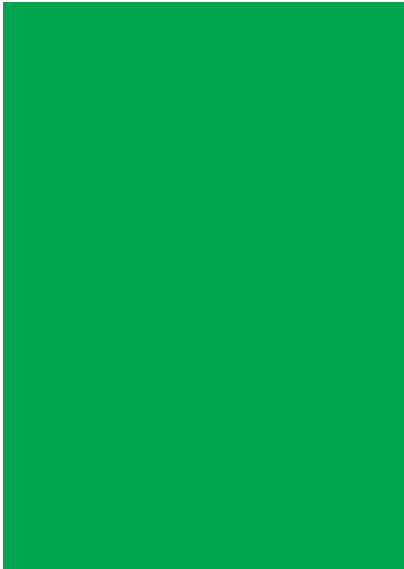
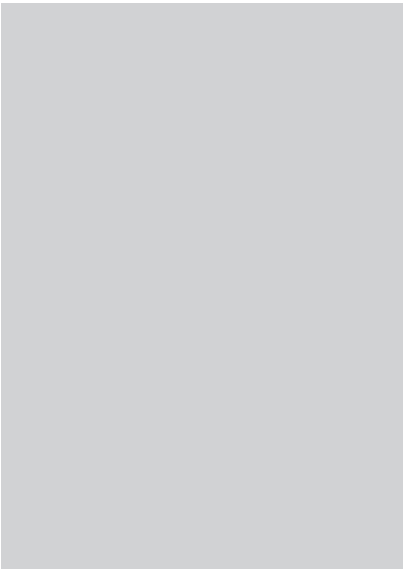
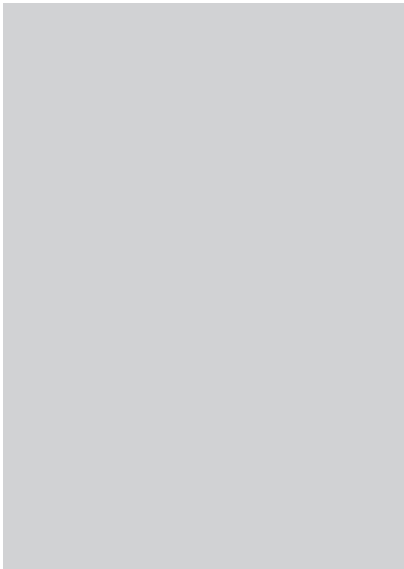




Boletín

de Malariología
y Salud Ambiental

Ministerio del Poder Popular para la Salud



Ciencias

Físicas

Biológicas

Sociales



ISSN: 1690 - 4648
Depósito Legal: pp-200303AR314

Vol. LIV, Nº 2, 2014

Maracay - Aragua - Venezuela

BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL

Vol. LIV, N° 2, Agosto-Diciembre, 2014

ISSN: 1690 - 4648 - DEPÓSITO LEGAL pp- 200303AR314

(antes Boletín de Malariología y Saneamiento Ambiental)

MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA SALUD

NANCY E. PÉREZ SIERRA
MINISTRA

VICEMINISTERIO DE REDES
DE SERVICIOS DE SALUD

DEFREN CAMEJO AGUILAR
VICEMINISTRO

DIRECTOR GENERAL
DE INVESTIGACIÓN Y EDUCACIÓN

JOEL JOSÉ CARABALLO
DIRECTOR

SERVICIO AUTÓNOMO
INSTITUTO DE ALTOS ESTUDIOS
“DR. ARNOLDO GABALDON”

TULIA HERNÁNDEZ
DIRECTORA

Editores

José Vicente Scorza
M. Dora Feliciangeli

Secretaría Técnica

Benny Suárez (IAE-MPPS)

Diseño y Diagramación

Oswaldo Flores S. (IAE-MPPS)

Comité Editorial

Francisco Armada (MPPS)
Roberto Briceño León (LaCSO-FaCES-UCV)
Rafael Cásares (Fac. Agronomía-UCV)
Oscar Feo (Fac. Ciencias de la Salud-UC)
Oscar Noya (Inst. Med. Trop.-UCV)
Yasmín Rubio-Palis (UC-MPPS)
Omar Verde (Fac. Veterinaria-UCV)

Comité Honorario

Jorge Alvar (España)
Lenea María Campino (Portugal)
José R. Coura (Brasil)
Philippe Desjeux (Francia)
Felipe Guhl (Colombia)
Santiago Mas Coma (España)
César Náquira (Perú)
Carlos Ponce (Honduras)
Antonieta Rojas de Arias (Paraguay)
Christopher Schofield (Reino Unido)
Rodrigo Zeledón (Costa Rica)

Para envío de artículos: bolmal2012@gmail.com

Para canje: mpps.iae.dgi@gmail.com

Apartado de Correos N° 2171. Maracay 2101. Estado Aragua, Venezuela.

Revista indizada en **Latindex, Lilacs, IMBIOMED, Global Health, Zoological Record, WEB Science Citation Index Expanded 2010**, y pertenece a la colección **SciELO Venezuela**.

Publicada por el Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldon”, ubicado en la Av. Bermúdez Sur, Maracay, estado Aragua, Venezuela.

Esta revista está editada “on line” en la dirección: www.iaes.edu.ve

Boletín de Malariología y Salud Ambiental

Vol. LIV, N° 2

Maracay, Aragua, Venezuela

Agosto-Diciembre, 2014

CONTENIDO

EDITORIAL

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) promueve el uso de las Guías de la Red EQUATOR para Autores, Árbitros y Editores

M. Dora Feliciangeli 118

ARTÍCULOS ORIGINALES

Enzimas y glicoproteínas presentes en extractos de vermes adultos de *Fasciola hepatica*

Enzymes and glycoproteins present in extracts of adult Fasciola hepatica worms

Diana E. Ballen, Mairym Barrios, Greslena Aparicio & Italo M. Cesari 120

Células inflamatorias en la secreción nasal y citocinas proinflamatorias Th1, Th2, Th17 y reguladoras en el suero de pacientes con leishmaniasis cutánea Americana

Inflammatory cells in the nasal secretion and serum pro-inflammatory Th1, Th2, Th17 and regulatory cytokines from American cutaneous leishmaniasis patients

Dennis A. Lugo, Orquídea L. Rodríguez, Wilmen Galindo, María E. Ortega, Ángel Cardozo, Arlet Ferrer, Rosaura Benítez, Aura M. Suarez, Dorila Delgado, Iraida Mendoza, José Carrero, Elizabeth Giganti, Alexis Castrillo, Olga Zerpa & Maira Cabrera 129

Biochemical and biological characterisation of lancehead (*Bothrops venezuelensis* Sandner 1952) snake venom from the Venezuelan Central Coastal range

Caracterización bioquímica y biológica del veneno de la serpiente "tigra mariposa" (Bothrops venezuelensis Sandner 1952) de la región central de la Cordillera de la Costa Venezolana

Elda E. Sánchez, María E. Girón, Nestor L. Uzcátegui, Belsy Guerrero, Max Saucedo, Esteban Cuevas & Alexis Rodríguez-Acosta 138

Parásitos patógenos en arena de playa y su relación con condiciones ambientales, en un balneario de Puerto Cabello, Venezuela, 2012-2013

Pathogens parasites in sand beach and it's relation to environmental conditions in a beach from Puerto Cabello, Venezuela, 2012-2013

Arli Marlinet Guerrero De Abreu, María Virginia Quiñones O., Ernesto José Sequera P. & José Luis Marín Franco 150

Aspectos clínicos y epidemiológicos de la infección por coccidios intestinales en Urumaco, estado Falcón, Venezuela

Clinical and epidemiological aspects of intestinal coccidian infection in Urumaco, Falcon state, Venezuela

Dalmiro Cazorla Perfetti, Geraldine Leal Rojas, Ángela Escalona Nelo, Javier Hernández Nava, María Acosta Quintero & Pedro Morales Moreno 159

Achatina fulica Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda, Achatinidae) carrier of Helminthes, Protozoa and Bacteria in northeast Venezuela

Achatina fulica Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda, Achatinidae) hospedador de helmintos, protozoarios y bacterias en el noreste de Venezuela

Antonio Morocoima, Valmore Rodríguez, René Rivas, Héctor Coriano, Sigdelis Rivero, Rosina Errante, Makeris Mitchell, Leidi Herrera & Servio Urdaneta-Morales 174

Abundancia y Diversidad de Especies de Culicinae (Diptera: Culicidae) del Alto Orinoco, estado Amazonas, Venezuela

Abundance and species diversity of Culicinae (Diptera: Culicidae) from Alto Orinoco, Amazonas, Venezuela

Yasmin Rubio-Palis, Magda Magris, Rodrigo Ramírez Álvarez, Hernán Guzmán, Alexander Suárez & Juan-Carlos Navarro..... 186

Efecto larvicida de extractos metanólicos obtenidos de semillas y hojas de *Persea americana* (Laurales: Lauraceae) (aguacate) sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Larvicide effect of methanolic extracts from seeds and leaves Persea americana (Laurales: Lauraceae) (avocado) on Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)

Irma F. Agrela, Yessika Hidalgo & Flor Herrera 199

Efecto del regulador de crecimiento pyriproxyfen sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) de La Pedrera, Maracay, estado Aragua, Venezuela

Effect of the growth regulator pyriproxyfen on Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) from La Pedrera, Maracay, Aragua, Venezuela

Gianna Martiradonna Ochipinti, Jesús Berti, Luis Antonio Guerra, Marlene Salazar, Carmen Zuleima Escobar & José Ángel Gómez 208

Propuestas para mejorar el manejo de sustancias peligrosas en los Laboratorios del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo

Proposals for improving the handling of hazardous substances in laboratories at the Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Carabobo University

Cristina De Sousa, Mariangel Blanco, Francy Travieso, Angelina Correia & María Cristina Colmenares 220

REPORTE EPIDEMIOLÓGICO

Evolución espacial y temporal de la malaria en el municipio Sifontes del estado Bolívar, Venezuela. 1980-2013

Spatial and temporal evolution of malaria in the municipality of Sifontes, Bolívar State, Venezuela. 1980-2013

Jorge E. Moreno, Yasmin Rubio-Palis, Ángela R. Martínez & Porfirio Acevedo 236

NOTAS CIENTÍFICAS

Nuevos registros de vectores potenciales de Fiebre Amarilla y Mayaro para el estado Guárico, Venezuela. Primer registro de *Haemagogus janthinomys* Dyar para los Llanos centrales de Venezuela

New records of potential yellow fever and mayaro vectors from Guarico State, Venezuela. First record of Haemagogus janthinomys Dyar from the central plains of Venezuela

Elvira Sánchez-González, Jonathan Liria, Rodrigo Ramírez, Manuel Muñoz & Juan-Carlos Navarro 250

Primer registro de *Anopheles (Stethomyia) nimbus* (Theobald, 1902) para el estado Bolívar, Venezuela

First record of Anopheles (Stethomyia) nimbus (Theobald, 1902) for Bolívar state, Venezuela

Jesús Berti, Yarys Estrada, Hernán Guzmán & Lourdes Arias 254

Primer registro de *Panstrongylus rufotuberculatus* (Hemiptera: Reduviidae) para el estado Mérida, Venezuela

First record of Panstrongylus rufotuberculatus (Hemiptera: Reduviidae) in Mérida State, Venezuela

Francys Avendaño-Rangel, Klever Rey, Elis Aldana & Eliecer Lizano 257

NOTICIAS..... 261

REVISTA DE REVISTAS..... 263

ÍNDICE ACUMULADO POR AUTORES..... 267

ÍNDICE ACUMULADO POR MATERIAS 269

LISTA DE ÁRBITROS 271

Editorial

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) promueve el uso de las Guías de la Red EQUATOR para Autores, Árbitros y Editores

El Boletín de Malariología y Salud Ambiental acoge la recomendación de la OPS de promover la difusión y el uso de las Guías de la Red EQUATOR

La calidad de una revista científica depende esencialmente de la calidad de los trabajos que son sometidos y aceptados para su publicación, tras un arbitraje riguroso y constructivo. En el proceso editorial no hay normas establecidas: el Editor, junto con el Comité Editorial, asume la responsabilidad de la aceptación para la publicación toda vez que los Autores, aceptando o refutando oportunamente las sugerencias de los Árbitros, logren que la calidad de su investigación se aprecie a través de la claridad y precisión de la información reportada. Sin embargo, no siempre los resultados son del todo satisfactorios!

Por esta razón, ya desde el año 2001, en el área de salud se ha resaltado la necesidad y se han hecho esfuerzos para estandarizar la metodología en la realización de la investigación y la presentación de los resultados para que éstos fueran más claros, más confiables y reproducibles. Se fueron desarrollando por lo tanto de manera independiente, Guías y lineamientos en diferentes especialidades, dirigidos a sus potenciales usuarios: Autores, Árbitros y Editores y el año 2006, surgió la RED EQUATOR (Enhancing the QUALity and Transparency Of health Research), una iniciativa internacional a través de la cual se decidió recopilar todo el material en un único website: <http://www.equator-network.org/>.

En el año 2010 la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Red EQUATOR Network se aliaron haciendo asequible la información en español de más de 200 Guías para “*mejorar la precisión, la transparencia y el rigor de la investigación y de la información en Salud en América Latina y el Caribe*”, en pro de un más alto nivel académico (<http://www.espanol.equator-network.org/>) y en abril del 2014 emprenden el “Plan de implementación OPS-Red EQUATOR” dirigido en primer lugar a los Editores de Revistas en el área de la Salud.

El Boletín de Malariología y Salud Ambiental responde con interés a este llamado y acoge la recomendación de la OPS de promover la difusión y el uso de las Guías de la Red EQUATOR.

Señalamos en esta comunicación sólo algunas de las más comunes, por considerarlas de mayor pertinencia con los temas de investigación del Boletín de Malariología y Salud Ambiental, con la invitación a Autores y Árbitros a visitar estas páginas, incorporar los lineamientos sugeridos y comprobar el cumplimiento de los mismos.

Estas Guías son:

- **STROBE** (The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology) para estudios observacionales en epidemiología. STROBE Lista de Comprobación.
- **STARD** (Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy) para estudios de precisión diagnóstica. STARD Lista de Comprobación.

- **CONSORT** (Consolidated Standards of Reporting Trials) para ensayos controlados aleatorizados. CONSORT Lista de Comprobación.
- **COREQ** (Consolidated criteria for Reporting Qualitative research) para reportes de investigación cualitativa. COREQ Lista de Comprobación.
- **PRISMA** (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses) para revisiones sistemáticas y metanálisis que evalúan las intervenciones de atención en salud. PRISMA Lista de Comprobación.

Confiamos en que, a medida que estos lineamientos sean adoptados y su uso se convierta en una práctica de constante aplicación, la calidad de los artículos publicados en el Boletín de Malariología y Salud Ambiental sea cada día mejor, al mismo tiempo que se les abre la posibilidad a los Autores y Árbitros de indagar sobre otras Guías que puedan ser de su interés.

M. Dora Feliciangeli
Editora
Bol. Mal. Salud Amb.

Artículos Originales //

Enzimas y glicoproteínas presentes en extractos de vermes adultos de *Fasciola hepatica*

Enzymes and glycoproteins present in extracts of adult Fasciola hepatica worms

Diana E. Ballen^{1*}, Mairym Barrios¹, Greslena Aparicio¹ & Italo M. Cesari^{1,2}

RESUMEN

Fasciola hepatica es un trematodo que causa lesiones en el hígado y vías biliares afectando a herbívoros y al hombre, constituyendo un problema de salud pública en zonas agrícolas a nivel mundial. El parásito posee glicoproteínas y enzimas que facilitan su penetración y migración en los tejidos hospederos. El objetivo fue evaluar estos componentes en extractos [fracción soluble (FS) y fracción particulada (FP)] de vermes adultos de *F. hepatica*. Las fracciones fueron analizadas para proteínas, carbohidratos, actividades enzimáticas, y por electroforesis (SDS-PAGE-15%) en condiciones no reductoras (NR) y reductoras (R). En FS, la concentración de carbohidratos fue 5,63 $\mu\text{mol/mL}$; se detectó la presencia de fosfohidrolasas, glicosidasas y peptidasas, sobresaliendo la actividad Fosfatasa Ácida (1,19 $\mu\text{mol/h/mg}$, pH 5,0). En FP, la concentración de carbohidratos fue más elevada (7,89 $\mu\text{mol/mL}$); se observaron valores elevados de Fosfatasa Alcalina (5,79 $\mu\text{mol/h/mg}$), Fosfatasa Ácida (1,67 $\mu\text{mol/h/mg}$) y moderados de Fosfodiesterasa (0,280 $\mu\text{mol/h/mg}$ pH 9,6). Se detectó actividad Acetilcolinesterasa mayor en FS que en FP (3,95 A/h vs. 1,68 A/h). En SDS-PAGE ambos extractos mostraron polipéptidos de ~80 a 10-kDa; el pre-tratamiento de las muestras con sodio-metaperiodato redujo el número de bandas en cada extracto, sugiriendo la presencia de glicocomponentes. En conclusión, se hallaron enzimas y glicocomponentes en los extractos de *F. hepatica* estudiados, lo cual constituye un aporte en la búsqueda de posibles blancos inmunológicos y farmacológicos para el control de esta parasitosis.

Palabras clave: *Fasciola hepatica*, actividades enzimáticas, glicoproteínas, trematodos.

SUMMARY

Fasciola hepatica is a trematode that causes damage to the liver and biliary tract in both herbivores and man, and is thus an important public health concern in agricultural areas worldwide. This parasite contains glycoproteins and enzymes that facilitate its penetration of, and migration through, host tissues. The aim of this study was to evaluate the relative proportions of these components in the soluble fraction (SF) and *n*-butanol-solubilized extracts of the particulate fraction (PF) of whole homogenates of adult *F. hepatica* worms. Extracts were analyzed for protein and carbohydrate content, and hydrolytic activity. In addition, 15% SDS-PAGE electrophoresis was performed under non-reducing (NR) and reducing (R) conditions to identify other components. The SF contained 5.63 μmol carbohydrate/mL, as well as phosphohydrolases, glycosidases and peptidases, with a high acid phosphatase activity (1.19 $\mu\text{mol/h/mg}$, pH 5.0) that seemed to be characteristic of this fraction. The PF contained 7.89 μmol carbohydrate/mL, with high alkaline phosphatase (5.79 $\mu\text{mol/h/mg}$) and acid phosphatase (1.67 $\mu\text{mol/h/mg}$), and moderate phosphodiesterase (0.280 $\mu\text{mol/h/mg}$ pH 9.6) values. Acetylcholinesterase activity was higher in the SF than the PF (3.95 A/h vs. 1.68 A/h). SDS-PAGE analysis showed the presence of polypeptides in both the SF and the PF of ~80 to 10-kDa. Pretreatment with sodium-metaperiodate reduced the number of bands in each extract suggesting the presence of glycoproteins. The notable presence of enzymes and glycoproteins in the SF and PF extracts of adult *F. hepatica* worms is a first step towards the eventual identification of new immunological and pharmacological targets for the control of this disease.

Key words: *Fasciola hepatica*, enzymatic activity, glycoproteins, trematodes.

¹ Unidad de Trematodiasis. Centro de Microbiología y Biología Celular. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Altos de Pipe, Apartado 21827, Miranda, Venezuela.

² Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Câncer, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo De Meis, Universidade de Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

* Autor de correspondencia: eleanni@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La fascioliasis es una enfermedad parasitaria, causada por el helminto trematodo *Fasciola hepatica* de amplia distribución mundial, que afecta a herbívoros tales como rumiantes, cerdos, equinos, roedores y otros, así como también al hombre (Mas-Coma *et al.*, 2009). A nivel mundial, alrededor de 17 millones de personas se encuentran infectadas y 180 millones están en riesgo de infección, constituyendo un problema de salud pública (WHO, 2010). Los vermes de *F. hepatica* migran a través de varios tejidos hospederos hasta alcanzar los conductos biliares causando daño hospedero en su desplazamiento. De manera similar a lo hallado en la mayoría de los trematodos, *Fasciola* sp. posee enzimas, necesarias para su migración, crecimiento, diferenciación, nutrición que le ayudan a adaptarse a su hospedador, y cumplir su ciclo de vida a fin de garantizar su persistencia (Norbury *et al.*, 2011).

Se han identificado y caracterizado enzimas en los productos de excreción-secreción de *F. hepatica*, algunas consideradas como antígenos en el inmunodiagnóstico de la fascioliasis, otras como candidatas para el desarrollo de vacunas o como proteínas que protegen al parásito de la respuesta inmunitaria del hospedador, entre las cuales destacan: las catepsinas L y D, la tierrodoxina (TRX), la enolasa, la glutatión S-transferasa (GST), la leucina aminopeptidasa (LAP), así como la proteína de unión a ácidos grasos (FABP), la proteína tipo saposina y la superóxido-dismutasa Cu/Zn (SOD-Cu/Zn) (Acosta *et al.*, 2008; Boukli *et al.*, 2011; Dalton *et al.*, 2003; Escalante *et al.*, 2011; Figueroa-Santiago *et al.*, 2011; Farhnaka *et al.*, 2013; Gonzales-Santana *et al.*, 2013; Morphew *et al.*, 2007), y otras con potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Robinson *et al.*, 2013).

En los helmintos, el tegumento es una estructura sincicial citoplasmática anucleada que recubre toda la superficie del parásito (Dalton *et al.*, 2004). Es la interfase que ayuda al parásito a mantener su homeostasis, allí ocurre la absorción e intercambio de nutrientes importante para su supervivencia. En el tegumento residen componentes responsables de los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria y que protegen al parásito contra agentes oxidantes (i.e., enzimas antioxidantes) (Dalton *et al.*, 2004). Dada su importancia en la nutrición y en la evasión

de la respuesta inmunológica, algunas proteínas presentes en el tegumento de los trematodos han sido consideradas blancos ideales para el desarrollo de drogas antihelmínticas y de vacunas (Loukas *et al.*, 2007; Meaney *et al.*, 2003; Mulvenna *et al.*, 2010).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la presencia de glicoproteínas y enzimas en la fracción soluble (FS) y la fracción particulada (FP) obtenidas de los vermes adultos de *F. hepatica*, con el propósito de facilitar su eventual identificación molecular y evaluación como potenciales blancos de acción contra este parásito. Se realizaron determinaciones enzimáticas a diferentes pH, según protocolos descrito previamente por Cesari *et al.* (2000), usando curvas de calibración (A_{405} nm vs. nmol) para interpolar la absorbancia de los grupos *p*-nitrofenol o *p*-nitroanilina liberados por la hidrólisis de los respectivos sustratos sintéticos, y se realizaron también análisis del respectivo perfil proteico mediante SDS-PAGE.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las fracciones soluble y particulada de vermes adultos de F. hepatica

Vermes adultos de *F. hepatica* fueron resuspendidos en 2 mL de agua milli-Q, agregando inhibidores de enzimas proteolíticas [PMSF (1 mM), $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (1-2 mM), Leupeptina (5-10 $\mu\text{g/mL}$), Aprotinina (1 $\mu\text{g/mL}$), Pestatina A (1-15 $\mu\text{g/mL}$)]. Los parásitos fueron homogeneizados y la suspensión resultante fue ultracentrifugada a 100.000 g por 2 h a 4°C (Ultracentrífuga Beckman Modelo L8-55). El sobrenadante representó la Fracción Soluble (FS); el sedimento se resuspendió en agua milli-Q, se re-homogenizó y se ultracentrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. El sobrenadante de esta última centrifugación se descartó y el sedimento membranoso o fracción particulada (FP) se resuspendió en 1 mL de agua milli-Q y la suspensión se sometió a un proceso de extracción butanólica.

Extracción de la fracción particulada con n-butanol

A 1 mL de FP se le añadió 1 mL de *n*-butanol saturado con agua (v/v), se agitó vigorosamente por 10 min y la emulsión se centrifugó a 20.000 g/20 min a 4°C. Se descartó la fase orgánica y se recuperó la fase acuosa, mientras que el material sólido restante en la interfase fue re-extraído con *n*-butanol. A ambas

fracciones se les determinó proteínas por el método de Bradford (1976) y carbohidratos por el método fenol-ácido sulfúrico descrito por Masuko *et al.* (2005).

Actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas ensayadas fueron: (1) Fosfatasa ácida (FAC, pH 5,0) y Fosfatasa alcalina (FAL, pH 9,6), utilizando *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) como sustrato. (2) Fosfodiesterasa alcalina (FDE, pH 9,6) con el sustrato 5'-timidina-monosfosfo-*p*-nitro-éster (5'-TMP). (3) Los sustratos L-leucin y L- α -alanil *p*-nitroanilida fueron usados para medir las actividades leucina (LAP; pH 8,0) y alanina aminopeptidasa (AAP; pH 8,0) respectivamente. (4) La N-acetil- β -D-glucosaminidasa (β -NAG; pH 5,5) se determinó con *p*-nitrofenil β -N-acetilglucosaminida y la α -Manosidasa (α -MAN; pH 5,6) con *p*-nitrofenil α -manósido (Cesari *et al.*, 2000). Las reacciones realizadas a pH ácido y alcalino se detuvieron con 1 N NaOH, excepto las reacciones aminopeptidasas donde se utilizó ácido acético a 2 M. La absorbancia (A) a 405 nm se leyó en un lector de placas SpectraMax 250 (Molecular Devices). Los valores de A_{405} nm se interpolaron en curvas de calibración de A_{405} nm vs. nmol de *p*-nitrophenol [*p*-NP] o *p*-nitroanilida [*p*-NA]. La actividad enzimática fue expresada en términos de micromoles de sustrato hidrolizado por hora [μ mol/h], definiéndose a la actividad específica como la actividad referida a la concentración de proteínas (μ mol/h/mg). El ensayo para acetilcolinesterasa (AChE, pH 7,6) se realizó a 37°C empleando como sustrato yoduro de acetilcolina (Ellman *et al.*, 1961). La lectura se hizo a 405 nm y la actividad específica fue expresada como A/h referida a la concentración de proteínas [A/h/mg].

Electroforesis unidimensional en Geles de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los componentes proteicos (10 μ g) de FS y FP se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE al 15% en condiciones no reductoras (NR) y reductoras (R, con β -mercaptoetanol) según Laemmli (1970). El gel fue teñido con Azul de Coomassie. Se evaluó la presencia de componentes glicosilados en FS y FP, utilizando un kit para detección de glicoproteínas (Immuno-Blot Kit for Glycoprotein Detection. Bio-Rad N° 170-6490).

Análisis Estadísticos

Todos los datos fueron procesados y analizados estadísticamente por Excel (Microsoft® Office®). Todas las actividades enzimáticas fueron reportadas como promedio $\pm$ 3 DEM de μ mol/h/mg y A/h/mg para la actividad enzimática AChE de 3 experimentos independientes (n = 3).

RESULTADOS

Determinación de carbohidratos en las preparaciones FS y FP de adultos de Fasciola

Se observó mayor presencia de compuestos glicosilados en FP ($7,89 \pm 0,55$ μ mol/mL) que en FS ($5,63 \pm 0,77$ μ mol/mL).

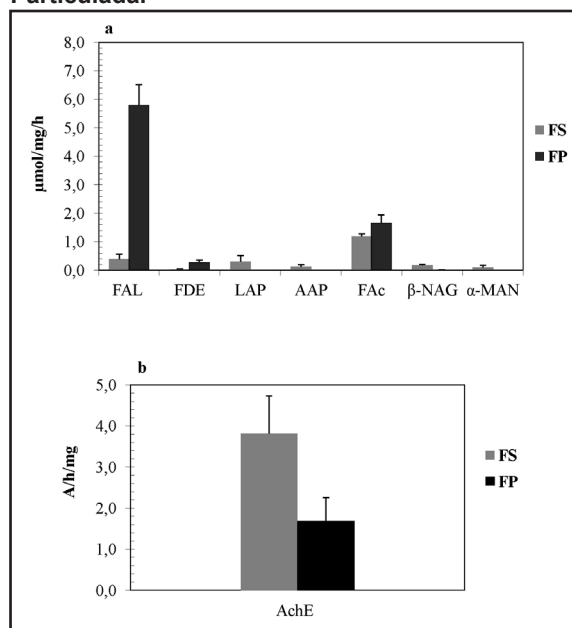
Actividad enzimática en FS y FP

Los resultados indican que en la FP, las actividades enzimáticas FAL (pH 9,6; $5,79 \pm 0,718$ μ mol/mg/h), FAC [pH 5,0; $1,67 \pm 0,27$ μ mol/mg/h] y FDE [pH 9,6; $0,28 \pm 0,08$ μ mol/h/mg] fueron más elevadas que en la FS [FAL, pH 9,6; $0,383 \pm 0,18$ μ mol/mg/h; FAC, pH 5,0; $1,190 \pm 0,089$ μ mol/mg/h; FDE, pH 9,6; $0,028 \pm 0,02$ μ mol/mg/h] (Fig. 1a). Las actividades monoaminopeptidasas LAP [pH: 8,0; $0,299 \pm 0,22$ μ mol/mg/h] y AAP [pH: 8,0; $0,123 \pm 0,07$ μ mol/mg/h] se hicieron presentes solo en FS, mientras que las glicosidasas β -NAG [$0,006 \pm 0,010$ μ mol/mg/h] y α -MAN [$0,002 \pm 0,0$ μ mol/mg/h] fueron muy bajas en FP que en la FS [β -NAG, pH: 5,6; $0,173 \pm 0,04$ μ mol/mg; α -MAN, pH: 5,6; $0,108 \pm 0,06$ μ mol/h/mg] (Fig. 1a). Con respecto a la AChE (determinada a pH 7,6) fue mayor en FS [$3,95$ A/h/mg] que en FP [$1,68$ A/h/mg] (Fig. 1b).

ID SDS-PAGE (15%)

Perfil de proteínas: Se observaron bandas en FS [NR y R] con masa molecular comprendida entre 62 y 10 kDa (Fig. 2, carril 1 y 2). Las bandas NR detectadas en FS fueron de 62, 60, 48, 45, 38, 36, 32, 25, 24, 21, 15, 14, 13, 12, 11 y 10 kDa (carril 1); luego de reducción, la mayoría de las bandas continuaron viéndose como tal en el gel pero con intensidad variable, excepto las de 62, 48 y 32 kDa que desaparecieron, apareciendo una banda de 40 kDa (carril 2).

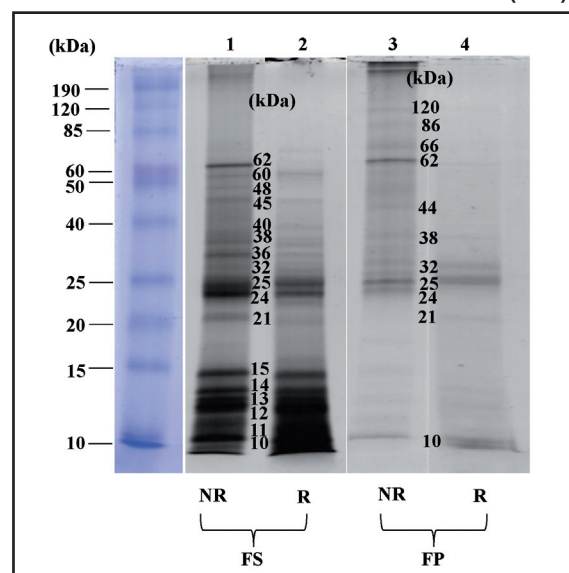
Fig. 1. Actividades enzimáticas en FS (100.000 g) y FP solubilizada mediante extracción butanólica, detectadas a diferentes pHs sobre sustratos sintéticos. (a) FAL (Fosfatasa Alcalina; pH 9,6), FDE (Fosfodiesterasa; pH 9,6), LAP (Leucina Aminopeptidasa; pH 8,0), Alanina Aminopeptidasa (AAP; pH 8,0), FAc (Fosfatasa Acida; pH 5,0), β -NAG (N-Acetil- β -D-Glucosaminidasa; pH 5,5), α -MAN (α -manosidasa; pH 5,5). (b) Actividad acetilcolinesterasa (AChE; pH 7,6). Resultados de 3 experimentos independientes (n = 3, promedio $\pm$ 3 DEM). FS: Fracción Soluble; FP: Fracción Particulada.



En geles 1D de FP en condiciones NR (Fig. 2, carril 3), se observó un patrón más simple de aproximadamente 10 bandas en el intervalo de 120 a 10 (~ 120 kDa, 86, 66, 62, 44, 38, 32, 25, 24, 10). Luego de reducción (Fig. 2, carril 4), continuaron observándose las bandas de 62, 38, 32, 25 y 10kDa pero con intensidad variable, desapareciendo las bandas de alto p.m., las de 44 y 24 kDa, y apareciendo una banda de 21 kDa.

Perfil de glicoproteínas: Después de tratamiento de la FS con el kit para detección de glicoproteínas (Immuno-Blot Kit for Glycoprotein Detection), bajo condiciones NR (Fig. 3a, carril, 2), se observaron bandas de aprox. 64, 60, 42, 25, 23, 14 y 12 kDa; luego de reducción, se continuaron viendo las mismas bandas pero con intensidad variable; aparecieron bandas de 50, 39 y 28 kDa (carril, 4) y

Fig. 2. SDS-PAGE (15%) en condiciones NR (no reductoras) y R (reductoras) de FS y FP del parásito adulto *F. hepatica*. (10 μg de cada fracción) luego de tinción con Coomassie. FS (NR, carril 1), FS (R, carril 2), FP (NR, carril 3), FP (R, carril 4). Marcadores de Peso Molecular Pre-teñidos (kDa).

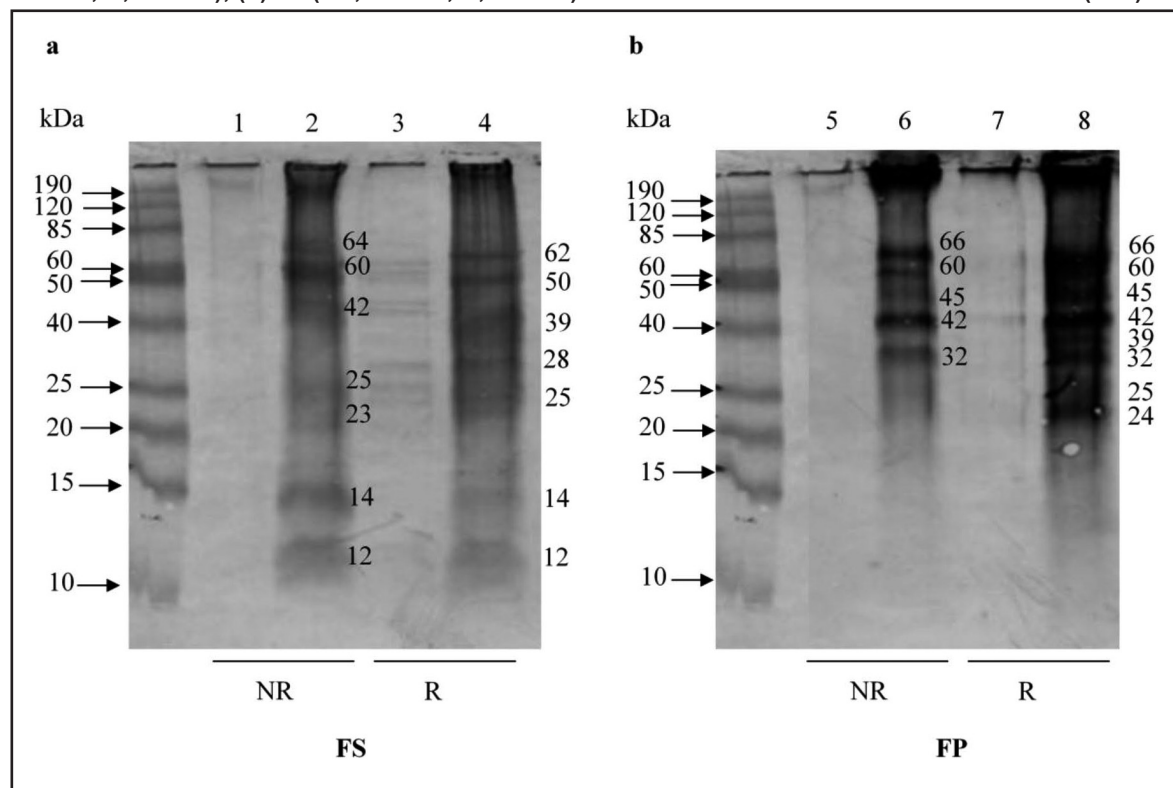


desaparecieron las de 64, 42 y 23 kDa (Fig. 3a, carril, 4). Los carriles 1 y 3 corresponden a la FS no tratada con el kit (Fig. 3a). En FP, tanto en condiciones NR como en R (Fig. 3b, carril 6 y 8), se detectaron bandas de 66, 60, 45, 42 y 32 kDa, excepto que en FP (R) aparecieron bandas de 39, 25 y 24 kDa (carril 8). Los carriles 6 y 7 corresponden a la FP no tratada con el kit (Fig. 3b).

DISCUSIÓN

La expresión y secreción de enzimas en los parásitos es de importancia fundamental en los procesos de invasión, nutrición, desarrollo, adaptación, virulencia, evasión y modulación inmune del hospedador por parte del parásito, todo lo cual ha sido descrito en *Fasciola* sp. (McVeigh *et al.*, 2012; Norbury *et al.*, 2011). En el presente estudio, reportamos la presencia diferencial de enzimas y glicocomponentes en las fracciones subcelulares soluble (FS) y particulada (FP) de vermes adultos de *F. hepatica*. Las actividades enzimáticas que se mostraron más relevantes en términos cuantitativos fueron las fosfomonoesterasas, estando la FAL (pH 9,6) y la FAc (pH 5,0) bastante elevadas en FP. El haber encontrado actividades con pH óptimo diferentes

Fig. 3. Detección mediante blotting de componentes glicosilados (glicoproteínas) en FS y FP del parásito adulto *F. hepatica* tratadas con kit para detección de carbohidratos. Los componentes fueron separados por SDS-PAGE (15%) en condiciones NR y R. (a) FS (NR, carril 2), FS (R, carril 4); (b) FP (NR, carril 6), FP (R, carril 8). Controles (muestras no tratadas para detección de carbohidratos): (a) FS (NR, carril 1; R, carril 3); (b) FP (NR, carril 5; R, carril 7). Marcadores de Peso Molecular Pre-teñido (kDa).



en la misma fracción se podría explicar porque el sedimento a 100 000 x g contiene tanto fragmentos de membrana plasmática del tegumento de estos trematodos (sede usual de las enzimas que trabajan *in vitro* a pH alcalino) como fragmentos intracelulares de membrana que delimitan compartimentos ácidos y organelas enteras como los lisosomas (sede usual de enzimas catabólicas que funcionan a pH ácido). Las proteínas unidas a membrana se extrajeron utilizando el solvente orgánico *n*-butanol, que desnatura y despolimeriza la mayor parte de proteínas de membrana sin afectar completamente aquellas que poseen cierto grado de glicosilación (glicoproteínas), muchas de las cuales logran preservar su estructura, función catalítica y antigenicidad después de este proceso, como ha sido demostrado en *S. mansoni* (Cesari *et al.*, 2005; 2002).

Hasta ahora no hemos encontrado descripción de actividad FAL asociada con preparaciones membranosas de *Fasciola* sp. Por otra

parte, la actividad FAc hallada en FS concuerda con resultados reportados por Probert & Lwin, (1974) quienes detectaron alta actividad FAc [pH 4,5 - 5,0] y baja actividad FAL [pH 9,0] en extractos solubles y fracciones subcelulares (mitocondrial y lisosomal) de *F. hepatica*. Los estudios realizados con *S. mansoni* han reportado que la FAL está asociada con fracciones membranosas de la cercaría, esquistosómulo, vermes adultos, particularmente en la superficie, donde parece jugar un papel importante en la invasión y adaptación del parásito al hospedador (Araujo-Montoya *et al.*, 2011; Cesari *et al.*, 1981; Fernández & Cortéz, 2002), y es considerada candidata a ser ensayada como vacuna contra la esquistosomiasis mansoni (Sulbaran *et al.*, 2013). Se observó actividad Fosfodiesterasa alcalina (FDE) más elevada en FP que en FS. Esta enzima, hasta ahora con función desconocida en este parásito, fue detectada en extractos solubles de *F. hepatica* (Mansour & Mansour, 1979). La FDE hidroliza enlaces fosfodiésteres y es estimulada por cloruro de magnesio y calcio, formando parte del

sistema de enzimas (junto con FAL y difosfohidrolasa) de recuperación de bases nucleotídicas (Braschi & Wilson, 2006; Cesari *et al.*, 1992).

No se observaron actividades monoaminopeptidasas en FP; pero en FS, se detectaron actividades de α -AAP (la cual libera preferiblemente alanina), y LAP (que libera leucina). Acosta *et al.* (1998) describieron actividad LAP en un extracto soluble de *F. hepatica* y su actividad se observó asociada principalmente con las células del tracto digestivo, lo cual concuerda con la actividad LAP hallada en FS. Por otra parte, la LAP forma parte de los productos de excreción-secreción de *F. hepatica* y es considerada un marcador de diagnóstico por ser un antígeno inmunodominante en esta fracción (Marcilla *et al.*, 2008); además, es capaz de inducir protección contra la fascioliasis en animales (Acosta *et al.*, 2008).

Las actividades glicosídicas N-Acetil- β -Glucosaminidasa (β -NAG) (que degradan oligosacáridos unidos por enlaces tipo-N, como en la mucina) y α -manosidasa (α -MAN), enzimas de origen lisosomal, solo se detectaron en FS. Hasta ahora, no hemos visto reportes de éstas actividades en *Fasciola* sp.; sin embargo, estudios realizados por Irwin *et al.* (2004) describieron la presencia de β -glucosaminidasa, β -galactosidasa y β -hexosaminidasa en productos de excreción-secreción de *F. hepatica*, extrapolando estar probablemente involucradas en la degradación de azúcares y glicoproteínas hospederas durante la penetración en los tejidos del hospedador y en la digestión de glicoproteínas que sirven para su nutrición. En el trematodo *Paragonimus westermani*, la actividad β -NAG se halló elevada en FS, siendo en este caso ser una enzima probablemente relacionada con la necesidad de degradar los numerosos sustratos glicosilados comúnmente presentes en las secreciones pulmonares, su hábitat natural (Gómez *et al.*, 2010). La α -MAN, también involucrada en la degradación de mucinas, fue igualmente detectada en esta fracción de *P. westermani* (Gómez *et al.*, 2010).

En el presente trabajo, la actividad AChE fue más marcada en la FS que en la FP, lo cual concuerda con los reportado por Frady & Knapp (1967), quien detectó esta actividad en extractos solubles de la etapa adulta de *Fasciola* sp. Arnon *et al.* (1999) hallaron esta enzima asociada al tejido muscular y en la superficie del tegumento de *S. mansoni* ayudando

a la adquisición de glucosa como nutriente para la supervivencia del parásito.

Los estudios realizados en FS y FP mediante análisis por SDS-PAGE, en condiciones reductoras y no reductoras, mostraron la presencia de proteínas comunes en ambas fracciones, identificadas con las masas moleculares de: 62, 45-44, 38, 32, 25, 24, 21 y 10 kDa. Éstos resultados concuerdan, y además se ven reforzados, con los estudios de Meshgi *et al.* (2008) obtenidos con una preparación de antígenos somáticos de adultos de *F. hepatica* en la cual se caracterizó el perfil de proteínas, reportando bandas de aprox. 62, 46, 36, 33 y kDa. De manera semejante, De Almeida *et al.* (2007) observaron en un extracto soluble del parásito, luego de SDS-PAGE (15%) y WB bajo condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR), bandas de 66, 45, 21, 12, 11, 10 y 9 kDa; estos autores reportaron además un reconocimiento específico de antígenos de 57, 46-44, 38, 10, 9 y 8 kDa en FS por sueros de pacientes infectados, considerado relevante para el diagnóstico de ésta enfermedad parasitaria.

