, Bergamini A, Okino M, Silva A, Oliveira M, Ribeiro E, Takayanagui A. Fiscalização de hortas produtoras de verduras do município de Ribeirão Preto, SP. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2000; 33(2): 169-174.
13. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation concentration method in *Schistosoma mansoni*. Puerto Rico J. publ. Hlth., 1934; 9: 283-291.
14. Oliveira LC, Campos DR, Freire-Martins IV. Contaminação por helmintos em agrião (*Nasturtium officinale*) comercializado no município de Alegre-Espírito Santo. Parasitol. Latinoam., 2017; 66(1): 54-58.
15. Mesquita, VCL et. al. Contaminação por enteroparasitas em hortaliças comercializadas nas cidades de Niterói e Rio de Janeiro, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med.Trop., 1999;32(4): 363-366.
16. Radavelli W, Pazinato R, Klauck V, Volpato A, Balzan A, Rossett J. et al. Occurrence of gastrointestinal parasites in goats from the Western Santa Catarina, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet., 2014; 23(1): 101-104.
17. Bica V, Dillenburg A, Tasca T. Diagnóstico laboratorial da giardiose humana: comparação entre as técnicas de sedimentação espontânea em água e de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco. Rev Hosp Clín Porto Alegre, 2011; 31(1): 39-45.
18. Cavalcante M, Corrêa E. Avaliação parasitológica e condições higiênico sanitárias de hortaliças comercializadas na cidade de Cruzeiro do sul, Acre, Brasil. Univ Fed Rond. 2010; 23(262).
19. Guimarães A, Alves E, Figueiredo H, Costa G, Rodrigues L. Frequência de enteroparasitas em amostras de alface comercializadas em Lavras, Minas Gerais. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 2003; 36(5): 621-623.
20. Falavigna L, Freitas C, Melo G, Nishi L, Araújo S, Guilherme A. Qualidade de hortaliças comercializadas no noroeste do Paraná, Brasil. Parasitol Latinoam. 2005; 60(4): 144-149.
21. Guilherme A, Araújo S, Falavigna D, Pupulim A, Dias M, Oliveira H. et al. Prevalência de enteroparasitas em horticultores e hortaliças da Feira do Produtor de Maringá, Paraná. Rev Soc Bras Med Trop. 1999; 32(4): 405-411.
22. Filgueira F. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Rev Ampl. 2000: 2(1); 402.
23. Fernandes AB, Baêta BA, De Vasconcelos Filho WF, Massad FV, Rebouças FACE, Carvalho JB, Lopes CWG. Relação entre animais de companhia e parasitoses intestinais em crianças, município de Seropédica, RJ. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2008; 17(1): 296-300.
24. Rey L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
25. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário – Número de estabelecimentos agropecuários e Quantidade produzida, por produtos da horticultura – resultados preliminares. IBGE, 2017.

Ectoparásitos en *Gallus gallus domesticus* en zonas rurales de la región de la Araucanía, Chile

MARÍA JOSÉ CUEVAS¹, ROBERTO QUINTREMAN¹, LUIS ZAROR¹, RENÉ FRANJOLA²

¹ Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Ciencias, Universidad Mayor, Temuco, Chile.

² Instituto de Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

Correspondencia: Luis Zaror C., Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Ciencias, Universidad Mayor. Avenida Alemania 281, Temuco, Chile. Correo: lzaror@yahoo.es

Recibido: 14/01/2019 Aceptado: 18/06/2019

Summary

Infestation by ectoparasites is common in humans and especially in animals, where poultry is one of the most affected species. The impact of the infestation on poultry can even lead to the death of these animals. By consulting the literature about the prevalence of ectoparasites in poultry of the species *Gallus gallus domesticus*, it became clear that this one is limited around the world, especially in Chile. The frequency of ectoparasites in poultry of the species *Gallus gallus domesticus* was studied in three different rural zones belonging to the municipality of Padre Las Casas, Gorbea, and Cholchol at Region de la Araucanía, Chile. Twenty chickens were analyzed in a chosen property from each county. Samples were taken from feathers and skin from the body and head of the chickens, which were transported to the research laboratory of Universidad Mayor, Temuco, in order to analyze them. –Seventy three (73%) of chickens were infested. *Menopon gallinae* (58%), *Goniodes dissimilis* (32%), *Lipeurus caponis* (3%), *Cuclotogaster heterographus* (2%), and *Menacanthus stramineus* (2%) were identified. 64% of chickens were monoparasited, 32% presented biparasitism, and only 4% triparasitism. It was shown that chickens living in a soil mixed with ash had less presence of ectoparasites in comparison to those ones living in soil only with soil. It follows that ash directly influences the frequency of these condition.

Resumen

La infestación por ectoparásitos es frecuente en humanos y especialmente en animales, donde las aves de corral son una de las especies más afectadas. El impacto que tiene la infestación en las aves de corral puede incluso llevar a la muerte. Es escasa la bibliografía mundial sobre la prevalencia de ectoparásitos en la especie *Gallus gallus domesticus*, especialmente en Chile. Se estudió la frecuencia de ectoparásitos en la especie *Gallus gallus domesticus* en tres diferentes zonas rurales pertenecientes a las comunas de Padre Las Casas, Gorbea y Cholchol, región de La Araucanía, Chile. Se analizaron 20 aves al azar en una propiedad elegida de cada comuna. Se extrajeron muestras de plumas y piel del cuerpo y cabeza de las aves, las que fueron transportadas al laboratorio de la Universidad Mayor, sede Temuco, para su análisis. Un 73% de las aves estaban infestadas. Se identificaron: *Menopon gallinae* (58%), *Goniodes dissimilis* (32%), *Lipeurus caponis* (3%), *Cuclotogaster heterographus* (2%) y *Menacanthus stramineus* (2%). Un 64% de las aves estaban monoparasitadas, el 32% presentó biparasitismo y solo un 4% triparasitismo. Se demostró que las aves que habitan en un suelo mezclado con ceniza tenían menos presencia de ectoparásitos en comparación con las que habitaban en un suelo sólo con tierra. Se deduce que la ceniza influye directamente en la ectoparasitosis.

Palabras clave: Ectoparásitos, *Gallus gallus domesticus*, Piojos, infestación.

Introducción

Los parásitos son organismos unicelulares o pluricelulares que necesitan vivir sobre o en el interior un hospedero. Son una de las formas de vida más abundante que existe en la Tierra por lo que son un componente muy importante en la integridad del ecosistema (1,2).

Entre la gran variedad de parásitos que existen en el mundo, se pueden distinguir principalmente tres grandes grupos, helmintos, protozoos y artrópodos, cada grupo teniendo la capacidad de producir enfermedades tanto en humanos como en animales (3).

Los ectoparásitos se ubican en la superficie del hospedero, provocando una infestación. Los artrópodos pertenecen a este grupo de parásitos (4). Entre los ectoparásitos más comunes y frecuentes que producen infestaciones están los piojos, pulgas, ácaros y garrapatas (5). Este estudio se restringe a los piojos de gallinas. Estos piojos son grandes, de tórax ancho y su cabeza tiene forma de flecha, su color es rojo-gris. Se alimentan a través de su probóscide que posee tres estiletes que les permite penetrar la piel y succionar sangre (6). El ciclo de vida completo ocurre en el hospedero, que depende de diversas condiciones ambientales como temperatura y humedad. La hembra realiza la ovoposición que posteriormente da origen a

ninfas, que luego de tres mudas llega a adulto (7). Las aves de corral frecuentemente son atacadas por ectoparásitos. En algunos estudios se menciona que el 100% de las gallinas alguna vez estuvo infestadas con ectoparásitos (8), ocasionando dermatitis, pérdida de peso y pérdidas en la producción de huevos, y pueden actuar como vectores biológicos, lo que puede derivar en graves enfermedades e incluso llevar a la muerte (9). La prevalencia de los ectoparásitos en aves de corral en distintas zonas geográficas del mundo es similar. En Venezuela, un estudio reveló que entre los ectoparásitos más frecuentes que afectan a las gallinas de corral se encuentran los piojos: *Menacanthus stramineus*, *Menopon gallinae*, *Goniocotes gallinae*, *Columbicola columbae* y *Echidnophaga gallinacea* (9). Un estudio, en Nigeria, revela que la mayoría de las gallinas de corral están infestadas con especies de ectoparásitos como *Menacanthus stramineus*, *Goniocotes gallinae*, *Goniocotes gigas*, *Lipeurus caponis*, *Knemidocoptes mutans* y *Echidnophaga gallinacea* (10).

