

Número de pares XY	6
Pearson r	0,9999
Intervalo de confianza 95%	0.9989
Valor de P <0.0001	
R cuadrado	0,9998

La precisión medida como coeficiente de variación se muestra en la Tabla N° 1.

Tabla N°1  
Coeficientes de variación de diferentes concentraciones de fention. Fenitrotion como estándar interno (0,1877 ppm)

Ppm	0,025	0,0625	0,125	0,1873	0,25	0,312
CV	2,02	3,44	0,56	1,2	1,82	1,45

## CONCLUSIONES

**Selectividad-especificidad:** debido a que en el método cromatográfico se utiliza un detector NPD, el cual responde a compuestos fosforados y nitrogenados, el fenitrotion y el fention, los cuales tienen fósforo, presentaron tiempos de retención de 6,6 y 6,9 minutos respectivamente; se observa que no existen otros compuestos en la matriz (leche), en los solventes o en los reactivos que coeluyan con las sustancias de interés (Figura N° 1).

**Linealidad:** el análisis de regresión lineal muestra como la variación en el cociente AFT/AFTT (variable dependiente) está significativamente ( $P < 0,01$ ), relacionado con cambios en el cociente CFT/CFTT (variable independiente). (Figura N° 2).

**Precisión (repetitibilidad):** se observa como el coeficiente de variación en las diferentes concentraciones fue menor del 5% que es lo aceptado para este tipo de análisis (Tabla N° 1).

## PALABRAS CLAVE

INTOXICACIÓN  
ORGANOFOSFORADOS  
RESIDUOS

## BIBLIOGRAFÍA

1. VAN DEN BERG JCT. Strategy for dairy development in the tropics and subtropics. Pudoc Wageningen. 1990. pp 192
2. HARDING F. World milk production. F. Harding First edition. 1995. 166p
3. DI MUCCIO A, PELOSI P, CAMONI I, et al. Selective, solid-matrix dispersion extraction of organophosphate pesticide residues from milk. Journal of Chromatography 1996; 754: 497-506.

# Disrupción del gen que codifica para la glicoproteína de 43kda en el hongo patógeno paracoccidioides brasiliensis

Alvaro Rúa-Giraldo<sup>2,3</sup>, Victoria Sepúlveda<sup>1</sup>,  
Angela Restrepo<sup>1</sup>, Juan McEwen<sup>1,4</sup>

## INTRODUCCIÓN

La Paracoccidioidomicosis es una enfermedad crónica endémica de Latinoamérica causada por el hongo dimórfico *P. brasiliensis*. Poco se conoce sobre los factores que hacen virulento al hongo una vez en el hospedero, lo que hace necesario implementar sistemas de mutagénesis y tamizaje fenotípico que permitan identificar dichos factores y esclarecer los eventos que ocurren durante la infección.

La transformación genética facilitada por *Agrobacterium tumefaciens* permite introducir ADN exógeno en células vegetales y micóticas, convirtiéndose en herramienta valiosa en experimentos de mutagénesis dirigida. Recientemente este sistema ha sido empleado en *P. brasiliensis* (1).

## OBJETIVOS

- Realizar la disrupción del gen de la glicoproteína antigénica de 43kDa de *P. brasiliensis* por medio de la transformación facilitada por *A. tumefaciens*.
- Evaluar por PCR, Southern blot y western blot, las colonias transformadas en busca de aquellas desprovistas del gen GP43 (knockout)

## METODOLOGÍA

Cepas y plásmidos.

*A. tumefaciens* LBA4404 (pAL4404) y GV3101 (pMP90) con los plásmidos AD1624 y AD1625 con secuencias promotoras (pCPC-1 o pGPD), terminadoras (tTRPC), genes de resistencia marcadores de selección (higromicina fosfotransferasa [HPH], ampicilina [Amp-R]), secuencias para transferencia e inserción en el genoma del hongo (región Ti, bordes derecho [right - RB] e izquierdo [left - LB]), sitios de restricción (HpaI y BglIII) y fragmentos de aproximadamente 400pb de las regiones 5' y 3' del gen GP43 (figura 1). Los plásmidos serán introducidos en la bacteria por electroporación.

*P. brasiliensis* ATCC 60855 y B339 en fase de levadura

.....  
<sup>1</sup> Corporación para Investigaciones Biológicas. Sección de Biología Celular e Inmunogenética.

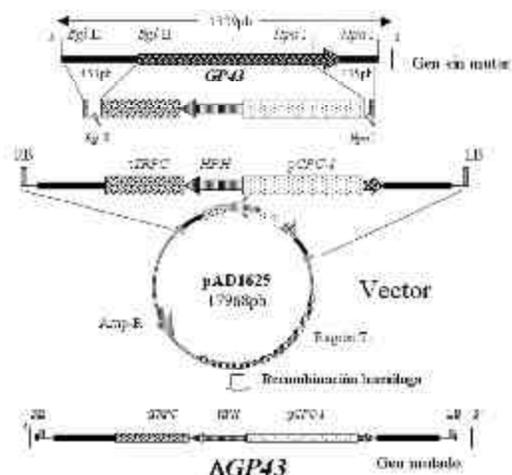
<sup>2</sup> Estudiante de Maestría. Posgrado Ciencias Básicas Biomédicas.