En el presente trabajo, se halló mayor contenido glicosídico en la FP que en FS. El tegumento de *F. hepatica* es de naturaleza sincicial cubierto de un glicocalix, contiene numerosas mitocondrias y vesículas secretoras, y está delimitado por dos capas membranosas de 12 nm (Threagold, 1976). En *F. hepatica*, el tegumento es una de las regiones de contacto del parásito con el medio que lo rodea y por lo tanto constituye una de las interfases entre el parásito y el hospedador, siendo la otra interfase la mucosa intestinal que recubre el aparato digestivo de estos parásitos. Se encuentra involucrado en la renovación de la membrana externa, nutrición (mediante la internalización de moléculas), modulación, secreción, transducción de señales y en la evasión inmune (Wilson, *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de varios estudios de proteómica en diferentes preparaciones de *F. hepatica*, incluyendo tegumento y secreciones, publicados recientemente (Haçariz, *et al.*, 2014., Morales & Espino, 2012., Wilson, *et al.*, 2011), no hemos podido encontrar aún información sobre las enzimas y los componentes que fueron objeto del presente estudio, los cuales, podrían ser de importancia funcional para el parásito y también para la respuesta inmunológica, pudiendo quizás ser eventuales blancos para el desarrollo de drogas y vacunas.

Debido a la selectiva resistencia a la desnaturalización por *n*-butanol de glicoproteínas, asumimos en consecuencia que la mayoría de las moléculas que observamos en FP, luego de SDS-PAGE, está glicosilada. Usando un kit para la tinción de glicoproteínas, pudimos de hecho demostrar la mayoritaria presencia de bandas glicosiladas en los perfiles electroforéticos de FS y en el extracto butanólico de FP. En esta última fracción, entre las bandas fuertemente detectadas llama la atención, el componente de 42 kDa. La banda de 42 kDa podría corresponder a la actina, una proteína muy conservada entre especies con masa molecular de 45-42 kDa. En *F. hepatica*, los filamentos de actina están localizados en el tegumento del parásito adulto (Tansattit *et al.*, 2006), y es considerada candidata potencial para vacuna contra la fascioliasis (Boukli *et al.*, 2011).

Los resultados descritos en el presente trabajo muestran la presencia de actividades enzimáticas y glicocomponentes en las FS y FP de vermes adultos de *F. hepatica*. Las actividades enzimáticas FAL y FAc fueron las más relevantes en la FP, siendo la actividad FAL muy alta en esta fracción. Aunque la relevancia de la presencia y/o ausencia de cada componente glicosídico y enzimático en *F. hepatica* aún no está completamente definida, los componentes descritos, deben ser estudiados con mayor profundidad hasta confirmar su identidad molecular ya que podrían ofrecer posibles blancos para el entendimiento de la interacción parásito-hospedador, de intervención inmunológica y/o farmacológica, así como constituirse en antígenos con alta sensibilidad y especificidad para el inmunodiagnóstico de la fascioliasis.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos que no existen conflictos de intereses en la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Douglas Oliva quien obtuvo los gusanos adultos de *Fasciola hepatica* a partir de los conductos biliares de hígados infectados de ganado que llegaron al matadero Industrial de Paraguaná, Bel C.A, Yaracal- Edo. Falcón, y gentilmente nos los donó.

REFERENCIAS

- Acosta D., Gonhi F. & Carmona, C. (1998). Characterization and partial purification of a leucine aminopeptidase from *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* **84**: 1-7.
- Acosta D., Cancela M., Piancenza L., Roche L., Carmona C. & Tort, J. (2008.) *Fasciola hepatica*. Leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **158**: 52-64.
- Araujo-Montoya B. O., Rofatto H. K., Tararam C. A., Farias L. P., Oliveira K. C., Verjovski-Almeida S., *et al.* (2011). *Schistosoma mansoni*: Molecular characterization of alkaline phosphatase and expression patterns across life cycle stages. *Exp Parasitol.* **129**: 284-291.
- Arnon R., Silman I. & Tarrab-Hazdai R. (1999). Acetylcholinesterase of *Schistosoma mansoni*: functional correlates. Contributed in honor of Profesor Hans Neurath's 90 birthday. *Prot. Sci.* **8**: 2553-2561.
- Boukli N. M., Delgado B., Ricaurte M. & Espino A. M. (2011). *Fasciola hepatica* and *Schistosoma mansoni*: identification of common proteins by comparative proteomic analysis. *J. Parasitol.* **97**: 852-861.
- Bradford M. (1976). A rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Braschi S. & Wilson R. (2006). Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. *Mol. Cell Proteom.* **5**: 347-356.
- Cesari I. M., Simpson A. & Evans W. (1981). Properties of a series of tegumental membrane bound phosphohydrolase activities of *Schistosoma mansoni*. *Biochem. J.* **198**: 467-473.
- Cesari I. M., Bouty I., Bout D., De Noya B. & Hoebeke J. (1992). Parasites enzymes as tool to investigate immune response. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **87**: 55-65.

- Cesari I. M., Ballen D. E., Perrone T., Hoebeke J. & Bout D. (2000). Enzyme activities in *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen. *Int. J. Parasitol.* **86**: 1137-1140.
- Cesari I. M., Mendoza L., Ballen D. E. & Alarcón de Noya B. (2002). Evaluación del "IEFA" como técnica de inmunodiagnóstico en el programa de lucha contra la bilharziosis. *Bol. Dir. Malarinol. San. Amb.* **42**: 29-32.
- Cesari I. M., Ballen D. E., Mendoza L. & Matos C. (2005). Detection of *Schistosoma mansoni* membrane antigens by immunoblot análisis of sera of patients from low transmission areas. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **12**: 280-286.
- Dalton J., Neill S., Stack C., Collins P., Walshe A., Sekiya M., et al. (2003). *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int. J. Parasitol.* **33**: 1173-1181.
- Dalton J. P., Skelly P. & Halton D. W. (2004). Role of the tegument and gut in nutrient uptake by parasitic platyhelminths. *Can. J. Zool.* **82**: 211-232.
- De Almeida M., Ferreira M., Planchart S., Terashima A., Maco V., Marcos L., et al. (2007). Preliminary antigenic characterization of an adult worm vomit preparation of *Fasciola hepatica* by infected human sera. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* **49**: 31-35.
- Ellman G., Courtney K., Andres V. & Feather R. (1961). A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**: 88-95.
- Escalante H., Davelois K., Ortiz P., Rodriguez H., Diaz H. & Jara C. (2011). Estandarización de la técnica de western blot para el diagnóstico de la fasciolosis humana utilizando antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*. *Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública.* **28**: 454-461.
- Farahnak A., Golestani A. & Eshraghian M. (2013). Activity of superoxide dismutase (SOD) enzyme in the excretory-secretory products of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* parasites. *Irian J. Parasitol.* **8**: 167-170.
- Fernandez M. & Cortez J. (2002). *Caracterización bioquímica e inmunológica de la actividad enzimática del esquistosómulo de Schistosoma mansoni*. Tesis de Pregrado, Bioanálisis, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.
- Figueroa-Santiago I., Delgado B. & Espino A. (2011). *Fasciola hepatica* saposin-like protein-2 based ELISA for the serodiagnosis of chronic human fascioliasis. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* **70**: 355-361.
- Fraday C. & Knapp S. (1967). A radioisotopic assay of acetylcholinesterase in *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* **53**: 298-302.
- Gomez E., Ballen D. E., Tulio M., Díaz Z., Zavala-Jaspe R., Alarcón de Noya B., et al. (2010). Diversidad enzimática de la fracción soluble de un aislado venezolano de adultos *Paragonimus* sp. *Bol. Mal. Salud Amb.* **1**: 75-84.
- Gonzales-Santana B., Dalton J. P., Vásquez Camargo F. & Parkinson M. (2013). The diagnosis of human Fascioliasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant cathepsin L protease. *PloS. Negl. Trop. Dis.* **7**: e2414.
- Haçarız O., Baykal A. T., Akgün M., Kavak P., Sağiroğlu M. Ş. & Sayers G. P. (2014). Generating a detailed protein profile of *Fasciola hepatica* during the chronic stage of infection in cattle. *Proteomics.* **14**: 1519-1530.
- Irwin J., Morrissey P., Ryan J., Walshe A., O'Neill S. M., et al. (2004). Glycosidase activity in the excretory-secretory products of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitol.* **29**: 465-472.
- Laemmli U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Loukas A., Tran M. & Pearson M. S. (2007). Schistosome membrane proteins as vaccines. *Int. J. Parasitol.* **37**: 257-263.
- Mansour T. & Mansour J. (1979). Phosphodiesterase in the liver fluke. *Fasciola hepatica*. *Biochem. Pharmacol.* **26**: 2325-2330.

- Marcilla A., De la Rubia J., Sotillo J., Bernal D., Carmona C., Villavicencio Z., *et al.* (2008). Leucine aminopeptidase is an immunodominant antigen of *Fasciola hepatica* excretory and secretory products in human infections. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**: 95-100.
- Mas-Coma S., Valero M. A. & Bargues M. D. (2009). *Fasciola*, Lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv. Parasitol.* **69**: 41-146.
- Masuko T., Minami A., Iwasaki N., Majima T., Nishimura S. & Lee Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Anal. Biochem.* **339**: 69-72.
- Meaney M., Fairweather I., Brennan G. P., McDowell L. S. & Forbes A. B. (2003). *Fasciola hepatica*: effects of the fasciolicide clorsulon *in vitro* and *in vivo* on the tegumental surface, and a comparison of the effects on young- and old-mature flukes. *Parasitol. Res.* **91**: 238-250.
- Meshgi B., Eslami A. & Hemmatzad F. (2008). Determination of somatic and excretory-secretory antigens of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* using SDS-PAGE. *Iranian J. Vet. Res.* **9**: 77-80.
- McVeigh P., Maule A. G., Dalton J. P. & Robinson M. W. (2012). *Fasciola hepatica* virulence associated cysteine peptidases: a systems biology perspective. *Microbes Infect.* **14**: 301-310.
- Morales A. & Espino A. M. (2012). Evaluation and characterization of *Fasciola hepatica* tegument protein extract for serodiagnosis of human fascioliasis. *Clin. Vaccine Immunol.* **19**: 1870-1878.
- Morphew R. M., Wright H. A., LaCourse E. J., Woods D. J. & Brophy P. M. (2007). Comparative proteomics of excretory-secretory proteins released by the liver fluke *Fasciola hepatica* in sheep host bile and during *in vitro* culture ex host. *Mol. Cell. Proteomics.* **6**: 963-972.
- Mulvenna J., Moertel L., Jones M. K., Nawaratna S., Lovas E. M., Gobert G. N., *et al.* (2010). Exposed proteins of the *Schistosoma japonicum* tegument. *Int. J. Parasitol.* **40**: 543-554.
- Norbury L., Beckham S., Pike R., Grams R., Spithill T., Fecondo J., *et al.* (2011). Adult and juvenile *Fasciola* cathepsin L proteases: Different enzymes for different roles. *Biochem.* **93**: 604-611.
- Probert A. & Lwin T. (1974). Kinetic properties, and location of nonspecific phosphomonoesterases in subcellular fractions of *Fasciola hepatica*. *Exp. Parasitol.* **35**: 253-261.
- Robinson M. W., Dalton J. P., O'Brien B. A. & Donnelly S. (2013). *Fasciola hepatica*: The therapeutic potential of a worm secretome. *Int. J. Parasitol.* **43**: 283-291.
- Sulbarán G., Noya O., Brito B., Ballén D. E. & Cesari I. M. (2013). Immunoprotection of mice against *Schistosomiasis mansoni* using solubilized membrane antigens. *PloS. Negl. Trop. Dis.* **7**: e2254.
- Tansatit T., Sahaphong S., Riengrojpitak S., Viyanant V. & Sobhon P. (2006). Immunolocalization of cytoskeletal components in the tegument of the 3-week-old juvenile and adult *Fasciola gigantica*. *Vet. Parasitol.* **135**: 269-278.
- Threadgold L. (1976). *Fasciola hepatica*: ultrastructure and histochemistry of the glycocalyx of the tegument. *Exp. Parasitol.* **39**: 119-134.
- Wilson R. A., Wright J. M., de Castro-Borges W., Parker-Manuel S. J., Dowle A. A., *et al.* (2011). Exploring the *Fasciola hepatica* tegument proteome. *Int. J. Parasitol.* **4**: 1347-1359.
- WHO (2010). *Neglected tropical Diseases*. [Documento en línea]. Disponible en: <http://www.who.int/neglected/fascioliasis/index.html>. [Consulta: septiembre de 2011].

Recibido el 05/01/2014
Aceptado el 11/08/2014

Células inflamatorias en la secreción nasal y citocinas proinflamatorias Th1, Th2, Th17 y reguladoras en el suero de pacientes con leishmaniasis cutánea Americana

Inflammatory cells in the nasal secretion and serum pro-inflammatory Th1, Th2, Th17 and regulatory cytokines from American cutaneous leishmaniasis patients

Dennis A. Lugo¹, Orquídea L. Rodríguez¹, Wilmen Galindo¹, María E. Ortega¹, Ángel Cardozo², Arlet Ferrer², Rosaura Benítez², Aura M. Suarez², Dorila Delgado², Iraida Mendoza², José Carrero², Elizabeth Giganti², Alexis Castrillo², Olga Zerpa¹ & Maira Cabrera^{*1}

RESUMEN

En la forma mucocutánea (LCM) y cutánea (LCL) de la leishmaniasis, se genera una respuesta inflamatoria cuyos mediadores (células y citocinas) se han involucrado en la severidad de las úlceras y en el daño tisular observado en estos pacientes, particularmente en los LCM. Por ello, nos propusimos identificar los grupos celulares predominantes en la secreción nasal de pacientes con LCL y LCM, y relacionarlos con citocinas proinflamatorias y reguladoras. Evaluamos en pacientes LCL (n=20), LCM (n=14) y 20 individuos sanos: a) La cuantificación de tipos de leucocitos en "frotis" de secreción nasal, úlceras cutáneas y sangre periférica teñidos con Giemsa empleando microscopía óptica, b) Concentraciones séricas de IL-8, IL-4 e IL-10 por citometría de flujo (CBA array) e IFN- γ , TNF- α e IL-17 por ELISA. El grupo celular predominante en la secreción nasal de pacientes con LCM fueron los neutrófilos (80,7%) y escasos eosinófilos (0,6%), comparados con los LCL y controles, en los que no se observaron estas células. Mientras que los "frotis" de las úlceras de los LCL presentaron 45,3% de neutrófilos y 43% de linfocitos. En contraste, en sangre periférica, de los pacientes se observó un incremento de neutrófilos y linfocitos junto a una frecuencia significativa de monocitos (LCM: 5,3; LCL: 6,3%) y eosinófilos (LCM: 8,2%; LCL: 5,2%). Todo esto sugiere la participación de los neutrófilos en la inmunopatogénesis en la LCM. Adicionalmente, se demostró una mayor ($P=0,03$) concentración sérica de IL-8 en los pacientes con LCL (18,5pg/mL) y LCM (18,2pg/mL) respecto a los individuos sanos, sugiriendo que esta citocina promueve el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección en los LCM, mientras que en los LCL contribuyen junto con los linfocitos T CD4+ de la subpoblación Th1 y productores de IFN- γ , en la activación de mecanismos leishmanicidas.

Palabras clave: leishmaniasis, células polimorfonucleares, citocinas, secreción nasal.

SUMMARY

In mucocutaneous (MCL) and cutaneous (LCL) leishmaniasis, the inflammatory mediators (cytokines and cells) have been associated with ulcers severity and tissue damage observed in these patients, particularly in MCL. Therefore, we decided to identify the predominant cell groups in the nasal secretion of LCL and MCL patients, and related pro-inflammatory and regulatory cytokines. It was evaluated in LCL (n = 20), MCL patients (n = 14) and 20 healthy volunteers: a) Differential leukocyte count by optical microscopy performed in: smear of a runny nose, skin ulcers and peripheral blood dyed with Giemsa, b) serum levels of IL-8, IL-4 and IL-10 using cytometric bead array (CBA) assay and IFN- γ , TNF- α and IL-17 by ELISA. In MCL patients, neutrophils (80.7%) were the most abundant cellular group in nose secretion, followed by a small amount of eosinophils (0.6%) compared to the LCL and controls, where no such cells were observed. In contrast, in peripheral blood from ACL patients were observed an abundant amount of neutrophils and lymphocytes together with a significant frequency of monocytes (MCL:5.3%; LCL: 6.3%) and eosinophils (MCL:8.2%; LCL:5.2%). While the smear from skin ulcers of LCL patients showed 45.3% of neutrophils and 43% lymphocytes. All of these indicate that neutrophils might play a role in the MCL immunopathogenesis. Moreover, an increased serum levels of IL-8 ($P=0.03$) were found in LCL (18.5pg/mL) and MCL (18.2pg/mL) patients, suggesting that this cytokine promotes the recruitment of neutrophils to the infection site in MCL; while in LCL patients may contribute with CD4 + Th1 (IFN- γ) cells in the activation of leishmanicida mechanisms.

Key words: leishmaniasis, polymorphonuclear cells, cytokines, nasal secretion.

¹ Instituto de Biomedicina "Jacinto Convit". Universidad Central de Venezuela - Ministerio del Poder Popular para la Salud (UCV-MPPS). San Nicolás a Providencia. Parroquia San José. Caracas 1010A, Venezuela.

² Servicios de Dermatología Sanitaria Regionales. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Venezuela.

*Autor de correspondencia: mairacab@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis cutánea Americana (LCA) es una enfermedad causada por la infección con protozoarios del género *Leishmania*. Dependiendo de la especie del parásito involucrado y de la respuesta inmunológica de los individuos infectados (WHO, 2000; Murray *et al.*, 2005), esta enfermedad se puede manifestar en diferentes formas clínicas que afectan la piel o las superficies mucosas, estas son: leishmaniasis cutánea localizada (LCL), mucocutánea (LCM) y leishmaniasis cutánea difusa (LCD) (Convit *et al.*, 1993).

En la forma localizada y mucocutánea de la leishmaniasis, se establece una respuesta inflamatoria cuyos mediadores (células y citocinas) han sido implicados en la resolución y severidad de esta enfermedad (Cabrera *et al.*, 2003; Tapia *et al.*, 2009; Kaye & Scott, 2011).

En la primera línea de defensa contra esta parasitosis están involucrados los neutrófilos junto con los macrófagos (Kolaczowska & Kubers, 2013) y el establecimiento de la infección, el desarrollo de la enfermedad clínica o la resolución de la misma dependerá de la capacidad activación de esta célula fagocítica, (Tapia *et al.*, 2009). Por otra parte, la fagocitosis de patógenos como *Leishmania* spp. por parte de los neutrófilos y los macrófagos, genera un microambiente de citocinas y quimiocinas, tales como la Interleucina (IL)-1, IL-6, Interferón (IFN)- γ , Factor de Necrosis Tumoral (TNF)- α y CXCL8 (IL-8) que contribuyen con el reclutamiento y activación de las mismas así como de otras células, como monocitos y células dendríticas (DCs) (Scapini *et al.*, 2000; Bennouna *et al.*, 2003; Nathan *et al.*, 2006), además de influir en la polarización de la respuesta dependiente de los linfocitos T cooperadores (Th, por sus siglas en inglés) (Bennouna *et al.*, 2003; Antonelli *et al.*, 2005; Nathan *et al.*, 2006; MacFarlane *et al.*, 2008).

Un patrón de respuesta de linfocitos CD4⁺ Th de tipo 1 (Th1) se ha descrito en modelos murinos resistentes a *Leishmania* spp. (Scott *et al.*, 1988; Heinzl *et al.*, 1989) y en pacientes que presentan LCL (Caceres-Dittmar *et al.*, 1993; Castes *et al.*, 1996), produciéndose concentraciones adecuadas de IFN- γ , TNF- α e IL-2, que conlleva a la eliminación de los parásitos por parte de los macrófagos mediante

la producción de óxido nítrico (Caceres-Dittmar *et al.*, 1993; Castes *et al.*, 1996; De Trez *et al.*, 2009). Mientras que, los pacientes con LCM secretan citocinas del patrón Th1 y Th2 (Cáceres-Dittmar *et al.*, 1993), observándose una elevada producción de IFN- γ , TNF- α y óxido nítrico, en ausencia de una adecuada regulación por parte de IL-10 y TGF- β y baja carga parasitaria (Castes *et al.*, 1996; Ribeiro de Jesús *et al.*, 1998; Cabrera *et al.*, 2003; Díaz *et al.*, 2005). Recientemente, se ha descrito la presencia de células IL-17⁺ en lesiones tisulares de estos pacientes (LCM) (Boaventura *et al.*, 2010). Todos estos hallazgos sugieren que el daño tisular que presentan los pacientes con LCM en sus mucosas, es debido a una exacerbada respuesta inflamatoria (Cabrera *et al.*, 2003; Faria *et al.*, 2005; Kolaczowska *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014). Por lo que nos propusimos evaluar a través de métodos no invasivos los tipos celulares predominantes, en la secreción nasal de los pacientes con las formas cutánea localizada y mucocutánea de la leishmaniasis y relacionarlos con citocinas séricas proinflamatorias y reguladoras con el fin de evidenciar en el proceso inflamatorio que se establece en esta secreción; lo cual sería de valor diagnóstico y pronóstico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

El estudio comprendió un total de 34 pacientes con LCA (LCL, n=20; LCM, n=14), con rango de edades comprendidos entre 18 y 60 años, los cuales fueron evaluados en la Sección clínica de leishmaniasis del Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit” y en los diferentes Servicios de Dermatología Sanitaria Regionales de Venezuela. Los pacientes fueron diagnosticados siguiendo los criterios clínicos, epidemiológicos e histopatológicos establecidos por Convit (1974). Ninguno de los pacientes se encontraba bajo algún tipo de tratamiento al momento de realizar el estudio.

Como controles se incluyeron un total de 20 individuos voluntarios sanos, con un rango de edades comprendidos entre 18 y 60 años. Todos provenientes de diferentes zonas endémicas de Venezuela y fueron negativos a la prueba cutánea de hipersensibilidad retardada (Prueba de Montenegro o Leishmanina).

Determinación de los grupos celulares presentes en sangre periférica, secreción nasal y lesión

Se tomaron muestras de 5 mL de sangre periférica por venopunción a cada uno de los pacientes y controles, posteriormente se extendió una gota de esta muestra sobre una lámina portaobjeto. Para el conteo celular en la secreción nasal se introdujo un hisopo impregnado con solución salina en las fosas nasales de los pacientes con LCL, LCM y voluntarios sanos y se realizó un frotis sobre una lámina portaobjeto. A los pacientes con LCL se les realizó también un frotis por aposición de la lesión en piel sobre una lámina portaobjeto. Todas las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente y se fijaron con metanol. Posteriormente, mediante una tinción de Giemsa, se cuantificó el porcentaje de neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos presentes en cada muestra, por conteo directo empleando un microscopio óptico (Olympus CH30) a 400X.

Determinación de citocinas

Las concentraciones de IL-4, IL-8 e IL-10 en el suero de los pacientes e individuos sanos fueron determinadas por citometría de flujo (FACSCanto (BD Biosciences), mediante un kit comercial ("CBA: Cytometric bead array" BD Bioscience, USA), siguiendo el procedimiento del fabricante con una curva patrón para cada citocina (0 a 5000 pg/mL). Los datos obtenidos se analizaron con el software BD™ Cytometric Bead Array (CBA) para obtener la concentraciones en pg/mL.

Las concentraciones de TNF- α , IFN- γ e IL-17 se determinaron mediante ELISA de captura comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D Systems, MN, USA). Las concentraciones de cada citocina se obtuvieron a partir de una curva patrón construida con recombinante de cada citocina suministradas por los kits (Human TNF- α DuoSet®, sensibilidad: 15,6 - 1000 pg/mL; Human IFN- γ DuoSet®, sensibilidad: 15,6 - 1000 pg/mL; Human IL-17A/F Heterodimer, sensibilidad: 156 - 10000 pg/mL, (R&D Systems, MN, USA). Los resultados fueron expresados en pg/mL.

Análisis estadístico

Las diferencias entre los grupos de pacientes para cada parámetro evaluado fueron establecidas

mediante el test de Mann-Whitney U debido a que los datos no tenían una distribución normal. Las comparaciones fueron consideradas significativas cuando $P < 0,05$. Para los análisis se usó el programa Prism 5 para Windows, versión 5.01 (GraphPad Software, Inc. 2007).

Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Biomedicina, Ministerio del Popular para la Salud y Universidad Central de Venezuela. Los individuos incluidos en el estudio, fueron debidamente informados e invitados a participar en el mismo. Ellos firmaron un consentimiento informado.

RESULTADOS

Frotis de la secreción nasal y sangre periférica

En los frotis de la secreción nasal de los pacientes con lesiones mucocutáneas se observaron un 80,7 % de neutrófilos y muy escasos eosinófilos ($0,6 \% \pm 1,4$), mientras que las células mononucleares (linfocitos y monocitos) estuvieron ausentes. En contraste, no se observó ningún grupo celular en la secreción nasal de los individuos sanos y los pacientes con LCL (Tabla I).

En las lesiones de los pacientes con LCL, predominaron los neutrófilos ($45,3 \% \pm 12,0$) seguido por los linfocitos ($43,0 \% \pm 12,2$), mientras que los monocitos ($9,3 \% \pm 5,3$) y los eosinófilos ($2,5 \% \pm 1,5$) fueron los grupos minoritarios.

En sangre periférica (Tabla II) los neutrófilos y los linfocitos constituyeron los grupos celulares predominantes en los pacientes LCL, LCM e individuos

Tabla I. Porcentaje de grupos celulares presentes en muestras de secreción nasal de pacientes con LCA.

	Neutrófilos (% $\pm$ desviación estándar)	Eosinófilos (%)
Controles	0,0	0,0
LCL	0,0	0,0
LCM	80,7 $\pm$ 40,1	0,6 $\pm$ 1,4

No se observaron linfocitos ni monocitos

Tabla II. Porcentaje de grupos celulares en sangre periférica de pacientes con LCA.

	Neutrófilos (% $\pm$ desviación estándar)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)
Controles	55,4 $\pm$ 9,6	37,3 $\pm$ 7,3	3,5 $\pm$ 1,6*	3,8 $\pm$ 5,4**
LCL	53,7 $\pm$ 10,1	34,7 $\pm$ 7,7	6,3 $\pm$ 3,5	5,2 $\pm$ 4,3
LCM	53,5 $\pm$ 8,3	33,1 $\pm$ 8,2	5,3 $\pm$ 2,0	8,2 $\pm$ 5,0***

* $P < 0,001$ Controles vs. LCL & LCM** $P = 0,015$ Controles vs LCL*** $P = 0,037$ LCM vs LCL & Controles

sanos, sin mostrar diferencias significativas entre ellos. Adicionalmente, se evidenció una mayor ($P < 0,05$) proporción de monocitos en la sangre periférica de los pacientes LCL ($6,3\% \pm 3,5$) y LCM ($5,3\% \pm 2,0$) comparado con los individuos sanos ($3,5\% \pm 1,6$); más aún, el mayor porcentaje ($P < 0,05$) de eosinófilos fue evidenciado en los pacientes con LCM ($8,2\% \pm 5,0$) aunque en los pacientes con LCL, evidenciamos un incremento ($5,2\% \pm 4,3$) en estas células ($P < 0,015$) respecto a los controles ($3,8\% \pm 5,4$).

Citocinas séricas

Las concentraciones de citocinas proinflamatorias (IL-8, TNF- α), citocinas del patrón Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4), Th17 (IL-17) y reguladoras (IL-10) en los sueros de los pacientes evaluados se presentan en la Fig. 1, evidenciamos mayor concentración de IL-8 en los pacientes LCL ($18,5 \pm 8,7$ pg/mL) y LCM ($18,2 \pm 12,3$ pg/mL) en comparación con los controles ($10,1 \pm 3,9$ pg/mL, $P < 0,05$). Asimismo se observó un leve aumento de TNF- α en los pacientes LCM ($64,4 \pm 67,0$ pg/mL), mientras que en los pacientes LCL ($68,2 \pm 15,8$ pg/mL) los valores de IFN- γ fueron significativamente mayores en comparación con los evidenciados en LCM ($45,6 \pm 7,2$ pg/mL) e individuos sanos ($48,4 \pm 9,5$ pg/mL). No encontramos diferencias significativas entre los grupos de pacientes y controles cuando comparamos las concentraciones de IL-4 e IL-10, sin embargo, se aprecia que los valores de IL-4 tienden a ser menores en los pacientes mucocutáneos ($7,5 \pm 2,0$ pg/mL). Por otro lado, observamos un leve aumento de IL-17 en los individuos con LCL ($272,4 \pm 90,6$ pg/mL) respecto a lo detectado en los pacientes LCM ($223,7 \pm 47,7$ pg/mL) e individuos sanos ($181,9 \pm 50,6$ pg/mL).

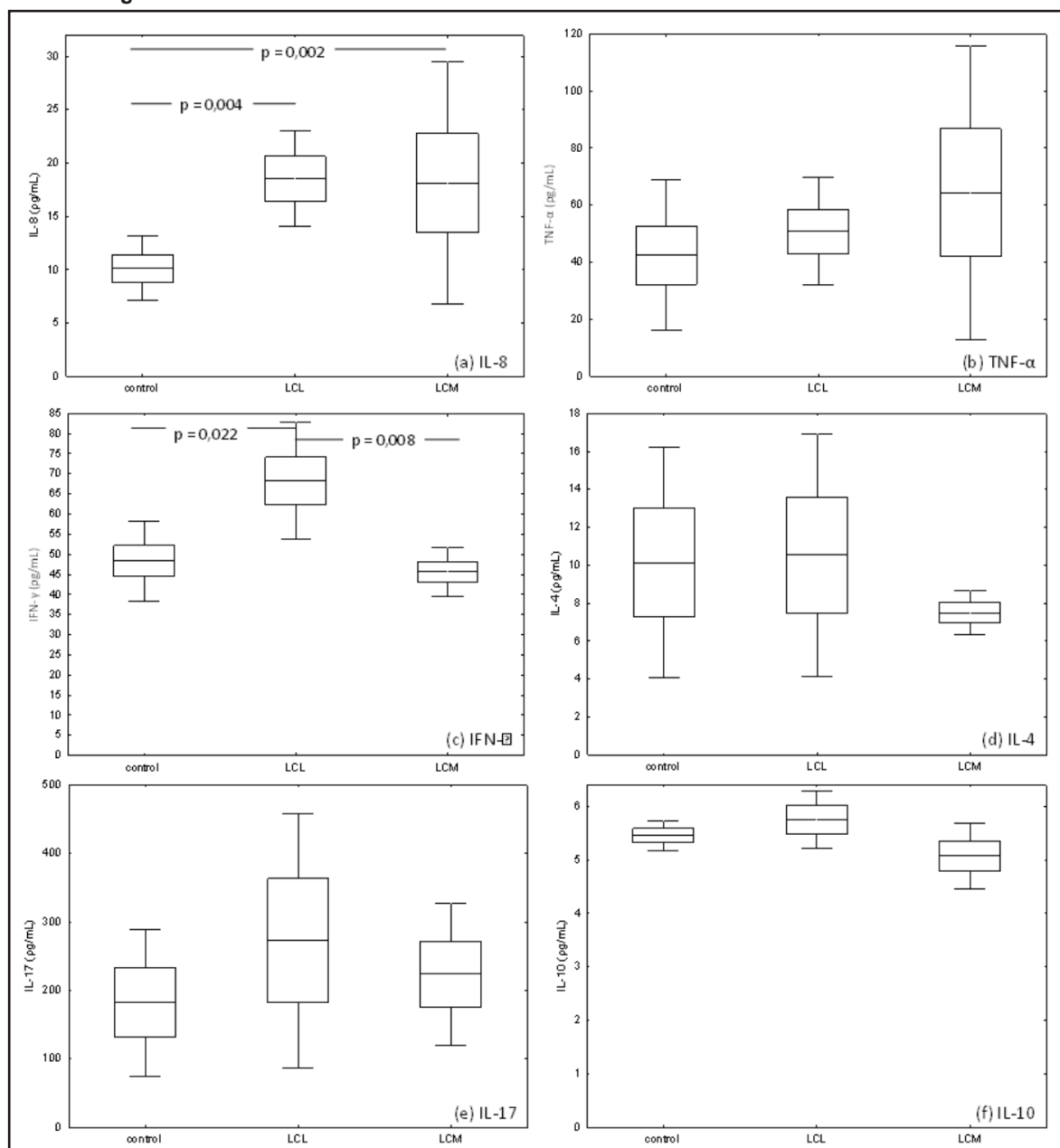
DISCUSIÓN

Diversas investigaciones han indicado que el daño tisular que se observa en los pacientes con LCA, particularmente en los LCM, se debe a la respuesta inflamatoria que se suscita en las lesiones, las cuales en la mayoría de los casos (90%) se presentan en la mucosa nasal (Castes *et al.*, 1996; Bacellar *et al.*, 2002; Cabrera *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2007). En el presente trabajo pudimos evidenciar en muestras de secreción nasal de pacientes con LCM la respuesta inflamatoria que se establece en las lesiones, aspecto muy importante ya que esto podría permitir la detección temprana de este proceso y prevenir daños irreversibles en el tabique nasal y zonas adyacentes.

Esta respuesta evidenciada en los pacientes con LCM estuvo constituida principalmente por un alto porcentaje de neutrófilos seguido de un número de eosinófilos bajo, comparado con los LCL y controles, en los que no se observó ningún grupo celular en su fluido nasal. Lo cual pudiese indicar una migración de neutrófilos desde el torrente sanguíneo hacia las mucosas, en las cuales estas células podrían desempeñar un papel importante en la inmunopatogénesis de esta forma de la enfermedad. Los neutrófilos además de su capacidad para fagocitar y destruir a los microorganismos incluyendo a *Leishmania* spp., son fundamentales en el inicio del proceso inflamatorio, se ha descrito que ejecutan importantes funciones inmunoreguladoras en diferentes infecciones (Scapini *et al.*, 2000; Tacchini-Cottier *et al.*, 2000). Por lo cual, una inapropiada o excesiva activación de este grupo celular puede generar como resultado daño tisular (Kalaczowska *et al.*, 2013).

Por otra parte, se conoce que los monocitos juegan un papel muy importante en el proceso de

Fig. 1. Concentraciones séricas de citocinas de pacientes con LCA y controles sanos. (a) y (b) Citocinas proinflamatorias: IL-8 y TNF- α . (c) Citocina Th1: IFN- γ . (d) Citocina Th2: IL-4. (e) Citocina Th17: IL-17. (f) Citocina reguladora: IL-10.



activación, diferenciación y supervivencia de los linfocitos T y B. Esto se debe a que los mismos son los precursores inmediatos de los macrófagos y las células dendríticas inflamatorias, ambas células presentadoras de antígenos profesionales, que en conjunto con la expresión de moléculas HLA-DR/péptidos y moléculas co-estimuladoras proporcionan

las primeras señales de activación a los linfocitos T (Geissmann, 2007; Maroof *et al.*, 2009; Jain *et al.*, 2011; Kaye & Scott, 2011). En este estudio se evidenció un aumento en el porcentaje de monocitos en la sangre periférica en los paciente con ambas formas de leishmaniasis evaluadas, también se observó un mayor porcentaje de monocitos y linfocitos en las

lesiones de los pacientes LCL comparados con los encontrados en sangre periférica, evidenciándose el proceso inflamatorio que se produce en la lesión.

Los eosinófilos han sido asociados con la respuesta inmune frente a infecciones con helmintos (Blanchard & Rothenberg, 2009). Por el contrario, éstos no han sido involucrados en la respuesta inmune en infecciones con protozoarios. Sin embargo, existen evidencias experimentales que involucran a estas células durante la infección con *Leishmania*. En ese sentido, se ha observado la quimiotaxis *in vitro* de eosinófilos hacia promastigotes de *L. amazonensis* (de Oliveira *et al.*, 2010). Otros estudios *in vivo* han mostrado el reclutamiento de estas células hacia los sitios de infección con *L. amazonensis* y *L. major* (Saito *et al.*, 1996). También, se ha evidenciado que los eosinófilos tienen actividad microbicida contra *L. mexicana* y *L. donovani*, mediante la ingestión y digestión de los mismos en el interior de la vacuola fagocítica. Por otra parte, se ha descrito que la fijación de los parásitos a la superficie de los eosinófilos induce la liberación de sus gránulos a la superficie de la *Leishmania* y causando su destrucción. (Pearson *et al.*, 1987; Pimenta *et al.*, 1987). Más aún, en pacientes infectados con *L. braziliensis* se ha observado una alta proporción de neutrófilos y eosinófilos en el infiltrado celular de linfadenopatías en fase temprana, comparado con los pacientes que presentan úlceras en piel y en la fase tardía de las linfadenopatías (Bomfim *et al.*, 2007). En nuestro estudio, encontramos en los pacientes con LCM un mayor porcentaje de eosinófilos en sangre periférica comparado con lo observado en los pacientes LCL y controles. En contraste, estas células estaban presentes muy escasamente en la secreción nasal de los pacientes LCM y en las lesiones cutáneas de los LCL, lo que nos hace suponer que estas células quizás no están participando en el proceso inmunopatológico presente en las lesiones de estos individuos. Queda para futuros estudios evaluar la participación de estas células en la infección por *Leishmania* spp.

Por otra parte, la IL-8, quimiocina producida por una variedad de células, incluyendo las células epiteliales nasales, fibroblastos nasales, queratinocitos entre otras (Jacobi *et al.*, 1998; Charmoy *et al.*, 2010) es importante en el reclutamiento de los neutrófilos (Van Zandbergen *et al.*, 2002), no así para los eosinófilos en las vías respiratorias superiores (Bochenska-Marciniak *et al.*, 2003). Más aún, se

ha demostrado que es producida por monocitos humanos infectados con *Leishmania major* y tiene actividad quimiotáctica para neutrófilos y monocitos (Badolato *et al.*, 1996).

En este trabajo se detectaron concentraciones significativas de IL-8 en el suero de los pacientes con leishmaniasis, lo que podría explicar la presencia de neutrófilos en la mucosa de los sujetos con LCM y en la lesión de los pacientes LCL. Esta quimiocina, podría estar actuando en conjunto con citocinas como IL-17 y TNF- α , las cuales también han sido asociadas con la quimiotaxis de los neutrófilos (Charmoy *et al.*, 2010), aunque nuestro estudio no reflejó diferencias significativas en las concentraciones de estas dos últimas citocinas, se observó un leve aumento de ambas en los sueros de los pacientes con lesiones cutáneas o mucocutáneas.

Por otro lado, con relación a la IL-4 e IL-10, tampoco se observaron cambios significativos en las concentraciones séricas de ambas citocinas, las cuales promueven el desarrollo de un patrón de respuesta inmunitaria de tipo Th2 (Garside *et al.*, 1995; Oliveira *et al.*, 2014), que actúan como factor de crecimiento/diferenciación de los linfocitos B, eosinófilos e inhiben las funciones de los macrófagos (Mossman & Coffman, 1989).

Múltiples estudios han demostrado que una respuesta de tipo Th1, con una alta producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , una deficiente regulación de IFN- γ y una alteración en la producción de la IL-10 o su receptor (rIL-10) generan una respuesta inflamatoria exacerbada que es responsable de la progresión y cronicidad de la lesión en mucosa (Bacellar *et al.*, 2002; Faria *et al.*, 2005), otros estudios también han demostrado que pacientes mucocutáneos producen más TNF- α y menos IL-10 en comparación con los LCL (Castes *et al.*, 1993; Tacchini-Cottier *et al.*, 2000), indicando que el problema de la regulación de TNF- α y otras citocinas proinflamatorias es debido a la baja expresión de receptores para IL-10 en la células de las lesiones de la mucosa (Faria *et al.*, 2005), además, como ya hemos señalado, nuestros resultados sugieren que el daño tisular presente en los pacientes con LCM pudiese estar promovido en parte por la permanente presencia de los neutrófilos atraídos hacia la mucosa por la alta concentración de IL-8.

Adicionalmente, evidenciamos un incremento en la concentración de IFN- γ en los pacientes LCL, junto con un leve aumento de IL-17. Otros autores afirman que la acción conjunta de las citocinas IFN- γ y TNF- α está asociada con el proceso de inflamación que se desarrolla en las lesiones (Castes *et al.*, 1996; Bacellar *et al.*, 2002), mientras que la IL 17 también se ha implicado en la defensa contra varios agentes intracelulares (Weaver *et al.*, 2007; Korn *et al.*, 2009), ya que contribuye en la producción de diversos mediadores inflamatorios como IL-1, IL-6, TNF- α (Korn *et al.*, 2009) junto con el reclutamiento de los neutrófilos por parte de la IL-8, probablemente hacia las lesiones cutáneas, contribuyendo junto con los linfocitos T CD4⁺ del patrón Th1, en la activación de mecanismos leishmanicidas dando como resultado la resolución de la lesión.

El estudio de factores asociados a esta respuesta en la mucosa nasal, a través de métodos no invasivos, como el estudio con muestras de fluidos y secreción nasal puede aportar importante información de los mecanismos inmunopatológicos asociados, al igual que estudios realizados con biopsias y/o citologías, que pudiese tener valor diagnóstico y pronóstico. En conclusión, los pacientes con LCM mostraron la presencia de células inflamatorias (neutrófilos y eosinófilos) en su secreción nasal a diferencia de los pacientes con LCL e individuos sanos en lo que no se evidenció ningún grupo celular, que en conjunto con una alta producción de IL-8, TNF- α e IL-17 sérico, pudiesen estar influyendo en la inmunopatogénesis de esta enfermedad.

Conflicto de intereses

Los autores del trabajo declaramos que para y durante la realización de este trabajo no se presentó ningún conflicto de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los pacientes, voluntarios sanos, personal médico y técnico pertenecientes a los Servicios de Dermatología Sanitaria Regionales por la cooperación en el desarrollo de este trabajo. Este trabajo fue financiado por la Universidad Central de Venezuela a través del CDCH N°PG-09-8736-2013/1.

REFERENCIAS

- Antonelli L. R. V., Dutra W. O., Almeida R. P., Bacellar O., Carvalho E. M. & Gollob K. J. (2005). Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol. Lett.* **101**: 226-230.
- Badolato R., Sacks D. L., Savoia D. & Musso T. (1996). *Leishmania major*: infection of human monocytes induces expression of IL-8 and MCAF. *Exp. Parasitol.* **82**: 21-26.
- Bacellar O., Lessa H., Schrieffer A., Machado P., Jesus A. R. de, Dutra W. O., *et al.* (2002). Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. *Infect. Immun.* **70**: 6734-6740.
- Bennouna S., Bliss S. K., Curiel T. J. & Denkers E. Y. (2003). Cross-talk in the innate immune system: Neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J. Immunol.* **171**: 6052-6058.
- Boaventura V. S., Santos C. S., Cardoso C. R., de Andrade J., Dos Santos W. L. C., Clarêncio J., *et al.* (2010). Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur. J. Immunol.* **40**: 2830-2836.
- Bocheńska-Marciniak M., Kupeczyk M., Górski P. & Kuna P. (2003). The effect of recombinant interleukin-8 on eosinophils' and neutrophils' migration in vivo and *in vitro*. *Allergy.* **58**: 795-801.
- Bomfim G., Andrade B. B., Santos S., Clarencio J., Barral-Netto M. & Barral A. (2007). Cellular analysis of cutaneous leishmaniasis lymphadenopathy: insights into the early phases of human disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**: 854-859.
- Blanchard C. & Rothenberg M. E. (2009). Biology of the eosinophils. *Adv. Immunol.* **101**: 81-121.
- Convit J. (1974). Leishmaniasis. Similar clinical-immunological-pathological models. *Ethiop. Med. J.* **12**: 187-195.