A pesar de que es similar la prevalencia de ectoparásitos en distintas partes del mundo, no provoca enfermedades graves, pero si esta población se ve alterada, pueden ocasionar cuadros severos en las aves afectadas (11). La prevalencia de ectoparásitos en *Gallus gallus domesticus* no ha sido

bien documentada ni estudiada en los últimos años. Las publicaciones hechas en Chile, según bibliografía, datan de los años 1974 y 2009 (13,14). Dado, la muerte masiva de gallinas en una zona rural de Temuco, se decidió estudiar la presencia de piojos, los que podrían haber estado involucrados en este evento (15).

Materiales y métodos

El tipo de muestreo fue no probabilístico por conveniencia, a partir de tres zonas rurales perteneciente a las comunas de Padre las Casas, Gorbea y Cholchol, de la región de La Araucanía, Chile.

Se obtuvo muestras de 60 aves, de la especie *Gallus gallus domesticus*, divididas en grupos de 20 por cada comuna. Se realizó una inspección visual utilizando una lupa, para detectar en cada ave el área de mayor infestación por ectoparásitos. Con pinzas, fueron extraídos los parásitos visibles y se transportaron al laboratorio en tubos de ensayo con alcohol al 70%. Los ectoparásitos no visibles, fueron extraídos con la ayuda de un bisturí, realizando un raspado de piel sobre el cuerpo y cabeza de las aves. Posteriormente, las muestras se depositaron en un portaobjetos, cubriéndolo con otro, y se envolvieron en hojas de papel previamente rotulado para su traslado al laboratorio de investigación de la Universidad Mayor, sede Temuco donde fueron procesadas y analizadas. Para la visualización de piojos, las muestras fueron tratadas con KOH 10% por 15 minutos para su diafanización. Posteriormente, los ectoparásitos se depositaron sobre un portaobjetos con 2 gotas de Xilol por 1 minuto, para aclararlos y retirar el resto de KOH. Luego, se realizó montaje utilizando Bálsamo de Canadá. Se observaron las láminas con microscopio óptico con 40 y 400 aumentos. Para la identificación, se utilizó descripciones, ilustraciones y/o claves taxonómicas (16,17).

Los datos se analizaron en base a un estudio no probabilístico por conveniencia, donde los resultados se presentan mediante estadística descriptiva, mostrando frecuencias y porcentajes. Se aplicó Chi cuadrado para la prueba de hipótesis con el fin de evidenciar las diferencias de frecuencias de ectoparásitos en relación con el tipo de suelo en que habitan las aves. La significancia fue evaluada al 0,05. Todo el procesamiento de datos se realizó mediante el software GraphPad versión 7, IBM SPSS Statistics versión 25 y Microsoft office Excel versión 2018.

Resultado

El 73 % de las 60 aves estudiadas, de las comunas de Padre Las Casas, Cholchol y Gorbea, presentó ectoparásitos del tipo piojos. La mayor parte de los ectoparásitos encontrados, fueron extraídos del cuerpo de las aves y en menor cantidad de la cabeza (Tabla 1).

Se encontró de la familia Philopteridae 5 especies de ectoparásitos (Fig. 1), identificándose, *Goniodes dissimilis* (32%), *L caponis* (3%) y *C heterographus* (2%).

De la familia Menoponidae se identificaron las especies *M gallinae* (58%) y *M stramineus* (2%).

La frecuencia de los ectoparásitos identificados se presenta en la Tabla 2. Aquellas aves que vivían en un suelo en el que se aplicaba ceniza presentaron menor frecuencia de ectoparásitos en comparación a aquellas que vivían en suelos no tratados. Se demostró mediante el análisis de hipótesis Chi cuadrado que existe una diferencia significativa en la presencia de ectoparásitos entre el grupo de aves que se encontraba en suelos con ceniza y las que no la estaban (Gráfico 1).

La mayoría de las aves examinadas estaban infestadas con una sola especie.

	Frecuencia	Porcentaje
Negativo	16	26,7
Cuerpo	39	65,0
Cuerpo y Cabeza	5	8,3
Total	60	100,0

Tabla 1. Porcentaje de muestras obtenidas en las diferentes zonas de muestreo en *Gallus gallus domesticus*. Región de la Araucanía, Chile.



Figura 1. Piojos en *Gallus gallus domesticus* (No a escala) encontrados en diferentes comunas de la región de la Araucanía, Chile. (A) *Menopon gallinae*, macho adulto; (B) *Menacanthus stramineus*, hembra adulta; (C) *Goniodes dissimilis*, macho adulto; (D) *Lipeurus caponis*, hembra adulto; (E) *Cuclogaster heterographus*, hembra adulto.

Ectoparásitos	Frecuencia	% Aves con Ectoparásitos
<i>Menopon gallinae</i>	35	58%
<i>Goniodes dissimilis</i>	19	32%
<i>Lipeurus caponis</i>	2	3%
<i>Menacanthus stramineus</i>	1	2%
<i>Cuclotogaster heterographus</i>	1	2%

Tabla 2. Frecuencia de ectoparásitos encontrados en tres zonas rurales de la región de la Araucanía, Chile, en *Gallus gallus domesticus*.

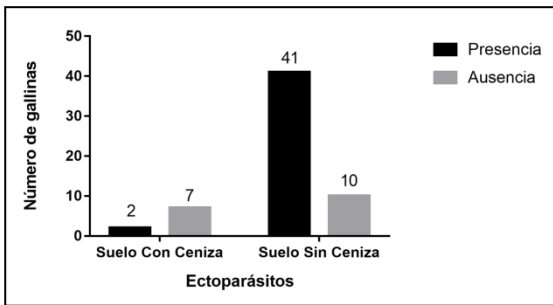


Gráfico 1. Distribución de ectoparásitos en *Gallus gallus domesticus*, que habitan en suelos con y sin ceniza. Suelo con ceniza (n=9) y suelo sin ceniza (n=51), la significancia estadística fue establecida para P <0.05.

Discusión

Las especies de ectoparásitos encontradas en *Gallus gallus domesticus* presenta la misma distribución mundial como lo demuestran estudios en Nigeria (8), Venezuela (9) e Irán (12). En Chile, los estudios que se han realizado sobre la prevalencia o frecuencia de ectoparásitos en aves de corral son escasos, aunque muestran resultados similares. Torres *et al* (13), reportaron en Valdivia, que las especies de piojos frecuentemente encontrado en aves de corral son *M gallinae* (60%), seguido de *G dissimilis* (57%), *M stramineus* (3%) y *L caponis* (11%). González *et al* (14), a diferencia del estudio anterior, reportó las especies, *M gallinae*, *G gigas*, *G gallinae*, *M stramineus*, pero no encontró *G dissimilis* ni *L caponis*. En estudios realizados en Latinoamérica, Cruz *et al* (18) informaron en México, que las especies de piojos más prevalentes fueron *M stramineus* (88%), *M gallinae* (86%), *Chelopistes meleagridis* (64%); no encontraron *G dissimilis*, *G gigas* ni *G gallinae*. Martínez *et al* (9), en Venezuela, reportaron una prevalencia de *M stramineus* de 80%, *M gallinae* de 51%, *L caponis* de 43%, *G gigas* de 33%, *G gallinae* de 15%, *Goniodes sp.* de 8 %, *G dissimilis* de 4%, *Colpocephalum sp* un 2%, *Chelopistes meleagridis* un 1%. Estos resultados, difieren de estudios

realizados en Chile, en donde *M gallinae* es más prevalente. Los piojos *M stramineus* y *M gallinae* se recolectaron en la mayoría de los estudios. Estos, morfológicamente, son muy similares, por lo tanto, es difícil su diferenciación e identificación; lo mismo sucede con la diferenciación de *G gigas* (Parasita en zonas tropicales) con *G dissimilis* (Está en zonas templadas) (19). No encontramos pulgas, a diferencia de un estudio realizado en California, que encontró solo *E gallinaea* (18%) (19). De igual manera en Nigeria, solo se reportó *E gallinaea* (12%) (8). La baja frecuencia de especies de pulgas en los estudios citados y el presente estudio, se podría explicar debido a que las pulgas son sensibles al clima y zonas geográficas con ambientes fríos inferiores a 13°C, los cuales no son favorables para su ciclo de vida, siendo propicias las zonas de alta humedad como las estaciones de primavera y verano donde presentan su máxima abundancia (20). La presencia de ectoparásitos en las aves se asocia a múltiples factores, que incluyen las condiciones climáticas, donde altas temperaturas y humedad favorecen el desarrollo de los ciclos de los ectoparásitos. También las pobres medidas higiénicas y ausencia de medidas de control son un importante factor en la presencia de ectoparásitos (21). Con respecto a la frecuencia de los ectoparásitos, según el tipo de suelo en que habitan, se deduce que la ceniza se puede utilizar para impedir el desarrollo de los piojos, ya que las aves realizan su limpieza con tierra o arena (baño de polvo), Según Ali y Morosetti (22), se puede utilizar una caja que contenga arena y ceniza, para que las aves mantengan su plumaje limpio y libre de ectoparásitos, lo que fue corroborado en el presente estudio. Si bien los ectoparásitos en aves repercuten directamente en su salud, afectando el ciclo de vida, deteriorando la producción de huevos y replicación (20), la presencia específica de parásitos hematófagos como ácaros del género *Dermanyssus spp*, *Ornithonyssus spp*, pulgas como *E gallinaea* y garrapatas como *Argas persicus*²⁵, pueden tener mayor peligro, ya que pueden de producir una intensa anemia, dependiendo de la intensidad de infestación. Estos tienen un importante papel como vectores y pueden transmitir enfermedades mortales que incluso puede afectar al humano (8, 23, 24).