<sup>3</sup> Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad de Antioquia.

<sup>4</sup> Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

mcewen@epm.net.co

**Figura 1**  
**Construido para la disrupción**  
**del gen GP43 de P. brasiliensis**



**Procedimiento**

Los cocultivos se harán en medio AB variando la relación hongo:bacteria. Los transformantes se seleccionaran en BHI con higromicina 200mg/ml. Su estabilidad mitótica se evaluará por repique continuo, la disrupción del gen por PCR y southern-blot (2,3) y la producción de Gp43 por medio de western-blot e inmunodifusión en gel empleando sueros de pacientes con paracoccidioidomicosis.

**RESULTADOS ESPERADOS**

La eficiencia de transformación será mejorada y se obtendrán colonias mutantes para el gen GP43 (no productoras de la proteína).

**CONCLUSIONES**

Las colonias knockout permitirán reconocer en futuros ensayos in vivo, el papel de esta proteína en la enfermedad; además, este sistema podrá emplearse en el estudio secuencial de otros genes del hongo, lo que favorecerá el conocimiento de la biología del hongo.

**PALABRAS CLAVE**

PARACOCIDIROIDES BRASILIENSIS  
 AGROBACTERIUM TUMEFACIENS  
 DISRUPCIÓN DE GENES  
 GLICOPROTEÍNA DE 43KDA

**BIBLIOGRAFÍA**

1. LEAL C, MONTES B, MESA A, RUA A, CORREDOR M, RESTREPO A, McEWEN J. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Paracoccidioides brasiliensis. Med Mycol (en prensa).

2. ABUODEH R, ORBACH M, MANDEL M, DAS A, GARGIANI J. Genetic transformation of Coccidioides immitis facilitated by Agrobacterium tumefaciens. J Infect Dis 2000; 181:2106-2110.  
 3. SULLIVAN T, ROONEY P, KLEIN B. Agrobacterium tumefaciens integrates transfer DNA into single chromosomal sites of dimorphic fungi and yields homokaryotic progeny from multinucleated yeast. Eukaryot Cell 2002; 1:895-905.

**Ausencia de equivalencia terapéutica**  
**de 7 productos genéricos**  
**de lincomicina comparados**  
**con el compuesto original**

Andrés Zuluaga<sup>1,2</sup>, Beatriz Salazar<sup>1,3</sup>, Carlos Rodríguez<sup>1,2</sup>,  
 María Agudelo<sup>1</sup>, Omar Vesga<sup>1</sup>.

**INTRODUCCIÓN**

La equivalencia farmacéutica (EF) como prueba de equivalencia terapéutica (ET) para productos genéricos parenterales (PG) es un dogma ampliamente difundido y aceptado, pero nunca se ha retado experimentalmente [1]. Comparamos la magnitud de los parámetros farmacodinámicos (PD) de los genéricos de lincomicina (LIN) con los del compuesto original (CO), mediante determinación de su eficacia bactericida in vitro e in vivo.

**METODOLOGÍA**

Para probar la EF se compararon curvas estándar tras ensayo microbiológico (EM), con Difco Antibiotic Medium 11 + M luteus ATCC 9341 y se determinó la susceptibilidad (MIC/MBC) por microdilución en caldo. Para probar la ET el modelo murino neutropénico de infección del muslo (MMNIM) empleó por producto 16 hembras MPF de la cepa Udea:ICR(CD-1) [2] inoculadas con S. aureus GRP-0057. LIN q3h vía SC se inició 2h post-infección, 5 ó más dosis totales, entre 1.17-1200 mg/kg/24h. Los parámetros PD efecto máximo ( $E_{max}$ ), dosis necesaria para 50% de  $E_{max}$  ( $P_{50}$ ), dosis bacteriostática in vivo (BD), y dosis requerida para matar 1 (1LKD) ó 2 (2LKD)  $\log_{10}$  CFU/g, sirvieron para comparar la eficacia de cada PG con la del CO.

**RESULTADOS**

Se realizaron EM para 7 PG de LIN; todos fallaron la EF según el análisis de ajuste de curvas (CFA), al contener 89-96% menor concentración de LIN ( $P < 0.02556$ ). Ningún PG presentó diferencias en las MIC/MBC contra S aureus GRP-0057,  $P > 0.05$  por Kruskal-Wallis Test. En el MMNIM, al iniciar LIN, la carga bacteriana era 4.64-5.25  $\log_{10}$  CFU/g. Los 7 PG demostraron

<sup>1</sup> GRIPE: Grupo Investigador de Problemas en Enfermedades Infecciosas, Universidad de Antioquia.

<sup>2</sup> Estudiante de Maestría con énfasis en farmacología.

<sup>3</sup> Microbiología de la CCBB.

Correspondencia: [azuluaga@medicina.udea.edu.co](mailto:azuluaga@medicina.udea.edu.co)