- Convit J., Ulrich M., Fernández C. T., Tapia F. J., Cáceres-Dittmar G., Castés M., *et al.* (1993). The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**: 444-448.
- Cabrera M., Rodríguez O., Monsalve I., Tovar R. & Hagel I. (2003). Variations in the serum levels of soluble CD23, nitric oxide and IgE across the spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* **88**: 145-151.
- Caceres-Dittmar G., Tapia F. J., Sánchez M. A., Yamamura M., Uyemura K., Modlin R. L., *et al.* (1993). Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin. Exp. Immunol.* **91**: 500-505.
- Castés M., Cabrera M., Trujillo D., Rodas A., Scott D. & Blackwell J. (1996). Cytokine profile in human American cutaneous leishmaniasis. New dimensions in Parasitology. *Acta Parasitol. Turcica.* **20**: 45-57.
- Castés M., Trujillo D., Rojas M. E., Fernandez C. T., Araya L., Cabrera M., *et al.* (1993). Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Biol. Res.* **26**: 233-238.
- Charmoy M., Auderset F., Allenbach C. & Tacchini-Cottier F. (2010). The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *J. Biomed Biotechnol.* **2010**: 719361.
- De Trez C., Magez S., Akira S., Ryffel B., Carlier Y. & Muraille E. (2009). iNOS-Producing Inflammatory Dendritic Cells Constitute the Major Infected Cell Type during the Chronic *Leishmania major* Infection Phase of C57BL/6 Resistant Mice. *PLoS. Pathog.* **5**: e1000494.
- de Oliveira C. F., de Souza C. da S., Mendes V. G., Abreu-Silva A. L., Goncalves S. C. & Calabrese K. S. (2010). Immunopathological studies of *Leishmania amazonensis* infection in resistant and in susceptible mice. *J. Infect. Dis.* **201**: 1933-1940.
- Diaz N. L., Arvelaez F. A., Zerpa O. & Tapia F. J. (2005). Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.* **31**: 114-117.
- Faria D. R., Gollob K. J., Barbosa J., Schriefer A., Machado P. R. L., Lessa H., *et al.* (2005). Decreased In Situ Expression of Interleukin-10 Receptor Is Correlated with the Exacerbated Inflammatory and Cytotoxic Responses Observed in Mucosal Leishmaniasis. *Infect Immun.* **73**: 7853-7859.
- Garside P. & Mowat A. M. (1995). Polarization of Th-cell responses: a phylogenetic consequence of nonspecific immune defence? *Immunol. Today.* **16**: 220-223.
- Geissmann F. (2007). The origin of the dendritic cells. *Nat. Immunol.* **8**: 558-560.
- Grimaldi G. Jr., Soares M. J. & Moriearty P. L. (1984). Tissue eosinophilia and *Leishmania mexicana mexicana* eosinophil interactions in murine cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* **6**: 397-408.
- Heinzel F. P., Sadick M. D., Holaday B. J., Coffman R. L. & Locksley R. M. (1989). Reciprocal expression of interferon-gamma or interleukin-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for the expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.* **169**: 59-72.
- Jacobi H. H., Poulsen L. K., Reimert C. M., Skov P. S., Ulfgren A.-K., Jones I., *et al.* (1998). IL-8 and the Activation of Eosinophils and Neutrophils following Nasal Allergen Challenge. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **116**: 53-59.
- Jain S., Chodisetti S. B. & Agrewala J. N. (2011). CD40 Signaling Synergizes with TLR-2 in the BCR Independent Activation of Resting B Cells. *PLoS. ONE.* **6**: e20651.
- Kaye P. & Scott P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 604-615.
- Kolaczowska E. & Kubes P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**: 159-175.

- Korn T., Bettelli E., Oukka M. & Kuchroo V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**: 485-517.
- Maroof A., Beattie L., Kirby A., Coles M. & Kaye P. M. (2009). Dendritic Cells Matured by Inflammation Induce CD86-Dependent Priming of Naïve CD8+ T Cells in the Absence of Their Cognate Peptide Antigen. *J. Immunol.* **183**: 7095-103.
- McFarlane E., Perez C., Charmoy M., Allenbach C., Carter K. C., Alexander J., et al. (2008). Neutrophils Contribute to Development of a Protective Immune Response during onset of Infection with *Leishmania donovani*. *Infect. Immun.* **76**: 532-541.
- Miranda M., Andrade H., Castro T., Oliveira A., Scherifer A., Machado P., et al. (2007). Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* **73**: 843-847.
- Mosmann T. R. & Coffman R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* **7**: 145-173.
- Murray H. W., Berman J. D., Davies C. R. & Saravia N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *The Lancet.* **366**: 1561-1577.
- Nathan C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Ver. Immunol.* **6**: 173-182.
- Oliveira W. N., Ribeiro L. E., Schrieffer A., Machado P., Carvalho E. M. & Bacellar O. (2014). The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine.* **66**: 127-132.
- Pearson R. D., Uydess I. L., Chapman S. W., Steigbigel R. T. (1987). Interaction of human eosinophils with *Leishmania donovani*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **81**: 735-739.
- Pimenta P. F., Dos Santos M. A. & De Souza W. (1987). Fine structure and cytochemistry of the interaction between *Leishmania mexicana amazonensis* and rat neutrophils and eosinophils. *J Submicrosc Cytol.* **19**: 387-395.

Recibido el 09/09/2014
Aceptado el 27/11/2014

Biochemical and biological characterisation of lancehead (*Bothrops venezuelensis* Sandner 1952) snake venom from the Venezuelan Central Coastal range

Caracterización bioquímica y biológica del veneno de la serpiente "tigra mariposa" (Bothrops venezuelensis Sandner 1952) de la región central de la Cordillera de la Costa Venezolana

Elda E. Sánchez¹, María E. Girón², Nestor L. Uzcátegui², Belsy Guerrero³, Max Saucedo¹, Esteban Cuevas¹ & Alexis Rodríguez-Acosta^{2*}

RESUMEN

Se aislaron fracciones del veneno de *Bothrops venezuelensis* que demuestran ser un espectro abundante de proteínas con actividades variadas (coagulante, hemorrágica, fibrinolítica, proteolítica y de función plaquetaria), para el análisis de sus propiedades físico-químicas y biológicas, el veneno fue fraccionado por cromatografía de exclusión molecular, corrido en una electroforesis en gel y realizada una batería de ensayos biológicos. La DL₅₀ del veneno de *B. venezuelensis* fue 6,39 mg/kg de peso corporal, fue determinada inyectando intraperitonealmente en ratones, diluciones seriadas de veneno de *B. venezuelensis*. Se colectaron doce fracciones a partir del veneno de *B. venezuelensis* mediante cromatografía de exclusión molecular. Las fracciones 1-5 y 7-9 tenían actividad hemorrágica. Todas las fracciones, con la excepción de las fracciones 3 y 6, tenían actividad fibrinolítica. Ninguna de las fracciones tuvo actividad de gelatinasa significativa, y sólo fracciones 4-6 demostraron actividad en polvo azul de ocultamiento. Con la excepción de las fracciones 1 y 4, todas hidrolizaron la cadena β de la insulina. Cada fracción del veneno, así como el veneno crudo mostraron actividad procoagulante, cuando se probó en un analizador Sonoclot. Las fracciones 1, 3, 5 y 9 inhibieron la función plaquetaria. En este estudio se señalan actividades biológicas de un veneno poco estudiado (*B. venezuelensis*) y sus fracciones. Al detectar actividades hemorrágicas, fibrinolíticas, procoagulantes, proteolíticas y de inhibición de la función plaquetaria. Este estudio preliminar abre el camino para la identificación de moléculas específicas que podrían tener potencial terapéutico en hemostasia y cáncer, que vienen siendo estudiados en nuestro grupo.

Palabras clave: *Bothrops venezuelensis*, hemostasia, hemorragia, fibrinólisis, función plaquetaria, veneno.

SUMMARY

Venom fractions isolated from *Bothrops venezuelensis* were shown to contain a broad spectrum of proteins with varied activities. This study describes venom fractions with coagulant, haemorrhagic, fibrinolytic, proteolytic and antiplatelet activities, and analyses their physico-chemical properties and biological activities via molecular exclusion chromatography, gel electrophoresis and a bioassay battery. The LD₅₀, determined by injecting intraperitoneally serial dilutions of *B. venezuelensis* venom into mice, was 6.39 mg/kg body weight. Twelve fractions were collected from *B. venezuelensis* venom using molecular exclusion chromatography. Of these, fractions 1-5 and 7-9 showed haemorrhagic activity, and all fractions except 3 and 6 showed fibrinolytic activity. However, none of the fractions had significant gelatinase activity, and only fractions 4-6 demonstrated activity on hide powder azure. With the exception of fractions 1 and 4, all fractions hydrolysed the insulin B-chain. In addition, all fractions as well as the crude venom showed strong procoagulant activity when tested using a Sonoclot Analyzer. Fractions 1, 3, 5 and 9 inhibited platelet function. In this study we have described the activities of the crude venom and its size-fractions from the scarcely studied *B. venezuelensis*. Haemorrhagic, fibrinolytic, procoagulant and proteolytic activities, and the inhibition of platelet function were detected. This preliminary study paves the way for the identification of specific molecules in *B. venezuelensis* venom that could have therapeutic potential for cancer and aberrant haemostasis treatment.

Key words: *Bothrops venezuelensis*, haemostasis, haemorrhages, fibrinolysis, platelet function, venom.

¹ National Natural Toxins Research Center, Texas A&M University-Kingsville, Kingsville, Texas, USA.

² Laboratorio de Inmunquímica y Ultraestructura Instituto Anatómico, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

³ Laboratorio de Fisiopatología, Centro de Medicina Experimental, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas 1020A, Venezuela.

*Autor de correspondencia: rodriguezacosta1946@yahoo.es

INTRODUCTION

Bothrops snake venoms are complex mixtures rich in proteins that include metalloproteinases, phospholipids A₂, serine proteases and other proteases that act through different mechanisms. In bothropic envenomations, proteinases may interfere with the coagulation and fibrinolytic systems of victims, inducing systemic alterations of important relevance in the clinical picture (Assakura *et al.*, 2003, Bello *et al.*, 2006, Salazar *et al.*, 2007, Girón *et al.*, 2013).

In Venezuela, *Bothrops* snakes cause 80% of human ophitoxemias with an important number of accidents among equine, goats and cattle resulting in severe economical losses (Rengifo and Rodríguez-Acosta, 2004). Bothropic accidents are multiple and severe, characterised by immediate local effects and different systemic manifestations where haemostasis disorders are predominant. These include coagulopathy through consumption as a result of thrombin-like molecules as well as activators of prothrombin and/or factor X. Another important feature in these patients is the activation of the fibrinolytic system with depletion of α 2-antiplasmin and increase of products of degradation of fibrinogen and/or D-dimers. The main components responsible for these activities are metalloproteinases (Markland 1998).

There are two principal species of *Bothrops* snakes in the Venezuelan Central Coastal range. One is the well-studied Mapanare (an Amerindian name) (*Bothrops colombiensis*), and the other is the "tigra mariposa" (named due to their aggressive nature and butterfly like pattern on their scales) (*Bothrops venezuelensis*) (Rengifo and Rodríguez-Acosta 2004). However, the toxicity of *B. venezuelensis* snake venom is well-known, amid people living in their endemic area, by the severity of accidents and fatal bites among humans and cattle, but a comprehensive study of this snake and its venom has not been carried out. In the current work, toxic fractions from *B. venezuelensis* were identified and suggested to be an ample spectrum of proteins with diverse activities. This paper focuses on describing venom fractions with procoagulant, haemorrhagic, fibrinolytic, proteolytic and platelet function activities as well as analysing its physicochemical properties and biological activities. These analyses will provide a wealth of

new information on these venom molecules to be characterised in the near future for the advancement of likely and supplementary efficient treatments as well as the enhancement of immunogens to produce better antivenoms.

MATERIALS AND METHODS

Venoms and snakes

Venoms were obtained from pools of fifteen *B. venezuelensis* snakes captured in the Venezuelan Central Coastal range at the Henri Pittier and Waraira Repano National Parks (Aragua state and Capital District, respectively). The snakes were kept in captivity in the Serpentarium of the Tropical Medicine Institute of the Universidad Central de Venezuela. Venoms were centrifuged to remove impurities, filtered and frozen at -70°C until use.

Experimental animals

Rabbits

To test skin haemorrhagic activity New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) were used. Two kilogram weight rabbits were obtained from the Vivarium of Tropical Medicine Institute of the Universidad Central de Venezuela, Caracas and the National Natural Toxins Research Center of the Texas A & M University-Kingsville, Kingsville, Texas, USA.

Mice

Female mice (INH strain) weighing 18-20 g were purchased from the Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas, Venezuela. The colony of mice was kept in boxes in a room maintained at 23°C on a 12/12-hr light/dark cycle.

Ethical statement

Professional staffs arranged all the experimental events concerning the use of live animals. Pertinent regulations as well as institutional guidelines, according to protocols approved by the National Natural Toxins Research Center, Texas A&M University-Kingsville, Texas, USA and the Institute of Anatomy of the Universidad Central de Venezuela following the norms obtained from the

guidelines for the care and use of laboratory animals, published by the US National Institute of Health (NIH 1985).

Lethality assay

Five groups of eight mice for each venom were housed in cages and observed throughout the quarantine period and experiments. All venoms were pooled from the same species covering the same county. Venoms were dissolved in 0.85% saline at the highest concentration of venom that was used for injection. Two-fold serial dilutions using saline were made to obtain four additional concentrations. All solutions during the experiment were stored at 4°C and warmed to 37°C just before being injected into mice. The lethal toxicity was determined by injecting 0.2 mL of venom into the tail veins of 18-20 g female BALB/c mice. The injections were administered using a 1 mL syringe fitted with a 30-gauge, 0.5-in. needle. The saline control was used. The endpoint of lethality of the mice was determined after 48 h. The LD₅₀ was calculated by the Spearman-Kärber (1978) method.

Molecular exclusion chromatography from B. venezuelensis venom

Four hundred micrograms of *B. venezuelensis* venom was separated by a 1-20 kDa molecular exclusion Waters™ ProteinPak60 (7.8 x 300 mm) column equilibrated with 0.02M sodium phosphate, pH 6.5 at a flow rate of 0.5 mL/min. The detection of proteins was spectrophotometrically carried out at 280 nm. A Waters™ High Performance Liquid Chromatography System (510 Pumps and a Tunable detector) was used.

Electrophoretic titration curves (ET)

To determine the isoelectric points (pIs) for the proteins found in the venom of *B. venezuelensis*, electrophoretic titration curves were employed. Samples were lyophilised and reconstituted in deionised water at 3 mg/mL. A pH gradient of 3-9 was established using IEF 3-9 PhastGels (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA).

The gels were then rotated 90° and 3 µL samples were applied in the centre of the gel. The proteins were separated and silver stained as recommended the PhastSystem™ manuals.

Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis

A total of 15 µg of crude venom was run on a 10-20% Tricine Gel (Invitrogen) under non-reducing conditions at 150 V for 90 min. Lane 1: SeeBlue Plus2 Markers (Invitrogen); lane 2: crude venom. The gel was stained with RapidStain (Invitrogen) for 1 hr and destained in 18 mega ohm water overnight.

Dialysis and protein concentration

Bothrops venezuelensis venom and fractions obtained by chromatography were desalted using a Pharmacia G25 HiTrap column (5,000 Da molecular weight cutting), and concentrated by freeze-drying (6 Freezone Labconco, Kansas, MO, USA) at -40°C.

Haemorrhagic analysis

To determine the haemorrhagic activities of *B. venezuelensis* crude venom and fractions, the modified Omori-Satoh *et al.* (1972) method was used. One hundred microlitres of crude venom or individual fractions were intracutaneously injected into the back of a New Zealand rabbit. After 15 h, the animal was sacrificed and depilated. Haemorrhagic activity was determined by the presence of haemorrhagic spots on the rabbit's skin. Specific haemorrhagic activity was established by dividing the size of the haemorrhagic point (mm) by the quantity of injected protein (µg). Haemorrhagic activity was compared with minimum haemorrhagic dose (MHD: 2.5 µg) of *Crotalus atrox* crude venom, which is defined as the amount of venom that causes a 10-mm hemorrhagic spot. Saline solution was used as negative control.

Fibrinolytic analysis

To determine the fibrinolytic activity of *B. venezuelensis* venom fractions, the modified Bajwa *et al.* (1980) method was used. Three hundred microlitres of fibrinogen and 12 µL thrombin solutions were put in each well of a 24 well plate and softly agitated. The plate was kept at room temperature until content solidified and incubated at 37°C for 3 h. Twenty microlitres of each fraction were added to each well and incubated at 37°C for another 15 h. After incubation, 700 µL of 10% trichloroacetic acid was placed in each well to stop the reaction. The wells were emptied after 10 min and results observed.

Specific fibrinolytic activity was calculated by dividing the cleared fibrin area (mm²) by the amount of protein (µg) in each well.

Proteolytic analysis using hide powder azure

A modified hide powder azure method by Rinderknecht *et al.* (1968) was used to test the proteolytic activity of the venom. Eight milligrams of hide powder azure was diluted in 2 mL of 0.02 M Tris-HCl, pH 8.0, and 100 µL of venom fraction was added. Each sample was incubated at 37°C for 1 h and agitated at intervals of 5 min. After incubation, each sample was centrifuged at 420 x g for 5 min. The supernatant was transferred to a vial and was measured at an absorbance of 595 nm. 0.02 M Tris-HCl was used as a negative control and *C. atrox* venom (1 mg/mL) was used as positive control. The absorbance units for each fraction were subtracted from the absorbance unit of the negative control. The specific activity was calculated by dividing the absorbance by the amount of used protein (mg).

Determination of the proteolytic activity of Bothrops venezuelensis venom fractions on B-chain of insulin using a capillary electrophoresis (CE)

To identify the proteolytic activity from each *Bothrops venezuelensis* venom fraction a P/ACE 5500 (Beckman, USA) capillary electrophoresis was used. Ten microlitres of the venom fractions (0.06 mg/mL) were incubated at room temperature for 1 h with 10 µL of B-chain of insulin (0.5 mg/mL) and 10 µL of 0.1 M sodium borate, pH 8.3. Then the mixture was separated during 10 min at 20 kV, using 0.1 M sodium borate, pH 8.3, in a 75 µm I.D x 50 cm (800 x 100 aperture) capillary tube. The proteins were detected at 214 nm.

Gelatinase activity

A modified X-ray film method (Huang & Pérez, 1980) was employed to assay the gelatinase activity of *B. venezuelensis* crude venom and fractions. An X-ray film containing a gelatine coating (Kodak X-OMAT) was washed with distilled water and incubated at 37°C for 45 min. After incubation, the film was completely dried and 20 µL of sequential diluted crude venom or fractions (starting at 50 µg protein) were placed on the film. The film was incubated for 2 h at 37°C in a humid incubator. After

incubation, the film was washed with distilled water and observed for cleared areas indicating hydrolysis. Serial dilutions were performed to determine the minimum amount of venom required to cause a clear spot on the film. The titre was defined as the reciprocal of the highest dilution that caused a clear spot on the film. The specific gelatinase activity was calculated by dividing the titre by the amount of protein (µg) applied on the film.

Blood sample collection

Blood was collected using a gravity flowing system, which generated no trauma to platelets. Eighteen millilitres of human blood (obtained with proper donor consent) were collected in a 50 mL test tube containing 1.8 mL of 1% sodium citrate. After blood collection, the tube was lightly inverted twice to ensure the total blood citration. The blood was aliquoted in 2 mL samples prior to its use.

Plasma collection

Fresh human plasma was obtained from our laboratory blood samples donors, without alterations in haemostasis, which was anticoagulated with 3.8% sodium citrate in 1:9 ratio. Plasma was obtained by centrifugation at 2000 g for 15 minutes at 4°C.

Procoagulant activity

To test the *B. venezuelensis* crude venom coagulant activity, bovine fibrinogen or fresh frozen plasma was used as substrate to evaluate thrombin-like or procoagulant activity (Austen & Rhymes, 1975). Briefly, 100 µL of citrated plasma or 0.3% fibrinogen solution was used in 0.05 M Tris -HCl pH 7.4 buffer (coagulation) by incubating for 3 min at 37°C, then adding 100 µL of coagulation buffer and 100 µL of thrombin solution (0.5 to 15 IU/mL) or 100 µL of crude venom or fraction (100 µg/mL); the mixture was hand agitated at 37°C and the coagulation time was recorded. Thrombin solution adjusted to 2.5 IU/mL prepared with coagulation buffer in which the clotting time is recorded between 18 and 22s is used as a control.

The thrombin-like activity present in the crude venom was reported in IU/mL when extrapolating results in a calibration curve generated with a thrombin control.

Coagulant and platelet function activity of venom and venom fractions via Sonoclot Analysis

Activation time, rate of coagulation and platelet function were analysed using a glass bead activated kit (gbAC, Sienco®, USA) on a Sonoclot® and a Platelet Function Analyser (Sienco®, Inc. Wheat Ridge, CO, U.S.A). A total of 300 µL of 37°C human citrated blood was added to a glass bead activated cuvette containing 13 µL of 0.25 M CaCl₂ and 13 µL of venom (1mg/mL) or venom fraction (varying concentrations as collected from molecular exclusion). The data was evaluated using a "Signature Viewer™" provided by Sienco® on an IMac computer.

RESULTS

Lethality assay

The LD₅₀ calculated from the *B. venezuelensis* snake venom was 6.39 mg/kg.

Molecular exclusion chromatography from *B. venezuelensis* venom

Twelve fractions were collected from *B. venezuelensis* venom (Fig. 1). Table 1 shows all fractions with their corresponding activities.

Electrophoretic titration curves (ET)

A banding pattern (Fig. 2a) gave us broad information on variations in the surface charge and pI of the venom proteins at different pHs. The titration curved showed that *B. venezuelensis* venom was a mixture of complex molecules many of which were acidic proteins. Although the ET is used primarily to determine the optimal conditions for the separation of molecules by ion exchange chromatography, it can also be used to indicate purity and venom complexity.

Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis

A total of 11 bands were observed ranging between 70 and 7 kDa (Fig. 2b).

Haemorrhagic analysis

Haemorrhagic activity was only detected in venom fractions 1-5, and 7-9. Fractions, 5, and 7-9 had the highest haemorrhagic specific activities (Table I).

Fibrinolytic activity in fibrin plates

Fibrinolytic activity of crude *B. venezuelensis* venom on fibrin plates was 11.0

Table I. Activity of the venom fractions of *B. venezuelensis*.

Fractions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Haemorrhagic	0.23 ± 0.3	0.22 ± 0.5	0.22 ± 0.4	0.06 ± 0.2	0.67 ± 0.3	0	0.42 ± 0.4	0.50 ± 0.3	0.83 ± 0.4	0	0	0
Fibrinolytic	6.5 ± 0.3	14.4 ± 0.2	0	3.9 ± 0.5	44 ± 2	0	60 ± 3	97.5 ± 5	175 ± 10	225 ± 5	225 ± 7	121 ± 4
Gelatinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Azure powder analysis	0.14 ± 0.02	0.41 ± 0.09	0.35 ± 0.04	0.88 ± 0.10	6.55 ± 0.9	11.6 ± 1	1.2 ± 0.6	0	2.55 ± 0.5	10.0 ± 2	2.76 ± 0.4	0
B-chain of Insulin Activity	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Activated Clot Time (172) 128-213	<60	na	<60	<60	<60	<60	<60	<60	<60	<60	<60	<60
Clot Rate (20) 15-26	∞	na	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	9.6	∞	∞
Platelet function (4) 3-5	0	na	1	4	1	3	4	4	2	3	4	3

Haemorrhagic specific activity is reported as mm/mg.

Fibrinolytic specific activity is reported as mm³/µg.

Hide powder azure specific activity is reported as AU/mg.

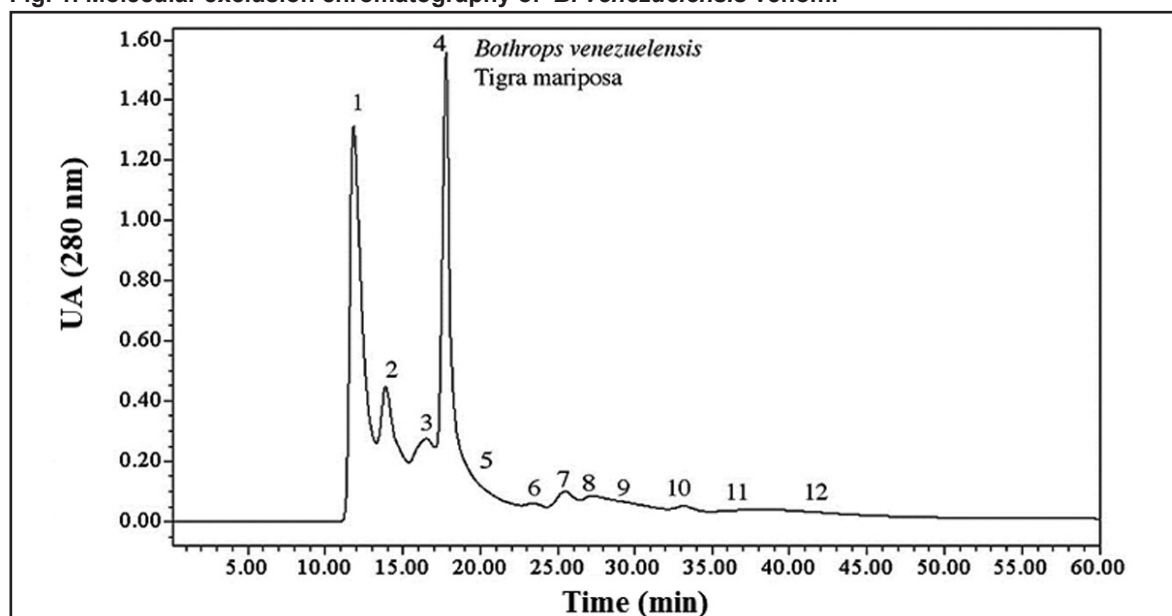
-No activity

∞: Clot rate undefined due to rapid increase of clot signal.

na: not available.

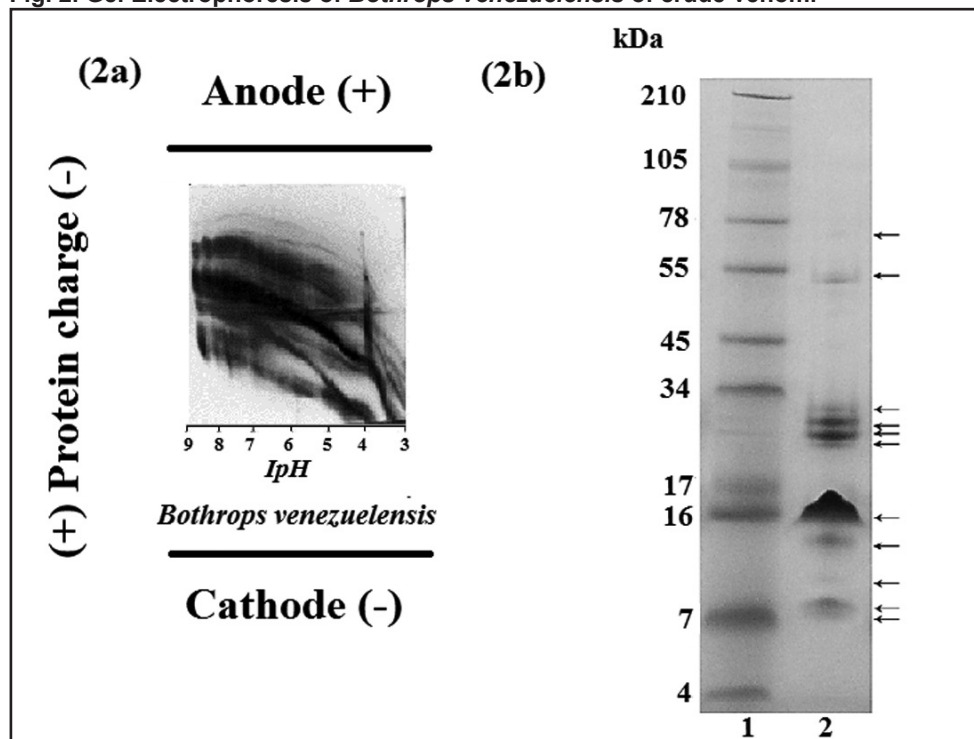
The numbers in parentheses and the numbers that follow are averages and ranges, respectively, for normal human blood.

Fig. 1. Molecular exclusion chromatography of *B. venezuelensis* venom.



A total of 150 μ L (42 mg/mL) was injected into a Waters™ ProteinPak60 column controlled by Waters™ 1525 Binary HPLC pumps. The proteins were detected at 280 nm using a 2487 dual detector. A total of 12 fractions were collected and tested for various activities.

Fig. 2. Gel Electrophoresis of *Bothrops venezuelensis* of crude venom.



(2a) Electrophoretic titration (ET) curve of *Bothrops venezuelensis* crude venom. Electrophoretic titration curves were automatically carried out in the horizontal system; PhastSystem®. A preliminary prefocusing of gels was performed, which allowed the generation of a 3 to 9 pH gradient between the anode and cathode, respectively. The gel was then rotated 90° and a 3 μ L venom sample (2 mg/mL concentration) was loaded at the origin. The gel was run and developed by silver stain according to the Pharmacia PhastSystem owner's manual. (2b) Electrophoretic profile of *B. venezuelensis* venom. A total of 15 μ g of crude venom was run on a 10-20% Tricine Gel (Invitrogen) under non-reducing conditions at 150 V for 90 min. Lane 1: SeeBlue Plus2 Markers (Invitrogen); lane 2: crude venom. The gel was stained with RapidStain (Invitrogen) for 1 hr and destained overnight in 18 mega ohm water.

(mm²/μg). Fibrinolytic activity was eluted in venom fractions 1, 2, 4, 5, 7-12 (Table I). The highest specific fibrinolytic activity was observed in fractions 8-12.

Gelatinase activity

The crude venom along with the chromatographic fractions was void of gelatinase activity (Table I).

Proteolytic analysis using hide powder azure

Crude *B. venezuelensis* venom had hide powder azure activity of 5.98 UA/mg proteins. All fractions, with the exception of 8 and 12, contained activity; however, fractions 5, 6 and 10 had the highest specific activity (Table I).

Determination of the proteolytic activity of *B. venezuelensis* venom fractions using a capillary electrophoresis (CE)

With the exception of fractions 1 and 4, all *B. venezuelensis* venom fractions had proteolytic activity by cleaving oxidized B-chain of insulin (Table I).

Procoagulant activity

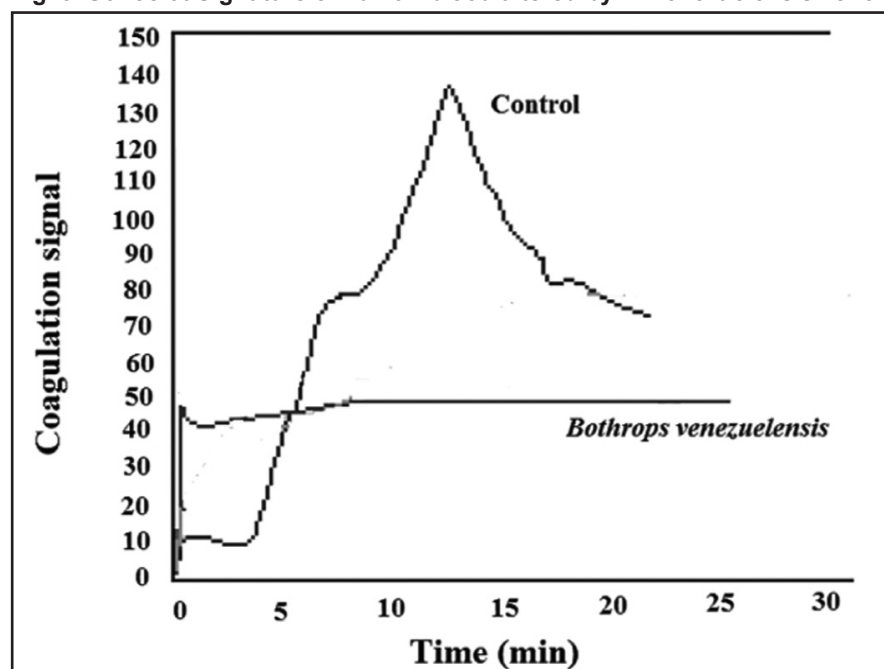
The procoagulant activity was evaluated on citrated human plasma or purified human fibrinogen. *B. venezuelensis* activity on plasma was 58.0 IU Thr/μg. When using purified human fibrinogen as substrate, *B. venezuelensis* venom showed 40.0 IU Thr/μg.

Coagulant and platelet function activity of venom and venom fractions via Sonoclot Analysis

All venom fractions had procoagulant activity when tested by the Sonoclot Analyzer. All fractions, including the crude venom, activated coagulation before 60 seconds (Table I). Normal activated clot time ranges from 128-213 s. The clot rate was undefined for all samples, which is a result of the immediate rise of the clot signal signifying strong coagulant activity (Fig. 3).

Platelet function (PF) is a measurement of the quality of clot retraction that causes a peak or peaks on the Sonoclot Signature. Platelet function is assigned a number from 0-5, where 0 signifies no PF and 5 indicates very strong PF. Normal PF varies

Fig. 3. Sonoclot Signature of human blood altered by *B. venezuelensis* venom.



A total of 13 μL (1 mg/mL) of crude venom was added with whole blood using glass bead activated cuvettes (gbACT) on a Sonoclot Analyzer System. The control represents a normal blood signature without venom. *Bothrops venezuelensis* venom showed intense procoagulant activity and loss of platelet function.

Fig. 4. Known geographical distribution of *Bothrops venezuelensis* (Rivas & Oliveros, 1997; Gregorini & De Sousa, 2005; Navarrete et al., 2009).



anywhere from 3-4. Crude venom had a PF of 0. A PF of 0 was also observed for fraction 1. Fractions 3, 5, and 9 had PFs of less than the normal range (Table I), and all other fractions displayed normal PFs.

DISCUSSION

Many of the early efforts of venom research have been directed toward the isolation and description of any venom protein that was found in abundance or those containing the most toxic activities. With the advent of more sophisticated techniques of purification, there have been studies of the new and interesting components of protein found in smaller quantities. Snake venom encloses many components with different pharmacological and biological activities, especially in haemostasis and anti-tumour therapy, and has progressively become a research motivation. A quantity of effective components like disintegrins (in particular anticoagulants), antitumor molecules and pain-relieving factors has been recently described from snake venom (Xu et al., 2005; Seoane et al., 2007; Zhang & Rui, 2007; Calvete et al., 2009; Sánchez et al., 2009). The synergic action of the venom proteins can enhance their activities or contribute to the spread of toxins (Calvete et al.,

2009), and this type of synergy plays an important role on the toxicity of venoms.

Bothrops venezuelensis, belonging to the *Bothrops* complex in South America, is one of the important snakes in the mountain areas of northern, eastern and western Venezuela as well as eastern Colombia (Fig. 4). *Bothrops venezuelensis* venom, as other bothropic venoms, contains numerous proteins that provoke, in envenomed victims, haemostatic alterations involving platelets, the coagulation and fibrinolysis systems as well as proteolytic and necrosis causing haemorrhagic syndrome and tissue death, respectively (Rengifo & Rodríguez-Acosta, 2004; Gutiérrez et al., 2009). The study of this venom has been neglected and scarcely investigated.

In the current paper, *B. venezuelensis* venom was fractionated by molecular exclusion WatersTM Protein-Pak60 chromatography. Procoagulant, fibrinolytic, haemorrhagic and platelet function activities were detected in the fractions of this venom. The molecular weights were determined by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and liquid chromatography.

Haemorrhage is a common manifestation in human and animal victims following a bite by *B. venezuelensis* (Rengifo & Rodríguez-Acosta, 2004). Of the 12 fractions collected by size exclusion chromatography, strong haemorrhagic specific activity was detected in fraction 8, which represented 66.7% of the venom components. Many snake venom components such as metallo- and serine-proteinases (Markland, 1998) produce local haemorrhage by direct or indirect actions on blood vessel membranes. On the other hand, these proteinases with important proteolytic functions represent significant tools for investigating the mechanism involved in blood vessel injury. The venom of *B. venezuelensis* presented a minimal haemorrhagic dose (MHD) of 2.5 µg. This potent dose could be associated with high molecular weight metalloproteinases such as Bothropasin, a type P-III metalloproteinase with potent haemorrhagic and necrotic activities, found in the venom of *B. jararaca* (Assakura *et al.*, 2003). The haemorrhagic activity of *B. venezuelensis* is similar to the MHD of the Western diamondback rattlesnake venom.

The specific toxins that disrupt blood coagulation activity may inhibit platelet aggregation or may digest fibrin and/or fibrinogen as well as other coagulation factors in blood. In the current work, *B. venezuelensis* venom had 12 fractions that eluted by molecular exclusion chromatography. Fractions 3 and 6 displaying fibrinolytic activity. Fractions 5, and 7-12 contained the highest specific activity. It is important to emphasize that fibrinolytic venom components, after purification and characterization could be used therapeutically against various coagulation disorders. Fibrinolytic enzymes that cause lyses of blood clots by direct fibrin degradation or plasminogen activators have been reported in the Viperidae family (Bello *et al.*, 2006; Salazar *et al.*, 2007; Girón *et al.*, 2013). Nevertheless, no report has been described on the fibrinolytic activity in the venom of *B. venezuelensis*. In addition, *B. venezuelensis* venom displayed proteolytic activity on substrates such as hide powder azure and B-chain of insulin, but had poor collagenases activity since no activity was observed on the X-ray film despite knowing that bothropic venoms have collagenase activity as demonstrated by zymograms (Giron *et al.*, 2013).

Coagulation disorders are more prominent in those bitten by *Bothrops*. In this work, it was observed that *B. venezuelensis* venom is comprised of different

venom components, which can either stimulate or inhibit the blood coagulation pathway. All fractions activated coagulation before 60 seconds and the rate of coagulation was not registered due the rapid speed of clot formation signifying strong procoagulant activity. Several published papers report that the coagulation activities of snake venom proteins are attributed to a number of venom molecules, such as inhibitors of blood coagulation factors IX and X, activation of protein C, inhibitors of thrombin, α and β -fibrinogenases (rarely γ -fibrinogenases), serine proteinases and L-amino acid oxidases (Larréché *et al.*, 2008; Rodríguez-Acosta *et al.*, 2010; Girón *et al.*, 2013) all degrade fibrinogen, and phospholipases damage phospholipids responsible for the formation of complexes vital to the activation of the coagulation cascade (Nahas *et al.*, 1979; Kini 2006.).

Considering the molecular weights as evidenced by electrophoresis or by gel filtration chromatography, the proteins present in *B. venezuelensis* may represent components with enzymatic activity similar to those reported in *Bothrops* venoms described to date, which have been evidenced as metalloproteinases with haemorrhagic activity (64-40 kDa), serine proteinases (40-20 kDa) and phospholipase A2 (16-13 kDa) (Moura da Silva *et al.*, 1990).

Bothrops venezuelensis venom showed 11 protein bands between 78-45 kDa (2), between 34-17 kDa (4), and between 16 and 7 kDa (5). Similar results are shown in inter specific studies of variability of Brazilian *Bothrops* snake venoms in which the study included *Bothrops alternatus*, *B. atrox*, *B. bilineatus*, *B. brazili*, *B. castelnaudi*, *B. cotiara*, *B. erythromelas*, *B. fonsecai*, *B. hyoprorus*, *B. insularis*, *B. itapetiningae*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. leucurus*, *B. marajoensis*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, *B. pirajai* and *B. pradoi*. The venom of these 19 species differed in composition, number and intensity of the protein bands via electrophoresis. However most of the venoms contained components, with molecular masses between 64 and 25 kDa, and about 14 kDa (Queiroz *et al.*, 2008).

Furtado (2005), comparing *B. jararaca* and *B. alcatraz* venoms, exhibited similar electrophoretic profiles. However, *B. alcatraz* displayed three protein bands of molecular masses of 97, 80 and 38 kDa, which were not present in the venom of *B. jararaca*.

These proteins bands could be associated with the stronger coagulant and proteolytic activities reported in the venom of *B. alcatraz*.

The clotting activity analysis from *B. venezuelensis* venom using plasma as substrate was 58 IUThr/μg and was higher for that of *B. colombiensis* in 2 regions of Venezuela (Girón *et al.*, 2008). The results of this clotting activity suggest the possible presence of thrombin-like proteins and factor X activators as has been reported by other authors (Nahas *et al.*, 1979, Maruyama *et al.*, 1992; Sánchez *et al.*, 2010), and/or prothrombins as reported for *B. asper* (Loria *et al.*, 2003); *B. erythromelas* (Silva *et al.*, 2003); *B. insularis* (Modesto *et al.*, 2005); *B. cotiara* (Senis *et al.*, 2006); and *B. jararaca* (Berger *et al.*, 2008).

It was in our best interest to initially identify those fractions containing strong inhibition of platelet function and having very little or no proteolytic activity. We are aware that the initial fractions consist of heterogeneous mixtures of proteins that could contain disintegrins (inhibitors of platelet function) as well as proteolytic enzymes (e.g. metalloproteinases, serine proteases, phospholipase A2s, etc.). The fractions fitting the criteria of strong platelet function inhibitors and low to no proteolytic activity were fractions 1 and 3. However, it is the intention after this preliminary research to allow us to identify many important activities which can be used as a foundation for later investigations on these venom molecules that have a promising future in biomedical research. The application of *Bothrops* venom in haemostasis and cancer therapy has caused a research frenzy, since many venom constituents have a wide range of uses in scientific research and in human and veterinary medicine.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding for the research was provided by grants from the Science and Technology Fund (FONACIT) programs (PG-2005000400 grant), Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas,

Caracas, Venezuela. NCRR/BMRG, Viper Resource Grant #s 8P40OD01960-10 and 3P40OD01096-10S1 (NNTRC, Texas A&M University-Kingsville), and the Robert A. Welch Foundation Department Grant # AC-0006 (TAMUK-Department of Chemistry).

REFERENCES

- Assakura M. T., Silva C. A., Mentale R., Camargo A. C. & Serrano S. M. (2003). Molecular cloning and expression of structural domains of bothropasin, a P-III metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. *Toxicon*. **41**: 217-27.
- Austen D. & Rhymes I. A. (1975). In: Mead, O. (Ed.), *Laboratory Manual of Blood Coagulation*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England.
- Bajwa S. S., Markland F. S. & Russell F. E. (1980). Fibrinolytic enzyme(s) in western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. *Toxicon*. **18**: 285-290.
- Bello C. A., Hermogenes A. L., Magalhaes A., Veiga S. S., Gremski L. H., Richardson M., *et al.* (2006). Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. *Biochimie*. **88**: 189-200.
- Berger M., Pinto A. F. & Guimarães J. A. (2008) Purification and functional characterization of bothrojaractivase, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*. **51**: 488-501.
- Calvete J. J., Borges A., Segura A., Flores-Díaz M., Alape-Girón A., Gutiérrez J. M., *et al.* (2009). Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox*-*asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. *J. Proteomics*. **72**: 227-240.
- Furtado M. F. (2005). Biological and immunological properties of the venom of *Bothrops alcatraz*, an endemic species of pitviper from Brazil. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **141**: 117-123.