Referencias

1. Llanos-Soto S, Muñoz B, Moreno L, Landaeta-Aqueveque C, Kinsella JM, Mironov S, et al. External and gastrointestinal parasites of the rufous-collared sparrow *Zonotrichia capensis* (Passeriformes, Emberizidae) in Chile. *Rev Bras Parasitol Veterinária*. 2017; 26(3):314–22.
2. J. Hudson P. Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends Ecol Evol*. 2006; 21(7):381–5.

3. Hopla CE, Durden LA, Keirans JE. Ectoparasites and classification. *Rev Sci Tech.* 1994;13(4):985–1017.
4. Zapata R. Artrópodos como ectoparásitos y vectores de microorganismos relacionados con el proceso de infección – salud - enfermedad en animales de producción, animales de compañía y humanos. *Hechos Microbiológicos.* 2012;3(1):63.
5. Byford RL, Craig ME, Crosby BL. A review of ectoparasites and their effect on cattle production. *J Anim Sci.* 1992; 70(2):597–602.
6. Del Pilar Pulido-Villamarín A, Castañeda-Salazar R, Ávila HI, Gómez-Méndez LD, Barbosa-Buitrago AM. Microscopía y Principales Características Morfológicas de algunos ectoparásitos de interés veterinario. *Rev Investig Vet del Perú.* 2016;27(1):91–113.
7. Lebowhl M, Clark L, Levitt J. Therapy for head lice based on life cycle, resistance, and safety considerations. *Pediatrics.* 2007; 119(5):965–974.
8. Bala A, Anka S, Waziri A, Shehu H. Preliminary Survey of Ectoparasites Infesting Chickens (*Gallus domesticus*) in Four Areas of Sokoto Metropolis. *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences.* Univ.Press; 2011;19(2): 173-180.
9. Martínez de Chirinos NI, Chirinos ÁR, Hinestroza Y, Inicarte MF, Manco M, Meléndez A. Prevalencia de ectoparásitos en gallinas de corral (*Gallus-gallus domesticus*) del municipio San Francisco, Estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica FCV-LUZ.* 2001; 11(4): 348–354.
10. Odenu RA, Mohammed BR, Simon MK, Agbade RIS. Ecto-parasites of Domestic Chickens (*Gallus gallus domesticus*) in Gwagwalada Area Council, Abuja, Nigeria-West Africa. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences.* 2016;51(1):140–146.
11. Trivedi MC, Rawat BS, The distribution of lice (Phthiraptera) on poultry (*Gallus domesticus*). *Int J Parasitol.* 1991; 21(2):247–249.
12. Rezaei F, Hashemnia M, Chalechale A, Seidi S, Gholizadeh M. Prevalence of ectoparasites in free-range backyard chickens, domestic pigeons (*Columba livia domestica*) and turkeys of Kermanshah province, west of Iran. *J Parasit Dis.* 2016; 40(2):448–453.
13. Torres, P., Franjola R., Yáñez, L., Díaz, V., González, E. Montecinos, M.I. Estudio preliminar sobre helmintos y artrópodos del *Gallus gallus domesticus* en la provincia de Valdivia, Chile. *Bol.*
14. González – Acuña D, Lara J, Cicchino A. Nuevos registros de piojos (Insecta: Phthiraptera) en aves domésticas y ornamentales en Chile. *Arch Med Vet.* 2009;41(2):181–184.
15. Jahantigh M, Esmailzade dizaji R, Teymoori Y. Prevalence of external parasites of pigeon in Zabol,southeast of Iran. *J Parasit Dis.* 2016;40(4):1548–1551.
16. Quintero M., Acevedo H. Estudios taxonómicos sobre piojos en animales domésticos. 1er Encuentro estatal sobre Entomología Médica y Veterinaria, y Segundas Jornadas Médicas de Salud en el Trabajo. Cuernavaca, Morelos, México 1989: 9-17.
17. Chirinos, A.R. Artrópodos de interés Médico veterinario. *Parasitología y Zoología Médica.* Tomo 2. Editorial Luz. Maracaibo, Venezuela. 1999: 775.
18. Cruz M., Figueroa CJ., Quintero MM., Alcalá C. Ectoparásitos de aves en explotaciones de traspatio de una región del sur de México. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol.* 2013; 72(2):185–189.
19. Murillo AC, Mullens BA. Diversity and Prevalence of Ectoparasites on Backyard Chicken Flocks in California. *J Med Entomol.* 2016; 53(3):707–711.
20. Van der Mescht L, Le Roux PC, Matthee CA, Raath MJ, Matthee S. The influence of life history characteristics on flea (Siphonaptera) species distribution models. *Parasit Vectors.* 2016; (9):178-193.
21. Lawal JR, Bukola Yusuf Z, Dauda J, Gazali YA, Biu AA. Ectoparasites Infestation and its Associated Risk Factors in Village Chickens (*Gallus gallus domesticus*) in and Around Potiskum, Yobe State, Nigeria. *Journal of Animal Husbandry and Dairy Science.* 2017. 1(1);8-19.
22. Ali TM y Morosetti G. Manual para el personal auxiliar de sanidad animal primaria. Food and Agriculture Org. M-27. ISBN 92-5-303258-8. Roma 1995.
23. Marín-Gómez S.J. y Benavides, J.A. Parásitos en aves domésticas (*Gallus domesticus*) en el Noroccidente de Colombia. *Rev. Vet. Zootec.*2007; 1(2): 43-51.
24. Abarca K, Gárate D, López J, Acosta-Jamett G. Flea and ticks species from dogs in urban and rural areas in four districts in Chile. *Arch Med Vet.* 2016; 48(2):247–253.
25. Surumay Q. Parasitismo en especies avícolas. FONAIAP DIVULGA 42, enero. Junio 1993.

Infestación por *Otodectes cynotis* en felinos domésticos (*Felis catus*) de Temuco, Chile

JOHAN FLÁNDEZ O.¹, LUIS ZAROR²

¹ Escuela de Medicina Veterinaria

² Escuela de Tecnología Médica, Universidad Mayor, sede Temuco.

Correspondencia: Luis Zaror C., Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Ciencias, Universidad Mayor. Avenida Alemania 281, Temuco, Chile. Correo: lzaror@yahoo.es

Recibido: 20/04/2019 Aceptado: 18/06/2019

Summary

Otodectes cynotis epidemiology data are barely known in Chile. Our study was conducted at the auricular level on 89 domestic felines in four clinics in the city of Temuco. A level of infestation of 5.6% was found, and this was observed both felines with otitis signs and without it. Our main findings showed significant relationships between the presence of otitis externa and the presence of *O. cynotis*, and between lifestyle and the presence of the mite, considering them as relevant risk factors.

Keywords: *Otodectes cynotis*, Mite, Cat, Otitis, Prevalence.

Resumen

Los datos de prevalencia de *Otodectes cynotis* son escasos en Chile. Se realizó un estudio a nivel auricular de 89 felinos domésticos en cuatro clínicas en la ciudad de Temuco. Se encontró un nivel de infestación del 5,6%, observándose tanto en felinos con signología de otitis como sin esta. Se encontraron las siguientes asociaciones significativas como factores de riesgo relevantes: relación de presencia de otitis externa versus la presencia de *O. cynotis* y la relación entre el estilo de vida versus la presencia del ácaro.

Palabras claves: *Otodectes cynotis*, Ácaro, Gato, Otitis, Prevalencia.

Introducción

En el canal auditivo de los gatos domésticos se pueden desencadenar diferentes procesos, como aumento de humedad, de pH y disminución del contenido de lípidos en el cerumen, alterándose el equilibrio de secreción y la microbiota normal, dando lugar a infecciones oportunistas que terminan predisponiendo a una otitis externa¹

Otodectes cynotis es un ácaro de importancia zoonótica, de rara presentación en el humano, provocando inflamación, irritación y prurito. Van de Heyning y Thienpont reportaron en 1977 el primer caso en una mujer,^{2,3,4}

La otitis externa, presenta factores predisponentes, primarios y secundarios. Primarios como: acumulación constante de pelo que puede conducir a traumatismo folicular, y/o el canal auricular inmóvil que limita el flujo de aire dentro del conducto auditivo^{5,6,7}. Razas de gatos con pelo largo son más propensas a desarrollar una otitis externa, por mala ventilación auricular que conduce a mayor humedad, produciendo cambios en el epitelio del conducto auditivo^{5,6,7,8,9,10}

Entre los factores secundarios de otitis se destacan bacterias y hongos.^{11,12,13,14}

Los ectoparásitos son los principales factores primarios de la otitis externa. Estos se alimentan y viven en la superficie de los mamíferos. Tienen una patogenicidad considerable e incluso pueden causar la muerte, dependiendo de la carga parasitaria, la intensidad de la parasitosis y el estado nutricional e inmunológico del hospedero^{15,16,17,18}.

Los principales ácaros involucrados en otitis son: *Sarcoptes scabiei* var *canis*, *Neotrombicula autumnalis*, *Cheyletiella yasguri*, *Notoedres cati* y *Otodectes cynotis*, siendo este último la causa parasitaria más frecuente de otitis externa en gatos^{13,16,17,19,20}

Se estima que el 50% de los casos de otitis en felinos son causados por este ácaro^{3,7,12,21}. Su distribución abarca cabeza y canal auditivo, siendo su signología clínica la presencia de eritema, pápulas, excoriaciones,

auto traumatismos por un prurito variado y exudado seroso de color marrón. Sin embargo, en algunos casos en gatos se presenta de forma asintomática²².

La principal vía de transmisión es el contacto directo con el huésped infestado, y puede ocurrir a cualquier edad^{15,16,23}. El diagnóstico de presencia del ácaro requiere confirmación visual de éstos en el oído, a través de la observación con otoscopio, microscopio y pruebas parasitológicas del cerumen. También se pueden aplicar pruebas adicionales como la citología^{2,23,24,25,26}

La mayoría de las publicaciones tratan aspectos clínicos y terapéuticos de *O. cynotis*, mientras que los datos epidemiológicos son escasos, especialmente en Chile. Se realizó la búsqueda de *Otodectes cynotis* en felinos domésticos (*Felis catus*) y factores asociados a la presencia de este, en clínicas veterinarias, en Temuco, Chile.

Material y métodos

Se estudió 89 gatos de la ciudad de Temuco, que concurrían a 4 clínicas veterinarias (Clínica Veterinaria Altamira, Clínica Veterinaria Arca de Noé, Clínica Veterinaria Kennel y Hospital Clínico Veterinario, Universidad Mayor). La población objetivo de Temuco fue calculada en base al estudio realizado por Ibarra 2003, que estimó 0.4 gatos por vivienda, en Santiago de Chile²⁷, empleando un margen de error del 5%, nivel de confianza del 80% y frecuencia esperada del 50%. Los criterios de inclusión en este estudio fueron felinos con dueño, pudiendo ser de carácter “Outdoor” o “Indoor”, de edad entre 4 meses a 13 años. Como criterios de exclusión se consideraron: felinos tratados recientemente (mínimo 1 mes) con acaricidas, o que cursaran con patologías como heridas por mordeduras, quemaduras, tumores u abscesos a nivel del pabellón auricular.

El estudio fue de tipo no experimental con un diseño transeccional descriptivo. El muestreo se realizó entre los meses de junio y octubre de 2017.

Los pacientes eran individuos que concurrían a clínicas veterinarias por diversas razones, y a cuyos propietarios se les solicitó la firma de una autorización para realizar la toma de muestra. A cada paciente se le realizó un examen clínico general por veterinario a cargo, registrando los datos del gato (sexo, pelaje, edad), de manejo (Indoor/Outdoor), y signología presente (Otitis). Luego del examen clínico, se colectó la muestra a través de raspado con un hisopo de algodón a nivel auricular de cada oreja (hisopos distintos) para recolectar material ótico. Luego este material se colocó en un portaobjeto. Para esto, el hisopo fue golpeado con golpes secos y breves con una posterior rotación sobre el portaobjetos, para permitir el desprendimiento de ácaros que se encuentren en la muestra. En el laboratorio, se agregó al portaobjeto una gota de Hidróxido de potasio al 10% con tinta Parker azul permanente. Se colocó un cubreobjeto, y se realizó observación microscópica, con 40 a 400 aumentos, recorriendo toda la muestra para observar la presencia del ácaro.

Para la identificación del ácaro, se observaron sus características físicas, teniendo presente la diferenciación de las etapas del ciclo de vida de *O. cynotis*, según la descripción de la OIE²⁸.

Cada paciente fue clasificado según la presencia de al menos un estadio de *O. cynotis* o ausencia del parásito.

Las variables se registraron en planilla Excel, para posterior análisis. El estudio se realizó con el animal vivo y sin uso de fármacos tranquilizantes o anestésicos generales.

El trabajo se realizó en base a estadística descriptiva, empleando variables nominales que son:

1. Pelaje, codificándose en “Doméstico de pelo corto” (DPC) = 1 y “Doméstico de pelo largo” (DPL) = 2.

2. Clasificación según su procedencia; si viven fuera de la casa “Outdoor” = 2 o si viven dentro de la casa, teniendo contacto en ciertas ocasiones con el exterior “Indoor” = 1.

3. Según Sexo “Macho” = 1 y “Hembra” = 2.

4. Edad en categorías (Juvenil: de 6 meses a 12 meses; Adulto 13 meses a 8 años; y Senil: de 9 años en adelante).

5. Presencia = 1 ó ausencia = 0, de *O. cynotis*.

Para explorar asociaciones entre factores de riesgo y la presencia de *O. cynotis* se generaron tablas de contingencia y se realizó el Test de Fisher con un nivel de significancia de <0.05. Los análisis estadísticos fueron realizados empleando el programa informático SPSS.

Resultados

Se muestreó 89 felinos, 49 machos y 40 hembras. No se alcanzó el tamaño de muestra calculado, disminuyendo el poder a un 60% (G*Power; considerando la prevalencia obtenida y prevalencia

detectada previamente en Chile 29. Los rangos de edad de los animales muestreados variaron desde los 6 meses a 9 años, con un promedio de 4 años.

Las características de los individuos estudiados se encuentran en la tabla N°1.

Características	<i>O. cynotis</i>		Total	
	Presencia	Ausencia		
Sexo	Macho	4 (4,5%)	45(50,56%)	49
	Hembra	1(1,12%)	39(43,8%)	40
	Juvenil	2(2,24%)	35(39,3%)	37
Edad	Adulto	3(3,37%)	43(48,31%)	46
	Senil	0	6(6,74%)	6
Estilo de vida	Indoor	1(1,12%)	62(69,6%)	63
	Outdoor	4(4,5%)	22(24,7%)	26
Pelaje	DPC	1(1.12%)	49(55%)	50
	DPL	4(4.5%)	35(39,3%)	39

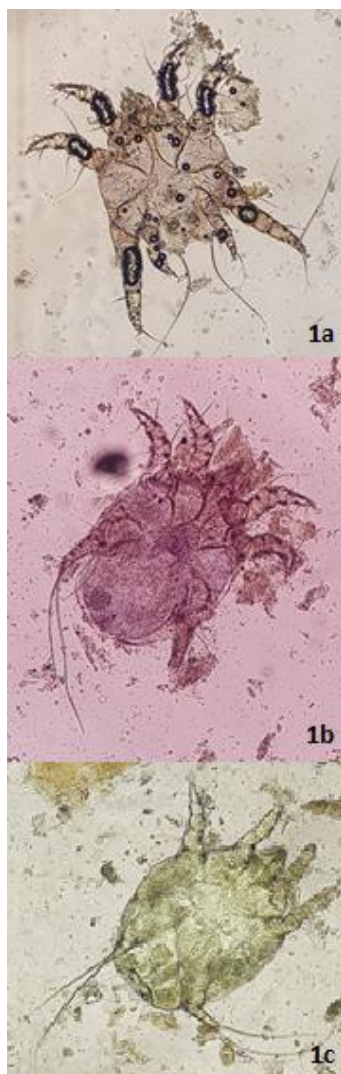
DPC= Doméstico de Pelo Corto. DPL= Doméstico de Pelo Largo.