- Girón M. E., Salazar A. M., Aguilar I., Pérez J. C., Sánchez E. E., Arocha-Piñango C. L., *et al.* (2008). Hemorrhagic, coagulant and fibrinolytic activities of crude venom and fractions from mapanare (*Bothrops colombiensis*) snakes. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **147**: 113-121.
- Girón M. E., Guerrero B., Salazar A. M., Sánchez E. E., Alvarez M. & Rodríguez-Acosta A. (2013). Functional characterization of fibrinolytic metalloproteinases (colombienases) isolated from *Bothrops colombiensis* venom. *Toxicon*. **74**: 116-26.
- Gregoriani T. & De Sousa L. (2005). Sima Talpa *Bothrops*, serranía del Turimiquire, estado Anzoátegui, Venezuela. *Saber*. **17**: 84-87.
- Gutiérrez J. M., Escalante T. & Rucavado A. (2009). Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*. **54**: 976-987.
- Huang S. Y. & Perez J. C. (1980). Comparative study on hemorrhagic and proteolytic activities of snake venoms. *Toxicon*. **18**: 421-426.
- Kini R. M. (2006). Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. *Biochem. J.* **397**: 377-387.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Larréché S., Mion G. & Goyffon M. (2008). Haemostasis disorders caused by snake venoms. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* **27**: 302-309.
- Loria G. D., Rucavado A., Kamiguti A. S., Theakston R. D, Fox J. W., Alape A., *et al.* (2003). Characterization of 'basparin A,' a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. *Arch. Biochem. Biophys.* **418**: 13-24.
- Markland Jr. F. S. (1998). Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an updated inventory. *Thromb. Haemost.* **79**: 668-674.
- Maruyama M., Kamiguti A. S., Tomy S. C., Antonio L. C., Sugiki M. & Mihara H. (1992). Prothrombin and factor X activating properties of *Bothrops erythromelas* venom. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **86**: 549-556.
- Modesto J. C., Junqueira-de-Azevedo I. L., Neves-Ferreira A. G., Fritzen M., Oliva M. L., Ho P. L., *et al.* (2005). Insularinase A, a prothrombin activator from *Bothrops insularis* venom, is a metalloprotease derived from a gene encoding protease and disintegrin domains. *Biol. Chem.* **386**: 589-600.
- Morita T. (2005). Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities. *Toxicon*. **45**: 1099-1114.
- Moura-da-Silva A. M., Cardoso D. F & Tanizaki M. M. (1990). Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. *Toxicon*. **28**: 1293-1301.
- Nahas L., Kamiguti A. S. & Barros M. A. (1979). Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thromb. Haemost.* **41**: 314-328.
- Navarrete L. F., López-Johnston J. C. & Blanco-Dávila A. (2009). *Guía de las serpientes de Venezuela. Biología, venenos, conservación y listado de especies*. Gráficas ACEA, Caracas, Venezuela, 103 pp.
- NIH, Principles of Laboratory Animal Care (1985). National Institute of Health of United States, Maryland, p. 1-86.
- Omori-Satoh T., Sadahiro S., Ohsaka A. & Murata R. (1972). Purification and characterization of an antihemorrhagic factor in the serum of *Trimeresurus flavoviridis*, a crotalid. *Biochim. Biophys. Acta.* **285**: 414-426.
- Queiroz G. P., Pessoa L. A., Portaro F. C., Furtado Mde F. & Tambourgi D. V. (2008). Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon*. **52**: 842-851.

- Rengifo C. & Rodríguez-Acosta A. (2004). *Serpientes, venenos y su tratamiento en Venezuela*. Fondo de Publicaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela, Caracas, p.1-80.
- Rinderknecht H., Geokas M. C., Silverman P. & Haverback B. J. (1968). A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. *Clin. Chim. Acta.* **21**: 197-203.
- Rivas G. & Oliveros O. (1997). Herpetofauna del Estado Sucre, Venezuela: Lista preliminar de reptiles. *Soc. Cien. Nat. La Salle.* **57**: 67-80.
- Rodríguez-Acosta A., Márquez A., Salazar A. M., Girón M. E., Carvajal Z., Ibarra C., et al. (2010). Hemostatic properties of Venezuelan *Bothrops isabellae* venom. *Toxicon.* **56**: 926-935.
- Salazar A. M., Rodríguez-Acosta A., Girón M. E., Aguilar I. & Guerrero B. (2007). A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the mapanare (*Bothrops atrox*) snake venom from different geographical areas in Venezuela. *Thromb. Res.* 120: 95-104.
- Sánchez E. E., Rodríguez-Acosta A., Palomar R., Lucena S. E., Bashir S., Soto J. G., et al. (2009). Colombistatin: a disintegrin isolated from the venom of the South American snake (*Bothrops colubriensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion. *Arch. Toxicol.* **83**: 271-279.
- Sánchez E. E., Rodríguez-Acosta A., Cantu E. & Guerrero B. (2010). *Antivenoms and Coagulation*. In: Kini R. M., Clemetson K. J., Markland F. S., McLane M. A., Morita. Toxins and Hemostasis from Bench to Bedside. Editorial Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
- Senis Y. A., Kim P. Y., Fuller G. L. J., Garcia A., Prabhakar S., Wilkinson M. C., et al. (2006). Isolation and characterization of cotiaractivase, a novel low molecular weight prothrombin activator from the venom of *Bothrops cotiara*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1764**: 863-871.
- Seoane A. I., Tran V. L., Sánchez E. E., White S. A., Choi J. L., Gaytán B., et al. (2007). The mojastin mutant Moj-DM induces apoptosis of the human melanoma SK-Mel-28, but not the mutant Moj-NN nor the non-mutated recombinant Moj-WN. *Gene.* **389**: 66-72.
- Silva M. B., Schattner M., Ramos C. R., Junqueira-de-Azevedo I. L., Guarnieri M. C., Lazzari M. A., et al. (2003). A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. *Biochem. J.* **369**: 129-139.
- Spearman-Kärber R. (1978). *Alternative methods of analysis for quantal responses*. In: Finney, D. (Ed.), Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin, London.
- Xu W., Li Z. Q., Wu S. Y. & Wu S. G. (2005). Structural and functional characterization of snake venom disintegrins. *Chin. Pharmacol. Bull. (Chin).* **21**: 17-22.
- Zhang Y. & Rui J. (2007). Research progress of snake venom disintegrin in treatment of tumor. *Chin. J. Clin. Pharmacol. Ther. (Chin).* **12**: 984-988.

Recibido el 16/06/2014
Aceptado el 11/09/2014

Parásitos patógenos en arena de playa y su relación con condiciones ambientales, en un balneario de Puerto Cabello, Venezuela, 2012-2013

Pathogens parasites in sand beach and it's relation to environmental conditions in a beach from Puerto Cabello, Venezuela, 2012-2013

Arli Marlinet Guerrero De Abreu^{1*}, María Virginia Quiñones O., Ernesto José Sequera P. & José Luis Marín Franco

RESUMEN

Venezuela, presenta una gran variedad de playas frecuentadas durante todo el año, por lo que legalmente se establece un monitoreo permanente de niveles de contaminación para su clasificación "apta" o no para bañistas. Sin embargo, esto no contempla la evaluación parasitológica en la arena de playa como criterio para la referida clasificación. Por ello, la presencia de sólo una forma parasitaria patógena indica que existe contaminación fecal dado por personas, animales o acúmulo de basura a lo largo del balneario; además de la influencia de las características geográficas y ambientales en el desarrollo de los parásitos. Esta investigación tuvo como objetivo determinar la presencia de formas parasitarias patógenas para el hombre como indicadores de contaminación fecal en un balneario en Puerto Cabello. Se recolectaron 110 muestras de arena durante un año en diferentes puntos geográficos seleccionados intencionalmente abarcando la extensión de la ensenada, registrándose: temporadas pre o post vacacionales, humedad relativa de la arena, punto geográfico de muestreo y estación climática. Se realizaron los métodos de Lavado con solución salina 0,85%, Rugai modificado y Willis. Resultados: 25% de muestras fueron positivas para parásitos patógenos, distribuyéndose: larvas rhabditoides (8,33%) y filarioides (2,08%) de *Strongyloides* spp., huevos (2,08%) y larvas rhabditoides (12,49%) de *Anquilostomidaeos*, huevo de *Toxocara* spp. (4,17%) y Ooquiste de *Isoospora belli* (2,08%), poniendo en evidencia la contaminación fecal de origen animal y humano. Se espera que investigaciones como éstas fomenten la elaboración de normativas de control sanitario y programas de evaluación de niveles de contaminación parasitaria en arena de playa.

Palabras Clave: parásito, playa, contaminación, antropozoonosis.

SUMMARY

A large number of beaches in Venezuela are visited throughout the year, and there is a legal system in place whereby these beaches are monitored and classified as suitable or not for bathing. However, the presence of parasites in the sand on the beaches is not evaluated as part of this classification. The presence of only one pathogenic parasite on a beach indicates fecal contamination either by humans, animals or the accumulation of trash, in addition to geographical and environmental characteristics which could influence the development of the parasites. The aim of this study was to determine the presence of parasites pathogenic to humans as indicators of fecal contamination on a beach in Puerto Cabello. A total of 110 sand samples were collected over one year at different geographic locations selected to cover the entire bay area. Samples were registered as collected during the pre or post-holiday seasons, and the relative moisture of the sand, geographic location and season were also noted. Parasites were collected by washing with 0.85% saline solution, and tested using the Rugai method modified by Willis. Overall, 25% of samples showed positive for the parasites as follows: *Strongyloides* spp.: rhabditoid (8.33%) and filarioid (2.08%) larvae, *Ancylostoma* spp.: eggs (2.08%) and rhabditoid larvae (12.49%), *Toxocara* spp.: eggs (4.17%) and *Isoospora belli*: oocysts (2.08%), indicating extensive fecal contamination from both human and animal sources. We hope that investigations such as this will lead to the establishment of hygiene standards and programs for monitoring the levels of parasitic contamination on sandy beaches.

Key words: parasite, beach pollution, zoonosis.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela, las playas constituyen uno de los espacios comúnmente visitados por su población para llevar a cabo actividades de esparcimiento y recreación durante los fines de semana y temporadas

vacacionales, mostrando gran afluencia turística, lo cual conduce a la contaminación ambiental y cambios en el ecosistema producto de la acumulación de desechos e inclusive la deposición de materia fecal humana y animal, lo que favorece la transmisión de enfermedades antropozoonóticas de interés sanitario

¹ Prácticas Profesionales de Parasitología. Dpto. Estudios Clínicos Escuela Bioanálisis, Universidad de Carabobo. Valencia, Estado Carabobo, Venezuela.

*Autor de correspondencia: arliguerrero@gmail.com

(Silva *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2011; Rumosa *et al.*, 2009; Neves & Massara, 2009) causadas por *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y *Toxocara* spp., a través de la ruta fecal oral. De igual manera las infecciones por Anquilostomídeos y *Strongyloides* spp. (De Castro *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2005), parásitos que cumplen parte de su ciclo evolutivo en suelos húmedos hasta entrar en contacto con la piel de individuos de sangre caliente, generan patologías dermatológicas y sistémicas importantes epidemiológicamente (Marques *et al.*, 2012; Neves & Massara, 2009; Rocha *et al.*, 2011; Cassenote *et al.*, 2011; Bojar & Kłapeć, 2012).

Los balnearios ubicados en el Municipio Puerto Cabello, Estado Carabobo, son objeto de importante intercambio comercial y de gran atracción turística por su ubicación geográfica frente al Mar Caribe; especialmente aquella que se encuentra cerca del casco histórico de la ciudad, zonas residenciales y comerciales y a pocos metros del malecón, la cual presenta una extensión de costa de 980 m de litoral (Ministerio del Poder Popular para la Defensa, 2012). Además, su topografía muestra un bloqueo parcial de la corriente marina que se desplaza desde Punta Brava (Este) de Puerto Cabello hasta Punta Arenas (Oeste) del Estado Falcón, reduciéndose la velocidad de circulación del agua marina y por tanto se reduce la capacidad de autodepuración de la masa de agua circulante y de los elementos microbiológicos y fisicoquímicos de la orilla de la playa, que favorece la proliferación de microorganismos indicadores de contaminación fecal humana y animal (Córdoba *et al.*, 2002).

Existen un conjunto de variables que podrían estar relacionadas directamente con el número estimado de parásitos en arena de playa que se puedan encontrar en todo el año tales como la estación climática, precipitaciones, temperatura atmosférica de la región, condición de la marea, presencia de animales domésticos en estado de abandono circulantes en las costas y el grado de afluencia de temporadistas durante periodos vacacionales (Cassenote *et al.*, 2011; Córdoba *et al.*, 2002); por lo cual deberían monitorearse de forma periódica las condiciones de calidad sanitarias de arena de costa como del agua de mar a fin de catalogar un balneario como apta o no para actividades de recreación.

Algunas organizaciones internacionales tales como la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) por medio de la Ley para la Evaluación de la Salud Ambiental de las Playas y Costas (USEPA; 2000); al igual que el Consejo Nacional del Medio Ambiente (Resolución N° 274 de Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2000) en Brasil establecen la evaluación de posibles parásitos indicadores de contaminación fecal en muestras de agua de mar y arena de playa, además de proveer el apoyo necesario para desarrollar e implementar programas que ayuden a notificar al público sobre la potencial exposición a microorganismos patógenos. Sin embargo, la República Bolivariana de Venezuela no tiene en la actualidad marco legal que contemple la evaluación de formas parasitarias de interés sanitario que podrían existir en estos ecosistemas, específicamente en los suelos de estos espacios (Normas para la clasificación y el control de la calidad en los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos, Decreto N° 883; Ley Orgánica del Ambiente de la República Bolivariana de Venezuela, 2006), lo que puede estar incurriendo en una incorrecta evaluación de la playas, en relación al nivel de contaminación.

Es por ello que esta investigación tuvo como objetivo determinar la presencia de formas parasitarias intestinales en arena de playa como indicadores de contaminación fecal, en un Balneario de Puerto Cabello; Marzo 2012 - Febrero 2013 y su relación con los puntos geográficos de la costa de playa analizados, humedad relativa de la arena (seca o mojada), periodos vacacionales y estacionalidad climática, para poder así identificar el riesgo infección parasitaria que afecte la calidad de vida de las personas que asisten al balneario con fines recreacionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

El balneario seleccionado para el estudio consta de un espacio territorial costero de aproximadamente 180 Km², la cual está ubicada en la zona central de Puerto Cabello, Estado Carabobo, orientada al Norte con el Mar Caribe. Esta playa representa geográficamente una extensión aproximada de 980 m de costa (Ministerio del Poder Popular para la Defensa, 2012). Se tomaron 110 muestras de arena recolectadas durante el periodo Marzo de 2012 - Febrero 2013; 10 por cada mes, siguiendo las características de un estudio de campo, descriptivo transversal de prevalencia porcentual. Para ello fueron

seleccionados intencionalmente cinco sitios de la playa de acuerdo a la observación de zonas donde se evidencien mayor contaminación ambiental, definidos como puntos geográficos de muestreo y enumerados desde el Punto cero (0) hasta el Punto cuatro (4); siguiendo alguna referencia ambiental y cubriendo toda la extensión de la costa, cuyas coordenadas se especifican en la Fig. 1 y Tabla I.

Muestreo

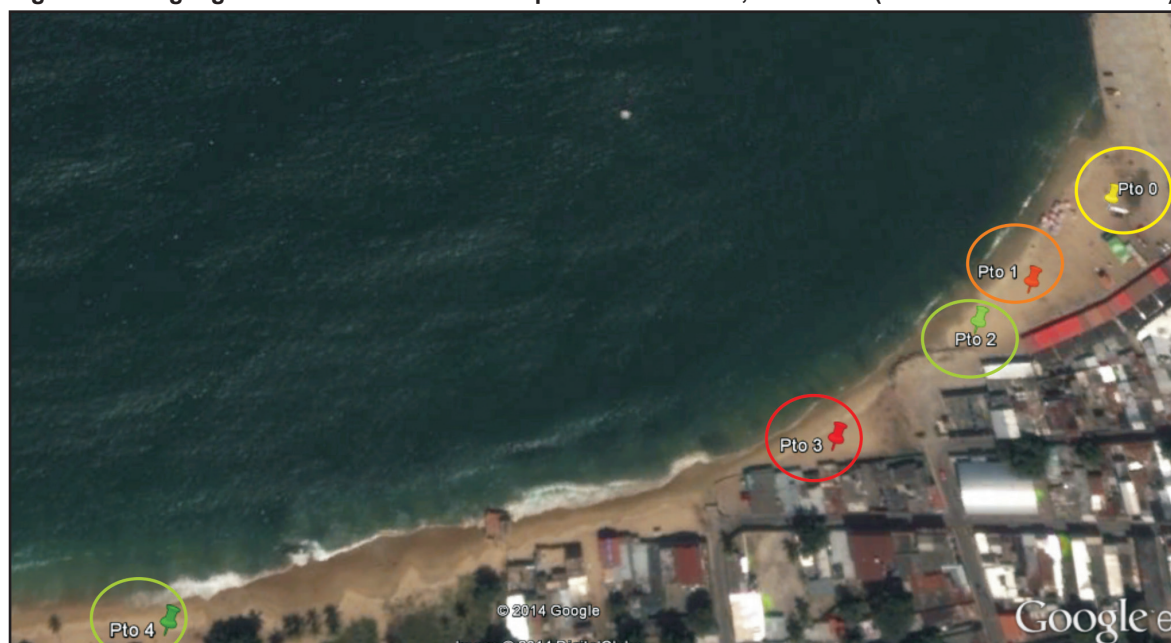
En cada punto de muestreo se delimitó un área de 10 cm de diámetro y 5 cm de profundidad (Cassenote *et al.*, 2011; Santarém *et al.*, 1998), en el cual se tomaron 500 gr de arena húmeda a la orilla del mar y 500 gr de arena seca ubicada aproximadamente a unos 14 metros de la orilla del mar, recopiladas entre las 7:30 am y 8:30 am; almacenadas en bolsas de plástico de cierre hermético para su transporte y procesamiento en el laboratorio en un periodo no mayor a 48 horas.

Se registraron en un instrumento datos relacionados con: hora de muestreo, fecha, condición de la marea, presencia de basura, animales, presencia de turistas y temporada turística; esta última tomando como temporada pre-vacacional los meses de Marzo, Junio, Julio, Noviembre y Diciembre y como post-

vacacionales los meses restantes. Igualmente se registró la estación climática, considerando que los meses de la estación de sequía en Venezuela corresponden desde Diciembre hasta Abril, mientras que los de lluvia son de Mayo a Noviembre de acuerdo a lo establecido por el Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMEH, 2012). El mes de Agosto no se pudo realizar muestreo en la playa dado a razones de logística. El análisis de las muestras recolectadas se llevó a cabo en el laboratorio de Prácticas Profesionales de Parasitología del Departamento de Estudios Clínicos de la Escuela de Bioanálisis, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo sede Carabobo. Este análisis se desarrolló de la siguiente manera:

Lavado con solución salina 0,85%: Se pesó 50 gr de arena y se lavó por inmersión (10 veces) en una bolsa plástica con 50 ml de NaCl al 0,85% (procedimiento realizado por duplicado), posteriormente se dejó reposar por 10 minutos y se drenó el contenido de la bolsa en vasos cónicos. Luego de 24 horas se tomaron alícuotas del sedimento y se colocaron en vidrio de reloj para ser observados con objetivo 4x y 10x al microscopio, con la finalidad de recuperar cualquier forma parasitaria presente en la muestra manteniendo un medio isotónico con solución salina fisiológica (Khazan *et al.*, 2012). Método de

Fig. 1. Puntos geográficos de muestreo. Municipio Puerto Cabello, Venezuela (Marzo 2012-Febrero 2013).



Fuente: Imagen tomada de Google Earth® (14 de febrero 2012).

Tabla I. Coordenadas de los puntos geográficos de muestreo a lo largo de la ensenada. Municipio Puerto Cabello. Período Marzo de 2012 - Febrero 2013.

Punto geográfico	Coordenadas	Referencia del lugar
P0	LA: 10°28'34.31"N LO: 68° 0'40.89"O	Toldos para bañistas
P1	LA: 10°28'32.57"N LO: 68° 0'40.92"O	Kioscos de comida
P2	LA: 10°28'31.59"N LO: 68° 0'42.70"O	Rompeolas natural de piedra
P3	LA: 10°28'28.73"N LO: 68° 0'44.85"O	Aproximadamente 50 mts del rompeolas
P4	LA: 10°28'26.87"N LO: 68° 0'48.97"O	Vegetación boscosa

Willis con solución de NaCl saturada: Se tomaron 19 gr de arena seca y 20 gr de arena mojada en un recipiente boca ancha y se le agregó solución saturada de NaCl hasta poner en contacto el líquido con una lámina portaobjeto. Finalmente se invirtió el porta objeto y se cubrió con una laminilla para observar en microscopio en búsqueda de huevos livianos de helmintos (Cassenote *et al.*, 2011). Método Rugai Modificado: se siguió la descrita por Santos *et al.* (2005) pero dejando sedimentar por 24 horas para la recuperación e identificación de parásitos en estadio larvario.

Analisis estadístico

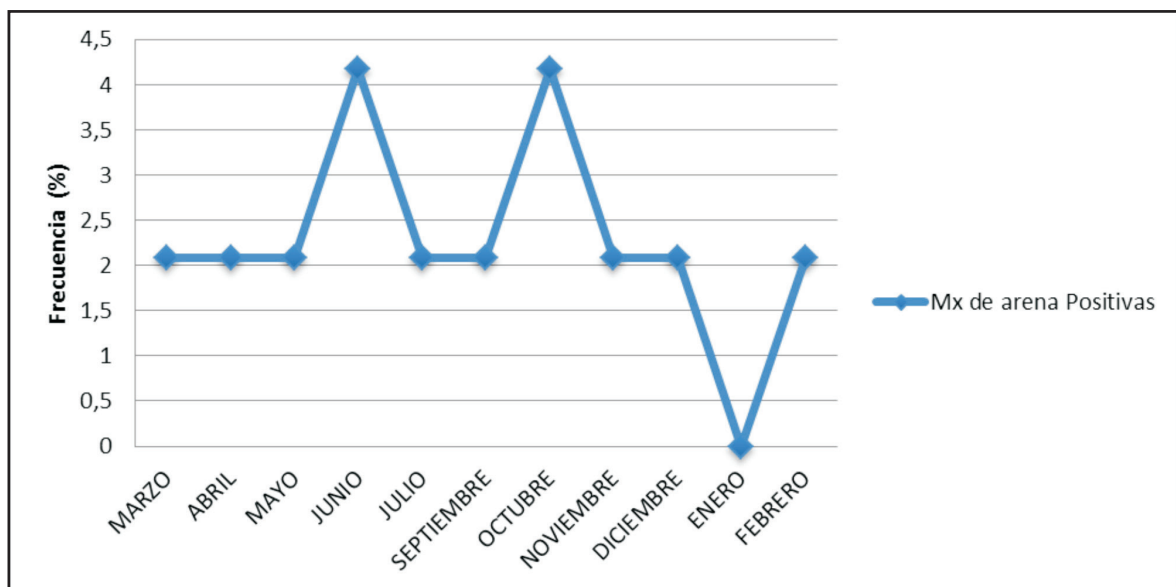
Los datos fueron tabulados según la humedad relativa de la arena (mojada: a la orilla del mar; seca: aproximadamente 14 m de la orilla), positividad o no para parásitos, forma evolutiva y género de los parásitos identificados, mes de muestreo, punto geográfico de la costa evaluado y estacionalidad del año. Se aplicó Chi cuadrado (χ^2) y Prueba exacta de Fisher para calcular las posibles asociaciones entre dichas variables, considerando una confiabilidad del 95%.

RESULTADOS

Las tres técnicas aplicadas para las muestras de arena recolectadas permitieron recuperar formas parasitarias en 43,64% (48/110) de los casos, a partir de las cuales el 25% (12/48) resultaron formas parasitarias de interés sanitario para el hombre, mientras que 85,41% (41/48) fueron protozoarios y helmintos de vida libre. Los resultados obtenidos de muestras positivas para patógenos de acuerdo al mes de muestreo se presentan en la Fig 2.

El mayor número de muestras con parásitos de interés sanitario se ubicó en el punto 0 con 12,5% (6/48), lugar donde se encuentran toldos para los bañistas, mientras que en los punto 1, 2, y 4 la frecuencia fue de 4,17% (2/48) en cada uno, y el punto 3 no mostro parásitos patógenos (Fig 3).

Fig. 2. Prevalencia de muestras con parásitos patógenos para el hombre en relación del total de muestras de arena positivas. Municipio Puerto Cabello. Período Marzo de 2012 - Febrero 2013.



De igual manera, se recuperaron parásitos patógenos en 16,67% (8/48) muestras con menor humedad relativa (arena seca) y 8,33% (4/48) en las de mayor humedad relativa (arena mojada), sin encontrarse relación estadísticamente significativa entre el nivel de humedad de la arena con la presencia o no de parásitos patógenos de dichas muestras ($P = 0,202$, por prueba exacta de Fisher).

En función a las estaciones climáticas que pueden afectar de manera directa en la cantidad de parásitos presentes en la arena de playa, las muestras

con patógenos para el hombre en la estación de sequía fue de 16,67% (8/48) y 8,33% (4/48) en época de lluvia mientras que en muestras con protozoarios y helmintos de vida libre, 64,58% (31/48) resultaron positivas en sequía y 20,83% (10/48) en lluvia (Fig. 4), sin obtener asociación estadísticamente significativa ($P = 0,489$) entre el porcentaje de recuperación de patógenos con la estacionalidad climática, de acuerdo a la prueba de Fisher.

Considerando que la afluencia de temporadistas puede influir en la mayor frecuencia

Fig. 3. Prevalencia de muestras positivas a patógenos en función al punto geográfico de muestreo. Municipio Puerto Cabello. Período Marzo de 2012 – Febrero 2013.

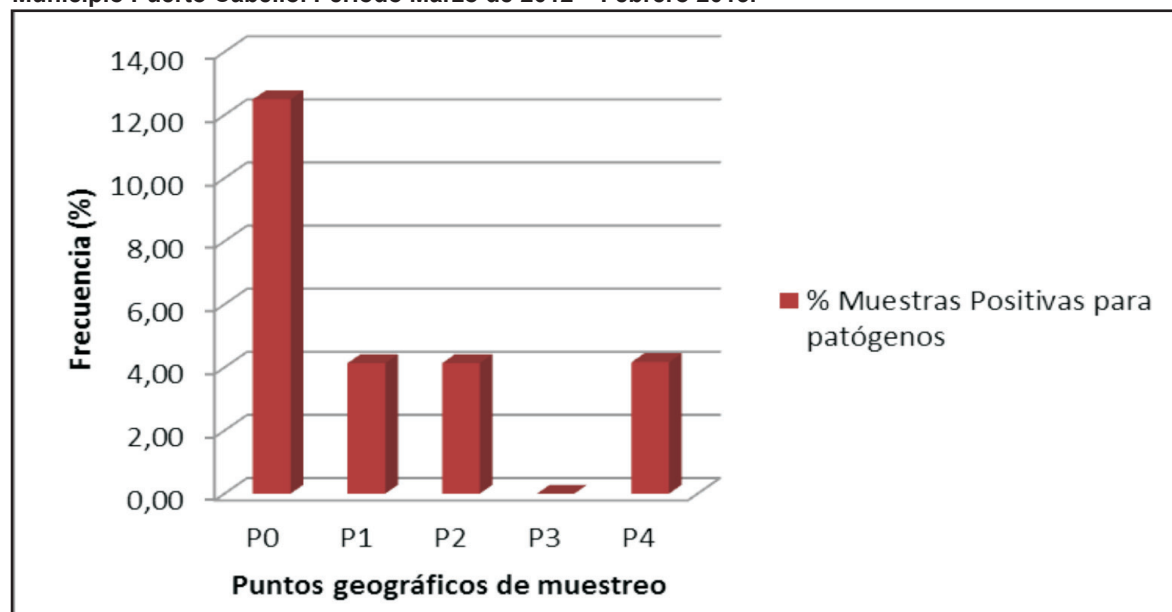


Fig. 4. Prevalencia de muestras con parásitos de interés clínico y de vida libre en función de la estación climática. Municipio Puerto Cabello. Período Marzo de 2012 - Febrero 2013.

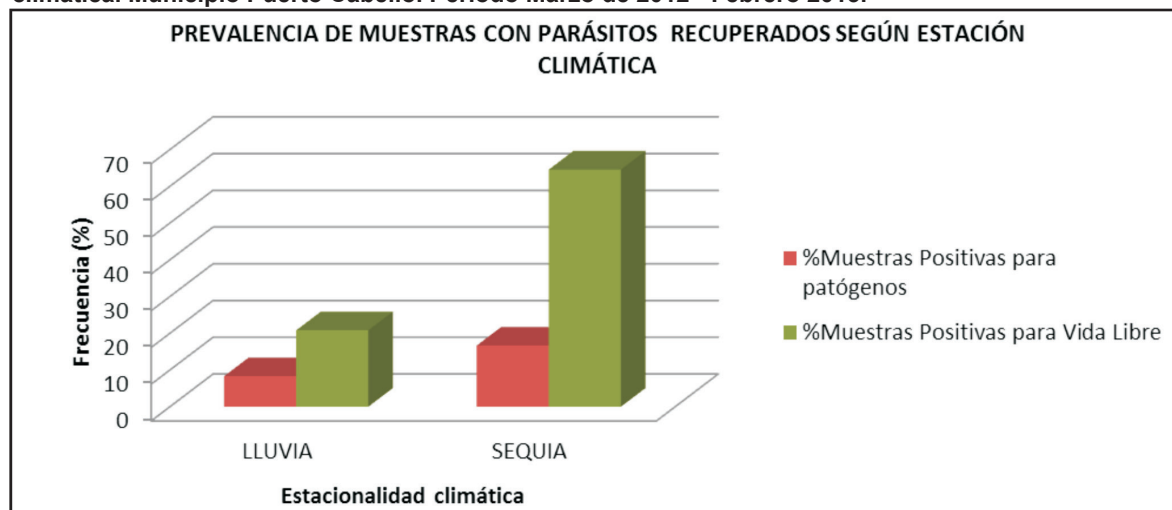


Tabla II. Prevalencia de parásitos de interés clínico en función a la temporada vacacional y a la humedad relativa de la arena. Municipio Puerto Cabello. Período Marzo de 2012-Febrero 2013.

Especie patógena	Arena Seca		Arena Mojada		Pre-Vacacional		Post-Vacacional		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Larva rabditoide de <i>Strongyloides</i> spp.	4	8,33	0	0,00	2	13,30	2	13,30	4	8,33
Larva filarioides de <i>Strongyloides</i> spp.	1	2,08	0	0,00	0	0,00	1	6,60	1	2,08
Larva rabditoide de Anquilostómidos	4	8,33	2	4,17	5	33,30	1	6,60	6	12,49
Huevos de Anquilostómidos	1	2,08	0	0,00	0	0,00	1	6,60	1	2,08
Huevos de <i>Toxocara</i> sp.	1	2,08	1	2,08	0	0,00	2	13,30	2	4,17
Ooquiste de <i>Isospora belli</i>	0	0,00	1	2,08	0	0,00	1	6,60	1	2,08

de parásitos patógenos en muestras de arena, esta investigación tuvo 12,5% (6/48) de muestras con patógenos durante la temporada pre-vacacional, mostrándose la misma frecuencia en la temporada post-vacacional, por lo que no existe diferencia significativa estadísticamente entre dichas variables, según el estadístico χ^2 ($P = 0,106$).

La frecuencia de las formas parasitarias que se recuperaron en función de la humedad relativa de la arena y a las temporadas pre-vacacionales y post-vacacionales a lo largo del estudio, se resume en la Tabla II.

DISCUSIÓN

Se logró determinar, a partir de los tres (3) métodos realizados, la positividad de parásitos considerados como indicadores de contaminación fecal, donde la presencia de estadios parasitarios en el suelo indica la existencia de una fuente de contaminación (Torres *et al.*, 1997; Soriano *et al.*, 2001), lo cual cataloga al balneario estudiado como no apto para fines recreacionales, tomando como criterio lo publicado por De Castro *et al.* (2005) donde determina que tan solo la presencia de una forma parasitaria patógena para el hombre recuperada tras análisis de muestras de arena define al lugar como no apto para actividades recreacionales, luego de demostrar presencia de larvas de Anquilostómidos y *Strongyloides* spp, huevos de *Toxocara* spp. y de *Ascaris lumbricoides* en muestras de arena de playa de una playa en Brasil.

En virtud de que en Venezuela la ley vigente relacionada con control ambiental no establece

los parámetros parasitológicos permisibles en la arena de playa (Ley Orgánica del Ambiente de la República Bolivariana de Venezuela, 2006), esta aseveración indicada por diversos autores (Neves & Massara, 2009; Rocha *et al.*, 2011; Cassenote *et al.*, 2011; Santarem *et al.*, 2004) toma importancia para el estudio de playas venezolanas, y después de los resultados obtenidos en la presente investigación, donde se mostró que el 25% (12/48) de las muestras presentaban contaminación por parásitos patógenos; se corrobora que la playa estudiada no presenta las condiciones propicias de saneamiento ambiental para visitas turísticas. Además, no se disponen de investigaciones previas que evalúen la presencia de parásitos en suelos de playa del Municipio Puerto Cabello, por lo que el presente estudio resulta innovador. Se conoce, sin embargo; el 63,16% de positividad para huevos de *Toxocara* spp. en muestras de suelos de arena, limo y/o arcilla, mediante técnica por flotación con NaCl (Willis-Molloy modificado) de 38 parques públicos de la ciudad de Coro, Estado Falcón, Venezuela, según lo publicado por Cazorla *et al.* (2007) que evidencia el grado de contaminación ambiental en estos sitios recreacionales.

De acuerdo al punto de la playa donde se recolectaron las muestras, se reveló la mayor presencia de parásitos en el punto cero (0) y el punto uno (1), debido a que corresponden a las área de mayor concurrencia de personas y animales, precisamente donde se ubican toldos para bañistas y kioscos para venta de comida, demostrando que éstos contribuyen a la contaminación de las playas, dado a la poca concientización de los bañistas en el cuidado y mantenimiento del medio ambiente, falta de hábitos de prevención de contaminación ambiental

y falta de limpieza del lugar. Esto conlleva por tanto a que la playa evaluada se considere de alto riesgo de infección para todos los turistas.

De igual manera, este estudio permitió conocer que los meses de mayor frecuencia de muestras de arena positivas para parásitos patógenos corresponden a los meses de junio y octubre, que corresponden a periodos pre-vacacional y post-vacacional respectivamente, demostrando que no existe asociación estadísticamente significativa entre las temporadas pre o post vacacionales y la recuperación o no de patógenos en muestras de arena de la playa seleccionada, lo cual puede deberse a que la afluencia de bañistas y la presencia de animales en abandono es constante, según lo observado durante los tiempos de muestreos. Sustentando esto, diversos autores coinciden en la afirmación de que mientras más accesible sea la playa y mayor sea el tránsito de personas y animales domiciliados o en abandono, mayor será la contaminación de la arena de la playa, favoreciendo mayor riesgo de infección parasitaria (Neves & Massara, 2009; Cassenote *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009).

Por otro lado, conociendo que los geohelmintos necesitan estar en la tierra para tener un desarrollo óptimo y cumplir una fase su ciclo de vida, Márquez *et al.* (2009) pone en evidencia en su investigación que los suelos arenosos reúnen condiciones propicias para el desarrollo de formas evolutivas de parásitos.

Por ello se evaluó en el presente estudio la frecuencia de parásitos patógenos obtenida en arena seca y mojada. Mientras Rocha *et al.* (2011) apunta a características de suelos arenosos, con humedad relativa, poca exposición al sol para evitar la desecación del parásito, en el presente trabajo la recuperación de patógenos fue mayor en las muestras de arena seca (o de menor humedad relativa) en comparación con las muestras de arena mojada (obtenidas a la orilla del mar), lo que sugiere que dichos microorganismos adquirieron cierta resistencia al tiempo de exposición al sol a fin de permitirse un mayor contacto con individuos de sangre caliente, garantizando la sobrevida de la especie tras alcanzar su hospedador, a expensas del menor grado de humedad. Esto también puede deberse a que en arena mojada existe un mayor porcentaje de salinidad y efecto mecánico de

arrastré de formas parasitarias en la orilla del mar por la marea.

La presencia de parásitos también depende de la estación climática. Se obtuvo mayor frecuencia de parásitos patógenos en época de sequía en relación a la época de lluvia, concluyendo que las lluvias en suelo arenoso inducen a una mayor depuración o arrastre de formas parasitarias, disminuyendo la tasa de recuperación de las mismas tal como lo afirma Cassenote *et al.* (2011).

Entre los parásitos que se hallaron durante el periodo de muestreo se encontraron principalmente larvas rabditoides de *Strongyloides* spp. y Anquilostomídeos, así como también Larvas filarioides de *Strongyloides* spp., huevos de Anquilostomídeos, huevos de *Toxocara* spp. y ooquiste de *Isospora belli*; lo que evidencia la contaminación fecal procedente de animales en estado de abandono y de personas visitantes de la playa (De Castro *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2005; Cassenote *et al.*, 2011; Córdoba *et al.*, 2002; Isla *et al.*, 2005).

En este sentido se espera que se fomenten normativas de control sanitario y programas de evaluación de niveles de contaminación parasitaria en arena de playa, así como también desarrollar campañas de concientización a los temporadistas en la preservación del ecosistema, y al mismo tiempo se contribuya en la disminución de la prevalencia de enfermedades antroponóticas.

Conflicto de intereses: Ninguno.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Emy González, del Laboratorio de Investigación de Posgrado de la Especialidad Bioquímica Clínica (LIPEB), Profesores del Departamento de investigación y Desarrollo profesional; ambos pertenecientes a la Escuela de Bioanálisis-Universidad de Carabobo, sede Carabobo; al personal obrero, administrativo y docente adscrito al Departamento de Estudios Clínicos, especialmente a los del Laboratorio de Prácticas Profesionales de Parasitología de la Escuela de Bioanálisis - Universidad de Carabobo, sede Carabobo. Nuestro especial agradecimiento a los árbitros anónimos de esta revista quienes contribuyeron enormemente en el enriquecimiento del trabajo.

REFERENCIAS

- Bojar H. & Kłapeć T. (2012). Contamination of soil with eggs of geohelminths in recreational areas in the Lublin region of Poland. *Ann. Agric. Environ.* **19**: 267-270.
- Cassenote F. A., Pinto J., De Abreu A. & Ferreira A. (2011). Contaminação do solo por ovos de geo-helminthos com potencial zoonótico na municipalidade de Fernandópolis, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **3**: 370-374.
- Castro C., de Oliveira J.B., Hernandez J. & Jimenez M. (2009). Contaminación por parásitos gastrointestinales de caninos en dieciocho playas del pacifico central: Implicaciones para la salud Pública. *Cien. Vet.* **27**: 47-56.
- Cazorla D., Morales P. & Acosta M. (2007). Contaminación de suelos con huevos de *Toxocara* spp. (nematoda, ascaridida) en parques públicos de la ciudad de Coro, Estado Falcón, Venezuela. *Rev. Cient. FCV-LUZ*, **17**: 117-122.
- Conselho Nacional do Meio Ambiente (2000). *Resolução CONAMA nº 274. Año 2000*. [Publicación N. 18, 25 de enero 2001, sección 1 (70-71)]. [Documento en línea]. Disponible en: http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua./praias/res_conama_274_pdf. [Consultado: enero 20, 2012]. Brasil.
- Córdoba A., Ciarmela M., Pezzani B., Gamboa M., De Luca M., Minvielle M., et al. (2002). Presencia de parásitos intestinales en paseos públicos urbanos en la plata, Argentina. *Parasitol Latinoam.* **57**: 25-29.
- De Castro J., Dos Santos S. y Monteiro N. (2005). Contaminação de canteiros da orla marítima do municipio Praia Grande, São Paulo, por ovos de *Ancylostoma* e *Toxocara* em fezes de cães. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **38**: 199-201.
- Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (2012). *Escenarios esperados para la temporada de lluvias 2012*. [Documento en línea]. Disponible en: <http://www.inameh.gob.ve/ESCENARIOS.pdf>. [Consultado: enero 20, 2012].
- Isla F., Denegil G. Cermelo L., Farias A. y Crowder P. (2005). *Mar de Plata: Fragilidad Costera*. Ed. Martin. Mar de Plata, Argentina.
- Khazan H., Khazaei M., Seyybe S. & Mehrabi A. (2012). Prevalence of *Toxocara* spp. Eggs in public parks in Tehran City, Iran. *Iran J. Parasitol.* **7**: 38-42.
- Ley Orgánica del Ambiente. Gaceta oficial N° 5.883 Extraordinario del 22 de Diciembre de 2006 de la República Bolivariana de Venezuela.
- Marques J., Guimarães C., Vilas Boas A., Caruaíba P. y Moraes J. (2009). Contamination of public parks and squares from Guarulhos São Paulo State, Brazil by *Toxocara* spp. and *Ancylostoma* spp. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* **51**: 217-218.
- Ministerio del Poder Popular para la Defensa (2012). *Carta Náutica del Servicio de Hidrografía y Navegación de la República Bolivariana de Venezuela*. [Documento en línea]. Disponible: <http://www.dhn.mil.ve/images/CATSHN2013.pdf?ml=5&mlt=system&tmpl=component>. [Consultado: marzo 01, 2012].
- Neves, R., & Massara, C. (2009). Da Silva R. & Massara C. (2009). Contaminação do solo de áreas comunitárias do município de Caratinga, por ovos de *Toxocara* sp. e cistos de *Entamoeba* sp. *Rev. de Patol. Trop.* **38**: 126-130.
- Normas para la clasificación y el control de la calidad en los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos. [Decreto N° 883. Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 5.021 de fecha 18 de diciembre de 2002], Caracas.
- Rocha S., Pinto R., Floriano A., Teixeira L., Bassili B., Martinez A., et al. (2011). Environmental analyses of the parasitic profile found in the sandy soil from the Santos municipality beaches, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* **5**: 277-281.
- Santarém V., Sartor I. & Matsubara F. (1998). Contaminação, por ovos de *Toxocara* spp., de parques e praças públicas de Botucatu, São Paulo, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **31**: 529-532.

- Santos S., Gonçalves F., Campos P., Matos E., Souza P., Cáceres Y., *et al.* (2005). Adaptação do método de Rugai e colaboradores para análise de parasitas do solo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **38**: 270-271.
- Silva P., Cavalcanti I. & Soares F. (2009). Common beach sand contamination due to enteroparasites on the southern coast of Pernambuco State, Brasil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* **51**: 217-218.
- Soriano S., Barbieri L, Pierangeli. N *et al.* (2001). Intestinal parasites and the environment: frequency of intestinal parasites in children of Neuquén, Patagonia, Argentina. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **43**: 96-101.
- Torres P., Otth L., Montefusco A., Wilson G., Ramirez C. y Acuña M. (1997). Infection by intestinal Protozoa and Helminths in schoolchildren from riverside sectors, with different fecal contamination levels Valdivia River, Chile. *Bol. Chil. Parasitol.* **52**: 3-11.
- USEPA (2012). *Beaches Environmental Assessment and Coastal Health Act of 2000*. [Documento en línea. Disponible en: <http://water.epa.gov/lawsregs/lawsguidance/beachrules/act.cfm>. [Consultado: febrero 20, 2012].