Tabla 1. Características de 89 gatos estudiados para búsqueda de *Otodectes cynotis*. Temuco.

Para el total de los felinos muestreados, la prevalencia del ácaro fue de 5,61% (5/89) destacando que del total de individuos el 4,49% (4/89) se encontraban cursando otitis externa al momento de la toma de muestra, y en estos, en 3 hubo presencia (75%) de *O. cynotis*. En cuanto a la presencia del ácaro, comparando los DPC (50 gatos) versus los DPL (39 gatos), se observó presencia del acaro en 1 de 50 gatos muestreados (2%) DPC y en 4 de 39 gatos muestreado (10,2%) DPL. En relación con la clasificación por edad se observó un 2,24% (2 positivos) de presencia del ácaro en gatos jóvenes y un 3,37% (3 positivos) en gatos adultos. No se encontró *Otodectes* en gatos seniles. Comparando machos versus hembras, se observó una prevalencia del 1,12% (1 positivo) en hembras versus un 4,5% (4 positivos) en los machos. En la comparación según estilos de vida, en gatos indoor se obtuvo una prevalencia de 1,12% (1 de 89 gatos muestreados) y un 4,5% (4 de 89 gatos muestreados) de gatos Outdoor.

Se detectó en 5 gatos con ácaro, que 3 cursaban con signología de otitis (prurito, pápulas, escoriaciones y secreción de color marrón negruzca y 2 gatos sin signología clínica.

El análisis de independencia (Test de Fisher, p< 0,05) reveló asociación significativa entre presencia de otitis versus la presencia de *O. cynotis* (p= .000), al igual que la relación entre el estilo de vida versus la presencia del acaro (p=.028). Las variables sexo (p=.374), edad (p=.806) y pelaje (p=.650) no fueron significativas.



Figuras 1.a, 1b y 1c: *Otodectes cynotis* adulto Macho, se observa sus cuatro miembros, abertura anal y su tubérculo copulador.

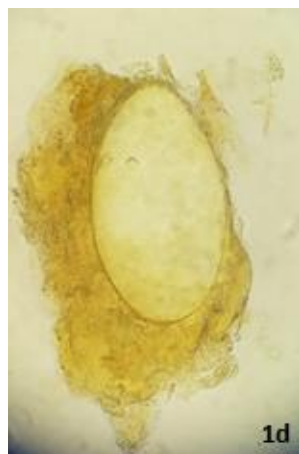


Figura 1d. Huevo de *Otodectes cynotis*. 40 aumentos

Discusión

Según lo descrito por Otranto et al 30, estudiando la sobrevivencia de *O. cynotis*, encontraron una sobrevivencia máxima de 12 días a una temperatura ambiente de 12,3 a 14,2°C, y con una humedad relativa entre 57,6 y 82,9%. En nuestro estudio la temperatura obtenida entre los meses de junio a octubre fue de 9°C a 17°C y una humedad relativa promedio del 50%, descrita por Meteorología de Chile (meteochile.gob.cl 2017) temperaturas propicias para su sobrevivencia en ambiente.

Los datos muestran prevalencias de otitis similares (4,4%) a las descritas por Lorenzana, de un 2-6%³². Al comparar la prevalencia de gatos que cursan con otitis provocada por *O. cynotis*, se obtuvo una alta presentación (75%) versus estudios previos, que la describían entre 40-60%^{13,20}. Si bien Ettinger³³ señala que la infestación es más común en animales menores de un año, en este estudio, no se dio dicho punto, encontrándose una presentación mayor en gatos adultos (3/5 total de felinos infestados) que en gatos juveniles (2/5 total felinos infestados), pero no significativa.

Al igual que lo reportado por Gatica³⁴ hay una mayor predisposición en gatos DPL versus los DPC, pudiendo ser producto de que su pelaje en oído es propicio para la proliferación de *Otodectes*, para lo cual se sugiere realizar estudio, sobre la influencia que presenta el pelo en las orejas de gatos DPL sobre la presencia de diferentes ácaros.

Observamos, dos casos que no presentaban sintología clínica de otitis, estos corresponden a una presencia muy baja de *Otodectes*. No se encontró en la bibliografía consultada una cuantificación del parásito, relacionada con otitis externa, lo cual podría ser objeto de un estudio posterior, ya que Cordero del Campillo¹⁸ indica que el gato es un reservorio natural, presentándose principalmente casos en felinos adultos. Se sugiere realizar dos estudios: primero ver cuando este ácaro pasa de ser un agente inocuo por producir otitis, y segundo, ¿cuándo la presencia de *Otodectes cynotis* se considera como normal o cuando una otocariosis?

Declaración de conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Agradecimientos

Se Agradece a las Clínicas Veterinarias; Arca de Noé, Altamira, Hovet, Kennel y a los médicos veterinarios con los que se trató en cada clínica por su ayuda y guía y a Rafaela Erices por su corrección del Abstract.

Referencias

- Cunningham, J.G y Klein, B.G, 2009. Fisiología Veterinaria. 4 edicion. Elsevier. Barcelona, España.
- Mosallanejad, B., Alborzi, A.R. y Katvandi, N., 2011. Prevalence and Intensity of *Otodectes cynotis* in Client-owned Cats in Ahvaz, Iran. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 6: 642–647.
- Jofré M, L., Noemí H, I., Neira O, P., Saavedra U, T. y Díaz L, C., 2009. Acarosis y zoonosis relacionadas. *Revista chilena de infectología*, 26, 3: 248–257.
- Van de Heyning J, & Thienpont D. 1977. Otitis externa in man caused by the mite *Otodectes cynotis*. *Laryngoscope* 87:1938-1941.
- Rejas, J, Goicoa, A., 2010. Otitis externa. Manual de dermatología de animales de compañía. U de León, España.
- Cole, L.K., 2011. Predisposing Factors, Primary Causes, and Perpetuating Factors of Otitis. NAVC Conference 2011, 1:474–476.
- Sotiraki, S.T., Koutinas, A.F., Leontides, L.S., Adamama-Moraitou, K.K. y Himonas, C.A., 2001. Factors affecting the frequency of ear canal and face infestation by *Otodectes cynotis* in the cat. *Veterinary Parasitology*, 96, 4: 309–315.
- Stahl, J., Mielke, S., Pankow, W.-R. y Kietzmann, M., 2013. Ceruminal diffusion activities and ceruminolytic characteristics of otic preparations -- an in-vitro study. *BMC veterinary research*, 9, 1: 70.
- Bernacka, H., Fac, E., Bearing, F., Breeding, A. y Breeding, A., 2015. Original article Prevalence and commonest causes for otitis externa in dogs from two polish veterinary clinics. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 1: 65–73.
- Acar, A. y Altinok Yipel, F., 2015. Kedi Kulak Uyuzu (*Otodectes cynotis*) Sıklığı İle İlgili Faktörler. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 22, 1: 75–78.
- Nelson, R.W., Couto, G., Hawkins, E.C., Johnson, C.A., Lappin, M.R. y Willard, M.D., 2000. Medicina interna de animales pequeños. Editorial Intermédica, Buenos Aires, Argentina.
- Carlotti, D.N., 1991. Diagnosis and medical treatment of otitis externa in dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*, vol. 32, no. 8, pp. 394–400.
- Dientsmann, S., 2010. Revisao sobre otite externa parasitaria por *Otodectes cynotis* EM caes e gatos, com enfoque no potencial terapeutico da selamectina. Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul.
- Arther, R.G., Davis, W.L., Jacobsen, J.A., Lewis, V.A. y Settje, T.L., 2015. Clinical evaluation of the safety and efficacy of 10% imidacloprid+2.5% moxidectin topical solution for the treatment of ear mite (*Otodectes cynotis*) infestations in dogs. *Veterinary Parasitology*, 210, 1–2: 64–68.
- Maazi, N., Jamshidi, S. y Hadadzadej, H., 2010. Ear mite infestation in four imported dogs from Thailand; a case report. *Iranian journal of arthropod-borne diseases*, vol. 4, no. 2, pp. 68–71.
- Flynn, R.J., 2007. Parasites of laboratory animals. 2a Ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Bowman, D.D. y Fogarty, E.A., 2003. Parasitología: Diagnósticos en Perros y Gatos. 1era Ed. Missouri, EE. UU: The Gloyd Group. Inc.
- Ddel Campillo, M.C. y Vásquez Rojo, F.A., 2001. Parasitología Veterinaria. 1era Ed McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España:
- Curtis, C.F., 2004. Current trends in the treatment of Sarcoptes, Cheyletiella and *Otodectes* mite infestations in dogs and cats. *Veterinary Dermatology*, 15, 2:108–114.
- Osborn, S., 2005. Dermatología: Enfermedades Pruríticas de la Piel en Perros y Gatos. 1o edición. Wilmington, Delaware Buenos Aires, Argentina.
- Ahn, A.J., Oh, D.S., Ahn, K.S. y Shin, S.S., 2013. First feline case of otodectosis in the Republic of Korea and successful treatment with imidacloprid/moxidectin topical solution. *Korean Journal of Parasitology*, 51, 1: 125–128.
- Merk, 2007. Manual Merck de Veterinaria. 6ta Ed. Barcelona, España. Editorial Océano.
- Schaer, M., 2006. Medicina Clínica del Perro y del Gato. Barcelona, España. Ed. Elsevier.
- Rand, J., 2006. Problem-based Feline Medicine. 1 era Ed. Elsevier.
- Souza, C.P., Ramadinha, R.R., Scott, F.B. y Pereira, M.J.S., 2008. Factors associated with the prevalence of *Otodectes cynotis* in an ambulatory population of dogs. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 28, 8: 375–378.