Recibido el 22/02/2014
Aceptado el 12/08/2014

Aspectos clínicos y epidemiológicos de la infección por coccidios intestinales en Urumaco, estado Falcón, Venezuela

Clinical and epidemiological aspects of intestinal coccidian infection in Urumaco, Falcon state, Venezuela

Dalmiro Cazorla Perfetti*, Geraldine Leal Rojas, Ángela Escalona Nelo, Javier Hernández Nava, María Acosta Quintero & Pedro Morales Moreno

RESUMEN

Entre septiembre-diciembre de 2013, se realizó un estudio para determinar los aspectos clínicos y epidemiológicos de la infección por coccidios intestinales en 187 habitantes ($\bar{X} \pm D.S. = 25.74 \pm 19.73$ años) de Urumaco, Estado Falcón, Venezuela. Se hizo evaluación clínica y anamnesis para la búsqueda de signos y síntomas que usualmente se encuentran asociados a las coccidiosis intestinales. El diagnóstico parasitológico se hizo mediante los métodos directo y coloración de Kinyoun. La prevalencia global de parasitosis intestinales fue de 78,07% (146/187), siendo *Blastocystis* spp. el taxón más frecuentemente observado (57,07%). La prevalencia de coccidiosis intestinal fue de 50,80% (95/187), y la criptosporidiosis la más prevalente con 40,64%. No se encontró una relación estadísticamente significativa entre el sexo o la edad y la presencia de los coccidios intestinales ($P > 0,05$). Hiporexia, epigastralgia y flatulencia fueron las manifestaciones clínicas características significativamente relacionadas con estas infecciones ($P \leq 0,05$). Presentar uñas sucias (Odds Ratio [OR]=1,33), el consumo de "comida rápida" (OR= 2,11), andar descalzo (OR=1,16), pertenecer al nivel socioeconómico IV y V (OR= 2,89), que merodeen animales ajenos en las viviendas (OR= 1,01), que no los amarren (OR= 2,79), su alimentación con desperdicios (OR= 1,9) y sin suministro de drogas antiparasitarias (OR= 3,54), aparecen como potenciales factores de riesgo significativamente asociados en la dinámica de transmisión de las coccidiosis intestinales.

Palabras clave: coccidiosis intestinales, epidemiología, manifestaciones clínicas, Venezuela.

SUMMARY

We investigated clinical and epidemiological aspects of intestinal coccidian infections in 187 inhabitants ($\bar{X} \pm S.D. = 25.74 \pm 19.73$ years) in the rural community of Urumaco, Falcón state, Venezuela, between September and December 2013. Direct smears and Kinyoun staining were used to perform parasitological diagnosis. The overall prevalence of intestinal parasitoses was 78.07% (146 /187), with *Blastocystis* spp. the most frequently parasite taxon observed (57.07 %). The prevalence of coccidiosis was 50.80 % (95 /187), and among these cryptosporidiosis was the most prevalent with 40.64% of patients infected. There were no statistically significant differences in parasite prevalence between sexes or ages ($P > 0.05$). Hyporexia, epigastralgia and flatulence were significantly associated with the infections ($P < 0.05$). Dirty fingernails (Odds Ratio [OR]=1.33), fast food consumption (OR= 2.11), walking barefoot (OR=1.16), belonging to a lower socioeconomic level (OR= 2.89), animals roaming freely in the houses (OR= 1.01), untied animals (OR= 2.79), feeding animals with food waste (OR= 1.9) and a lack of anti-parasitic treatment (OR= 3.54) were determined as risk factors significantly associated with the transmission dynamics of enteric coccidiosis.

Key words: intestinal coccidiosis, epidemiology, clinical manifestations, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

Dentro de las enteroparasitosis que afectan al ser humano destacan en la actualidad las ocasionadas por coccidios intestinales, los cuales son protozoarios que se ubican taxonómicamente en el Phylum Apicomplexa. Entre los principales taxones

de coccidios con hábitos entéricos que infectan a los humanos, se encuentran los pertenecientes a los géneros *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora* spp. y *Cystoisospora* spp. (= *Isospora*), agentes causales de las criptosporidiosis, ciclosporiasis y cystoisosporiosis, respectivamente, y se les considera como emergentes y reemergentes por su relevancia

Laboratorio de Entomología, Parasitología y Medicina Tropical (LEPAMET), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda" (UNEFM), Apdo. 7403, Coro 4101, Estado Falcón, Venezuela.

* Autor de correspondencia: lutzomyia@hotmail.com

en individuos con inmunosupresión (Becerril, 2011; Botero & Restrepo, 2012). Como sus congéneres apicomplejos, estos 3 taxones de coccidios poseen un complejo apical que les permite penetrar las células (enterocitos) de sus hospedadores; además, resalta en sus biología, que son monoxénicos con una alternancia en sus ciclos reproductivos: esquizogonia (asexual) y esporogonia (sexual), cuyo estadio final es el ooquiste que se excreta por las heces, y algunos tienen un componente zoonótico (Becerril 2011; Botero & Restrepo, 2012).

Las infecciones ocasionadas por coccidios intestinales pueden ser asintomáticas o sintomáticas. En estos casos, pueden presentarse desde una diarrea autolimitada, esteatorrea, dolor de cabeza y abdominal, fiebre y pérdida de peso en individuos inmunocompetentes, hasta la presencia de diarrea crónica, caquexia, desbalance de electrolitos e inclusive la muerte en niños y adultos con inmunodeficiencias (SIDA/VIH, cáncer, quimioterapia antineoplásica, malnutrición, etc.) (Becerril 2011; Botero & Restrepo, 2012).

Aunque es más económico, práctico y requiere menor tiempo, la búsqueda de los ooquistes en la materia fecal por el método coprológico directo no ofrece un diagnóstico preciso de las criptosporidiosis, ciclosporiasis y cistoisporiosis; es por ello que se requieren coloraciones específicas, siendo la de Ziehl-Neelsen modificada (Kinyoun) una de las más empleadas (Botero & Restrepo, 2012). Como ya se ha comentado previamente (Cazorla *et al.*, 2012), se presume que en el país existe un subregistro de casos, esto debido a que la coloración de Kinyoun al no ser una técnica de rutina no se ejecuta si no es solicitada por el médico consultante.

Los coccidios intestinales se transmiten por vía fecal-oral, a través de fuentes de aguas inadecuadamente tratadas, comidas como vegetales o frutas, de forma directa persona-persona, fómites, así como también por vía zoonótica, ya que algunos ooquistes, especialmente de *Cryptosporidium* spp., se han logrado aislar en las heces de varios tipos de animales domésticos, de granjas y silvestres (Becerril, 2011; Botero & Restrepo, 2012). Estas enteroparasitosis son más frecuentes en poblaciones de los denominados países en desarrollo, especialmente en las regiones tropicales, y con perfiles socio-económicos y de salubridad deficientes;

las condiciones ambientales (e.g., temperaturas bajas) y las lluvias también favorecen su transmisión en los grupos vulnerables (Becerril, 2011; Botero & Restrepo, 2012).

En Venezuela se han realizado varios estudios sobre las coccidiosis intestinales, especialmente en los estados Zulia, Bolívar y la región Capital (Chacín-Bonilla *et al.*, 2003; 2008; Devera *et al.*, 2005a; 2010; Tutaya *et al.*, 2006; Chacón *et al.*, 2009; Tedesco *et al.*, 2012; Rivero-Rodríguez *et al.*, 2013); pero aún existen muchas regiones sin investigar; aunque la información obtenida sugiere que la problemática de estas enteroparasitosis es relevante para la Salud Pública en el territorio nacional (Barrios *et al.*, 2004).

Con respecto al estado Falcón, en la región nor-occidental de Venezuela, son similarmente escasos los trabajos sobre las coccidiosis intestinales. El único documentado en revistas especializadas realizado en una pequeña población rural de la zona semiárida, se encontró una prevalencia de 26,11%, la cual se consideró como “relativamente alta” (Cazorla *et al.*, 2012). En la continuación de estos estudios, se muestrearon tres sectores de Urumaco, otra comunidad rural del semiárido falconiano, obteniéndose una prevalencia global de coccidiosis intestinales de más del 50%, lo cual es a todas luces poco usual. En el presente artículo se muestran los perfiles clínicos y epidemiológicos de dicho estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio de tipo descriptivo, prospectivo y transversal se realizó entre septiembre y diciembre de 2013, en los Sectores “Sabaz”, “Puesto Policial” y el “Estadio” (parroquia Urumaco) de la población rural de Urumaco (10° 53'18" y 11° 21'17"N; 70° 07'08" y 70° 26'29"W), Municipio Urumaco, enclavada a 67 msnm en la región semiárida del estado Falcón al nor-occidente de Venezuela. El área posee una zona de vida bioclimática correspondiente al Monte Espinoso Tropical (MET), cuyas características se han descrito en un artículo previo (Acosta *et al.*, 2002).

Muestra

Los sectores “Sabaz”, “Puesto Policial” y “El Estadio” de Urumaco se encuentran integrados

por alrededor de 500 habitantes. El cálculo del tamaño muestral se hizo mediante el programa de análisis de muestreo Raosoft (Raosoft, Inc. 2004, EUA), tomando un 95% de nivel de confianza y un margen de error del 5%, asumiendo una distribución normal, y de acuerdo a ensayos copro-parasitológicos (Kinyoun) previos (Cazorla *et al.*, 2012), una prevalencia esperada de enterococcidiosis para la zona semiárida falconiana de alrededor de 26%, lo cual arrojó un mínimo total de 187 individuos a muestrear, que se seleccionaron por azar simple. De este total, 89 (47,59%) correspondieron al sexo masculino y 98 (52,41%) al femenino, con edades comprendidas entre 2 meses - 84 años ($\bar{X} \pm D.S = 25,74 \pm 19,73$).

Diagnóstico parasitológico

De cada individuo se obtuvo mediante evacuación espontánea una muestra de heces, que fue recolectada por ellos mismos con un depresor de plástico desechable, y se colocó en un recipiente hermético *ad hoc*, previamente identificado. Las mismas se guardaron y transportaron en cavas de anime con hielo seco al Laboratorio de Entomología, Parasitología y Medicina Tropical (LEPAMET), Área Ciencias de la Salud, de la Universidad Nacional Experimental “Francisco de Miranda” (UNEFM), Coro, estado Falcón, Venezuela. Las muestras fecales se procesaron parasitológicamente por el método coprológico directo con solución salina y lugol, y la técnica de coloración de Kinyoun (Ziehl-Neelsen modificado). En los casos que se observó ooquistes, fueron medidos empleando micrómetro ocular (Botero & Restrepo, 2012).

Encuesta epidemiológica y manifestaciones clínicas

A cada individuo se le entregó una ficha-encuesta para la identificación de los probables factores de riesgos asociados a coccidiosis intestinales. La estratificación social se hizo según Graffar modificado por Méndez-Castellano *et al.* (1986). Así mismo, se incluyeron preguntas relacionadas con la sintomatología debida a coccidiosis intestinales, tales como dolor abdominal, diarrea, pérdida de peso, epigastria, cólicos, flatulencia, hiporexia (Botero & Restrepo, 2012).

Análisis estadístico

La afinidad entre pares de especies que co-ocurrieron se midió mediante el Índice de Fager

($I_{A,B}$), determinándose su significancia con el test de “t”, como ya se ha explicado en otro trabajo (Cazorla *et al.*, 2012). La asociación univariante entre las manifestaciones clínicas y los posibles factores de riesgo con la presencia de enterococcidiosis se hizo mediante las pruebas de Ji cuadrado (X^2) y X^2 de Mantel-Haenszel. En los casos donde se encontró una asociación significativa ($P \leq 0.05$) en el análisis univariado, la fuerza se determinó mediante los Odds Ratio (OR). Para el caso de las manifestaciones clínicas, los mismos se obtuvieron por las tablas de contingencia (análisis bivalente simple), y para los factores de riesgo por análisis de regresión logística múltiple (ARLM) utilizándose como método de estimación de parámetros el de Máxima Verosimilitud, y calculándose su bondad de ajuste con las pruebas de Razón de Verosimilitud y Hosmer-Lemeshow, a fin de poder controlar las variables de confusión (confounding variables). Es importante acotar que los cálculos de los OR de 11 de las 13 variables relacionadas con “Tenencia y cría de animales” (Tablas VII, VIII), se hicieron con los datos de 117 individuos que manifestaron poseer animales domésticos. Los datos se analizaron mediante paquete estadístico SIGMAPLOT versión 12.5 (Systat Software Inc.), y página Web para cálculos estadísticos StatPages.net (members.aol.com/johnp71/javastat.html).

Consideraciones bioéticas

Previo a la recolección de la información y muestras, se solicitó la colaboración voluntaria de la población y autoridades recalándose la confidencialidad del estudio. Se realizó un plan de acción que incluyó actividades de promoción y prevención sobre parasitosis intestinales. Se siguieron las normas de bioética establecidas en la Declaración Helsinki de la Asociación Médica Mundial en su versión adoptada en la LII Asamblea General de Edimburgo del año 2000. Se proporcionó “Consentimiento Informado”, en el que quedó por escrito su deseo de colaborar voluntariamente; en el caso de menores de edad lo firmaron sus representantes.

RESULTADOS

Los análisis coproscópicos revelaron una prevalencia global de parasitosis intestinales de 78,08% (146/187). La prevalencia de las diversas

especies de protozoarios/cromistas y helmintos se exhibe en la Tabla I. El cromista *Blastocystis* spp. fue el taxón más frecuentemente observado con un 57,75% de los casos; mientras que *Ascaris lumbricoides* (2,14%) fue el helminto que presentó la mayor prevalencia. Mediante la aplicación de la técnica de coloración de Kinyoun se logró la detección de una prevalencia general de coccidios intestinales del 50,80% (95/187), observándose prevalencias de 40,64% para *Cryptosporidium* spp., 36,36% para *C. cayetanensis* y 6,95% para *C. belli* (Tabla I).

El monoparasitismo se presentó en 32,82% de los individuos, con predominio de *Blastocystis* spp. (21,23%: 31/146), seguido de *Cryptosporidium* spp. (3,43%: 5/146), y *G. intestinalis*, *C. cayetanensis* y *E. coli* con iguales cantidades (2,06%: 3/146); en el caso de las infecciones múltiples se detectaron individuos con hasta 6 taxones parasitarios distintos, siendo el biparasitismo la asociación más predominante con un 33,5%, y los pares *Blastocystis* spp./*Cryptosporidium* spp. y *Cryptosporidium* spp./*C. cayetanensis* los más prevalentes con un 8,22% cada uno (Tabla II). La aplicación del Índice de Fager ($I_{A,B}$) reveló afinidades estadísticamente significativas entre *Blastocystis* spp. con *G. intestinalis* ($I_{A,B}$ = 0,71, t = 8,6); *Blastocystis* spp. con *E. coli* ($I_{A,B}$ = 0,44, t = 3,4); *Blastocystis* spp. con *E. histolytica/dispar/moshkovskii* ($I_{A,B}$ = 0,37,

t = 3,4); *Blastocystis* spp. con *Cryptosporidium* spp. ($I_{A,B}$ = 0,93, t = 9,1); *Blastocystis* spp. con *C. cayetanensis* ($I_{A,B}$ = 0,76, t = 5,5); *Blastocystis* spp. con *C. belli* ($I_{A,B}$ = 0,45, t = 3,7); *E. coli* con *G. intestinalis* ($I_{A,B}$ = 0,78, t = 8,1); *E. coli* con *E. histolytica/dispar/moshkovskii* ($I_{A,B}$ = 0,25, t = 2,5); *E. coli* con *Cryptosporidium* spp. ($I_{A,B}$ = 0,63, t = 4,6); *E. coli* con *C. cayetanensis* ($I_{A,B}$ = 0,29, t = 2,9); *G. intestinalis* con *Cryptosporidium* spp. ($I_{A,B}$ = 0,87, t = 8,1); *G. intestinalis* con *C. cayetanensis* ($I_{A,B}$ = 0,59, t = 4,9); *G. intestinalis* con *E. histolytica/dispar/moshkovskii* ($I_{A,B}$ = 0,35, t = 2,9); *Cryptosporidium* spp. con *C. cayetanensis* ($I_{A,B}$ = 0,93, t = 8,9); *Cryptosporidium* spp. con *E. histolytica/dispar/moshkovskii* ($I_{A,B}$ = 0,46, t = 3,5); *Cryptosporidium* spp. con *C. belli* ($I_{A,B}$ = 0,27, t = 3,1); *C. cayetanensis* con *C. belli* ($I_{A,B}$ = 0,33, t = 2,1).

A pesar de que los individuos del sexo femenino y los grupos de edad menores presentaron mayores porcentajes de infección (Tabla III), estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas (X^2 = 0,27; P = 0,60; X^2 = 21,2; P = 0,17, respectivamente) (Tabla III).

En lo referente a los síntomas y signos asociados a las coccidiosis intestinales (Tabla IV), la hiporexia (P = 0,002; OR = 3,24), epigastralgia (P = 0,001; OR = 2,41) y flatulencias (P = 0,000; OR = 4,14), fueron las únicas manifestaciones características relacionadas significativamente con estas infecciones; presentándose en 15,51%, 17,11% y 24,60% de los individuos con ooquistes de coccidios intestinales y en el 5,88%, 8,56% y 9,09% de sus contrapartes no parasitados, respectivamente. Es importante señalar que ninguno de los individuos estudiados presentó inmunosupresión.

Dentro de las características de higiene personal y familiar (Tabla V), se encontraron significativamente asociadas con la coccidiosis intestinal: presentar uñas sucias (X^2 = 20,19; P = 0,000), el lavado inadecuado de las manos (X^2 = 49,61; P = 0,000), consumo de vegetales crudos (X^2 = 6,12; P = 0,014), consumo de "comida rápida" (X^2 = 5,10; P = 0,024) y andar descalzo (X^2 = 3,92; P = 0,048). Entre las variables socio-económicas (Tabla VI), sólo fue estadísticamente significativa su asociación a las coccidiosis intestinales: pertenecer a un nivel socioeconómico bajo (Graffar: IV/V) (X^2 = 7,66; P = 0,006). En relación con la cría y tenencia de

Tabla I. Prevalencia de parásitos intestinales en Urumaco, estado Falcón, Venezuela.

Taxón	N	%
Cromistas		
<i>Blastocystis</i> spp.	108	57,75
Protozoarios		
<i>Cryptosporidium</i> spp.	76	40,64
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	68	36,36
<i>Giardia intestinalis</i>	20	10,7
<i>Entamoeba coli</i>	19	10,16
<i>Cystoisospora belli</i>	13	6,95
<i>E. histolytica/dispar/moshkovskii</i>	5	2,67
<i>Chilomastix mesnili</i>	2	1,07
<i>Endolimax nana</i>	2	1,07
Helmintos		
<i>Ascaris lumbricoides</i>	4	2,14
<i>Anquilostomideos</i>	1	0,54
<i>Enterobius vermicularis</i>	1	0,54

Tabla II. Asociación entre parásitos intestinales en Urumaco, Estado Falcón, Venezuela.

Taxón**	N	%*
Biparasitados		
<i>Enterobius vermicularis</i> /Endolimax nana	1	0,69
<i>G. intestinalis</i> /Cystoisospora belli	1	0,69
<i>Blastocystis</i> spp./ <i>G. intestinalis</i>	4	2,74
<i>Blastocystis</i> spp./ <i>E. nana</i>	1	0,69
<i>Blastocystis</i> spp./ <i>Ascaris lumbricoides</i>	1	0,69
<i>Blastocystis</i> spp./ <i>Anquilostomídeos</i>	1	0,69
<i>Blastocystis</i> spp./ <i>C. cayetanensis</i>	3	2,06
<i>Blastocystis</i> spp./ <i>C. belli</i>	1	0,69
<i>Blastocystis</i> spp./ <i>Cryptosporidium</i> spp.	12	8,22
<i>Blastocystis</i> spp./ <i>E. histolytica</i> /dispar/moshkovskii	1	0,69
<i>Blastocystis</i> spp./ <i>E. coli</i>	7	4,8
<i>E. nana</i> /A. lumbricoides	1	0,69
A. lumbricoides/ <i>Cryptosporidium</i> spp.	1	0,69
<i>Cryptosporidium</i> sp./ <i>C. cayetanensis</i>	12	8,22
<i>Chilomatix mesnili</i> /C. cayetanensis	1	0,69
<i>E. coli</i> / <i>Cryptosporidium</i> spp.	1	0,69
Tripasitados		
<i>E. histolytica</i> /dispar/moshkovskii/C. cayetanensis/C. belli	1	0,69
<i>E. nana</i> /A. lumbricoides/ <i>Blastocystis</i> spp.	1	0,69
<i>Blastocystis</i> spp./C. cayetanensis/C. belli	1	0,69
<i>Blastocystis</i> spp./C. cayetanensis/ <i>Cryptosporidium</i> spp.	21	14,38
<i>Blastocystis</i> spp./ <i>G. intestinalis</i> /C. cayetanensis	1	0,69
<i>Blastocystis</i> spp./ <i>E. coli</i> / <i>Cryptosporidium</i> spp.	4	2,74
<i>Blastocystis</i> spp./ <i>G. intestinalis</i> / <i>Cryptosporidium</i> spp.	1	0,69
<i>G. intestinalis</i> /C. cayetanensis/C. belli	1	0,69
<i>G. intestinalis</i> /C. cayetanensis/ <i>Cryptosporidium</i> spp.	2	1,37
Tetraparasitados		
<i>E. coli</i> / <i>Blastocystis</i> spp./C. cayetanensis/ <i>Cryptosporidium</i> spp.	1	0,69
<i>E. coli</i> / <i>G. intestinalis</i> / <i>Blastocystis</i> spp./ <i>Cryptosporidium</i> spp.	1	0,69
<i>Blastocystis</i> spp./ <i>G. intestinalis</i> /C. cayetanensis/ <i>Cryptosporidium</i> spp.	4	2,74
<i>Blastocystis</i> spp./C. cayetanensis/ <i>Cryptosporidium</i> spp./C. belli	3	2,06
<i>Blastocystis</i> /E. histolytica/dispar/moshkovskii/C. cayetanensis/ <i>Cryptosporidium</i>	3	2,06
<i>E. coli</i> / <i>Blastocystis</i> spp./C. cayetanensis/ <i>Cryptosporidium</i> spp.	3	2,06
<i>E. coli</i> / <i>G. intestinalis</i> /C. cayetanensis/ <i>Cryptosporidium</i> spp.	1	0,69
<i>E. nana</i> / <i>Blastocystis</i> spp./C. cayetanensis/C. belli	1	0,69
Pentapasitados		
<i>Blastocystis</i> spp./ <i>G. intestinalis</i> / <i>Cryptosporidium</i> spp./C. belli/C. cayetanensis	1	0,69
Hexapasitados		
<i>Blastocystis</i> spp./C. mesnili/A. lumbricoides/C. cayetanensis/C. belli/ <i>Cryptosporidium</i>	1	0,69

*Los porcentajes se calcularon mediante la división del número de personas infectadas por un parásito/asociación en cada una de las categorías (e.g., biparasitados) entre el número total de individuos infectados (N=146).

**La significancia del índice de Fager ($I_{A,B}$) para todos los pares de especies que co-ocurrieron se da en el texto.

Tabla III. Prevalencia de coccidiosis intestinales por edad y sexo, en Urumaco, Estado Falcón, Venezuela.

Edad (años)**	Femenino*		Masculino		Total	
	N	%	N	%	N	%
0-4	5	5,26	7	7,37	12	12,63
5-9	8	8,42	4	4,21	12	12,63
10-14	4	4,21	11	11,58	15	15,79
15-19	1	1,05	4	4,21	5	5,26
20-24	9	9,47	5	5,26	14	14,74
25-29	2	2,11	2	2,11	4	4,21
30-34	1	1,05	1	1,05	2	2,11
35-39	1	1,05	1	1,05	2	2,11
40-44	3	3,16	1	1,05	4	4,21
45-49	4	4,21	5	5,26	9	9,47
50-54	4	4,21	2	2,11	6	6,32
55-59	2	2,11	0	0	2	2,11
60-64	1	1,05	1	1,05	2	2,11
65-69	1	1,05	1	1,05	2	2,11
70-74	1	1,05	1	1,05	2	2,11
75-79	1	1,05	0	0	1	1,05
80-84	0	0	1	1,05	1	1,05
Total	48	50,53	47	49,47	95	100

*Las diferencias entre sexos ($X^2=0,27$; $P=0,60$) y grupos de edades ($X^2=21,2$; $P=0,17$) no fueron estadísticamente significativas.

animales domésticos (Tabla VII), se encontraron significativamente asociadas con la coccidiosis intestinal: merodeo de animales ajenos en vivienda ($X^2=16,47$; $P=0,000$), la no sujeción de los animales ($X^2=7,18$; $P=0,008$), su alimentación con desperdicios ($X^2=6,08$; $P=0,014$), su aseo infrecuente ($X^2=3,84$; $P=0,000$) y no suministrarles antiparasitarios ($X^2=4,72$; $P=0,031$).

Los OR obtenidos por ARLM se muestran en la Tabla VIII. Como se detalla, los factores de riesgo significativamente asociados con la infección por coccidios intestinales, tal como lo sugieren sus elevados OR, fueron: presentar uñas sucias (OR=1,33), consumo de “comida rápida” (OR=2,11), andar descalzo (OR=1,16), pertenecer a nivel socioeconómico IV y V (OR=2,89), que merodeen animales ajenos en las viviendas (OR=1,01), y que anden sin amarre o realengos en peridomicilio de sus dueños (OR=2,79), la alimentación de los animales con desperdicios (OR=1,9) y sin suministro de drogas antiparasitarios (OR=3,54) (Tabla VIII).

Por otro lado, tal como se muestra en la Tabla VIII, se considera que el modelo obtenido cuenta con un buen ajuste, ya que se obtuvo un nivel significativo en la Razón de Verosimilitud, y la prueba de Hosmer-Lemeshow mostró valores no significativos.

DISCUSIÓN

En la presente investigación se delimitaron como comunidades de estudio tres sectores (Sabaz, Puesto Policial y Estadio) de Urumaco del Estado Falcón, Venezuela, cuyas características socio-demográficas son: población joven y con una tasa de natalidad alta, con un nivel socioeconómico bajo (estrato IV y V: 78,1%), típicas de países en vías de desarrollo, con infraestructura sanitaria pobre y sistemas de salud ineficientes (Becerril, 2011). Por ello, no es sorprendente la elevada prevalencia de 78,07% de parasitosis intestinal detectada en esta comunidad, basado en una simple muestra fecal. Esto coincide con estudios similares efectuados en otras regiones del país, incluyendo la región falconiana; constituyéndose en una de las principales

Tabla IV. Manifestaciones características asociadas a coccidiosis intestinales en Urumaco, estado Falcón, Venezuela

Característica	Con coccidios		Sin coccidios		X ²	P	OR (95% Intervalo de confianza)*
	N	%	N	%			
Diarrea							
Sí	13	6,95	15	8,02	0,251	3,24	-
No	82	43,85	77	41,18			
Hiporexia							
Sí	29	15,51	11	5,88	9,59	0,002**	3,24 (1,42-7,50)
No	66	32,29	81	43,32			
Pérdida de peso							
Sí	11	5,88	6	3,21	1,44	0,23	-
No	84	44,92	86	46			
Epigastralgia							
Sí	32	17,11	16	8,56	6,5	0,01**	2,41 (1,15-5,09)
No	63	33,68	76	40,64			
Cólicos							
Sí	44	23,53	32	17,11	2,57	0,11	-
No	51	27,27	60	32,08			
Malestar General							
Sí	18	9,63	10	5,35	2,39	0,12	-
No	77	41,18	82	43,85			
Distensión abdominal							
Sí	31	16,58	19	10,16	3,42	0,065	-
No	64	34,22	73	39,04			
Diarrea Acuosa							
Sí	11	5,88	4	2,14	3,31	0,07	-
No	84	44,92	88	47,06			
Flatulencias							
Sí	46	24,6	17	9,09	18,76	0,000**	4,14 (2,04-8,50)
No	49	26,2	75	40,11			
Náuseas							
Sí	16	8,56	14	7,41	0,092	0,76	-
No	79	42,25	78	41,71			
Alza térmica							
Sí	0	0	0	0	-	-	-
No	95	50,8	92	49,19			
Dolor Abdominal							
Sí	39	20,86	26	13,9	3,37	0,06	-
No	56	29,95	66	35,29			

*Sólo se incluyen los OR que resultaron estadísticamente significativos, que se calcularon en la Tabla de Contingencia.**Estadísticamente significativo.

Tabla V. Características de higiene personal y familiar y su asociación con coccidiosis intestinales en Urumaco, estado Falcón, Venezuela.

Característica	Con coccidios		Sin coccidios		Total		X ²	P
	N	%	N	%	N	%		
Geofagia								
Sí	4	100	0,0	0,0	4	2,13	1,75	0,187
No	91	49,72	92	50,27	183	97,86		
Uñas sucias								
Sí	59	68,60	27	31,39	86	45,99	20,19	0,000*
No	36	35,64	65	64,36	101	54,01		
Uñas largas								
Sí	14	60,86	9	39,13	23	12,30	1,06	0,30
No	81	49,39	83	50,60	164	87,70		
Lavado adecuado de manos								
Sí	6	10,90	49	89,09	55	29,41	49,61	0,000*
No	89	67,42	43	32,57	132	70,59		
Consumo de vegetales crudos								
Sí	78	56,11	61	43,88	139	74,33	6,12	0,014*
No	17	53,41	31	64,58	48	25,67		
Consumo de “comida rápida”								
Sí	61	58,09	44	41,90	105	56,15	5,10	0,024*
No	34	41,46	48	58,53	82	43,85		
Frecuencia de baño								
1	94	50,53	92	49,46	186	99,47	0,001	0,98
≥2	1	100	0,0	0,0	1	0,53		
Juega en piso de tierra								
Sí	37	57,81	27	42,18	64	34,22	1,91	0,17
No	58	47,15	65	52,84	123	65,78		
Anda descalzo								
Sí	40	60,60	26	39,39	66	35,30	3,92	0,048*
No	55	45,45	66	54,54	121	64,70		
Juega con mascotas								
Sí	14	45,16	17	54,83	31	16,58	0,47	0,49
No	81	51,92	75	48,07	156	83,42		
Lavado de frutas								
Agua	52	53,06	46	46,93	98	52,41	0,47	0,52
Vinagre/ Limón	43	48,31	46	51,68	89	47,59		
Consumo de agua no potable								
Sí	27	57,44	20	42,55	47	25,13	1,10	0,29
No	68	48,57	72	51,42	140	74,87		
Ebullición de agua								
Sí	4	66,66	2	33,33	6	3,21	0,62	0,43
No	91	50,27	90	49,72	181	96,79		
Disposición de excretas campo raso								
Sí	26	50	26	50	52	27,81	0,019	0,89
No	69	51,11	66	48,88	135	72,19		

*Estadísticamente significativo.

enfermedades gastrointestinales de origen infeccioso (Devera *et al.*, 2005a,b; Tutaya *et al.*, 2006; Humbria & Toyo, 2011; Pérez *et al.*, 2011; Cazorla *et al.*, 2012; Tedesco *et al.*, 2012).

Llama la atención que sin aplicarse técnicas parasitológicas de concentración, así como tampoco técnicas moleculares, ni inmunológicas y con una sola muestra de heces, en 187 individuos de todos los

grupos de edades muestreados al azar se encontró una prevalencia de 50,80% de coccidiosis intestinal en los 3 sectores estudiados. Esta cifra puede considerarse elevada, especialmente si se tiene en cuenta que eran individuos aparentemente inmunocompetentes, y se compara con estudios similares realizados en Latinoamérica, incluyendo Argentina (1,3%) (Salomón *et al.*, 2007); Perú (5,4-8,9%) (Huiza *et al.*, 2004; Chinchá *et al.*, 2009); Guatemala (7,14-13,7%)

Tabla VI. Características socio-económicas y su asociación con coccidiosis intestinales en Urumaco, estado Falcón, Venezuela.

Característica	Con coccidios		Sin coccidios		Total		X ²	P
	N	%	N	%	N	%		
Piso								
Cemento/Cerámica	93	50,54	91	49,45	184	98,39	1,1	0,58
Tierra	2	66,66	1	33,33	3	1,6		
Suministro de Agua								
Tubería	0	0	0	0	0	0	0,001	0,98
Cisterna	95	50,8	92	48,93	187	100		
Almacenamiento de Agua								
Tanque	45	45	55	55	100	53,47	2,89	0,09
Pipa	50	57,47	37	42,52	87	46,52		
Mayor uso de agua								
Comida	0	0	2	100	2	1,07	0,37	0,54
Aseo personal y ropa	95	51,35	90	48,65	185	98,93		
Recolección de basura								
Pipa Sin tapa/bolsas	92	50,82	89	49,17	181	96,79	0,002	0,97
Pipa con tapa	3	50	3	50	6	3,21		
Eliminación de basura								
Aseo Urbano	58	51,32	55	48,67	113	60,43	0,032	0,86
Incineración/ Exteriores	37	50	37	50	74	39,57		
Sitio para dormir								
Cama	67	54,03	57	45,97	124	66,31	1,53	0,22
Hamaca	28	44,44	35	55,55	63	33,69		
Conocimiento de parasitosis								
Sí	16	51,61	15	48,39	31	16,58	0,01	0,92
No	79	50,64	77	49,36	156	83,42		
Personas/ cama								
1	63	55,26	51	44,73	114	60,96	2,32	0,13
≥2	32	43,84	41	56,16	73	39,04		
Nivel socioeconómico								
I, II, III	13	31,7	28	68,29	41	21,93	7,66	0,006*
IV, V	82	56,16	64	43,84	146	78,07		

*Estadísticamente significativo.

Tabla VII. Tenencia y cría de animales domésticos y su asociación con coccidiosis intestinales en Urumaco, estado Falcón, Venezuela.

Característica	Con coccidios		Sin coccidios		TOTAL		X ²	P
	N	%	N	%	N	%		
Tenencia**								
Sí	59	50,42	58	49,57	117	62,57	0,02	0,9
No	36	51,42	34	48,57	70	37,43		
Merodean animales ajenos vivienda								
Sí	84	59,15	58	40,84	142	75,94	16,47	0,000*
No	11	24,44	34	75,55	45	24,06		
Amarre+								
Sí	21	37,5	35	62,5	56	47,86	7,18	0,008*
No	38	62,3	23	37,7	61	52,14		
Visitan sus animales otros animales+								
Sí	36	58,06	26	41,93	62	52,99	3,07	0,081
No	23	41,81	32	58,18	55	47		
Alimentación con desperdicios+								
Sí	47	58,02	34	41,97	81	69,23	6,08	0,014*
No	12	33,33	24	66,66	36	30,77		
Lavado de bebedero/comedero+								
Sí	38	51,35	36	48,64	74	63,25	0,07	0,79
No	21	48,83	22	51,16	43	36,75		
Lavado de comedero/ bebedero con jabón+								
Sí	8	61,54	5	38,46	13	11,11	0,72	0,4
No	51	49,04	53	50,96	104	88,89		
Aseo frecuente+								
Sí	27	42,18	37	57,81	64	54,7		
No	32	60,37	21	39,62	53	45,3	3,84	0,051*
Higiene de área de permanencia+								
Sí	30	54,54	25	45,45	55	47	0,7	0,4
No	29	46,77	33	53,22	62	53		
Utiliza jabón para el lavado del área+								
Sí	8	61,54	5	38,46	13	11,11	0,72	0,4
No	51	49,04	53	50,96	104	88,89		
Control con el veterinario+								
Sí	4	57,14	3	42,85	7	5,98	0,13	0,71
No	55	50	55	50	110	94,01		
Suministro antiparasitario+								
Sí	7	87,5	1	12,5	8	6,83		
No	52	47,7	57	52,29	109	93,16	4,72	0,031*
Lugar de defecación+								
Intradomicilio	1	33,33	2	66,66	3	2,56	0,36	0,55
Peridomicilio	58	50,87	56	49,12	114	97,43		

*Estadísticamente significativo.

**Incluye aves, caprinos, caninos, equinos y/o felinos domésticos. +El X² se calculó con base a 117 personas que poseen animales.

(Vela, 2000) y México (9,8%) (Miller *et al.*, 1994). De manera similar ocurre cuando se hace comparaciones con otras regiones de Venezuela: DF (8%) (Chacón *et al.*, 2009), estados Carabobo (0,8%) (Barrios *et al.*, 2004), Bolívar (10,9%-13,1%) (Devera *et al.*, 2005a; 2010; Tutaya *et al.*, 2006), Zulia (11,8-13%) (Chacín-Bonilla *et al.*, 2008; Freitas *et al.*, 2009), y dentro del mismo estado Falcón (26,11- 28,6%) (Humbria & Toyo, 2011; Cazorla *et al.*, 2012).

Además de haber sido el parásito intestinal mayormente detectado, el monoparasitismo debido a *Blastocystis* spp. también fue el de mayor prevalencia. Asimismo, este taxón cromista se presentó en elevada frecuencia en asociación con hasta 6 taxones de parásitos intestinales. El poliparasitismo posee mayor impacto sobre las comunidades de hospedadores que el monoparasitismo. Por otra parte, resalta el hecho que las asociaciones parasitarias, en especial de los coccidios intestinales, se presentaron de forma significativa ($t > 1,645$; $\alpha = 5\%$) con varios protozoos/cromistas, lo cual corrobora observaciones previas en la zona semiárida falconiana (Humbria & Toyo, 2011; Cazorla *et al.*, 2012). Desde un punto

de vista epidemiológico, esto aparece como una indicación de similares mecanismos de transmisión, del deterioro ambiental por fecalismo, de condiciones socio-económicas, de higiene personal y comunitaria deficientes. Esto último indicado, se ve apoyado por el hallazgo de algunas variables estudiadas como el nivel socioeconómico IV y V (OR= 2,89), no asearse las uñas (OR=1,33) y el merodeo de animales ajenos en las viviendas (OR=1,01), o que no los amarren (OR=2,79), las cuales se encontraron significativamente asociadas con la presencia de coccidios intestinales. Es particularmente destacable la asociación con las uñas sucias, lo que refuerza la idea de que la ruta fecal-oral es aún importante en la transmisión. Desde un punto de vista clínico, se debe tomar en cuenta que a semejanza de los enterococcidios, otros protozoarios/cromistas como *Blastocystis* spp. y *G. intestinalis* son importantes agentes de diarrea humana, además de otras sintomatologías gastrointestinales, por lo que se hace necesario realizar un diagnóstico parasitológico preciso; esto debido a que el esquema quimioterapéutico para ambos casos es diferente (Becerril, 2011; Botero & Restrepo, 2012; Montalvo *et al.*, 2013).

Tabla VIII. Odds Ratios (OR) obtenidos del análisis de regresión logística múltiple (ARLM) para factores de riesgo potencialmente asociados a coccidios intestinales en Urumaco, estado Falcón, Venezuela.

Variable	Coficiente	Error estándar	Estadístico Wald	VIF*	OR (95% intervalo de confianza)
Tener uñas sucias	0,29	0,35	0,68	1,01	1,33 (0,67-2,64)
Lavado inadecuado de manos**	-1,92	0,4	22,93	1,08	0,15 (0,10 – 0,32)
Consumo de vegetales crudos**	-0,32	0,39	0,66	1,01	0,73 (0,34 -1,57)
Consumo de "comida rápida"***	0,75	0,35	4,57	1,1	2,11 (1,06 - 4,20)
Andar descalzo**	0,15	0,35	0,18	1,05	1,16 (0,59- 2,31)
Nivel IV/V de Graffar**	1,06	0,42	6,43	1,07	2,89 (1,27-6,57)
Merodeo de animales ajenos en vivienda**	0,01	0,41	0	1,09	1,01 (0,45-2,23)
Animales sin amarre+	1,03	0,46	5,1	1,77	2,79 (1,15-6,82)
Alimentación de animales con desperdicios+	0,64	0,47	1,82	2,23	1,90 (0,75-4,81)
Aseo infrecuente de animales+	-1,26	0,51	6,17	1,91	0,28 (0,10- 0,77)
No desparasitación de animales+	1,26	0,84	2,26	1,03	3,54 (0,68-18,44)

*Factor de inflación de la varianza. **El ARLM se hizo con el total de 187 individuos muestreados (Razón de verosimilitud: $-2LL = 215,48$, $X^2 = 43,62$, $P < 0,001$; prueba de Hosmer-Lemeshow: $X^2 = 11,412$, $P = 0,234$). +El ARLM se realizó con los 117 individuos que poseen animales domésticos (Razón de verosimilitud: $-2LL = 244,98$; $X^2 = 14,12$; $P = 0,007$; prueba de Hosmer-Lemeshow: $X^2 = 1,029$; $P = 0,994$).

La prevalencia de criptosporidiosis detectada en habitantes de Urumaco, tanto en individuos asintomáticos como sintomáticos, fue de 40,64%, siendo la enteroparasitosis más prevalente después de las infecciones debidas al taxón cromista *Blastocystis* spp., y la primera entre las especies de coccidios. Esta cifra se puede considerar elevada, si se compara con las observadas en otras regiones de Venezuela, incluyendo los estados Bolívar (0,6-10,9%) (Devera *et al.*, 2005a; 2007; Tutaya *et al.*, 2006; Devera *et al.*, 2010), Zulia (11,8-13%) (Chacín-Bonilla *et al.*, 2008; Freitas *et al.*, 2009), Carabobo 0,8% (Barrios *et al.*, 2004), Trujillo (28%) (Pérez *et al.*, 2011), o dentro del semiárido rural del estado Falcón 17,83-20% (Humbria & Toyo, 2011; Cazorla *et al.*, 2012). El hecho de que sus ooquistes son infectivos una vez que se excretan, posean un componente zoonótico y sean altamente resistentes a los tratamientos químicos comúnmente utilizados (*e.g.*, cloro), hace de este entero-coccidio de una alta transmisibilidad (Compañ-Barco *et al.*, 1991; Fayer, 2004; Becerril, 2011; Botero & Restrepo, 2012). La manifestación clínica más relevante es la diarrea aguda secretora que puede ser modificada por el estado inmunológico del hospedador, se autolimita en pacientes inmunocompetentes y puede evolucionar a choque hipovolémico y muerte en pacientes con inmunosupresión (Becerril, 2011; Botero & Restrepo, 2012).

La infección por *C. cayetanensis* se presentó en el 36,6% de las personas muestreadas. Esta tasa de ciclosporiasis es más elevada que la observada en otras partes de Venezuela, incluyendo el estado Falcón (Devera *et al.*, 2005a; 2007; Tutaya *et al.*, 2006; Devera *et al.*, 2010; Humbria & Toyo, 2011; Cazorla *et al.*, 2012). Es un protozoo coccidio muy prevalente en las zonas tropicales, pudiendo ocasionar diarrea acuosa y explosiva en pacientes inmunocompetentes; y en los inmunocomprometidos en especial los de VIH/SIDA, les produce diarrea crónica (Becerril, 2011; Botero & Restrepo, 2012)

Dentro de los coccidios, la prevalencia de *C. belli* fue la más baja detectada (6,95%), pero similar o más elevada a las de otros protozoos/comensalistas y geohelminthos intestinales observados en Urumaco. Esta cifra es similar o mayor a la encontrada en otras regiones de Venezuela (*e.g.*, estado Bolívar: 0-0,6%) (Devera *et al.*, 2005a; 2007; Tutaya *et al.*, 2006; Devera *et al.*, 2010), o en otras zonas del semiárido

rural de Falcón (1,91%: Cazorla *et al.*, 2012; 6,8%: Humbria & Toyo, 2011). Es relevante indicar que en pacientes VIH/SIDA se han encontrado guarismos de hasta 24,4% (Certad *et al.*, 2003; Rivero-Rodríguez *et al.*, 2013).

Tal como se detectó en otras poblaciones del semiárido falconiano (Humbria & Toyo, 2011; Cazorla *et al.*, 2012), en Urumaco no se encontró una relación estadísticamente significativa entre la prevalencia de las entero-coccidiosis y la edad y el sexo, lo que sugiere que independientemente de ambos parámetros todos los individuos se encuentran expuestos de una manera similar a los factores de riesgo; pudiendo tener mayor relevancia otras características como las prácticas de higiene individual, familiar o comunitarias, o las de tipo socio-económico.