26. Lefkaditis, M.A., Koukeri, S.E. y Mihalca, A.D., 2009. Prevalence and intensity of *Otodectes cynotis* in kittens from Thessaloniki area, Greece. *Veterinary Parasitology*, 163, 4: 374–375.
27. Ibarra, L., Morales M., & Acuña, P. 2003 Aspectos demográficos de la población de perros y gatos en la ciudad de Santiago, Chile. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 18(1-2).
28. Organización mundial de sanidad animal (OIE). 2008. Manual de la OIE sobre animales terrestres. Paris, Francia.
29. Díaz, F., 2007 “Estudio de la prevalencia de *Otodectes cynotis* en conducto auditivo de felinos domésticos que viven en una zona de riesgo (albergue) de la región metropolitana”. *Avances en Ciencias Veterinarias*. Tesis. Universidad Mayor, Santiago.
30. Otranto, D., 2004. *Otodectes cynotis* (Acari: Psoroptidae): Examination of survival off-the-host under natural and laboratory conditions. *Experimental and Applied Acarology* 32: 171–179.
31. Dirección Meteorológica de Chile, 2017 <http://www.meteochile.gob.cl/PortalDMC-web/index.xhtml>. consultado el 20 de noviembre 2017.
32. Lorenzana, L. 2004. Otitis externa. *Revista Virbac al día. Animales de compañía*. 21:1-12.
33. Ettinger, S, Feldman, E., 1997 "Tratado de Medicina veterinaria" 4ª Ed. Editorial Inter-medica, Buenos Aires, Argentina.
34. Gatica, E., 2007 “Determinación de la presencia de *Otodectes cynotis* en caninos que consultan clínicas veterinarias de la zona oriente de Santiago”. Tesis. Universidad Mayor, Santiago.

Trabajo de Incorporación SOCHIPA

Clonaje y caracterización de factores de crecimiento en el patógeno humano *Trichomonas vaginalis*

CHRISTIAN MUÑOZ, ALEJANDRO CATALÁN, JUAN SAN FRANCISCO,
BESSY GUTIÉRREZ, JORGE ARAYA & JORGE GONZÁLEZ

Laboratorio Parasitología Molecular, Departamento de Tecnología Médica, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Antofagasta.

Trichomonas vaginalis es un protozoo flagelado que parasita exclusivamente al ser humano, presentando una incidencia anual de casos estimada en más de 276,4 millones de personas infectadas.

Diferentes investigaciones han demostrado que la patogenicidad de *T. vaginalis* es el resultado de eventos complejos que involucran moléculas de adhesión, hemolisinas, cisteínas proteasas y factor de separación celular. Sin embargo, un evento crítico en la colonización del epitelio urogenital humano, es la proliferación celular, la cual no ha sido estudiada en *T. vaginalis*, y los mecanismos biológicos y/o moleculares involucrados en ella no son conocidos.

Esta investigación permitió evidenciar el papel crítico de los factores de crecimiento en la proliferación del patógeno humano *T. vaginalis*. En este estudio, demostramos que en el protozoo parásito *T. vaginalis*, existen 3 genes que codifican para factores de crecimiento, los cuales son sintetizados, traducidos y secretados por el parásito con la finalidad de estimular su proliferación celular, denominados TvFC1, TvFC2 y TvFC3. En primer lugar, la incubación de *T. vaginalis* con sobrenadantes de cultivos, estimula la proliferación celular del parásito, mientras que la incubación con Brefeldrina A, un potente inhibidor del tráfico intracelular, la inhibe. Segundo, demostramos que los factores de crecimiento recombinantes estimulan la proliferación *in vivo* de *T. vaginalis*, y sus proteínas nativas están presentes en diferentes cepas del parásito, por último, oligonucleótidos antisentido dirigidos contra la región codificante de TvFC3 bloquearon significativamente la proliferación celular en la fase de crecimiento exponencial del parásito. Además, mediante ensayos de marcación metabólica con metionina ³⁵S, demostramos que los factores de crecimiento de *T. vaginalis* son secretados al medio de cultivo. Este mecanismo de secreción parece ser mediado por vías no clásicas o no convencionales, las cuales no han sido descritas en protozoos parásitos humanos.

Nuestras observaciones, sugieren que los factores de crecimiento podrían ser potenciales factores de virulencia, ya que uno de los eventos esenciales asociados a la patogenia de cualquier parásito patógeno es aumentar su densidad poblacional, existiendo una directa correlación entre el número de parásitos y la patogenia. De este modo, varias piezas de evidencia sugieren fuertemente que la proliferación *in vitro* de *T. vaginalis* es inducida por factores de crecimiento.

En este estudio, hemos identificado por primera vez factores de crecimiento y descrito su papel tanto en la proliferación de *T. vaginalis*, así como también su potencial función como nuevos factores de virulencia del parásito. No obstante, este hallazgo puede tener, además múltiples implicancias. Primero, desde la perspectiva de la biología celular, nuestras observaciones abren nuevas avenidas en el estudio de los mecanismos de tráfico intracelular de *T. vaginalis*, siendo que las vías de secreción no convencionales no han sido descritas ni estudiadas en este protozoo. Segundo, desde una perspectiva biotecnológica, nuestro trabajo sugiere que *T. vaginalis* es una célula secretora de potencial aplicación biotecnológica que, dado su particular hábitat, podría ser utilizada como vector para potenciales vacunas contra cáncer cérvico uterino y de próstata. Del mismo modo, la existencia de regiones particulares que difieren de aquellas presentes en los factores de crecimiento del huésped humano, sugiere la posibilidad de usar estos factores de crecimiento como potenciales herramientas diagnósticas.

Señalización intracelular mediada por fosfolipasas D del veneno de *Loxosceles laeta*: el papel de los microdominios de balsas lipídicas

Dr. ALEJANDRO CATALÁN

Las arañas del género *Loxosceles*, en Chile la especie *Loxosceles laeta*, producen un cuadro tóxico de envenenamiento denominado loxoscelismo. Este cuadro se manifiesta en dos formas clínicas: el loxoscelismo cutáneo (LC) y el loxoscelismo cutáneo-visceral (LCV). El LC es más frecuente y está caracterizado por una lesión en la piel, con presencia de eritema, edema, y una marcada infiltración en la dermis de células inflamatorias y producción de mediadores pro-inflamatorios, seguido finalmente por necrosis del tejido. El veneno de las arañas del género *Loxosceles*, esta compuesto por una mezcla proteica, rica en proteínas de baja masa molecular (5-40 kDa), donde destacan tres clases de proteínas altamente expresadas: proteasas tipo astacinas, péptidos insecticidas, y enzimas de la familia de las fosfolipasas D (PLD). Estas últimas son consideradas como el principal componente tóxico del veneno de *Loxosceles*. Si bien, se ha destacado el papel del reclutamiento de células inmunes al sitio de lesión durante el loxoscelismo cutáneo, poco se conoce en relación al mecanismo molecular que induce la liberación de mediadores pro-inflamatorios. Recientemente, reportamos que las isoformas recombinantes 1 y 2 de fosfolipasas D de *L. laeta* (rLIPLD1 y rLIPLD2), son capaces de inducir la expresión de IL-6, IL-8, CXCL1/GRO- α y CCL2/MCP-1 en la línea células de fibroblastos de piel humana HFF-1. Este efecto fue dependiente de las PLD, pero independiente de la actividad catalítica de las enzimas, puesto que una isoforma catalíticamente activa (rLIPLD1) y otra inactiva (rLIPLD2) inducen de manera similar la expresión de estos mediadores inflamatorios. Además, el efecto de las PLD recombinantes de *L. laeta* fue significativamente mayor al de los productos lipídicos ceramida 1-fosfato y ácido lisofosfatídico formados de la degradación de esfingomiélna y de lisofosfatidilcolina, respectivamente. Junto con esto, los mediadores inflamatorios, fueron capaces de estimular la migración de monocitos THP-1. Sin embargo el mecanismo mediante el cual PLDs de *Loxosceles* estimulan la expresión de estos mediadores inflamatorios se desconoce. Un blanco molecular que podría actuar como un recurso de sustrato celular (esfingomiélna) y como plataforma de señalización para la expresión de estos mediadores pro-inflamatorios en respuesta a las fosfolipasas D de *Loxosceles* podrían ser las balsas lipídicas de la membrana celular. Se ha reportado la importancia de las balsas lipídicas en la expresión de la quimiocina CCL2 y también su papel en la activación de la vía de señalización PI3K/Akt. Esta última participante de la expresión de esta importante quimiocina para el reclutamiento de monocitos. Además, anteriormente hemos demostrado que las rLIPLDs son capaces de activar la vía de señalización PI3K/Akt en fibroblastos HFF-1. Por lo anterior, hipotetizamos que las balsas lipídicas de la membrana plasmática de fibroblastos actúan como plataforma de señalización y como recurso de sustrato para las fosfolipasas D de *Loxosceles*. Para esto, evaluamos la interacción de diferentes isoformas de PLDs de *L. laeta* (rLIPLD1 y rLIPLD2), así como también de dos isoformas mutantes de PLD1 (rLIPLD1-W256S y rLIPLD1-D259G) deficientes en la unión a esfingomiélna, con las balsas lipídicas de la membrana plasmática de los fibroblastos HFF-1 mediante fluorescencia confocal, con marcaje de las balsas lipídicas utilizando la subunidad B de la toxina de cólera conjugada con Alexa Fluor 594 y marcaje de las PLDs con anticuerpos anti-rPLD seguido de un anti-inmunoglobulina conjugada con Alexa Fluor 488. Tanto, las isoformas recombinantes rLIPLD1 como rLIPLD2, fueron capaces de colocalizar con las balsas lipídicas, mientras que no se observó marcaje con anti-PLD en las células no tratadas. Además, ambas isoformas mutantes no fueron capaces de unirse a las balsas lipídicas de la membrana plasmática de los fibroblastos, a diferencia de la isoforma PLD1 no mutada. Esto demuestra que la esfingomiélna presente en las balsas lipídicas es reconocida por las fosfolipasas D, independiente de su actividad catalítica, pero que si depende de la presencia de aminoácidos esenciales para el reconocimiento de sustrato. Finalmente, mediante western blot de Akt fosforilada en extractos celulares de fibroblastos HFF-1 tratados con las diferentes isoformas de PLD, demostramos que rLIPLD1 y rLIPLD2, fosforilan Akt a los 15 minutos de incubación, y que además este efecto fue mediante activación de la vía de señalización PI3K/Akt, puesto que el inhibidor wortmanina a 10 nM, inhibe la fosforilación de Akt dependiente de las PLD de *L. laeta*. Junto con esto, no se observó fosforilación de Akt cuando las células fueron tratadas con las isoformas mutantes de PLD1, lo que indica que la interacción entre PLD y su sustrato, es esencial para la activación de la vía de señalización PI3K/Akt. Estos resultados, entregan importantes antecedentes sobre el mecanismo molecular involucrado en la interacción de las fosfolipasas D de *Loxosceles* y su sustrato celular.

Trabajo de Incorporación SOCHIPA

Prevalencia de la infestación por *Demodex spp* en la ciudad de Antofagasta

Lic. Mg. Cs. BESSY GUTIÉRREZ ASTUDILLO

En la piel humana es posible encontrar a una gran variedad de microorganismos, dentro de éstos, destacan los ácaros microscópicos pertenecientes al género *Demodex*. Un total de 140 especies o subespecies han sido identificadas alrededor del mundo en 11 Ordenes de animales incluyendo al hombre y existen dos especies que afectan al ser humano: *Demodex folliculorum* y el *Demodex brevis* [1]. Ambos son los ectoparásitos permanentes más frecuentes en el ser humano. Estos ácaros se pueden encontrar en los folículos pilosos y las glándulas sebáceas de la piel, especialmente en el rostro y han sido encontrados en casi todas las edades y grupos raciales.

En la literatura de parasitología, las referencias a *D. folliculorum* suelen ser escasas y poco descriptivas [2, 3, 4]. Esta aparente falta de interés podría deberse quizás a la discutible patogenicidad del parásito. La presencia de éste en el ser humano ha suscitado, no obstante, el interés de muchos dermatólogos, debido a su posible asociación con las más variadas dermatosis, particularmente la rosácea [2, 3, 4]. El nombre *Demodex* proviene del griego demos: grasa; y dex: carcoma insecto roedor de madera [5]. Pertenece al phylum *artrópoda*, clase: Arachnida, orden: Acari; superfamilia: Demodicoida [6]. Este ácaro fue descubierto por Berger en 1841 en el meato auditivo externo humano y por Henle (1841) en un caso de acné de la cara [7]. Owen (1843) propuso el término *Demodex folliculorum*. Becker en 1875 fue el primero en detectar el *Demodex* en la región ocular, encontrándolo en el ducto excretorio de una glándula de meibomio [7]. Majocchi (1878) recogió *Demodex* en un chalazión de un paciente con blefaritis crónica. Estos ácaros se pueden encontrar en los folículos pilosos y las glándulas sebáceas de la piel, especialmente en el rostro. Los ácaros del género *Demodex* se percibían originalmente como comensales, y que tenían una relación simbiótica con el huésped humano. Sin embargo, la opinión sobre el papel de *Demodex* en la patogénesis de muchas enfermedades, incluyendo la rosácea ha ido cambiando. En algunas condiciones específicas del huésped, los ácaros del género *Demodex* pueden llegar a ser patógenos potenciales. Esto puede suceder cuando las condiciones inmunológicas del cambio de huésped y las nuevas condiciones ambientales sobre la piel facilitan el desarrollo de los ácaros *Demodex* [8]. En este estudio, se investigó la presencia de *Demodex sp* y su relación, edad, género, actividad laboral y enfermedades alérgicas. **Hipótesis:** En habitantes de la ciudad de Antofagasta, la mayor prevalencia de *Demodex sp*, tiene relación con la actividad laboral. **Objetivo General:** Determinar la prevalencia de la infestación por *Demodex sp*, en los folículos pilosos de rostro y pestañas en habitantes de la Ciudad de Antofagasta. **Material y Método:** El universo fue conformado por un total de 680 personas. Todas las personas consintieron por escrito participar en el estudio mediante una carta de consentimiento informado, ser examinadas mediante el uso de la biopsia superficial de la piel estandarizada (SSSB). El grupo de estudio, estuvo compuesto por personas cuyos rangos de edad fluctuaban entre los 18 y los 78 años. **Resultados:** Del total de individuos examinados, el 13,5% estaba infectado por *Demodex sp*. Una leve mayor prevalencia fue observada en el género masculino (51,1%), mientras que en el femenino mostró una prevalencia de 48,9%. De igual modo, un mayor porcentaje de infección por *Demodex sp* se observó en los pacientes de grupos etarios entre 48 a 78 años.