El análisis estadístico de las manifestaciones clínicas, arrojó que solamente la hiporexia (OR=3,24), flatulencias (OR=2,41) y epigastralgia (OR=4,14) se encontraron significativamente asociadas a la presencia de los entero-coccidios, tal como los resultados obtenidos en otra investigación similar en la zona semiárida falconiana (Cazorla *et al.*, 2012). La epigastralgia se puede explicar por las alteraciones tanto histológicas (atrofia, hiperplasia de criptas, pérdida de epitelio) y fisiológicas (disminución de enzimas, nutrientes, electrolitos) que generan estos protozoos apicomplejos en las vellosidades intestinales, lo que induce la liberación de los mediadores pro-inflamatorios (*e.g.*, interleuquinas, quimiocinas, prostaglandinas) con el subsecuente dolor visceral; estas mismas sustancias propias de la inflamación (*e.g.*, prostaglandinas, interleuquinas) pueden ejercer efectos sistémicos (sistema nervioso, músculo esquelético) llevando a la hiporexia (Fayer, 2004; Becerril, 2011; Thomas, 2011). A diferencia de un trabajo previo en otra población del semiárido rural falconiano (Cazorla *et al.*, 2012), en el muestreo de Urumaco la diarrea no se encontró significativamente asociada a la presencia de los entero-coccidios, resultando sólo 13 (6,95%) individuos infectados con la afección. Esto se podría explicar por el hecho de que la coccidiosis intestinal cursa en muchos casos de forma asintomática en pacientes inmunocompetentes (portadores asintomáticos), quienes pueden desarrollar resistencia a la infección si se exponen de manera repetida al parásito; sin embargo, estos individuos poseen una importancia epidemiológica,

ya que al excretar los ooquistes mantienen los ciclos de la infección sin ser detectados; situación que se agrava cuando existe un componente zoonótico (e.g., *Cryptosporidium* spp.), y pudiendo ser fuente de infección de múltiples especies de hospedadores (Becerril, 2011).

El consumo de “comida rápida” (“fast food”) fuera del núcleo familiar en >50% de los casos, resultó ser otro potencial factor de riesgo significativamente asociado con la infección por coccidios intestinales para los habitantes de Urumaco (OR=2,11). Esto debe alertar a las autoridades sanitarias, especialmente si se toma en cuenta que en un estudio hecho en muestras de vegetales utilizadas en la preparación de este tipo de comidas (e.g., “perros calientes”, hamburguesas) en el semiárido urbano falconiano, se detectó ooquistes de *Cryptosporidium* spp., *C. cayetanensis* y/o *C. belli*, además de otras taxa de enteroparásitos, en casi el 80% de los casos. Más preocupante aún fue que los propietarios de los locales comerciales indicaron que en su mayoría cumplían con las normas sanitarias, lavando con vinagre/limón y usando guantes, los vegetales, los cuales mantenían en refrigeración (Cazorla *et al.*, 2013). Por otra parte, se debe tomar en cuenta que a la región falconiana permanentemente asisten numerosos turistas que consumen asiduamente “comidas rápidas”, por lo que se corre el riesgo potencial de adquirir infecciones enteroparasitarias, como, entre otras, la “diarrea del viajero” (Cazorla *et al.*, 2013).

Se debe resaltar el hecho de que el merodeo de animales domésticos ajenos (aves, caprinos, caninos, equinos y/o felinos) en las viviendas (OR= 1,01), permanecer sin amarre en los peridomicilios de sus dueños (OR= 2,79), la alimentación con desperdicios (OR= 1,9) y sin suministro de drogas antiparasitarias (OR= 3,54), aparecen como factores potencialmente importantes en la dinámica de transmisión y mantenimiento endémico de los enterococcidios en Urumaco. Similares perfiles se detectaron en otra pequeña comunidad del semiárido rural falconiano (Cazorla *et al.*, 2012). Dado el comportamiento zoonótico por ejemplo de la criptosporidiosis, se corre el riesgo de contaminación fecal si no se controlan estas parasitosis en los animales con la desinfección de locales y establos, sin permitir la convivencia de especies susceptibles y animales de diversas edades, y suministro de vacunaciones, desparasitaciones y alimentación adecuada (Compañ-Barco *et al.*, 1991;

Fayer, 2004; Becerril, 2011; Botero & Restrepo, 2012).

En virtud de la problemática expuesta, se recomienda incluir el método diagnóstico de Kinyoun en los laboratorios de la red sanitaria pública nacional; difundir cursos de actualización orientados a dar a conocer todo lo relacionado sobre las coccidiosis intestinales (e.g., generalidades, diagnóstico y tratamiento), especialmente en el gremio médico que labora en el área rural; y para futuros estudios, incorporar técnicas inmunológicas y moleculares para determinar con mayor exactitud las fuentes de contaminación y el potencial zoonótico de las enterococcidiosis, y sus patrones eco-epidemiológicos en general. Esto dará las bases para implementar programas de vigilancia epidemiológica eficientes, incluyendo la promoción de salud y prevención, contra estas infecciones enteroparasitarias.

Conflicto de intereses: Ninguno.

AGRADECIMIENTOS

A los habitantes y Consejos Comunales de Urumaco; Oficinas regionales de Malariología y SILOS-Coro por donación de medicamentos antiparasitarios.

REFERENCIAS

- Acosta M., Cazorla D. & Garvett M. (2002). Enterobiasis en escolares de una población rural del Estado Falcón, Venezuela y su relación con el nivel socio-económico. *Invest. Clín.* **43**: 173-181.
- Barrios E., Delgado V., Araque W., Chiang M., Martínez L., Materán G., López Y. & Peralta J. (2004). *Cryptosporidium*: diagnóstico y prevalencia en niños sanos del estado Carabobo, Venezuela. *Salus*. **8**: 45-52.
- Becerril M. (2011). *Parasitología Médica*. 3a edición. Editorial Mc Graw Hill: D.F., México.
- Botero D. & Restrepo M. (2012). *Parasitosis humanas*. 5a edición. Corporación para Investigaciones Biológicas: Medellín, Colombia.
- Cazorla D., Acosta M., Acosta M. & Morales P. (2012). Estudio clínico-epidemiológico de

- coccidiosis intestinales en una población rural de región semiárida del estado Falcón, Venezuela. *Invest. Clín.* **53**: 273-288.
- Cazorla D., Morales, P. & Chirinos P. (2013). Evaluación parasitológica de cuatro especies de vegetales utilizados en establecimientos de "comida rápida" en Coro, Falcón, Venezuela. *Rev. Venez. Cienc. Tecnol. Aliment.* **4**: 032-046.
- Certad G., Arenas-Pinto A., Pocaterra L., Ferrara G., Castro J., Bello A. & Núñez L. (2003). Isosporiasis in Venezuelan adults infected with human immunodeficiency virus clinical characterization. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **69**: 217-222.
- Chacín-Bonilla L., Mejía M. & Estévez J. (2003). Prevalence and pathogenic role of *Cyclospora cayetanensis* in a Venezuelan community. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **68**: 304-306.
- Chacín-Bonilla L., Barrios F. & Sánchez Y. (2008). Environmental risk factors for *Cryptosporidium* infection in an island from Western Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **103**: 45-49.
- Chacón N., Salinas R., Kuo E., Durán C., Márquez W. & Contreras R. (2009). Ocurrencia de *Isospora belli*, *Cryptosporidium* spp. y *Cyclospora cayetanensis* en pacientes urbanos evaluados por síntomas gastrointestinales con o sin inmunosupresión. *Rev. Fac. Med.* **32**: 124-131.
- Chincha O., Bernabé-Ortiz A., Samalvides F., Soto L., Gotuzzo E. & Terashima A. (2009). Infecciones parasitarias intestinales y factores asociados a la infección por coccidias en pacientes adultos de un hospital público de Lima, Perú. *Rev. Chil. Infect.* **26**: 440-444.
- Compañ-Barco M., Llopis-González A. & Morales M. (1991). Consideraciones epidemiológicas sobre criptosporidiosis. *Rev. San. Hig. Púb.* **65**: 363-370.
- Devera R., Blanco Y. & Cabello E. (2005a). Elevada prevalencia de *Cyclospora cayetanensis* en indígenas del estado Bolívar, Venezuela. *Cad. Saúde Pública.* **21**: 1778-1784.
- Devera R., Finali M., Franceschi G., Gil S. & Quintero O. (2005b). Elevada prevalencia de parasitosis intestinales en indígenas del Estado Delta Amacuro, Venezuela. *Rev. Biomed.* **16**: 289-291.
- Devera R., Ortega N. & Suárez M. (2007). Parásitos intestinales en la población del Instituto Nacional del Menor, Ciudad Bolívar, Venezuela. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **27**: 349-363.
- Devera R., Blanco Y., Certad I., Figueras L. & Femayor A. (2010). Prevalence of intestinal coccidian in preschool children from San Felix City, Venezuela. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **30**: 61-64.
- Fayer, R. (2004). *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet. Parasitol.* **126**: 37-56.
- Thomas, D. (2011). Use of orexigenic medications in geriatric patients. *Am. J. Geriatr. Pharmacother.* **9**: 97-108.
- Freites A., Colmenares D., Pérez M., García M. & Suárez O. (2009). Infección por *Cryptosporidium* sp. y otros parásitos intestinales en manipuladores de alimentos del estado Zulia, Venezuela. *Invest. Clín.* **50**: 13-21.
- Huiza A., Espinoza Y., Rojas R., Sevilla C, Pilar A., Verástegui R., Quispe E., Romualdo G., Ángeles Z., Candiotti J. & Huapaya P. (2004). Detección de coccidios en niños asintomáticos mediante esporulación de muestras fecales. *An. Fac. Med. Lima.* **65**: 239-242.
- Humbria L. & Toyo M. (2011). *Estudio clínico-epidemiológico de parasitosis intestinal en niños y adolescentes de una comunidad rural del estado Falcón, Venezuela. Trabajo de Ascenso.* Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda Coro, estado Falcón, Venezuela.
- Méndez- Castellano H., López M., Landaeta M. & González A. (1986). Estudio transversal de Caracas. *Arch. Venez. Puericult. Pediatr.* **49**: 111-115.
- Miller K., Durán-Pinales C., Cruz-López A., Morales-Lechuga L., Taren D. & Enríquez F. (1994).

- Cryptosporidium parvum* in children with diarrhea in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**: 322-325.
- Montalvo R., Ticona E., Ñavincopa M., García Y., Chávez G., Chávez V., Arévalo J., Soria J. & Huiza A. (2013). Diarrea recurrente por *Cystoisopora belli* en pacientes con infección por VIH con TARGA. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública.* **30**: 326-330.
- Pérez M., Durán I., Gil M. & Pineda A. (2011). *Cryptosporidium* sp. en pacientes que acuden al ambulatorio Monay, y Hospital IVSS e IPASME Trujillo. *ACADEMIA.* **10**: 5-11.
- Rivero-Rodríguez Z., Hernández A., Bracho A., Salazar S. & Villalobos R. (2013). Prevalencia de microsporidios intestinales y otros enteroparásitos en pacientes con VIH positivo de Maracaibo, Venezuela. *Biomédica.* **33**: 538-545.
- Salomón M., Tonelli R., Borremans C., Bertello D., De Jong L., Jofré C., Enríquez V., Carrizo L. & Costamagna S. (2007). Prevalencia de parásitos intestinales en niños de la ciudad de Mendoza, Argentina. *Parasitol. Latinoam.* **62**: 49-53.
- Tedesco R., Camacaro Y., Morales G., Amaya I., Blanco Y. & Devera R. (2012). Parásitos intestinales en niños de hogares de cuidado diario comunitarios de Ciudad Bolívar, Estado Bolívar, Venezuela. *Saber.* **24**: 142-150.
- Tutaya R., Blanco Y., Sandoval M., Alcalá F., Aponte M. & Devera R. (2006). Coccidiosis intestinal en habitantes del barrio 6 de noviembre, Ciudad Bolívar, Estado Bolívar, Venezuela. *Rev. Biomed.* **17**: 152-154.
- Vela C. (2000). *Prevalencia y manifestaciones clínicas de coccidios intestinales en pacientes con VIH/SIDA*. Trabajo de Grado. Universidad Francisco Marroquín, Guatemala.

Recibido el 26/05/2014
Aceptado el 06/09/2014

***Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda, Achatinidae) carrier of Helminthes, Protozoa and Bacteria in northeast Venezuela**

***Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda, Achatinidae) hospedador de helmintos, protozoarios y bacterias en el noreste de Venezuela**

Antonio Morocoima¹, Valmore Rodríguez², René Rivas³, Héctor Coriano¹, Sigdelis Rivero¹, Rosina Errante¹, Makeris Mitchell¹, Leidi Herrera⁴ & Servio Urdaneta-Morales^{4*}

Dedicated to Dr. Rafael Martínez Escarbassiere for his pioneering research on Achatina fulica in America.

RESUMEN

Por cuanto el molusco *Achatina fulica* nativo del África es vector de helmintos, pero su relación con protozoarios y bacterias es poco conocida, decidimos estudiar las excretas de 1.200 ejemplares capturados en los estados Anzoátegui, Monagas, Sucre y Nueva Esparta, del noreste de Venezuela. Su moco pedal y heces mostraron infección por los protozoarios *Chilomastix* spp., *Trichomonas* spp., *Giardia* spp., *Balantidium* spp., *Entamoeba* spp., *Iodamoeba* spp., *Blastocystis* spp. Y por los helmintos de los grupos Ascarioidea, Trichuroidea, Ancylostomatidae y Cestoda. El moco céfalopodal mostró únicamente larvas de Rhabditida. Las bacterias *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. azaenae*, *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* spp. infectaron a las tres excretas. Los mecanismos de transmisión y la composición de las excretas, como nichos fisiológicamente apropiados para los organismos encontrados, son discutidos en relación con el riesgo epidemiológico que el molusco representa en salud pública y veterinaria.

Palabras clave: *Achatina fulica*, carrier, helmintos, protozoarios, bacterias, Venezuela.

SUMMARY

The mollusk *Achatina fulica*, native to Eastern Equatorial Africa, has been incriminated as a carrier or vector of helminthes. Nevertheless, information in the literature as regards its status as a carrier for bacteria is scarce, and we could find no reference at all for its relation to protozoa. We studied microscopically the excreta from 1200 snails captured in Anzoátegui, Monagas, Sucre and Nueva Esparta states, in northeast Venezuela. The pedal mucus and feces were infected by the protozoa *Chilomastix* spp., *Trichomonas* spp., *Giardia* spp., *Balantidium* spp., *Entamoeba* spp., *Iodamoeba* spp., *Blastocystis* spp., as well as helminthes of Ascarioidea, Trichuroidea, Ancylostomatidae and Cestoda groups. The only helminthes found in the cephalopodal mucus were Rhabditida larvae. The three excreta were also infected by the bacteria: *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. azaenae*, *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* spp. Risk of infection and transmission mechanisms as well as the composition of the excreta as appropriate physiological niches for the organisms mentioned, are discussed with regard to the epidemiological importance of this snail for in human and veterinary health.

Key words: *Achatina fulica* carrier, helminthes, protozoa, bacteria, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

Achatina fulica (the Giant African snail, called in Venezuela "caracol africano") is an arboreal and terrestrial mollusk that frequently invades the vegetated shores of tropical and subtropical water

bodies. The snails were introduced from Eastern Equatorial Africa by humans and are currently found in Asia (India, China, Japan, Philippines), the Pacific, Madagascar, Indonesia, Australia, the Caribbean Basin, the United States and South America (Colombia, Venezuela, Ecuador, Brazil,

¹ Eastern Center for Tropical Medicine, School of Health Sciences, Eastern University, Anzoátegui state, Venezuela. School of Health Sciences, Eastern University, Anzoátegui state, Venezuela.

² Microlab Laboratory, Lecheria, Anzoátegui state, Venezuela

³ Regional Coordination of Epidemiological Monitoring, Monagas state, Venezuela

⁴ Laboratory for the Biology of Vectors and Parasites, Tropical Zoology and Ecology Institute, Faculty of Sciences, Central University of Venezuela, Caracas, Venezuela

*Autor de correspondencia: tropism2006@yahoo.es

Argentina) (Martínez Escarbassiere & Martínez, 1997; Correoso, 2006; USDA, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2011).

Achatina fulica snails are polyphagous (herbivores, carnivores, necrophages), and along with organic detritus, their preferred food list to date consists of over 500 known plant species, ranging from coffee and bananas in the tropics to potatoes and tobacco in more temperate zones. The snails are voracious eaters and competitors of native snails as well as habitat modifiers. Their importance in agricultural systems gardens and as agents for the reduction of biological diversity is increasing at an alarming rate making them one of the 100 most important pests worldwide (USDA, 2007; Zanol *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2012).

Furthermore, this species is an intermediate host for nematode pathogens such as *Angiostrongylus cantonensis*, the causal agent of zoonotic meningoencephalitis and *A. costaricensis*, which produces abdominal ileocolitis. They are thus also considered to represent a potential zoonotic risk and a possible danger to public health (Martínez Escarbassiere & Martínez, 1997; Teles *et al.*, 1997).

Achatina fulica, like all Achatinidae, needs calcium for the formation of its shell and for reproduction. It thus prefers environments rich in calcium carbonate, such as limestone landscapes with a pH of 7.0-8.0 and urban areas with abundant cement or concrete. Snails are active in the early morning, late afternoon, on cloudy, damp, or rainy days and avoid direct sunlight (USDA, 2007).

The muci of the Mollusca are produced by several glands that secrete the mucus through pores that pass between the epidermal cells. Pedal mucus is a gel produced when the foot gland of the snail, which can detect vibrations, is stimulated mechanically or chemically. This gel acts as a lubricant that permits the snails to slide over the surface of terrestrial or aquatic habitats by reducing friction between the foot (sole) and the ground (the slime trail). It also has strong adhesive properties that enable the snails to crawl up vertical surfaces such as walls and roofs without falling off. Furthermore, the mucus acts as a means by which information regarding locomotion direction, osmoregulation and the reparation of skin

lesions can be conveyed as well as the type of food travelled over and the snail's sexual state (Skingsley *et al.*, 2000).

It is frequently difficult to differentiate where the head of the snail ends and the foot begins, so they are collectively called head-foot or cephalopodium which is a typical morphological character of all gastropods (Nordsieck, 2011). If the snail is disturbed continuously or even violently it discharges a clear foamy mucus by the synchronised contraction of the cephalopodal gland, located in the upper lateral region of the cephalopodium. This mucus is composed of acidic, neutral and sulphated mucins which behave as chemical barriers and form part of the defense mechanisms of the innate immunological system of the snails (Skingsley *et al.*, 2000; Pinchuck & Hodgson, 2009, 2012).

Achatina fulica was captured for the first time in Venezuela in Caracas, the capital city, and subsequently in the states of Miranda, Lara, Portuguesa, Carabobo, Aragua, Nueva Esparta (Margarita Island), Sucre, Monagas and the Delta Amacuro and most recently in Zulia, Anzoátegui and Yaracuy states. The snails have been found in diverse habitats; from forests to mountains and in both rural and strictly urban areas (Martínez Escarbassiere & Martínez, 1997; Martínez Escarbassiere *et al.*, 2008; Oletta & Carvajal, 2011). In Venezuela *A. fulica* has been found infected with *Schistosoma mansoni*, *Strongyloides* spp., *Trichuris* spp. and *Hymenolepis* spp. (Liboria *et al.*, 2010); the first case of human infection by *A. costaricensis* was reported by Incani *et al.* (2007).

To our knowledge, despite the extensive geographical distribution and the importance of *A. fulica* as a carrier or vector of helminthes, studies regarding its status for bacteria are scarce and infrequent, and as far as we know there are none incriminating it as a carrier for protozoa (Utomo *et al.*, 1991; Cardoso *et al.*, 2012). This, coupled with the explosive dispersion of dense populations of the snails in Venezuela, prompted this investigation. We chose the northeast of Venezuela as our study area due to the lack of investigations undertaken in this region, despite continuous complaints of the snails' presence made to the Eastern Center for Tropical Medicine, Eastern University, (Anzoátegui state) by the local inhabitants.

MATERIAL AND METHODS

Capture, maintenance, identification and parasitological and microbiological analyses of the snails

Snails were captured in the afore mentioned habitats in the evening (USDA, 2007) from urban areas in Anzoátegui, Monagas, Sucre and Nueva Esparta (Margarita Island) states during the months of June to August 2011 inclusive. Adult snails (average length 18 cm, able to copulate and oviposit) were collected by hand from plants, fruits and vegetables in small farms and residential gardens, as well as on walls outside human dwellings and pavements (Fig. 1 A/F). Latex gloves and safety glasses were worn at all times to prevent any risk from infection.

After collection, snails were placed in plastic bags, labeled according to date and collection site and kept in the laboratory in darkness at a

relative humidity of 70%, and temperature 24-26°C. They were fed with lettuce leaves (*Lactuca sativa*) *ad libitum* (Liboria *et al.*, 2010) thoroughly washed with sterile saline solution and vinegar. Species were identified according to Martínez Escarbassiere & Martínez (1997).

For the parasitological study, three hundred snails were collected from each of the four states mentioned (n=1200). They were separated into groups of 150 mollusks each from two municipalities per state and placed in plastic containers 60 x 40 x 20 cm, divided internally into five compartments with stiff plastic sheets and covered with perforated lids so that the snails could breathe easily (Fig. 2A, B). Each container was labeled according to the collection site of the snails placed in it. Snails were washed with sterile saline solution before placing them individually in each of the five compartments and the different types of mucus were obtained sequentially using a sterile pipette, as follows: pedal mucus (3

Fig. 1. *Achatina fulica*. A) Specimens undergoing intercourse; B) eggs inside the snail observed after dissection (400 X); C) eggs extracted by dissection (400 X); D) specimens attached to a plantain plant (*Musa paradisiaca*) in a garden; E) snails and excreted feces attached to a taro leaf (*Xanthosoma sagittifolium*); F) individuals attached to wall of a house.

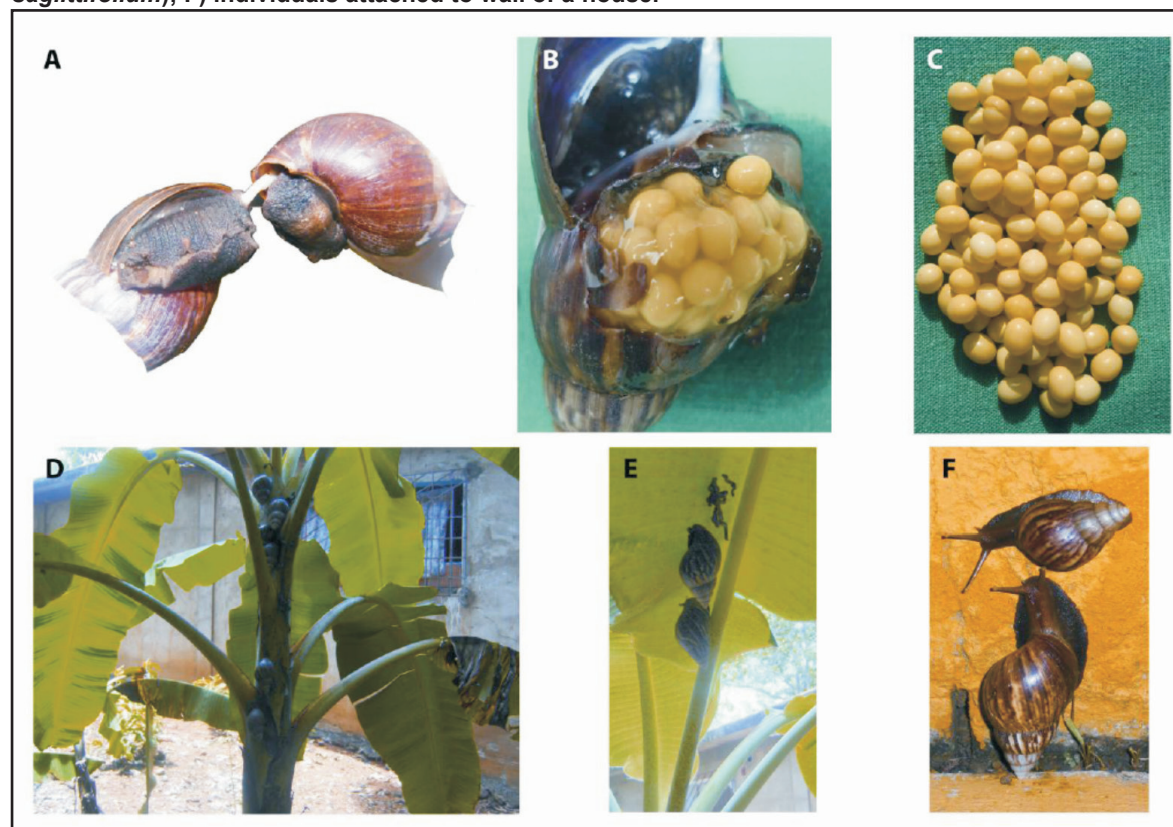
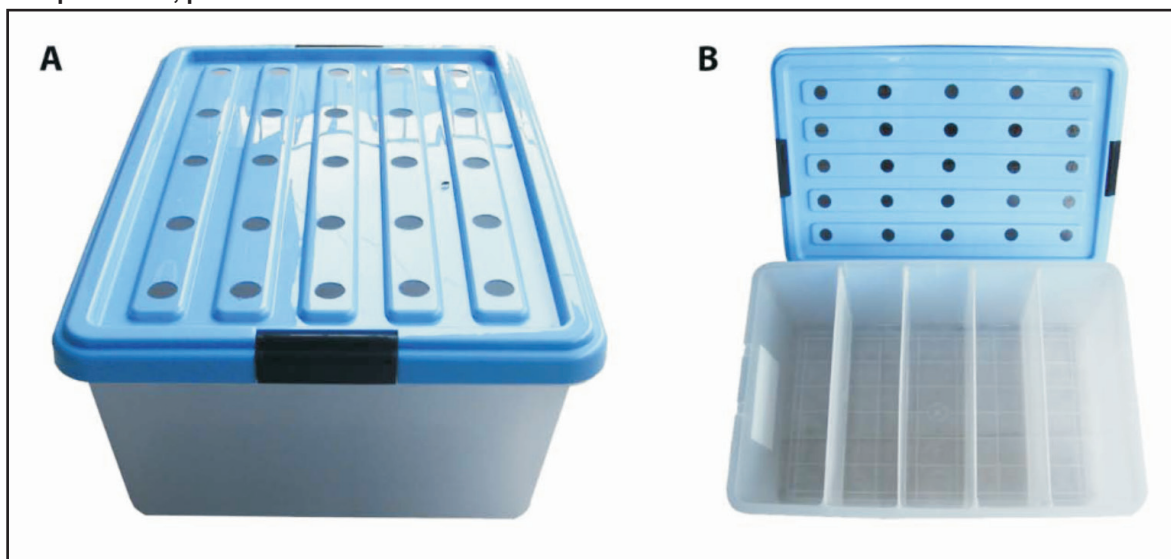


Fig. 2. A) container used for maintaining the snails in the laboratory; B) container divided into five compartments, perforated lid to allow the snails to breathe.



ml average) by lightly rubbing the snails feet with a small, sterile applicator stick; cephalopodal mucus (5 ml average) expressed by manual compression on the cephalopodal gland and finally the feces (50 mg average). In order to avoid fecal contamination, feces released during the collection of the other excreta were immediately recovered and both the compartment and the snail were thoroughly washed before continuing with their extraction. Samples of the three excreta were taken with small sterile applicator sticks and prepared as wet mounts by mixing them with drops of sterile isotonic solution. They were examined immediately for protozoa (trophozoites or cysts) and helminthes (eggs, larvae or adults). The material was also stained using Lugol's solution in order to confirm the identification of cysts and eggs. The presence of coccidians was determined from samples stained with Kinyoun's solution. Fecal samples were prepared according to the Kato-Katz method for qualitative diagnosis. All preparations were sufficiently thin so as to be spread smoothly and evenly under the cover glass (75 x 37 mm) (Spencer & Monroe, 1961). Preparations were examined immediately with an Olympus CH20 microscope (400X; 1,000X magnification) and micrographs were taken using a digital camera (Nikon Coolpix P550, resolution 16.1 megapixels) attached to the microscope.

The presence and identification of the bacteria observed in the three types of excreta taken

from ten snails captured from each of the four states surveyed ($n = 40$), was done using Gram coloration and by inoculation in gelatin agar Thiosulfate-Citrate-Bile- Sucrose (TCBS), Xylose-lysine-desoxycholate (XLD) agar, Salmonella-Shigella (S-S) agar, MacConkey agar and MacConkey broth (incubated at 35°C/24hs, under facultative aerobic conditions); blood agar and chocolate agar (incubated at 35°C/24hs under microaerophilic conditions); Preston agar and chrome agar (incubated at 35°C/48hs under microaerophilic conditions).

Ethics Considerations

All experiments involving animals were conducted according to the current Bioethical Laws as laid down by the Venezuelan Science and Technology Ministry, and were approved by the Ethics Committee and the Committee for Animal Care of the National Fund for Science and Technology (FONACIT, Caracas, Venezuela).

RESULTS

Results of the parasitological analyses of the mollusks

All three excreta types in every one of the 1,200 *A. fulica* specimens examined were infected (Tables I, II). Both, the pedal mucus and the feces, contained protozoa and helminthes taxa of human and

Fig. 3. A) *Chilomastix* spp., trophozoite; B) *Trichomonas* spp., trophozoite; C) *Giardia* spp., cyst; D) *Balantidium* spp., trophozoite; E) *Entamoeba* spp., cyst; F) *Entamoeba* spp., trophozoite; G) *Iodamoeba* spp., cyst; H) *Blastocystis* spp., vacuolar stage (1000X; bar= 10um).

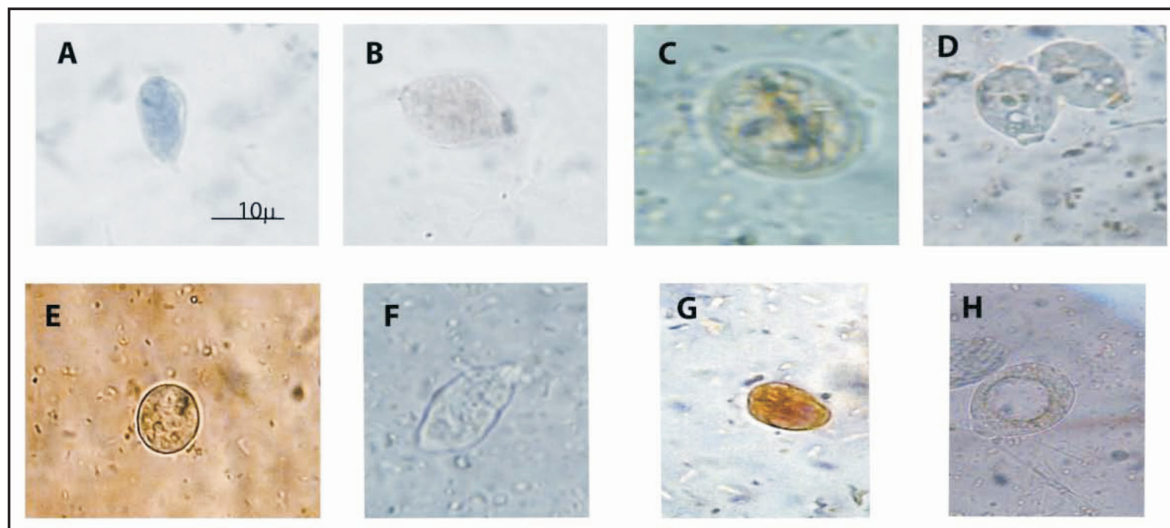


Fig. 4. Eggs of: A) Ascaridida; B) Trichuroidea; C) Ancylostomatidae; D) Toxocaridae; E) *Toxascaris* spp.; F) *Hymenolepidae* spp.; G) Rabdithida, female; H) Rabdithida, male, posterior end; I) Rabdithida male; anterior end.

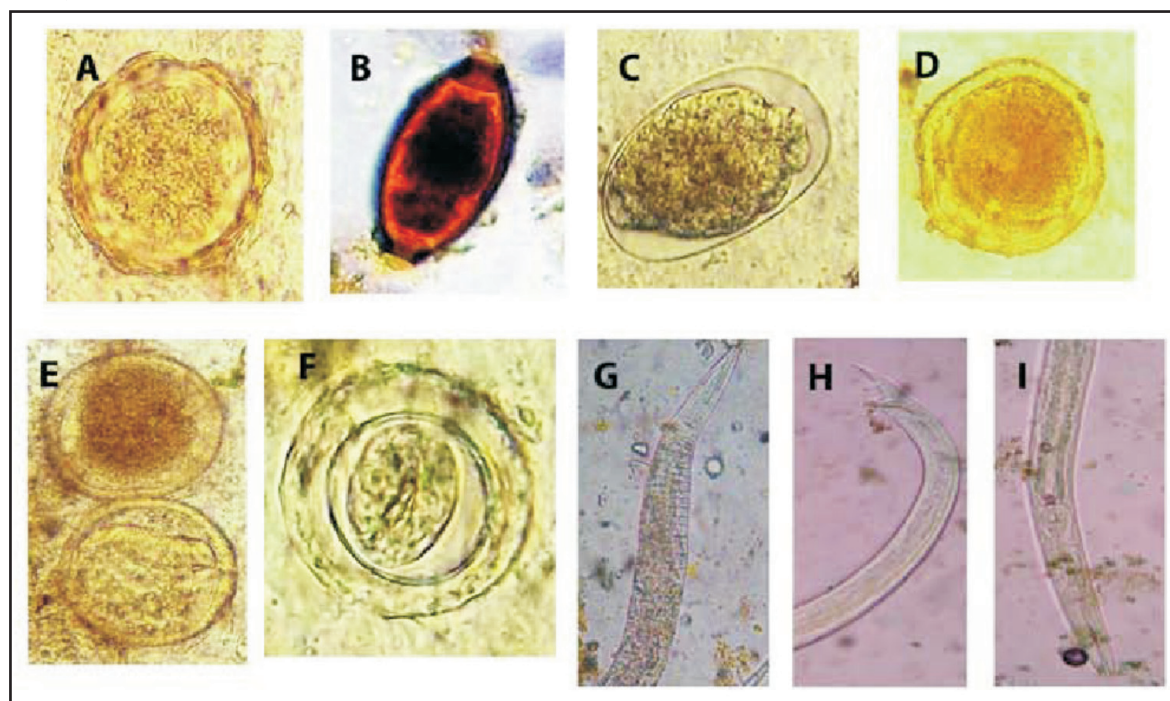


Table I. Proportion of Protozoa and Helminthes observed in the pedal mucus, and feces of *Achatina fulica* captured in Anzoátegui and Monagas states (northeast Venezuela).

Organisms	Excreta	Taxa	Anzoátegui			Monagas		
			Bolívar Municipality Examined snails / infected snails (%)	Sotillo municipality Examined snails / infected snails (%)	Total Examined snails / infected snails (%)	Bolívar Municipality Examined snails / infected snails (%)	Piar Municipality Examined snails / infected snails (%)	Total Examined snails / infected snails (%)
Protozoa	Pedal mucus	<i>Chilomastix</i> spp.	150/14 (9%)	150/13 (9%)	300/27 (9%)	150/11 (7%)	150/9 (6%)	300/20 (7%)
		<i>Trichomonas</i> spp.	150/19 (13%)	150/18 (12%)	300/37 (12%)	150/6 (4%)	150/6 (4%)	300/12 (4%)
		<i>Giardia</i> spp.	150/7 (5%)	150/12 (8%)	300/19 (6%)	150/0 (0%)	150/3 (2%)	300/3 (1%)
		<i>Balanitidium</i> spp.	150/2 (1%)	150/1 (1%)	300/3 (1%)	150/2 (1%)	150/1 (1%)	300/3 (1%)
		<i>Entamoeba</i> spp.	150/3 (2%)	150/2 (1%)	300/5 (2%)	150/5 (3%)	150/5 (3%)	300/10 (3%)
		<i>Iodamoeba</i> spp.	150/4 (3%)	150/7 (5%)	300/11 (4%)	150/4 (3%)	150/9 (6%)	300/13 (4%)
		<i>Blastocystis</i> spp.	150/20 (13%)	150/23 (15%)	300/43 (14%)	150/9 (6%)	150/8 (5%)	300/17 (6%)
		<i>Chilomastix</i> spp.	150/8 (5%)	150/7 (5%)	300/15 (5%)	150/7 (5%)	150/8 (5%)	150/8 (5%)
		<i>Trichomonas</i> spp.	150/9 (6%)	150/11 (7%)	300/20 (7%)	150/5 (3%)	150/4 (3%)	150/4 (3%)
		<i>Giardia</i> spp.	150/13 (9%)	150/7 (5%)	300/20 (7%)	150/0 (0%)	150/0 (0%)	150/0 (0%)
Protozoa	Feces	<i>Balanitidium</i> spp.	150/2 (1%)	150/1 (1%)	300/3 (1%)	150/0 (0%)	150/0 (0%)	150/0 (0%)
		<i>Entamoeba</i> spp.	150/2 (1%)	150/2 (1%)	300/4 (1%)	150/5 (3%)	150/5 (3%)	150/5 (3%)
		<i>Iodamoeba</i> spp.	150/1 (1%)	150/6 (4%)	300/7 (2%)	150/5 (3%)	150/6 (4%)	150/6 (4%)
		<i>Blastocystis</i> spp.	150/5 (3%)	150/4 (3%)	300/9 (3%)	150/9 (6%)	150/10 (7%)	300/19 (6%)
		<i>Ascarioidea</i>	150/9 (6%)	150/4 (3%)	300/13 (4%)	150/7 (5%)	150/6 (4%)	300/13 (4%)
		<i>Trichuroidea</i>	150/5 (3%)	150/7 (5%)	300/12 (4%)	150/9 (6%)	150/7 (5%)	300/16 (5%)
		<i>Ancylostomatidae</i>	150/4 (3%)	150/3 (2%)	300/7 (2%)	150/3 (2%)	150/1 (1%)	300/4 (1%)
		<i>Toxocaridae</i>	150/10 (7%)	150/0 (0%)	300/10 (3%)	150/0 (0%)	150/4 (3%)	300/4 (1%)
		<i>Hymenolepidae</i>	150/9 (6%)	150/2 (1%)	300/11 (4%)	150/3 (2%)	150/6 (4%)	300/9 (3%)
		<i>Rhabditidae</i>	150/2 (1%)	150/2 (1%)	300/4 (1%)	150/3 (2%)	150/1 (1%)	300/4 (1%)
Helminths	Pedal mucus	<i>Ascarioidea</i>	150/0 (0%)	150/0 (0%)	300/0 (0%)	150/9 (6%)	150/7 (5%)	300/16 (5%)
		<i>Trichuroidea</i>	150/5 (3%)	150/3 (2%)	300/8 (3%)	150/7 (5%)	150/5 (3%)	300/12 (4%)
		<i>Ancylostomatidae</i>	150/6 (4%)	150/9 (6%)	300/15 (5%)	150/3 (2%)	150/3 (2%)	300/6 (2%)
		<i>Toxocaridae</i>	150/4 (3%)	150/1 (1%)	300/5 (2%)	150/5 (3%)	150/9 (6%)	300/14 (5%)
		<i>Toxascaris</i> (?)	150/0 (0%)	150/0 (0%)	300/0 (0%)	15/4 (3%)	150/3 (2%)	300/7 (2%)
		<i>Cestoda</i> .	150/3 (2%)	150/2 (1%)	300/5 (2%)	150/3 (2%)	150/2 (1%)	300/5 (2%)

Table II. Proportion of Protozoa and Helminthes observed in the pedal mucus, cephalopodal mucus and feces of *Achatina fulica* captured in Sucre and Nueva Esparta states (northeast Venezuela).

Organisms	Excreta	Taxa	Anzoátegui			Monagas		
			Bolívar Municipality Examined snails / infected snails (%)	Sotillo municipality Examined snails / infected snails (%)	Total Examined snails / infected snails (%)	Bolívar Municipality Examined snails / infected snails (%)	Piar Municipality Examined snails / infected snails (%)	Total Examined snails / infected snails (%)
Protozoa	Pedal mucus	<i>Chilomastix</i> spp.	150/14 (9%)	150/9 (6%)	300/ 23 (8%)	150/5 (3%)	150/8 (5%)	300/13 (4%)
		<i>Trichomonas</i> spp.	150/8 (5%)	150/6 (4%)	300/14 (5%)	150/8 (5%)	150/7 (5%)	300/15 (5%)
		<i>Giardia</i> spp.	150/17 (11%)	150/11 (7%)	300/28 (9%)	150/1 (1%)	150/0 (0%)	300/1 (0%)
		<i>Balanitidium</i> spp.	150/1 (1%)	150/4 (3%)	300/5 (2%)	150/4 (3%)	150/5 (3%)	300/9 (3%)
		<i>Entamoeba</i> spp.	150/5 (3%)	150/3 (2%)	300/8 (3%)	150/6 (4%)	150/7 (5%)	300/13 (4%)
		<i>Iodamoeba</i> spp.	150/3 (2%)	150/5 (3%)	300/8 (3%)	150/9 (6%)	150/6 (4%)	300/15 (5%)
	Feces	<i>Blastocystis</i> spp.	150/6 (4%)	150/7 (5%)	300/13 (4%)	150/4 (3%)	150/9 (6%)	300/13 (4%)
		<i>Chilomastix</i> spp.	150/9 (6%)	150/6 (4%)	300/15 (5%)	150/6 (4%)	150/8 (5%)	300/14 (5%)
		<i>Trichomonas</i> spp.	150/8 (5%)	150/10 (7%)	300/18 (6%)	150/11 (7%)	150/13 (9%)	300/24 (8%)
		<i>Giardia</i> spp.	150/4 (3%)	150/0 (0%)	300/4 (1%)	150/0 (0%)	150/0 (0%)	300/0 (0%)
		<i>Balanitidium</i> spp.	150/4 (3%)	150/3 (2%)	300/7 (2%)	150/5 (3%)	150/4 (3%)	300/9 (3%)
		<i>Entamoeba</i> spp.	150/3 (2%)	150/7 (5%)	300/10 (3%)	150/7 (5%)	150/7 (5%)	300/14 (5%)
Helminths	Pedal mucus	<i>Iodamoeba</i> spp.	150/4 (3%)	150/7 (5%)	300/11 (4%)	150/2 (1%)	150/13 (9%)	300/15 (5%)
		<i>Blastocystis</i> spp.	150/7 (5%)	150/8 (5%)	300/15 (5%)	150/8 (5%)	150/11 (7%)	300/19 (6%)
		<i>Ascarioidea</i>	150/5 (3%)	150/7 (5%)	300/12 (4%)	150/14 (9%)	150/17 (11%)	300/31 (10%)
		<i>Trichuroidea</i>	150/8 (5%)	150/9 (6%)	300/17 (6%)	150/7 (5%)	150/12 (8%)	300/19 (6%)
		<i>Ancylostomatidae</i>	150/3 (2%)	150/5 (3%)	300/8 (3%)	150/3 (2%)	150/1 (1%)	300/4 (1%)
		<i>Toxocaridae</i>	150/7 (5%)	150/2 (1%)	300/9 (3%)	150/2 (1%)	150/1 (1%)	300/3 (1%)
	Feces	<i>Hymenolepidae</i>	150/1 (1%)	150/2 (1%)	300/3 (1%)	150/5 (3%)	150/1 (1%)	300/6 (2%)
		<i>Rhabditidae</i>	150/2 (1%)	150/1 (1%)	300/3 (1%)	150/1 (1%)	150/2 (1%)	300/3 (1%)
		<i>Ascarioidea</i>	150/4 (3%)	150/5 (3%)	300/9 (3%)	150/11 (7%)	150/6 (4%)	300/17 (6%)
		<i>Trichuroidea</i>	150/7 (5%)	150/5 (3%)	300/12 (4%)	150/5 (3%)	150/2 (1%)	300/7 (2%)
		<i>Ancylostomatidae</i>	150/1 (1%)	150/2 (1%)	300/3 (1%)	150/1 (1%)	150/1 (1%)	300/2 (1%)
		<i>Toxocaridae</i>	150/10 (7%)	150/2 (1%)	300/12 (4%)	150/3 (2%)	150/2 (1%)	300/5 (2%)
		<i>Hymenolepidae</i>	150/3 (2%)	150/1 (1%)	300/4 (1%)	150/2 (1%)	150/3 (2%)	300/5 (2%)

or animal importance (Figs. 3A/H; 4A/I); coccidia were not observed. The cephalopodal mucus was infected by adult of one imputed Rhabditida. Protozoa and helminthes were common in the pedal mucus and feces of snails collected from all the states surveyed, although the percentages of infection did vary. In addition, these excreta contained larval stages of Nematodes, highlighting the need for further studies for their identification to gender or species level.

Results of the microbiological analyses of the mollusks

The microbiological study (Tables III, IV) showed that all three types of excreta sampled from the 40 individuals examined, contained gram-negative facultative anaerobic bacilli and coccobacilli Enterobacteriaceae and Aeromonadaceae, as well as other bacteria whose taxonomic status is not well defined (Murray *et al.*, 2009). All three types of excreta were negative for levaduriforme yeasts.

DISCUSSION

All the helminthes found in *A. fulica* snails belong to taxa that require soil to complete their development cycles. The Enterobacteriaceae, as well as *A. hidrofila*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. coli* and *Campylobacter* spp. also develop and proliferate in soil, vegetation, decomposing organic material and water (Murray *et al.*, 2009), all of which are inhabited by *A. fulica*.

On the other hand, it has been estimated that 5.3 billion people are at risk of contracting geohelminthiasis mainly caused by *Ascaris*, *Trichuris*, *Necator/Ancylostoma*, *Toxocara* and *Toxascaris*, with the highest prevalence reported from Africa, Asia and Latin America. These helminthes are endemic in America and the Caribbean, with around 100, 84 and 50 million people infected with the first three helminthes listed above, respectively. Venezuela has been reported as being among the countries with the highest risk of infection (27% for *Trichuris* spp., indicating an urgent need for the implementation of control measures according to the latest recommendations drawn up by the PAHO (Pullan & Brooker, 2012; Chammartin *et al.*, 2013).

Similar health risks have been linked to the presence of the protozoa and bacteria found

in the snail's excreta during this investigation, which taken together, are responsible for three of the greatest current global public health problems. This is especially true for populations with a high degree of poverty, an inadequate water supply and poor sanitation and health education (Murray *et al.*, 2009; Duc *et al.*, 2011, Pullan & Brooker, 2012); a situation typical of many tropical countries, including Venezuela.

Furthermore, two of the bacteria identified in the snails examined, *E. coli* and *Campylobacter* spp., have been singled out as being among the seven most important bacterial pathogens for humans (Faruque, 2012).

Investigations on the composition, characterization and functions of the microbiota in the gastrointestinal tract of the Mollusca and in particular *A. fulica*, are scarce. According to Charrier *et al.* (2006) in *Helix* spp. the digestive tract is acidic in the crop but neutral or alkaline in the intestine. This highlights the dependence of these snails on the high biochemical potential of their diverse bacterial microbiota for the degradation and fermentation of the principal vegetable components (soluble sugars and polymers) that make up their diet.

Cardoso *et al.* (2012) also found diverse, abundant and metabolically active bacterial communities that included, among others, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Acinetobacter* and *Pseudomonas* in the intestinal tracts of Giant African snails starved for 72 hours in order to minimize the presence of transient bacteria. This leads us to suppose that these bacteria are native to the intestinal tracts of *A. fulica* making it "*per se*" a very effective disperser of these organisms.

The bacteria are probably acquired by *A. fulica* through its diet, the polyphagous nature of which results in the development of a structurally complex and highly diverse microbiotic community. The impact of biotic and abiotic factors on this bacterial community should, however, be investigated. These bacteria are responsible for the digestion of complex polysaccharides, by converting sugars to short-chain fatty acids and synthesizing amino acids and essential vitamins. Cardoso *et al.* (2012) suggest that this microbiota enables the snails to adapt to different diets. It is thus important to determine their species

Table III. Presence (+) or absence (-) of bacteria in the pedal mucus, cephalopodal mucus and feces of *Achatina fulica* captured in Anzoátegui and Monagas states (Northeast Venezuela).

Excreta	Taxa	Anzoátegui	Monagas State
		Number of examined exemplars. N=10	Number of examined exemplars. N=10
Pedal mucus	<i>Escherichia coli</i> *	+	+
	<i>Citrobacter freundii</i> *	+	+
	<i>Klebsiella azaenae</i> *	+	+
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> *	+	+
	<i>Aeromonas hydrophila</i> **	+	+
	<i>Acinetobacter baumannii</i> ***	+	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ***	+	+
	<i>Campylobacter</i> spp.***	+	+
Cephalopodal mucus	<i>Escherichia coli</i> *	-	-
	<i>Citrobacter freundii</i> *	+	+
	<i>Klebsiella azaenae</i> *	-	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> *	+	+
	<i>Aeromonas hydrophila</i> **	+	+
	<i>Acinetobacter baumannii</i> ***	-	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ***	+	-
	<i>Campylobacter</i> spp.***	-	+
Feces	<i>Escherichia coli</i> *	+	+
	<i>Citrobacter freundii</i> *	-	+
	<i>Klebsiella azaenae</i> *	+	+
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> *	+	+
	<i>Aeromonas hydrophila</i> **	+	+
	<i>Acinetobacter baumannii</i> ***	+	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ***	-	-
	<i>Campylobacter</i> spp.***	-	-

*=Enterobacteriaceae; **=Aeromonadaceae; ***=Taxonomic status is not well defined (Murray *et al.*, 2009)

composition, in order to provide knowledge that could contribute to the elaboration of strategies for snail control. With this in mind, we would like to mention the fact that *A. hydrophila* (Aeromonadaceae) the causal agent of diseases in humans, fish and mollusks and identified in all three excreta types collected from *A. fulica*, has been implicated in its decline in several geographic regions (Yamada *et al.*, 2011).

The polyphagous diet of *A. fulica*, together with its physiologically high environmental adaptability and capacity to proliferate in an eclectic range of habitats over a wide geographic range (in Venezuela, snails have been reported as having invaded 60% of the national territory; Martínez Escarbassiere *et al.* (2008); Oletta & Carvajal (2011))

are characteristics that make it a very important carrier and disperser of protozoa, helminthes and bacteria. So much so that has been reported to “sow” terrestrial environments and contaminate water bodies with these organisms and has thus become an excellent indicator for their presence (Liboria *et al.*, 2010).

These pathogens may be transmitted from *A. fulica* to humans and animals by the ingestion of raw plant products and water infected by their excreta (Faruque, 2012), eating raw or undercooked snails (Zanol *et al.*, 2010), or possibly from the handling of live snails, especially if the mucous membranes of the eyes, nose or mouth come into contact with the snails' excreta (USDA, 2008).

Table IV. Bacteria observed in the pedal mucus, cephalopodal mucus and feces of *Achatina fulica* captured in Sucre and Nueva Esparta states (Northeast Venezuela).

Excreta	Taxa	Sucre State	Nueva Esparta State
		Snails examined N=10	Snails examined N=10
Pedal mucus	<i>Escherichia coli</i> *	+	+
	<i>Citrobacter freundii</i> *	+	+
	<i>Klebsiella azaenae</i> *	+	+
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> *	+	+
	<i>Aeromonas hydrophila</i> **	+	+
	<i>Acinetobacter baumannii</i> ***	+	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ***	+	+
	<i>Campylobacter</i> spp.***	+	+
Cephalopodal mucus	<i>Escherichia coli</i> *	-	-
	<i>Citrobacter freundii</i> *	+	-
	<i>Klebsiella azaenae</i> *	-	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> *	+	+
	<i>Aeromonas hydrophila</i> **	+	+
	<i>Acinetobacter baumannii</i> ***	+	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ***	-	-
	<i>Campylobacter</i> spp.***	-	-
Feces	<i>Escherichia coli</i> *	+	+
	<i>Citrobacter freundii</i> *	+	+
	<i>Klebsiella azaenae</i> *	+	+
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> *	+	+
	<i>Aeromonas hydrophila</i> **	+	-
	<i>Acinetobacter baumannii</i> ***	+	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ***	+	+
	<i>Campylobacter</i> spp.***	+	+

*=Enterobacteriaceae; **=Aeromonadaceae; ***=Taxonomic status is not well defined (Murray *et al.*, 2009)

Despite the warnings given by Martinez Escarbassiere & Martinez (1997) about the risks associated with the presence of *A. fulica* in Venezuela, few studies have determined the impact of this snail species either on the natural environment or human and veterinary health. Thus a low priority has been given to the proper surveillance of the zones invaded by this mollusk by the health authorities and there have been few measures taken to restrict its invasion of the rest of the country. There have also been a lack of control measures as regards food security issues and little attempt to educate the population as regards the health risks involved. Implementation of these aspects would contribute to mitigating the number of cases of infection reported as well as the emergence of new diseases due to the intense and rapid invasion

and proliferation of *A. fulica* in Venezuela. A greater knowledge of the snail distribution would enable the instigation of effective measures for the control of the protozoa, helminthes and bacteria that they harbor. We suggest that these considerations underline the epidemiological importance of *A. fulica* for human and animal health.

Two mucopolysaccharide groups, Glycosaminoglycans (GAGs, heparin-, chondroitin-, dermatan sulfate and hyaluronic acid) and glycoproteins, suspended in 80-99% water have been found ubiquitously in the animal kingdom, from the most primitive invertebrates (Hydra, Cnidaria) to vertebrates, demonstrating their conserved status and role in fundamental biological processes. In

the *A. fulica* pedal mucus, these structures are responsible for regulating cell growth, proliferation, differentiation, morphogenesis and migration, and are also involved in the transport of substances, thus providing energy and metabolic resources basic to the snail's survival (Skingsley *et al.*, 2000; Berniyanti *et al.*, 2007; Yamada *et al.*, 2011).

In addition, it has been demonstrated that this mucus contains a broad spectrum antibiotic glycoprotein effective against *E. coli*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis* (Berniyanti *et al.*, 2007; Santana *et al.*, 2012) indicating its importance for the mollusk immune system. With regard to this we should add that a highly sulfated product -acharan sulfate, related to heparin/heparin sulfate but structurally unique to *A. fulica*, may also be responsible for protecting *A. fulica* from foreign bodies such as bacteria and virus (Yamada *et al.*, 2011).

Mucins, a family of highly glycosylated proteins found throughout the animal kingdom including mollusks, are basic components of gel secretions. They have diverse functions, ranging from lubrication and the regulation of the calcification process as constituents of the snail's shell, to the formation of physical barriers for defence including inhibitory chemicals which bind to parasites, commensals and predators (Skingsley *et al.*, 2000, Pinchuck & Hodgson, 2009, 2012). These aspects could explain the role of the snails' excreta as appropriate niches for the organisms mentioned.

CONFLICT OF INTERESTS: None.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Ricardo Guerrero and José Leonardo De Sousa for assistance in laboratory work; Hermes Piñango (*in memoriam*), Frances Osborn, Wilma Urdaneta and Verónica Aguilar, for their help in the preparation of the manuscript.

REFERENCES

Berniyanti T., Waskito E. B. & Suwarno T. (2007). Biochemical characterization of an antibacterial glycoprotein from *Achatina fulica* ferussac snail mucus local isolate and their implication on

bacterial dental infection. *Indonesian J. Biotech.* **12**: 943-951.

Cardoso A. M., Cavalcante J. V., Vieira R. P., Lima J. L., Griecol M. A., Clementino M. M., *et al.* (2012). Gut bacterial communities in the giant land snail *Achatina fulica* and their modification by sugarcane-based diet. *PLoS ONE* **7**: e33440.

Chammartin F., Scholte R., Guimarães L. H., Tanner M., Utzinger J. & Vounatsou P. (2013). Soil-transmitted helminth infection in South America: a systematic review and geostatistical meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **13**: 507-518.

Charrier M. A., Fonty G., Gaillard-Martinie B., Ainouche K. & Gerard A. (2006). Isolation and characterization of cultivable fermentative bacteria from the intestine of two edible snails, *Helix pomatia* and *Cornu aspersum* (Gastropoda: Pulmonata). *Biol. Res.* **39**: 669-681.

Correoso M. (2006). Estrategia preliminar para evaluar y erradicar *Achatina fulica* (Gastropoda: Achatinaceae) en Ecuador. *Bol. Técnico 6, Serie Zoológica.* **2**: 45-52.

Duc P. P., Viet H. N., Hattendorf S., Zinsstag J., Cam P. D. & Odermatt P. (2011). Risk factors for *Entamoeba histolytica* infection in an agricultural community in Hanam province, Vietnam. *Parasit. Vectors.* **4**: 102-111.

Faruque S. M. (2012). Introduction 3-11. In: *Foodborne and waterborne bacterial pathogens: Epidemiology*. Faruque SM (ed.) Caister Academic Press, Norfolk, UK.

Gutiérrez D. E., Núñez V., Vogler R. & Rumi A. (2011). Invasion of the Argentinean Paraense rainforest by the Giant African snail *Achatina fulica*. *Amer. Malacol. Bull.* **29**: 135-137

Inceni R. N., Caleiras E., Martin M. & González C. (2007). Human infection by *Angiostrongylus costaricensis* in Venezuela: first report of a confirmed case. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo.* **49**: 197-200.

Liboria M., Morales G., Sierra C., Silva I. & Luz P. (2010). Primer hallazgo en Venezuela

- de huevos de *Schistosoma mansoni* y de otros helmintos de interés en salud pública, presentes en heces y secreción mucosa del molusco terrestre *Achatina fulica* (Bowdich, 1822). *Zootecnia Trop.* **28**: 383-394.
- Martínez Escarbassiere R. & Martínez M. E. (1997). Nota acerca de la *Achatina (Lissachatina) fulica* (Bowdich, 1822), peligroso caracol africano (Pulmonata Achatinidae) introducido en Venezuela. *Acta Biol. Venez.* **17**: 37-40.
- Martínez Escarbassiere R., Martínez M. E. & Castillo O. (2008). Distribución geográfica de *Achatina (Lissachatina) fulica* (Bowdich, 1882) (Gastropoda-Stylommatophora- Achatinidae) en Venezuela. *Mem. Fundac. La Salle Ciencias.* **68**: 93-106.
- Murray P. R., Rosenthal K. S. & Pfäller M. A. (2009). *Microbiología médica*. Sexta edit. Elsevier España, Barcelona, Spain.
- Nordsieck R. (2011). *The living word of Molluscs*. The Locomotion of Gastropods. <http://molluscs.at/gastropoda/terrestrial.html>.
- Oletta J. F. & Carvajal A. C. (2011). Caracoles africanos como plaga potencial y riesgo para la salud en Venezuela. *Red. Soc. Cient. Méd. Venez.* Alerta Epidemiol. No. 193: 8-15.
- Pinchuck S. C. & Hodgson A. N. (2009). Comparative structure of the lateral pedal defensive glands of three species of *Siphonaria* (Gastropoda: Basommatophora). *J. Mollus. Stud.* **75**: 371-380.
- Pinchuck S. C. & Hodgson A. N. (2012). Structure of the lateral pedal defensive glands of *Trimusculus costatus* (Gastropoda: Trimusculidae). *J. Mollus. Stud.* **78**: 44-51.
- Pullan R. I. & Brooker S. J. (2012). The global limits and population at risk of soil-transmitted helminth infections in 2010. *Parasit. Vectors.* **5**: 81-95.
- Santana W. A., Moura de Melo C., Cardoso J. C., et al. (2012). Assessment of antimicrobial activity and healing potential of mucous secretion of *Achatina fulica*. *Int. J. Morphol.* **30**: 365-373.
- Skingsley D. R., White A. J. & Weston A. (2000). Analysis of Pulmonate mucus by infrared spectroscopy. *J. Moll. Stud.* **66**: 363-371.
- Spencer F. M. & Monroe L. E. (1961). *The color atlas of intestinal parasites*. Charles C Thomas Pub, Springfield, Illinois, USA.
- Teles H. M., Vaz J. F., Fontes L. R. & Fátima M. (1997). Registro de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) no Brasil: caramujo hospedeiro intermediário da angiostrongilíase. *Rev. Saúde Púb.* **31**: 310-312.
- USDA. United States Department of Agriculture. National Invasive Species Information Center (2007). New Pest Response Guidelines. Giant African Snails: Snail Pests in the Family Achatinidae, New York, USA.
- USDA. United States Department of Agriculture. National Invasive Species Information Center (2008). *Achatina fulica* Bowdich; Giant African Land Snail). Available from: <http://www.invasivespeciesinfo.gov/animals/africansnail.shtml>.
- Utomo B. N., Poernomo S., Hardjoutomo S., et al. (1991). A bacteriological study on earth snails (*Achatina fulica*). *Penyakit Hewan.* **23**: 15-17.
- Yamada S., Sugahara K. & Özbek S. (2011). Evolution of glycosaminoglycans Comparative biochemical study. *Commun. Integr. Biol.* **4**: 150-158.
- Zanol J., Fernandez M. A., de Oliveira A. P. M., et al. (2010). O caramujo exótico invasor *Achatina fulica* (Stylommatophora, Mollusca) no Estado de Rio de Janeiro (Brasil): situação atual. *Biota Neurotrop.* **10**: 448-451.

Recibido el 30/05/2014
Aceptado el 29/10/2014

Abundancia y diversidad de especies de Culicinae (Diptera: Culicidae) del Alto Orinoco, estado Amazonas, Venezuela

Abundance and species diversity of Culicinae (Diptera: Culicidae) from Alto Orinoco, Amazonas, Venezuela

Yasmin Rubio-Palis^{1,2*}, Magda Magris³, Rodrigo Ramírez Álvarez⁴, Hernán Guzmán⁴, Alexander Suárez⁵ & Juan-Carlos Navarro⁶

RESUMEN

Se realizó un estudio longitudinal en 18 comunidades o shabonos de las localidades Yanomami Ocamo y Mavaca del municipio Alto Orinoco entre Junio 1998 y Diciembre 2000 para caracterizar la fauna de culicinos. Se colocaron trampas CDC dentro de viviendas entre 1900 y 0600 horas a fin de capturar los mosquitos atraídos por personas protegidas por mosquiteros. Se capturaron un total de 4.635 culicinos pertenecientes a nueve géneros y 25 especies. Del total de especies identificadas, 18 especies (72%) constituyen nuevos registros para el estado Amazonas. Las especies más abundantes fueron *Mansonia (Mansonia) titillans* (48%), *Aedes (Ochlerotatus) fulvus* (16.9%) y *Culex (Melanoconion) spissipes* (12%). Se observaron correlaciones negativamente significativas entre precipitación, nivel del río y abundancia de *Ma. titillans* y *Ae. fulvus*. La abundancia y diversidad de especies resultó diferente entre comunidades. La mayor diversidad y abundancia se encontró en las comunidades Santa María de los Guaiacas y Carlitos. El esfuerzo de captura, disponibilidad de criaderos y diversidad de hábitats en estas comunidades influye en esta diferencia con respecto a las otras comunidades. El presente constituye el primer y único estudio longitudinal realizado en el estado Amazonas para caracterizar la fauna de culicinos, la cual incluye especies de importancia en salud pública.

Palabras clave: Amazonía, abundancia, inventario, mosquitos, trampa CDC, Venezuela.

SUMMARY

A longitudinal study was conducted in 18 communities or "shabonos" in the Yanomami inhabited Ocamo and Mavaca regions in the Alto Orinoco municipality between June 1998 and December 2000. CDC light traps were placed inside dwellings to catch mosquitoes attracted to humans protected by mosquito nets between 1900 and 0600 hours. A total of 4.635 culicines belonging to 9 genera and 25 species were captured. Of the total number of species identified, 18 (72%) are new reports for Amazonas state. The most abundant species were *Mansonia (Mansonia) titillans* (48%), *Aedes (Ochlerotatus) fulvus* (16.9%) and *Culex (Melanoconion) spissipes* (12%). There were significantly negative correlations between rainfall and river levels, and the abundance of *Ma. titillans* and *Ae. fulvus*. The abundance and species diversity of culicines differed among communities, with the highest values of both these parameters found in Santa María de los Guaiacas and Carlitos. These differences were partly due to sampling effort but could also have been produced by the availability of larval habitats and niche diversity in these communities compared to the others surveyed. Up until, now this is the only longitudinal study to characterize the culicine fauna in Amazonas state, which includes several species of public health importance.

Key words: Amazonia, abundance, inventory, mosquitoes, CDC light trap, Venezuela

INTRODUCCIÓN

Hasta el presente se han identificado en Venezuela aproximadamente unas 315 especies de culicinos, principalmente en la región norte del país (Del Ventura *et al.*, 2013; Navarro *et al.*, 2007; Sutil,

1980). Sin embargo, recientemente se han realizado nuevos registros en el estado Bolívar (Berti *et al.*, 2011) pero es muy poco lo que se conoce aún de la fauna de Culicidae del estado Amazonas y en particular del Alto Orinoco. En efecto, aparte de los reportes generales para el estado Amazonas de Sutil

¹ Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental "Dr. Arnoldo Gabaldon"

² Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Carabobo

³ Centro Amazónico de Investigación y Control de Enfermedades Tropicales "Simón Bolívar"

⁴ Centro de Investigaciones en Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental, Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon"

⁵ Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

⁶ Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Universidad Central de Venezuela

* Autor de correspondencia: rubiopalis@gmail.com

(1980) y Mora Rodríguez (1988) y capturas puntuales de Navarro *et al.* (2007), sólo contamos con el reporte de la expedición de Suárez *et al.* (1992) a la Serranía de Tapirapicó, cerca de la frontera con Brasil, lo cual supone un sesgo en el conocimiento de la distribución de Culicinos en Venezuela.

La subfamilia Culicinae tiene gran importancia en salud pública por incluir especies involucradas en la transmisión de varios virus tales como fiebre amarilla, dengue, encefalitis equina venezolana, virus del oeste del Nilo, Mayaro y otros virus aun poco estudiados en Venezuela. Por tal motivo, es altamente relevante dar a conocer la fauna de culicinos de varias localidades del municipio Alto Orinoco del estado Amazonas, algunas de las cuales podrían estar involucradas en la transmisión de diversos virus. El presente constituye el primer estudio longitudinal sobre la abundancia y diversidad de culicinos adultos capturados en esta área remota del estado Amazonas. Este estudio estuvo enmarcado dentro del proyecto de evaluación de intervención con mosquiteros tratados con insecticida para el control de la malaria en el Alto Orinoco (Magris *et al.*, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Los muestreos fueron realizados en comunidades seleccionadas y habitadas por indígenas de la etnia Yanomami ubicadas en las localidades de Ocamo (2°47'8"N; 65°12'57"W) y Mavaca (2°30'38"N, 65°09'28"W), municipio Alto Orinoco, estado Amazonas. Las comunidades se encuentran a altitudes comprendidas entre 110 y 120 m. Desde el punto de vista eco-epidemiológico, el área ha sido clasificada como malaria de bosques interiores en tierras bajas (Rubio-Palis & Zimmerman, 1997). De acuerdo a la clasificación bioclimática de Haldridge (1979) el Alto Orinoco se caracteriza por ser ombrófilo macrotérmico, la precipitación anual varía entre 3.750 y 5.000 mm, temperatura media anual de 26-27°C, y 80% de humedad relativa (MARNR, 1998-2000). Prácticamente llueve durante todo el año, sin embargo hay un periodo de menor precipitación entre Octubre y Marzo y mayor precipitación entre Abril y Octubre. Desde el punto de vista geomorfológico el área es considerada de peniplanicies, caracterizada por un paisaje levemente ondulado con colinas dispersas, la vegetación dominante son los bosques ribereños, la

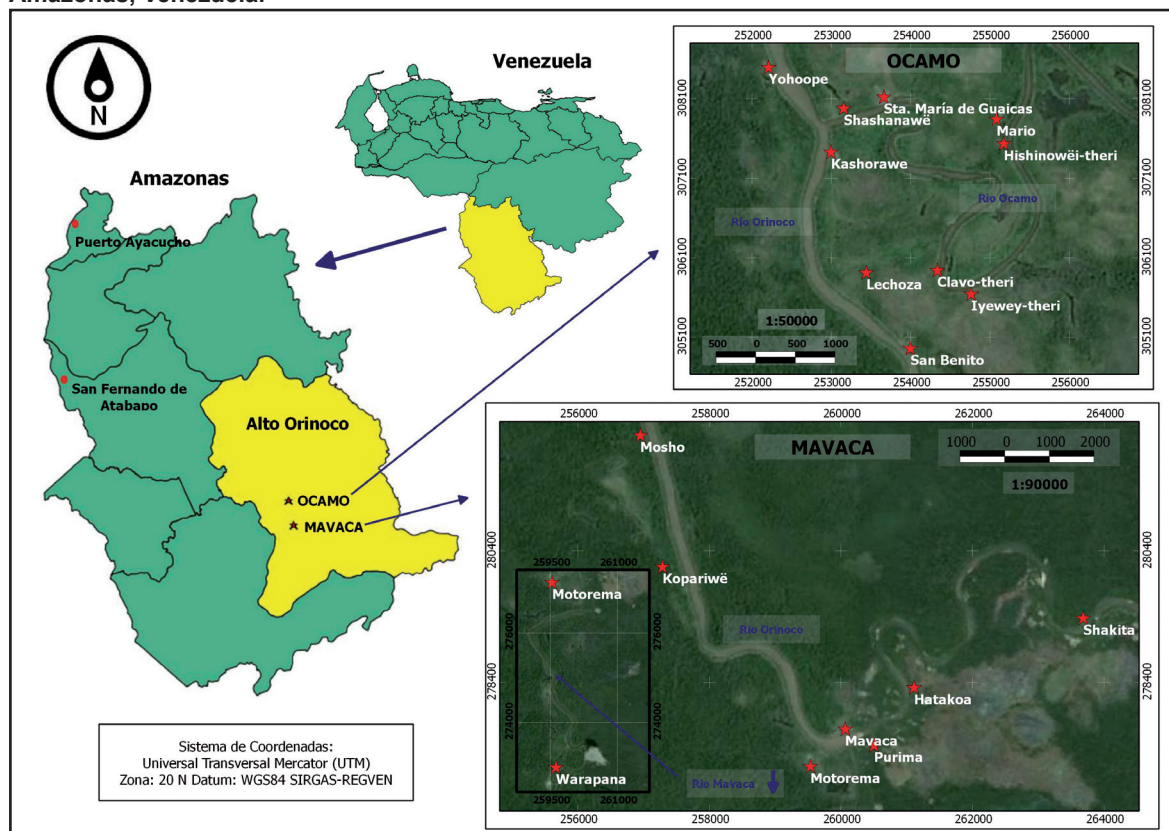
mayoría de los cuales son inundables en las márgenes de los ríos Orinoco y Ocamo (Huber, 1995). La localidad de Ocamo incluye once comunidades o shabonos: Santa María de los Guaicas, Carlitos, Clavotheri, Iyewëi-theri, Hishinowëi-theri, Mario, Kashorawë, Shashanawë, Yohoopë, San Benito y Lechoza, ubicados a lo largo de los ríos Orinoco y Ocamo. La localidad de Mavaca está compuesta por ocho comunidades: Mosho, Kopariwë, Motorema, Piegrita, Purima, Hatakoa, Shakita y Warapana, ubicadas a lo largo de los ríos Orinoco y Mavaca (Fig. 1). La distancia entre las localidades de Ocamo y Mavaca es de aproximadamente 25 km, y entre las comunidades que las integran no más de 2 km.

Capturas de mosquitos

Las capturas se realizaron simultáneamente en cada comunidad de Ocamo durante al menos cuatro noches consecutivas de cada mes, a la semana siguiente se realizaban en las comunidades de Mavaca, entre Junio de 1998 y Diciembre 2000. Sin embargo, el esfuerzo de captura no fue igual en todas las localidades debido a diversos problemas de logística, especialmente en Mavaca.

Los mosquitos se capturaron dentro de una vivienda seleccionada en cada comunidad y mediante consentimiento informado del dueño, se colocó una trampa CDC con luz de tungsteno y conectada a una batería recargable de 6 voltios a una altura del suelo de aproximadamente 1,5 m entre las 19:00 y 06:00 horas. La trampa se ubicó cerca de una persona acostada en su hamaca y protegida por mosquitero. El dueño de la vivienda fue entrenado para apagar la trampa en la mañana, luego de amarrar la bolsa para impedir que los mosquitos escaparan. Cada muestra de mosquitos se transportaban en contenedores térmicos con toallas húmedas al laboratorio de campo ubicado en Santa María de los Guaiacas o a la Medicatura Rural ubicada en Mavaca para su identificación a nivel de Subfamilia y preservación en sílica gel hasta su identificación posterior a nivel de especie en el Laboratorio de Biología de Vectores, Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas y en el Laboratorio de Entomología del Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA) del Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon", Maracay (IAE).

Fig. 1. Ubicación relativa de las comunidades de Ocamo y Mavaca, municipio Alto Orinoco, estado Amazonas, Venezuela.



Diversidad de especies

Para la identificación de especies se emplearon las siguientes Claves: para culicinos en general Cova García *et al.* (1966), Chavarri (1995) y Lane (1953); Berlin & Belkin (1980) para *Culex* y subgéneros; Sallum & Forattini (1996) para el subgénero *Melanoconion* de *Culex*; Liria & Navarro (2003) para *Psorophora* y Zavortink (1979) para *Trichoprosopon s.l.* Para la abreviación de géneros y subgéneros se siguió la sugerida por Reinert (1975). Los mosquitos identificados se encuentran depositados en la colección del Laboratorio de Entomología del CEEESA. Utilizando parámetros de abundancia y riqueza de especies por comunidad, se determinaron los índices no paramétricos de diversidad de Shannon-Weaver, números de Hill (Hill, 1973) y Equidad de Alatalo derivado de Hill (Moreno, 2001). Asimismo se estimó la riqueza de especies esperada Chao-1 empleando el programa EstimateS 9.1.0, utilizando un valor de 500 réplicas (Colwell, 2004).

Datos climatológicos

Los registros diarios de precipitación y nivel del río se tomaron de la estación climatológica del Ministerio del Ambiente y Recursos Naturales Renovables (MARNR) ubicada en Santa María de los Guaicas.

Análisis de datos

Se realizaron análisis de correlación de Spearman entre el promedio de mosquitos capturados mensualmente de las especies más abundantes y las variables físicas precipitación y nivel del río Orinoco. Para comparar la estructura y composición de especies entre las comunidades con similar esfuerzo de captura, se procedió a estandarizar aquellas siguiendo el criterio mínimo. Para evidenciar diferencias significativas entre comunidades y especies de mosquitos, se realizó la prueba no paramétrica de similitud (ANOSIM; distancia Bray-Curtis y 10.000 permutaciones). ANOSIM

compara los intervalos de distancia entre los grupos (en este caso, abundancia en las comunidades) con los intervalos dentro de los grupos (abundancia por especie de mosquitos de cada comunidad). Las medias de estos dos tipos de rangos son comparadas y el resultado se representa mediante el estadístico R (Clarke, 1993). Posteriormente se realizó el análisis de similaridad porcentual (SIMPER; distancia Bray-Curtis), para evidenciar aquellos taxa responsables de las diferencias entre comunidades (Clarke, 1993), empleando métodos de las distancias de Bray-Curtis. Estos análisis fueron calculados utilizando el programa PAST (Hammer *et al.*, 2001).

Consideraciones éticas

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los residentes de las comunidades involucradas en el estudio y en particular, de los jefes de casa en donde se colocaron las trampas. Este trabajo obtuvo el aval de la Comisión de Ética *ad hoc* del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (oficio s/n del 04/09/1998).

RESULTADOS

Durante el período de estudio se capturaron un total de 4.635 culicinos pertenecientes a nueve géneros y 25 especies (Tabla I). *Mansonia* (*Mansonia*) *titillans* (Walker) fue la especie más abundante (48%), seguida de *Aedes* (*Ochlerotatus*) *fulvus* (Wiedemann) (16,9%) y *Culex* (*Melanoconion*) *spissipes* (Theobald) (12%). No fue posible la identificación de algunos mosquitos a nivel de especies debido a daños causados por el ventilador de la trampa. En cuanto a la abundancia por género tenemos que *Mansonia* fue el más abundante (49,6%), seguido de *Culex* (24,5%), *Aedes* (17,7%), *Limatus* (4,15%) y *Psorophora* (2,7%). La abundancia de mosquitos de los géneros *Aedeomyia*, *Coquillettidia*, *Trichoprosopon* y *Uranotaenia* representó en conjunto 1,47%. Del total de especies identificadas, 18 especies (72%) constituyen nuevos registros para el estado Amazonas (Tabla I).

En cuanto a los registros climáticos se observaron variaciones tanto en la precipitación como en el nivel del río no sólo en magnitud sino también en el patrón entre los años de estudio (1999-2000). En efecto, durante 1999 se registraron un total de 2.640 mm de precipitación, siendo Mayo

el mes más lluvioso (280 mm) y el menos lluvioso Diciembre (142 mm); mientras que en el año 2000 se registraron 4.507 mm de precipitación, registrándose el máximo en Junio (590 mm) y el mínimo en Octubre (121 mm). Cabe señalar que durante el estudio no se registró un período de sequía como tal sino meses con mayor o menor precipitación pero superior a 120 mm. Con respecto al nivel del río Orinoco, encontramos que para el año 1999 el nivel máximo se registró en Mayo (7,42 m) y el mínimo en Diciembre (2,65 m); este patrón varió en el año 2000, registrándose el nivel máximo en el mes de Agosto (7,74 m) y el mínimo en Abril (2,34 m). Las figuras 2 y 3 muestran el número promedio de *Ma. titillans* y *Ae. fulvus* en función de la precipitación y el nivel del río mensual respectivamente. A fin de determinar si existe correlación significativa entre la abundancia de las especies más frecuentes *Ma. titillans* y *Ae. fulvus* y las variables precipitación y nivel del río, se realizaron pruebas de correlación de Spearman de los datos transformados a log (x+1). Se encontraron correlaciones significativamente negativas entre la abundancia promedio mensual de *Ma. titillans* y la precipitación en el mismo mes ($R = 0,7486$; $P = -0,0652$); la significación fue mayor al considerar la precipitación con rezagos de uno ($R = 0,8737$; $P = -0,0102$) y dos meses ($R = 0,9333$; $P = -0,018$). Sin embargo, al considerar por separado los años 1999 y 2000, no existe correlación significativa ($P > 0,05$). Para *Ae. fulvus* solo se encontró correlación negativa significativa con la precipitación el mes previo ($R = 0,8936$; $P = -0,0126$), pero al considerar por separado los dos años de estudio se obtiene correlación significativamente negativa para la precipitación en el mismo mes tanto para 1999 ($R = 0,9484$; $P = -0,0209$) como para 2000 ($R = 0,9305$; $P = -0,0283$). En cuanto al nivel del río, se encontró correlación negativa significativa entre el promedio capturado de *Ma. titillans* y el nivel medio del río ($R = 0,8588$; $P = -0,0522$); sólo se encontró correlación significativamente negativa con un mes de rezago ($R = 0,9640$; $P = -0,0146$) para el nivel máximo del río durante 1999. En cuanto *Ae. fulvus*, la correlación resultó significativamente negativa entre abundancia promedio mensual y el nivel mínimo del río con dos meses de rezago ($R = 0,9691$; $P = -0,0148$) y con el nivel máximo del río durante el año 2000 ($R = 0,9549$; $P = -0,0146$).

Con respecto a la riqueza de especies por comunidad (Tabla II) se encontró mayor número de

Tabla I. Especies y abundancia de culicinos capturados en trampas de luz CDC en comunidades del municipio Alto Orinoco, estado Amazonas, Venezuela. 1998-2000.

Especies	Número Capturado
<i>Aedeomyia (Aedeomyia) squamipennis</i> (Lynch Arribáizaga)**	13
<i>Aedes (Ochlerotatus) fulvus</i> (Wiedemann)	781
<i>Aedes (Ochlerotatus) scapularis</i> (Rondani)**	7
<i>Aedes (Ochlerotatus) serratus</i> Theobald sensu lato	6
<i>Aedes</i> sp*	1
<i>Coquillettidia (Rhynchoetaenia) juxtamansonia</i> (Chagas)**	1
<i>Coquillettidia</i> sp.	30
<i>Culex (Aedinus) amazonensis</i> (Lutz)**	1
<i>Culex (Culex) quinquefasciatus</i> Say **	21
<i>Culex (Culex)</i> sp*	459
<i>Culex (Melanoconion) dunni</i> Dyar	38
<i>Culex (Melanoconion) erraticus</i> (Dyar & Knab)**	8
<i>Culex (Melanoconion) ocosa</i> Dyar & Knab**	4
<i>Culex (Melanoconion) pedroi</i> Sirivanakarn & Belkin**	11
<i>Culex (Melanoconion) spissipes</i> (Theobald)**	555
<i>Culex (Melanoconion)</i> sp*	149
<i>Limatus asulleptus</i> (Theobald)**	53
<i>Limatus durhamii</i> Theobald**	104
<i>Limatus</i> sp*	26
<i>Mansonia (Mansonia) titillans</i> (Walker)	2223
<i>Psorophora (Janthinosoma) albipes</i> (Theobald)	83
<i>Psorophora (Janthinosoma) cyanescens</i> (Coquillett)**	8
<i>Psorophora (Grabhamia) cingulata</i> (Fabricius)**	1
<i>Psorophora (Psorophora) ciliata</i> (Fabricius)**	1
<i>Psorophora (Psorophora) cilipes</i> (Fabricius)**	3
<i>Psorophora (Psorophora) lineata</i> (Von Humboldt)**	9
<i>Psorophora (Janthinosoma) ferox</i> (Von Humboldt)	15
<i>Trichoprosopon digitatum</i> (Rondani)**	2
<i>Trichoprosopon</i> sp*	4
<i>Uranotaenia (Uranotaenia) geometrica</i> Theobald	2
<i>Uranotaenia (Uranotaenia) pulcherrima</i> Lynch Arribáizaga**	7
<i>Uranotaenia</i> sp*	9
TOTAL	4635

* No identificable a nivel de especie debido a falta de caracteres taxonómicos observables por el estado del material.

** Nuevos registros para el estado Amazonas.

Tabla II. Especies de culicinos capturadas entre 19:00 y 06:00 horas con trampas CDC, esfuerzo de captura (horas), Riqueza Absoluta y Riqueza Estimada (Chao1) en cada comunidad (shabono) de las localidades de Ocamo y Mavaca, municipio Alto Orinoco, estado Amazonas, Venezuela. 1998-2000.

ESPECIES	OCAMO											MAVACA							
	CAR	CLA	HIS	IYE	KAS	LEC	MAR	SB	SHA	SMG	YOH	HAT	KOP	MOS	MOT	PUR	SHA	WAR	
<i>Aedeomyia squamipennis</i>	X	X	X	0	0	X	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	
<i>Aedes fulvus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0	X	
<i>Ae. scapularis</i>	0	X	0	X	0	0	0	X	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Ae. serratus</i>	X	0	0	0	0	X	0	X	0	X	X	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Aedes</i> sp.*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	
<i>Coquillietidia juxmansonia</i>	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Coquillietidia</i> sp.*	X	X	X	X	0	X	X	X	0	X	X	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Culex (Aed.) amazonensis</i>	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Cx. (Mel.) dunni</i>	X	X	X	X	0	X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Cx. (Mel.) erraticus</i>	X	X	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Cx. (Mel.) ocosa</i>	0	0	0	0	0	X	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Cx. (Mel.) pedroi</i>	X	0	0	X	0	X	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Cx. (Mel.)</i> sp.*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0	X	X	0	X	0	
<i>Cx. (Mel.) spissipes</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Cx. (Cux)</i> sp.*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	
<i>Cx. (Cux) quinquefasciatus</i>	X	X	0	X	X	0	0	0	X	X	X	X	0	X	X	X	X	0	
<i>Limatus asulleptus</i>	X	X	X	X	0	X	X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	
<i>Limatus durhamii</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0	0	0	0	0	0	0	

...continua en la pag. 192

[illegible]

O= ausente

STEX Shashanawe, SHG Santa Maria de los Guaces, ICH Ichochope.
MAVACA: HAT= Hatakoa; KOP= Kopariwë; MOS= Moshö; MOT= Motorema; PUR= Purima; SHA= Shakita; WAR= Warapana.

especies (18) en Carlitos y Santa María de los Guaicas; seguidos de Iyewëi-theri (17); Clavo-theri, Mario y Lechoza 16 especies en cada una; Shashanawë (14), Hishinowëi-theri y Yoohope 12 especies. En estas localidades se registró 78,5% de la riqueza total de especies capturadas. Las mayores estimaciones de diversidad (Chao1) se reportaron en Iyewëi-theri (27 especies), Carlitos (20), Santa María de los Guaicas (19,5) y Mario (19), el resto de las comunidades reportaron estimaciones menores a 18 especies (Tabla II). En cuanto a la abundancia de culicinos por comunidad (Tabla III), 88% de la abundancia total se obtuvo en las comunidades de Carlitos (688 especímenes), Mario (647), Santa María de los Guaicas (561), Iyewëi-theri (490), Lechoza (449), Clavo-theri (327), Hishinowëi-theri (309) y Yoohope (303), las demás comunidades reportaron valores menores a 250 especímenes. La mayor diversidad de especies se alcanzó en Santa María de los Guaicas, Hatakoa, Shashanawë, Carlitos y Mario, mientras que para el índice de Alatalo las comunidades más equitativas fueron Shakita y Mosho (Tabla III).

El análisis de composición de especies entre comunidades se determinó para cinco comunidades con similar esfuerzo de muestreo, Santa María de los Guaicas, Carlitos, Iyewëi-theri, Lechoza y Mario (Tabla IV). La comparación arrojó diferencias significativas entre las comunidades Carlitos y Iyewëi-theri ($P=0,044$); Carlitos y Lechoza ($P=0,072$) y Carlitos y Mario ($P=0,037$), el resto de las comunidades no arrojaron diferencias significativas. El Análisis de Similaridad Porcentual (SIMPER), reportó disimilitudes parecidas entre comunidades. Sin embargo, la comunidad de Santa María de los Guaicas (SMG) arrojó las mayores diferencias, SMG y Lechoza (66,69% de disimilitud), SMG y Carlitos (67,46%) y SMG y Iyewëi-theri (66,26%) (Tabla IV). Las 25 especies registradas en el estudio contribuyeron para el 100% de la disimilitud obtenida en cada comparación, sin embargo, de estas solo tres especies, *Ma. titillans*, *Ae. fulvus* y *Cx. spissipes* aportaron el 80% para dicha diferencia.

DISCUSIÓN

El presente trabajo constituye el primer estudio longitudinal realizado en el estado Amazonas para caracterizar la fauna de culicinos que entran a alimentarse en viviendas de comunidades indígenas atraídos por humanos protegidos por mosquiteros y

luz de tungsteno de trampas CDC. Se identificaron un total de 25 especies, de las cuales 18 (72%) son nuevos registros para el estado Amazonas (Tabla I) elevando a 41 las especies señaladas para el estado. Suárez *et al.* (1992) en capturas realizadas con trampas CDC en la serranía de Tapirapecó, Alto Orinoco, solo reportaron seis especies que coinciden con nuestro estudio: *Ae. fulvus*, *Ae. serratus* (Theobald) *sensu lato*, *Ma. titillans*, *Ps. albipes* (Theobald), *Ps. ferox* (Humboldt) y *Ur. geométrica* Theobald.