Referencias

- 1 Simon, C.. Über eine in den kranken und normalen Haarsacken Menschen lebende Milbe. Arch.Ant.Physiol.Wissensch.Med. Vol 01 (1842); 218-237.
- 2 Markell, E. y Voge, M.. El ácaro del folículo pilosebáceo: *Demodex folliculorum*. Parasitología Médica; Interamericana/McGraw-Hill, México Vol 01 (1990); 293.
- 3 Romero Cabello, R.. Ácaros de importancia médica. En: Microbiología y parasitología; Panamericana, Bs.As. Vol 05 (2000); 691-692.
- 4 Atías, A., Sarna y otras acarosis que afectan al hombre. En: Parasitología Médica; Publ. Téc. Mediterráneo, Chile. Vol 02 (1998); 488-489.
- 5 Corredor-Osorio, R.. Blefaritis por *Demodex folliculorum*. Rev Fac Med UNAM Vol 43, (2000); 125-129.
- 6 Niño, F.L.. *Demodex folliculorum*. En: Parasitología [Capítulo XXV, IIIa parte: Orden acaríneos]; Editorial Beta, Bs.As. Vol 12 (1965); 503.
- 7 Ruffli, T. Mumcuoglu, Y.. The hair follicle mites *Demodex folliculorum*, Y. and *Demodex brevis*: Biology and medical importance. Dermatológica Vol 62 (1981); 01-11.
- 8 Jarmuda S.; O'Reilly N.; Zaba R.; Jakubowicz O.; Szkaradkiewicz A.; Kavanagh K.. The potential role of *Demodex folliculorum* mites and bacteria in the induction of rosacea. Journal of Medical Microbiology(2012).

Trabajo de Incorporación SOCHIPA

El clon C8C3 H510 como modelo de estudio de la virulencia de *Trypanosoma cruzi*

Dr. (C) JUAN SAN FRANCISCO

Programa Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Antofagasta

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la Enfermedad de Chagas, que afecta entre 6 a 8 millones de personas aproximadamente alrededor del mundo (1). Además, millones de pacientes crónicos corren el riesgo de desarrollar patologías cardíacas, lo que hace que la Enfermedad de Chagas sea una de las principales causas de morbilidad cardiovascular y muerte prematura en Latinoamérica (2).

La virulencia de *T. cruzi* está altamente implicada en la capacidad que tiene el parásito de diferenciarse a sus estadios infecciosos, penetrar epitelio, invadir células, proliferar y evadir la respuesta inmune del hospedero (3). En esta perspectiva, varias proteínas implicadas en la evasión de la respuesta inmune han sido descritas y son denominadas factores de virulencia (4). Entre estos se encuentran las cisteíno proteasas y miembros de la familia Gp85/Transialidasas. Sin embargo, la verdadera contribución de cada factor permanece desconocida. De la misma manera, ninguna evidencia experimental nos ha permitido comprender la virulencia mostrada por *T. cruzi* de una manera integral (5). A pesar de la evidencia, los estudios sobre los factores de virulencia de *T. cruzi* han sido difíciles, principalmente por lo complejo de la biología del parásito, debido a un único mecanismo para la expresión de genes, ausencia de algunos mecanismos que controlan el inicio de la transcripción, la existencia de dos estadios infectivos, entre otros (6). Incluso, desde el punto de vista biológico y bioquímico, *T. cruzi* es una especie genéticamente muy heterogénea entre sí, que posee una gran cantidad de cepas, que debido a su gran dispersión geográfica, se distribuyen en diferentes vectores y en una gran cantidad de hospedadores mamíferos (7). Esta alta heterogeneidad es llamada variabilidad genética, las cuales serán observadas en las diferentes manifestaciones clínicas que pueden presentar las distintas cepas; todo esto con base en la diferencia en virulencia que puede presentar una cepa en comparación con otra (8). Hoy en día, *T. cruzi* se clasifica en siete unidades discretas de tipificación (DTU's) que van desde TcI a TcVI y TcBat (2,9,10). La gran diversidad en la virulencia de las diferentes cepas de *T. cruzi* también se asocia con la capacidad de generar patogenicidad en el hospedero, donde algunas de ellas presentan una mayor virulencia y por ende una mayor patogenicidad que otras (3). Hasta hoy, no se entienden completamente porqué unas cepas son más virulentas que otras, sin embargo, la explicación más probable es que el grado de virulencia de las diferentes cepas se establece por la expresión diferencial de algunos factores de virulencia. Si bien se han descrito y propuesto diferentes proteínas y factores de virulencia que están involucrados en todos los procesos, la base molecular exacta de la virulencia de *T. cruzi* aun se desconoce (3). Existen diferentes estudios en los que comparan cepas virulentas de *T. cruzi* con cepas no virulentas o de baja virulencia (11,12), pero no se han obtenido resultados concluyentes. Esto sucede, debido a que estas investigaciones se realizan con parásitos que pertenecen a diferentes cepas, y poseen una heterogeneidad muy variada, lo cual genera que no se puedan obtener evidencias significativa al momento de generar comparaciones en estos estudios, ya que no solo poseen diferencias genéticas, si no que también han sido aislados de diferentes hospederos, que provienen de diferentes zonas geográficas y pertenecen a diferentes DTU's (13,14). Es por esto, que es necesario un buen modelo para estudiar la virulencia en *T. cruzi*.

Aquí, proponemos un nuevo modelo para estudiar la virulencia de *T. cruzi*, el cual comprende dos líneas celulares provenientes de un mismo clon, una de las cuales posee una alta virulencia (C8C3*hvir*) y una que posee una baja o nula virulencia (C8C3*lvir*). De esta manera, se puede proporcionar un nuevo método de entendimiento para descubrir las bases moleculares en la infección por *T. cruzi*. De ésta manera, utilizando tripomastigotes derivados de cultivo celular provenientes de dos líneas celulares de un mismo origen genético, pero con virulencias y características patogénicas opuestas, la virulencia fue evaluada mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. De este modo, ratones infectados con C8C3*hvir* desarrollaron altas parasitemias mientras que los infectados con C8C3*lvir* desarrollaron parasitemias subpatentes. De igual manera, C8C3*hvir* fue 3 a 5 veces más infectiva para células Vero que C8C3*lvir*. Cuando cinco conocidos factores de virulencia fueron evaluados mediante ensayos de western blot uni y bidimensional, se observó que la línea celular C8C3*hvir* mostró una mayor expresión de Cruzipaína, Tc85, Trans-sialidasas, Proteína Reguladora del Complemento y Calpaínas respecto de su contaparte de menor virulencia C8C3*lvir*. De este modo, la mayor expresión de estos factores de virulencia podría explicar las diferencias en el comportamiento biológico entre tripomastigotes de la línea celular C8C3*hvir* y aquellos de la línea celular C8C3*lvir*.

Referencias

1. WHO. WHO, 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>. 2018.
2. Zingales B. Trypanosoma cruzi genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop.* 2018;184:38–52.
3. Atayde VD, Neira I, Cortez M, Ferreira D, Freymüller E, Yoshida N. Molecular basis of non-virulence of Trypanosoma cruzi clone CL-14. *Int J Parasitol.* 2004;34(7):851–60.
4. HALL BF, JOINER KA. Developmentally-Regulated Virulence Factors of Trypanosoma cruzi and Their Relationship to Evasion of Host Defences. *J Eukaryot Microbiol.* 1993;
5. Osorio L, Ríos I, Gutiérrez B, González J. Virulence factors of Trypanosoma cruzi: who is who? *Microbes Infect [Internet]*. 2012;14(15):1390–402. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23006853>
6. Yoshida N. Molecular basis of mammalian cell invasion by Trypanosoma cruzi. *An Acad Bras Cienc.* 2006;78(1):87–111.
7. Miles MA, Toye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of Trypanosoma cruzi, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1977;71(3):217–25.
8. Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SDJ. Trypanosoma cruzi: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. Vol. 99, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2004. p. 1–12.
9. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(7):1051–4.
10. Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto CM, et al. Genetic diversity of Trypanosoma cruzi in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tc_{bat} as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop.* 2015;
11. Revelli S, Gómez L, Wietzerbin J, Bottasso O, Basombrio MA. Levels of tumor necrosis factor alpha, gamma interferon, and interleukins 4, 6, and 10 as determined in mice infected with virulent or attenuated strains of Trypanosoma cruzi. *Parasitol Res.* 1999;
12. Henrique PM, Marques T, da Silva MV, Nascentes GAN, de Oliveira CF, Rodrigues V, et al. Correlation between the virulence of T. cruzi strains, complement regulatory protein expression levels, and the ability to elicit lytic antibody production. *Exp Parasitol.* 2016;
13. Meza SKL, Kaneshima EN, Silva S de O, Gabriel M, Araújo SM de, Gomes MôL, et al. Comparative pathogenicity in Swiss mice of Trypanosoma cruzi IV from northern Brazil and Trypanosoma cruzi II from southern Brazil. *Exp Parasitol.* 2014;
14. Sales-Campos H, Kappel HB, Andrade CP, Lima TP, Castilho A De, Giraldo LER, et al. Trypanosoma cruzi DTU TcII presents higher blood parasitism than DTU TcI in an experimental model of mixed infection. *Acta Parasitol.* 2015;

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 “superscript”** . 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://ccslw2.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