Mansonia titillans, *Ae. fulvus* y *Cx. spissipes* fueron las especies más abundantes, siendo las dos primeras importantes vectores del virus de encefalitis equina venezolana (VEEV) (Turell *et al.*, 2000, Weaver *et al.*, 2004; Walder *et al.*, 1984) y como posibles exportadores del VEEV desde los focos enzoóticos a las áreas abiertas (Méndez *et al.*, 2001) y *Cx. spissipes* como vector enzoótico de VEEV (Walder *et al.*, 1984; Weaver *et al.*, 2004). Otras especies de importancia en la transmisión enzoótica de VEEV también fueron colectadas aunque en baja proporción: *Cx. (Mel.) pedroi* Sirivanakarn & Belkin, *Cx. (Mel.) ocosa* Dyar & Knab (Navarro & Weaver, 2004; Weaver *et al.*, 2004), así como *Cx. (Mel.) dunni* Dyar del virus de la encefalitis del Este (EEEV) (Walder *et al.*, 1984), siendo estos los reportes más al sur de estas especies en Venezuela. Cabe resaltar que *Cx. pedroi* además ha sido involucrado en la transmisión EEEV y otros virus en Panamá y Brasil (Galindo & Srihongse, 1967). Por lo antes expuesto, se requieren estudios para caracterizar los arbovirus circulando en esta región así como las especies de mosquitos vectoras.

Los análisis de correlación entre la precipitación, nivel del río y abundancia de las especies más frecuentes *Ae. fulvus* y *Ma. titillans* resultaron significativamente negativas. Esto podría estar asociado a la dinámica entre esta variable y al tipo y ubicación de los criaderos o hábitats de fases inmaduras que estas especies explotan, los cuales al incrementar la precipitación podrían ser lavados resultando en la disminución de la abundancia de estas especies. Una vez se estabilizan estos hábitats, aumenta la abundancia.

Se ha demostrado que especies como *Ae. fulvus*, *Ae. scapularis*, *Ae. serratus* s.l., *Ps. albipes*, *Ps. ferox*, *Ps. cyanescens* (Coquillett), *Ps. cilipes* (Fabricius) y *Ps. lineata* (Humboldt) son especies

Tabla III. Riqueza de especies, abundancia, Índices de Diversidad de Shannon, Números de Hill (N1, N2) y Equidad de Alatalo en comunidades de Ocamo y Mavaca, Municipio Alto Orinoco, estado Amazonas, Venezuela.

Comunidades	Riqueza	Abundancia	Shannon-Weaver (H)	N1	N2	F2,1 Alatalo
Carlitos	18	688	1,68	5,35	4,01	0,69
Santa María de los Guaicas	18	561	1,75	5,75	3,91	0,61
Iyewei-theri	17	490	1,51	4,54	2,72	0,49
Clavotheri	16	327	1,68	5,37	3,42	0,55
Lechoza	16	446	1,33	3,79	2,35	0,48
Mario	16	647	1,62	5,06	3,31	0,57
San Benito	15	357	1,59	4,88	3,33	0,6
Shashanawe	14	239	1,69	5,42	3,81	0,63
Hishinowei-theri	12	309	1,14	3,11	1,80	0,38
Yohoope	12	303	1,16	3,18	1,97	0,44
Hatakoa	9	29	1,73	5,64	4,10	0,67
Kashorawe	7	115	1,47	4,33	3,39	0,72
Mosho	5	22	1,18	3,27	2,60	0,71
Motorema	5	22	1,25	3,50	2,88	0,75
Shakita	4	10	1,17	3,22	2,78	0,80
Kopariwe	3	35	0,51	1,66	1,34	0,52
Purima	3	22	0,76	2,13	1,85	0,75
Warapana	2	13	0,27	1,31	1,17	0,53

que se encuentran en áreas boscosas (Alfonzo *et al.*, 2005; Guimaraes *et al.*, 2000; Lutz & Lourenço de Oliveira, 1996; Méndez *et al.*, 2001) donde los principales criaderos disponibles son pozos y charcas. Esto corroboraría las fluctuaciones observadas en la abundancia de hembras adultas de *Ae. fulvus*, las cuales muestran correlaciones negativas significativas tanto durante el año 1999 como en el año 2000 con la precipitación (Figs. 2 y 3A). Así tenemos que casi simultáneamente con el incremento de la precipitación se registra la disminución de la abundancia, siendo más evidente durante Febrero 1999, Enero y Mayo 2000.

En cuanto a *Ma. titillans*, la especie de culicino más abundante en el área de estudio (48%), se encuentra en diversidad de criaderos tipo lagunas con plantas acuáticas flotantes (e.g. *Pistia stratiotes*) en áreas abiertas (Alfonzo *et al.*, 2005). Estudios realizados en el área de Ocamo sobre caracterización de criaderos de anofelinos (Rejmankova *et al.*, 1999; Rubio-Palis *et al.*, 2005) mostraron que alrededor de

las comunidades de Ocamo hay grandes lagunas que se forman por desborde de los ríos Orinoco y Ocamo. Estas lagunas están expuestas al sol en áreas abiertas rodeadas de gramíneas, con abundante vegetación sumergida como *Mayaca* sp. y *Utricularia* sp. y plantas flotantes como *Pistia stratiotes*, las cuales son criaderos explotados por *Ma. titillans*. Esto se evidencia al observar por separado para cada año de estudio el patrón relativamente estable de la precipitación durante el año 1999 lo cual contribuye a la estabilidad del criadero, mientras que las marcadas fluctuaciones de la precipitación registradas durante el año 2000 se corresponden con incrementos y descensos en la abundancia de hembras adultas de *Ma. titillans*. No obstante, esta relación no fue significativa ($P > 0,05$) y se mantienen abundancias importantes de esta especie, debido posiblemente al registro de niveles altos del río Orinoco (Figs. 2 y 3B) que contribuyeron a la permanencia de los cuerpos de agua.

Es interesante señalar que tanto especies como *Ma. titillans* que se encuentran en áreas abiertas

como *Ae. fulvus* que se encuentra en el bosque, vuelan en horario nocturno en busca de fuentes de comidas sanguíneas ubicadas dentro de viviendas, lo cual se corresponde con lo encontrado por Méndez *et al.* (2001) en el Catatumbo (estado Zulia) siendo los principales candidatos a exportadores del virus de VEEV u otros virus a zonas abiertas.

Cabe resaltar la presencia de una especie netamente urbana como *Cx. quinquefasciatus* Say en un área selvática de difícil acceso, si bien en cantidades muy bajas, en varias comunidades (Tabla II) lo que evidencia su reciente introducción desde zonas urbanas mediante mecanismos que resultaría interesante investigar por técnicas genético-poblacionales. La introducción de esta especie podría incrementar la transmisión de filarias que puedan existir en forma enzoótica. La utilización de otros métodos de capturas como atractantes humanos, podrían arrojar abundancias mayores para esta especie. Cabe señalar que estudios realizados en un caserío cercano a la ciudad de Manaos, estado Amazonas, Brasil, reportan la presencia de *Cx. quinquefasciatus* tanto en el intradomicilio como en el peridomicilio y el bosque próximo (Barbosa *et al.*, 2008), evidenciándose que esta especie coloniza zonas boscosas próximas a centros urbanos. Estos resultados contrastan con los hallazgos de Hutchings *et al.* (2002; 2005) en áreas remotas del estado Amazonas de Brasil. En efecto, estos autores no capturaron esta especie utilizando diversos métodos entre 1993 y 1996 en el Parque Nacional Jaú (Hutchings *et al.*, 2005) ni en Querari, puesto fronterizo con Colombia.

En general se observa una alta diversidad de especies de culicinos en el Alto Orinoco (Tabla I), lo cual contrasta con la baja diversidad de anofelinos capturados durante el estudio. Sin embargo, el número de anofelinos capturados fue aproximadamente 80 veces superior. En efecto, se capturaron un total de 332.355 anofelinos, de los cuales 99,9% se identificaron como *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root; el 0,01% restantes estaba integrado por *An. (Nys.) triannulatus* (Neiva & Pinto), *An. (Nys.) oswaldoi* (Peryassú) *sensu lato*, *An. (Nys.) strodei* Root, *An. (Nys.) benarrochi* Gabaldon, Cova García & López y *An. (Anopheles) mattogrossensis* (Lutz & Neiva) (Rubio-Palis *et al.*, 2000).

La riqueza y abundancia de especies resultó diferente en cada comunidad, siendo mayor en Santa

María de los Guaiacas y Carlitos (Tabla III). Si bien, estas diferencias entre comunidades posiblemente es debida a diferencias en el esfuerzo de captura, lo cual se evidencia al contrastar los valores del estimador de riqueza Chao 1 (Tabla II). En términos de diversidad, se observa que comunidades con igual esfuerzo de capturas reportan valores de diversidad similares, aquellas comunidades con bajo esfuerzo de muestreo reportan valores bajos de diversidad (Tabla III). Varios factores son relevantes al considerar diferencias en la diversidad esperada. La disponibilidad de criaderos y la oferta de micro hábitats disponibles ofrecen nichos favorables para diversidades altas de mosquitos (Yanoviak, 2001). En un sentido amplio, las comunidades no presentan diferencias relevantes desde un punto de vista estructural de conformación vegetal, así las especies reportadas en las comunidades presentan requerimientos ecológicos similares. Así mismo, la fauna de culicinos registrada, corresponde a muestreos puntuales dirigidos a capturas de mosquitos adultos, lo cual restringe aquellas especies con comportamiento ecológicos estenoicos (fauna asociada a fitotelmata). Esto podría explicar la baja abundancia encontradas en este grupo funcional que son poco atraídos a las trampas de luz y algunos al attractante humano o que son de hábitos diurnos y se encuentran en el bosque como los sabetinos..

Sin embargo, al comparar la composición de especies entre las comunidades con igual esfuerzo de captura, se muestra que hay diferencias significativas entre las comunidades de mosquitos (Tabla IV). Estas diferencias están dadas no sólo por la composición sino también por la abundancia relativa de las especies, específicamente el SIMPER revela que la disimilitud entre comunidades es explicada principalmente por las tres especies más abundantes *Ma. titillans*, *Ae. fulvus* y *Cx. spissipes*, las cuales aportaron el 80% para esta diferencia. Es posible que dicha disimilitud se deba a diferencias en la cobertura vegetal y disponibilidad de criaderos en los alrededores de cada comunidad, si bien la distancia entre estas (menor de 2 km) está dentro del rango de vuelo de estas especies (Edman & Bidlingmayer, 1969).

Hasta el presente se han reportado 41 especies de culicinos para el estado Amazonas en Venezuela, pero en comparación con el vecino estado Amazonas de Brasil, esta diversidad es baja. En efecto, capturas realizadas en áreas rurales de dicho estado reportaron 48 especies (Barbosa *et al.*, 2008), mientras que en

bosques primarios el número de especies de culicinos asciende a 119 (Hutchings *et al.*, 2005). Por tanto se considera que todavía es preliminar el conocimiento de la fauna de Culicidae para este importante territorio desde el punto de vista de biodiversidad de especies y su relación biogeográfica, así como la importancia en los ciclos de transmisión de importantes patógenos no estudiados en dicha región. Se requiere de mayores estudios en biodiversidad y ecología mediante estudios longitudinales en el tiempo, así como de la búsqueda de patógenos parasitarios y virales zoonóticos de importancia potencial en salud pública circulantes en sus ciclos naturales.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos que no ha habido entre nosotros conflictos de intereses durante el desarrollo del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A todas las comunidades del Alto Orinoco que participaron y colaboraron durante la realización del estudio. A Ukako, Gerardo y Remi (equipo de entomología yanomami); a Víctor Sánchez, Ramón y Cristóbal Menarez quienes participaron en las actividades de campo. A Tarcisio, Pepito y Joseito (motoristas yanomami). Este estudio fue posible gracias al financiamiento de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental y el Instituto de Biomedicina a través del Proyecto Control de Enfermedades Endémicas, Ministerio de Salud y Asistencia Social-Banco Mundial (PCEE/VEN/021-002).

REFERENCIAS

- Alfonzo D., Grillet M. E., Liria J., Navarro J. C., Weaver S. C. & Barrera R. (2005). Ecological characterization of the aquatic habitats of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in enzootic foci of Venezuelan Equine Encephalitis Virus in western Venezuela. *J. Med. Entomol.* **42**: 278-284.
- Barbosa M. G. V., Fé N. F., Marcião A. H. R., da Silva A. P. T., Monteiro W. M., Guerra M. V. F. *et al.* (2008). Registro de Culicidae de importância epidemiológica na área rural de Manaus, Amazonas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **41**: 658-663.
- Berlin O. G. & Belkin J. N. (1980). Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXVI. Subgenera *Aedinus*, *Tinolestes* and *Anoediopora* of *Culex*. *Contrib. Amer. Ent. Inst.* **17**: 1-104.
- Berti J., Guzmán H, Liria J., González J., Estrada Y. & Pérez E. (2011). Nuevos registros de mosquitos (Diptera: Culicidae) para el estado Bolívar, Venezuela: dos de ellos nuevos para el país. *Bol. Mal. Salud Amb.* **51**: 59-69.
- Clarke K. R. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology.* **18**: 117-143.
- Cova García P., Sutil E. & Rausseo J.A. (1966). *Mosquitos (Culicinos) de Venezuela. Vol. I y II.* Publicaciones del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. Caracas, Venezuela.
- Chavarri L.G. (1995). *Clave fotográfica para hembras de zancudos (Diptera: Culicidae) presentes en Centro América y Panamá.* Instituto Nacional de Biodiversidad. San José, Costa Rica.
- Del Ventura F., Liria J. & Navarro J.C. (2013). Determinación de Áreas de Endemismo en Mosquitos (Diptera: Culicidae) en Venezuela, mediante criterios explícitos de optimización. *Bol. Mal. Salud Amb.* **53**: 165-182.
- Edman J. D. & Bidlingmayer W. L. (1969). Flight capacity of blood-engorged mosquitoes. *Mosq. News.* **29**: 386-392.
- Galindo P. & Srihongse S. (1967). Transmission of arboviruses to hamsters by the bite of naturally infected *Culex (Melanoconion) mosquitoes*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **16**: 525-530.
- Guimarães A. E., Gentile C., Macedo Lopes C. & Pinto de Mello R. (2000). Ecology of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Areas of Serra do Mar State Park, State of São Paulo, Brazil. II - Habitat Distribution. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **95**: 17-28,
- Hammer O., Harper D. A. T. & Ryan P. D. (2001). *PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis.* Paleontologia Electronica. 4(1): 9pp.

- Hill M. O. (1973). Diversity and Evenness: A unifying notation and its consequences. *Ecology*. **54**: 427-432.
- Holdridge L. R. (1979). *Ecología basada en zonas de vida*. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José. Costa Rica.
- Huber O. (1995). Geographical and physical features. pp. 1-51. En: *Flora of the Venezuelan Guayana*. Vol. I. Eds. Berry P.E., Holst B.K. & Yats Kievych K. Missouri Botanical Gardens, St. Louis & Timber Press Portland, Oregon, USA.
- Hutchings R. S. G., Sallum M. A. M. & Ferreira R. L. M. (2002). Culicidae (Diptera: Culicomorpha) da Amazônia Ocidental Brasileira: Querari. *Acta Amaz.* **32**: 109-122.
- Hutchings R. S. G., Sallum M. A. M., Ferreira R. L. M. & Hutchings R. W. (2005). Mosquitoes of the Jaú National Park and their potential importance in Brazilian Amazonia. *Med. Vet. Entomol.* **19**: 428-441.
- Lane J. (1953). *Neotropical Culicidae. Vol. I y II*. Universidad de São Paulo, Brasil.
- Liria J. & Navarro J. C. (2003). *Psorophora (Psorophora) lineata* (Humboldt, 1819) y *Psorophora (Pso.) saeva* Dyar & Knab, 1906 (Diptera: Culicidae). Correcciones en su identificación. *Entomotropica*. **18**: 113-119.
- Luz S. B. & Lourenço de Oliveira R. (1996). Forest culicinae mosquitoes in the environs of Samuel Hydroelectric Plant, State of Rondônia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **91**: 427-432.
- Méndez W., Liria J., Navarro J. C., García C. Z., Freier J. E., Salas R. et al. (2001). Spatial dispersion of adult mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a sylvatic focus of Venezuelan equine encephalitis virus. *J. Med. Entomol.* **38**: 813-821.
- Ministerio del Ambiente y los Recursos Naturales Renovables-MARNR. (1998-2000). Registros diarios, estación climatológica Santa María de los Guaicas, Alto Orinoco, Amazonas. Venezuela.
- Mora Rodríguez J. D. (1988). Distribución geográfica por géneros de la familia Culicidae en Venezuela. *Bol. Dir. Mal. San. Amb.* **38**: 75-82.
- Moreno C. E. (2001). *Métodos para medir la biodiversidad*. M&T-Manuales y tesis SEA, Vol.1 Zaragoza, España.
- Navarro J. C. & Weaver S. C. (2004). Molecular Phylogeny of the Vomerifer and Pedroi Groups in the Spissipes Section of *Culex (Melanoconion)*. *J. Med. Entomol.* **41**: 575-581.
- Navarro J. C., Liria J., Piñango H. & Barrera R. (2007). Biogeographic area relationships in Venezuela: A parsimony analysis of Culicidae-Phytotelmata distribution in National Parks. *Zootaxa*. **1547**: 1-19.
- Reinert J. (1972). Mosquito generic and subgeneric abbreviations (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* **7**: 105-110.
- Rejmanková E., Rubio-Palis Y. & Villegas L. (1999). Larval habitats of anopheline mosquitoes in the Upper Orinoco, Venezuela. *J. Vector Ecol.* **24**: 130-137.
- Rubio-Palis Y., Magris M., Paz R. & Lines J. (2000). Population fluctuations of the malaria vector *Anopheles darlingi* in southern Venezuela. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* **16**: 309.
- Rubio-Palis Y., Menare C., Quinto A., Magris M. & Amarista M. (2005). Caracterización de criaderos de anofelinos (Diptera: Culicidae) vectores de malaria en el Alto Orinoco, Amazonas, Venezuela. *Entomotropica*. **20**: 29-38.
- Rubio-Palis Y. & Zimmerman R. H. (1997). Ecoregional classification of malaria vectors in the neotropics. *J. Med. Entomol.* **34**: 499-510.
- Sallum M. A. M. & Forattini O. P. (1996). Revision of the Spissipes section of *Culex (Melanoconion)* (Diptera: Culicidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **12**: 517-600.
- Suárez O. M., Navarro J. C., Walder R., Montañez H. & Decena C. (1992). Dípteros hematófagos de

- la serranía de Tapirapicó, estado Amazonas. *Acta Biol. Venez.* **14**: 1-6.
- Sutil E. (1980). Enumeración histórica y geográfica de las especies de Culicidae de Venezuela ordenadas según su Taxonomía. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **20**: 1-32.
- Turell M. J., Jones J. W., Sardelis M. R., Dohm D. J., Coleman R. E., Watts D. M. *et al.* (2000). Vector competence of *Peruvian mosquitoes* (Diptera: Culicidae) for epizootic and enzootic strains of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus. *J. Med. Entomol.* **37**: 835-839.
- Walder R., Suárez O. M. & Calisher C. H. (1984). Arboviruses studies in south western Venezuela during 1973-81. II. Isolations and further studies of Venezuelan and Eastern Equine Encephalitis, Una, Itaqi, and Moju viruses. *Am J. Trop. Med. Hyg.* **33**: 483-491.
- Weaver S. C., Ferro C., Barrera R., Boshell J. & Navarro J. C. (2004). Venezuelan Equine Encephalitis. *Ann. Rev. Entomol.* **49**: 141-74.
- Yanoviak S. P. (2001). Predation, resource availability and community structure in Neotropical water-filled tree holes. *Oecologia.* **126**: 125-133.
- Zavortink T. J. (1979). A reclassification of the sabethine genus *Trichoprosopon*. *Mosq. Syst.* **11**: 255-257.

Recibido el 20/05/2014
Aceptado el 20/08/2014

Efecto larvícida de extractos metanólicos obtenidos de semillas y hojas de *Persea americana* (Laurales: Lauraceae) (aguacate) sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)
Larvicide effect of methanolic extracts from seeds and leaves *Persea americana* (Laurales: Lauraceae) (avocado) on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Irma F. Agrela*, Yessika Hidalgo & Flor Herrera

RESUMEN

Aedes aegypti es el principal vector del dengue en el continente americano, una de las arbovirosis de mayor impacto en Venezuela, debido a su alta morbilidad y mortalidad. La ausencia de una vacuna contra este virus ha llevado al uso indiscriminado de insecticidas provocando la resistencia del vector, daños al medio ambiente y reacciones adversas en personas susceptibles. En un esfuerzo por encontrar formas eficaces y asequibles para el control, surge como una alternativa el uso de extractos vegetales que proporcionen menos riesgo ambiental y bajo costo. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto larvícida de extractos metanólicos obtenidos a partir de semillas y hojas de *Persea americana* (aguacate) sobre *Ae. aegypti* [cepas Rockefeller y Mario Briceño Iragorry (MBI)]. El mayor efecto tóxico se observó con el extracto metanólico obtenido a partir de las semillas con 100% de mortalidad a 25 mg/L para la cepa Rockefeller y 50 mg/L para la cepa MBI, 24 horas post-exposición. Las concentraciones letales (CL_{50}) fueron las siguientes: a) extracto metanólico preparado a partir de las semillas CL_{50} = 5,7mg/L para Rockefeller y CL_{50} = 9,9 mg/L para MBI; b) extracto metanólico de las hojas CL_{50} = 22,8mg/L para Rockefeller y para MBI CL_{50} = 26,2 mg/L. Los resultados muestran el efecto tóxico de los extractos metanólicos preparados a partir de la semilla y de la hoja del aguacate, sobre *Ae. aegypti* y sugieren la potencialidad de estos productos como agentes de control químico.

Palabras clave: dengue, *Aedes aegypti*, *Persea americana*, larvicidas, concentración letal.

SUMMARY

Aedes aegypti is the main vector of dengue in the Americas. This disease is one of the most important arboviruses in Venezuela due to the high morbidity and mortality it produces. The absence of a vaccine against this virus has led to the indiscriminate use of insecticides causing vector resistance, environmental damage and adverse reactions in susceptible individuals. The search for effective and inexpensive ways to control dengue has led to the evaluation of plant extracts as a low environmental risk, economical alternative. The aim of this study was to assess the larvicidal effect of methanol extracts obtained from the seeds and leaves of *Persea americana* (avocado) on *Ae. aegypti* [Rockefeller and Mario Briceño Iragorry (MBI) strains]. The methanol extract obtained from the seeds proved to be the most toxic for *Ae. aegypti*, producing 100% mortality 24 hours post-exposure, at concentrations of 25 mg/L (Rockefeller strain) and 50 mg/L (MBI strain). The lethal concentrations (LC_{50}) were: a) methanol seed extract LC_{50} = 5.7 mg/L (Rockefeller strain) and 9.9 mg/L (MBI strain), b) methanol leaf extract LC_{50} = 22.8 mg/L (Rockefeller strain) and 26.2 mg/L (MBI strain). These results demonstrate the toxicity of methanol extracts from avocado seeds and leaves for *Ae. aegypti* and suggest that these products have potential as chemical controls of this vector.

Key words: dengue, *Aedes aegypti*, *Persea americana*, larvicide, lethal concentrations

INTRODUCCIÓN

Pese a los esfuerzos realizados por diferentes entes gubernamentales [Dirección de Epidemiología del Ministerio para el poder popular para la Salud (MPPS), Corporación de Salud (CORPOSALUD), Laboratorio Regional para el Diagnóstico del Dengue y otras

Enfermedades Virales (LARDIDEV)] el dengue sigue siendo la arbovirosis de mayor impacto en la salud de los venezolanos. Para el año 2013 se registró un incremento de 36,4% en los casos de dengue a nivel nacional (63.726 en 2013 vs 46.708 en 2012) mientras que la tasa promedio nacional de incidencia fue 211,3/100.000 habitantes la cual fue superada por 12 estados entre los que figuran

Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Facultad de Ciencias de la Salud, Sede Aragua. Universidad de Carabobo. Maracay, edo. Aragua - Venezuela

*Autor de correspondencia: agrelairma@hotmail.com

los estados Aragua, Carabobo y Guárico. Se mantiene la circulación de los cuatro serotipos del virus dengue con predominio del serotipo DEN-2 (MPPS, 2013).

Debido a que aún no se cuenta con una vacuna que permita proteger a la población susceptible, el control del mosquito vector continúa siendo la única herramienta eficaz para controlar la transmisión del dengue. En este sentido, los únicos métodos para prevenir y controlar la enfermedad consisten en reducir el contacto hombre-vector, disminuir las poblaciones de mosquitos mediante el uso de insecticidas y reducir el grado de infestación de los posibles criaderos utilizando larvicidas (Rose, 2001); aunque estos métodos de control han demostrado ser eficientes bajo ciertas condiciones; se ha reportado resistencia a los insecticidas organofosforados y piretroides, utilizados para el desarrollo de las estrategias de control antes mencionadas en diferentes partes del mundo (Rodríguez *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2011; Grisales *et al.*, 2013) y además los insecticidas sintéticos pueden ocasionar daños al medio ambiente y a la salud humana (Yang *et al.*, 2002; Chowdhury *et al.*, 2008; Kamaraj *et al.*, 2009).

Productos extraídos a partir de las plantas han mostrado toxicidad frente a adultos y larvas de mosquitos pertenecientes a la familia Culicidae (Pérez y Iannacone, 2004; Bagavan *et al.*, 2009; Raghavendra *et al.*, 2009; Kamaraj *et al.*, 2010; Madhu *et al.*, 2010; Kamaraj *et al.*, 2011) y por ende tienen gran potencial para ser utilizados como herramientas en el control de especies de mosquitos vectores de enfermedades. Entre ellos destacan los extractos preparados a partir de *Annona squamosa* (Annonaceae, guanábana) (George & Vincent, 2005; Kihampa *et al.*, 2009; Kamaraj *et al.*, 2010, 2011) los cuales han demostrado importantes efectos citotóxicos sobre las células epiteliales del intestino medio de *Aedes aegypti* (Costa *et al.*, 2014). Así mismo, extractos crudos y aceites esenciales obtenidos a partir de las hojas de chan (*Hyptis suaveolens*, Lamiaceae) han demostrado actividades repelentes e insecticidas sobre mosquitos (Jaenson *et al.*, 2006; Conti *et al.*, 2012; Kovendan *et al.*, 2012).

El aguacate (*Persea americana*, Miller) es una planta originaria de América Central, de un elevado valor nutricional gracias a su alto contenido de proteínas y escaso contenido de colesterol. Desde el punto de vista médico, los productos derivados de esta planta tienen efectos potenciales contra parásitos

y bacterias (Abe *et al.*, 2005; Dike *et al.*, 2012; Jiménez-Arellanes *et al.*, 2013), efectos antioxidantes (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011) y anticancerígenos (D'Ambrosio *et al.*, 2011); así mismo, se ha señalado que los extractos acuosos obtenidos de la semilla del aguacate reducen la presión arterial (Ojewole *et al.*, 2007) y disminuyen los niveles de colesterol (López *et al.*, 1996) y glucosa en sangre (Lima *et al.*, 2012).

Por otra parte, se ha descrito la actividad larvicida de extractos obtenidos a partir de la semilla del aguacate sobre larvas de *Ae. aegypti* (Oberlies *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2009); así mismo, está documentado que extractos obtenidos a partir de este producto ocasionan daños histológicos en el intestino medio de larvas de *Anopheles gambiae*, principal vector de la malaria en África (Koua *et al.*, 1998).

El propósito de la presente investigación fue evaluar el efecto larvicida de extractos metanólicos obtenidos a partir de la hoja y de la semilla del aguacate (*Persea americana*, variedad criolla) sobre larvas de *Ae. aegypti*.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Obtención del material vegetal

Las hojas y las semillas de aguacate fueron donadas por el Sr. Eduardo Valera, propietario del Fundo Valera ubicado en la Carretera Nacional casa 3, Valle del Tucutunemo, Villa de Cura, estado Aragua. Tanto las hojas como las semillas fueron lavadas con agua corriente y entonces se dejó secar a temperatura ambiente durante, aproximadamente, una semana. Una vez seco el material se procedió a pulverizar las hojas y las semillas por separado, el polvo obtenido de cada parte de la planta se colocó a temperatura ambiente durante cuatro días en metanol a razón de 30 g de material vegetal por cada 150 mL de metanol, agitando dos veces al día. Una vez concluido el periodo de maceración se procedió a filtrar usando papel de filtro (Whatman N° 1) y posteriormente se evaporó completamente el alcohol en baño de María a 50°C. El residuo obtenido fue pesado y disuelto completamente en 20 mL de agua destilada. Una vez disuelto el residuo se procedió a realizar diluciones seriadas y cada una de las diluciones fue utilizada en los bioensayos para comprobar la actividad larvicida de los extractos sobre larvas de *Ae. aegypti*.

Larvas

Para la evaluación de la actividad larvicida de los extractos obtenidos se utilizaron larvas de tercer estadio tardío y cuarto estadio temprano pertenecientes a la especie *Ae. aegypti* obtenidas por el “Laboratorio de Resistencia a Insecticidas de la Dirección de Salud Ambiental del Ministerio del Poder Popular para la Salud”; Maracay en colonias establecidas a partir de material colectado en la comunidad del Sector 4 de Caña de Azúcar, Municipio Mario Briceño Iragorry, Estado Aragua (denominada en adelante MBI) y como cepa de referencia se utilizó la cepa Rockefeller. Los ejemplares fueron mantenidos bajo condiciones estándares y a una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa de $65 \pm 5\%$ y fotoperiodo de 12 horas.

Evaluación de la actividad larvicida

Los bioensayos se realizaron siguiendo las recomendaciones de WHO (1981). Para el extracto obtenido de la semilla se probaron ocho diluciones (2-50 mg/L) mientras que para el extracto obtenido a partir de la hoja se probaron seis diluciones (10-120 mg/L) y por cada dilución se realizaron cinco réplicas. Como control o testigo se usaron cinco vasos a los cuales no se agregó el extracto. De cada experimento se realizaron tres repeticiones.

Las larvas fueron colocadas en una bandeja plástica con agua de chorro y de allí se seleccionaron al azar grupos de 20 larvas que fueron colocadas en vasos plásticos de 150 mL, a los cuales se añadió previamente 90 mL de agua corriente y 10 mL de cada una de las diluciones del extracto a ensayar (Volumen final=100 mL). Todos los grupos se mantuvieron a una temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Los vasos controles de la prueba fueron preparados con 100 mL de agua de chorro y en ellos se colocó 20 larvas por vaso.

Evaluación de la mortalidad larvaria

Las larvas fueron expuestas a los extractos en estudio durante 24 horas y éstas se consideraron muertas cuando no reaccionaban al ser tocadas con un puntero romo en la región cervical. Los ensayos se consideraron inválidos si más del 10% de las larvas empupaban y/o si la mortalidad de los controles superaba el 10% (WHO, 1981).

Análisis estadístico

Tanto las curvas dosis-respuesta como las rectas probit-logaritmo y pendientes para hallar los

niveles de susceptibilidad, se realizaron mediante el programa Excel for Windows 2007. Así mismo, las concentraciones letales 50 (CL_{50}) y sus respectivos límites de confianza fueron calculados a partir de los datos de mortalidad que se obtuvieron en las pruebas con ambos extractos metanólicos en forma manual según Finney (1971). Finalmente, las diferencias entre las dos cepas de *Ae. aegypti* al efecto de los extractos de *P. americana* fue evaluada mediante un análisis de varianza de dos vías y las diferencias significativas entre los tratamientos y/o entre las cepas de *Ae. aegypti* fueron evaluadas usando la prueba de Tukey.

RESULTADOS

Con el extracto obtenido a partir de las semilla se obtuvo 100% de mortalidad al exponer las larvas durante 24 horas a 25 mg/L y a 50 mg/L para las larvas pertenecientes a la cepa Rockefeller y MBI, respectivamente; mientras que al usar el extracto obtenido a partir de las hojas se necesitó exponer las larvas de ambas cepas a 120 mg/L durante el mismo periodo para lograr el 100% de mortalidad (Fig. 1). En todos los casos la mortalidad en el grupo control (larvas no expuestas pertenecientes a cada cepa) fue igual a cero.

Las concentraciones letales 50 (CL_{50}) y sus límites de confianza ($CL_{0.95}$) muestran que la efectividad del extracto obtenido a partir de la semilla del aguacate es superior a la efectividad observada con el extracto obtenido a partir de la hoja. Así mismo, se observó que la CL_{50} es menor para la cepa Rockefeller (cepa de referencia) que para la cepa MBI (cepa de campo) frente a ambos extractos (Tabla I).

La Fig. 2 muestra la mortalidad larvaria en unidades probit en relación con el logaritmo de sus respectivas concentraciones después de 24 horas de exposición al extracto metanólico obtenido a partir de la semilla y de la hoja de *P. americana*. Las gráficas muestran un patrón de respuesta relativamente homogéneo de ambas cepas de *Ae. aegypti* frente a cada extracto, lo cual puede observarse en los valores obtenidos para las pendientes de las rectas de regresión (Tabla I).

Las larvas muertas por el efecto tóxico del extracto obtenido a partir de la semilla y de la hoja del aguacate mostraron abultamiento del tórax y ennegrecimiento de su cuerpo (Fig. 3).

Fig. 1. Curva dosis respuesta para larvas de *Aedes aegypti* a diferentes concentraciones del extracto metanólico obtenido a partir de la semilla (A) y de la hoja (B) del aguacate (*Persea americana*) después de 24 horas de exposición.

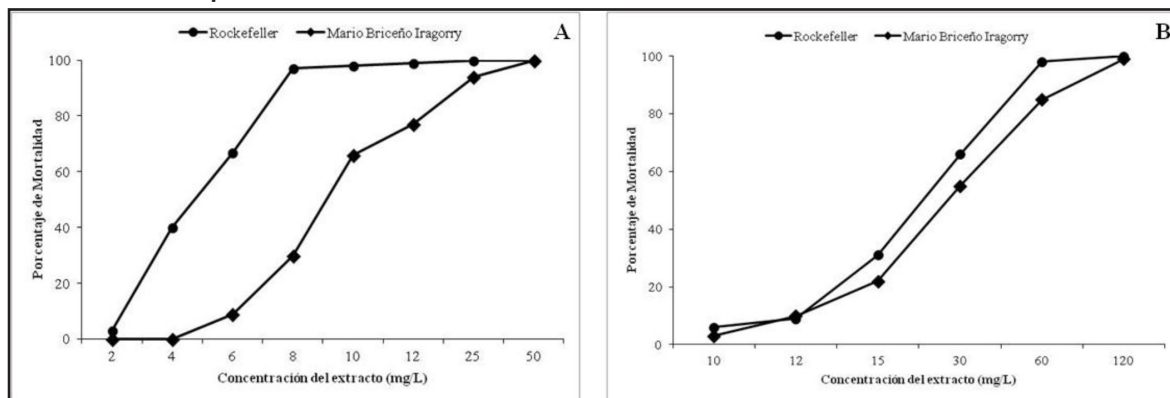


Tabla I. Concentraciones letales 50 (CL_{50}), límites de confianza ($CL_{0,95}$), rectas de regresión y valor de r^2 obtenidas para los extractos ensayados.

Cepa de <i>Aedes aegypti</i>	Semilla	Hoja
Rockefeller	$CL_{50} = 5,7 \text{ mg/L}$	$CL_{50} = 22,8 \text{ mg/L}$
	$CL_{0,95} = 4,5-7,1 \text{ mg/L}$	$CL_{0,95} = 13,7-37,9 \text{ mg/L}$
	$y = 6,196x + 1,073$	$y = 4,466x - 1,063$
	$r^2 = 0,97$	$r^2 = 0,99$
Mario Briceño Irigaray	$CL_{50} = 9,9 \text{ mg/L}$	$CL_{50} = 26,2 \text{ mg/L}$
	$CL_{0,95} = 5,9-16,5 \text{ mg/L}$	$CL_{0,95} = 15,2-45,3 \text{ mg/L}$
	$y = 4,448x + 0,571$	$y = 4,172x - 0,917$
	$r^2 = 0,96$	$r^2 = 0,97$

Fig. 2. Mortalidad Probit versus el logaritmo de las concentraciones del extracto metanólico obtenido a partir de la semilla (A) y de la hoja (B) del aguacate (*Persea americana*) sobre larvas de *Aedes aegypti* después de 24 horas de exposición.

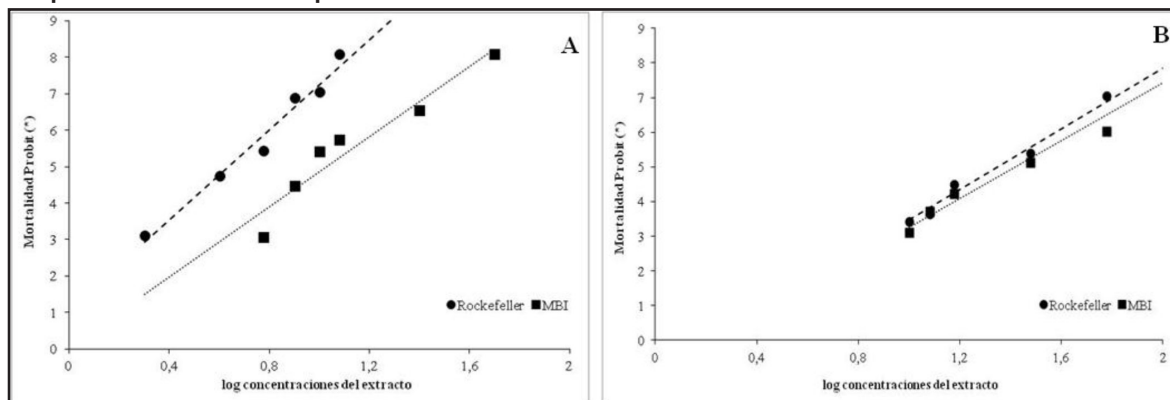
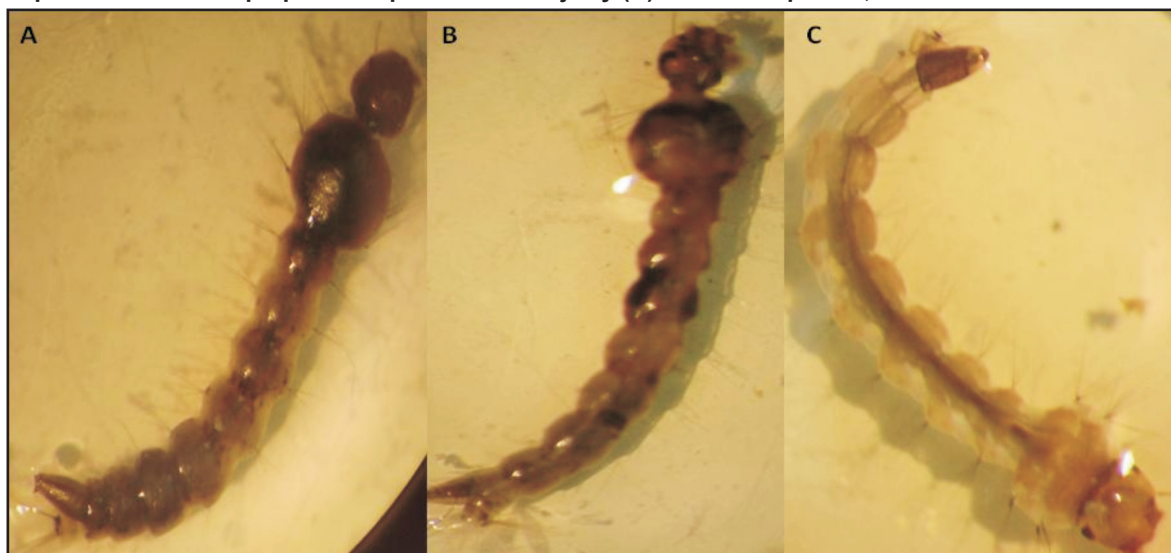


Fig. 3. Larvas de *Aedes aegypti* después de 24 horas de exposición al extracto metanólico preparado a partir de *Persea americana*. (A) larva expuesta al extracto preparado a partir de las semillas, (B) larva expuesta al extracto preparado a partir de las hojas y (C) larva no expuesta, control. Aumento 16x.



El análisis de varianza en el que se evaluó el efecto de cada variable y su interacción demostró diferencias significativas en la mortalidad ocasionada por el extracto obtenido a partir de las semillas y de las hojas pero no para los valores de mortalidad observada para ambas cepas durante su exposición al extracto metanólico obtenido a partir de la hoja (Tabla II).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que ambos extractos tienen efecto letal sobre larvas de *Ae.*

aegypti; no obstante, el efecto larvicida del extracto metanólico obtenido a partir de la semilla es superior al efecto letal ocasionado por el extracto metanólico obtenido a partir de la hoja; esto, relacionado con el hecho de que la semilla es un órgano de reserva y donde, muy probablemente, se concentren los principios activos capaces de causar toxicidad sobre las larvas en comparación con la hoja que mostró menor toxicidad (Bobadilla *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos con el extracto metanólico preparado a partir de la semilla son consistentes con los obtenidos por Ramos *et al.* (2007),

Tabla II. Análisis de varianza para la evaluación de la mortalidad ocasionada por el extracto metanólico obtenido a partir de semillas y hojas de *Persea americana* sobre *Aedes aegypti*.

Semilla		
Fuente de Variación	F	p
Cepa de <i>Aedes</i> (A)	771,75	0,0001*
Concentración del extracto de la semilla (B)	657,58	0,0001*
A*B	74,68	0,0001*
Hoja		
Fuente de Variación	F	p
Cepa de <i>Aedes</i> (A)	1,66	0,21
Concentración del extracto de la hoja (B)	53,36	0,0001*
A*B	0,27	0,923

Significativo al nivel de $P \leq 0,05$

y Leite *et al.* (2009), quienes también observaron el efecto tóxico de un extracto metanólico obtenidos a partir de la semilla de *P. americana*, aunque la CL_{50} obtenida por ellos fue mucho mayor que la obtenida en este estudio. Las diferencias observadas en la respuesta inducida por fitoquímicos sobre una especie particular de mosquito pueden estar influida por una serie de factores que incluyen la época de recolección, la variedad empleada y el origen geográfico de la planta; así como también aspectos relacionados con la población o cepa de mosquito que se estudió y el método utilizado para evaluar la susceptibilidad del vector.

Durante el desarrollo del estudio se observó que la cepa Rockefeller es más sensible al efecto tóxico de ambos extractos; esto, probablemente se deba al hecho de ser una cepa de laboratorio no expuesta a los productos usados en los programas de control, los cuales pueden generar resistencia cruzada. Así mismo, a partir del valor de las pendientes obtenidas en las rectas de regresión se deduce que ambas cepas mostraron homogeneidad en su respuesta frente a ambos productos.

Para las condiciones en las que se llevó a cabo los ensayos, el análisis estadístico de los resultados demostró que el efecto tóxico del extracto obtenido a partir de la semilla depende tanto de la cepa utilizada como de la dosis a la cual fueron expuestas las larvas; sin embargo, el efecto tóxico del extracto preparado con la hoja del aguacate depende únicamente de la concentración empleada. Estos datos sugieren que el extracto obtenido a partir de la hoja es menos tóxico y afecta por igual a ambas cepas; por el contrario, el extracto preparado con la semilla del aguacate mostró efecto tóxico a concentraciones más baja y afectó de manera más significativa a la cepa de laboratorio.

A pesar de que el extracto metanólico obtenido a partir de la hoja de *P. americana*, resultó ser menos eficiente que el obtenido a partir de la semilla; que se tenga conocimiento, es la primera vez que se evalúa el potencial larvicida de esta parte de la planta y los resultados obtenidos sugieren que la hoja de la planta del aguacate también poseen compuestos químicos con actividad larvicida pero, probablemente en menor concentración.

Koua *et al.* (1998), describieron que extractos acuosos de *P. americana* tienen importantes

efectos histopatológicos sobre el intestino de *An. gambiae*; es posible que los extractos evaluados durante el desarrollo de esta investigación ocasionen también daños importantes sobre el intestino de *Ae. aegypti* los cuales podrían explicar nuestras observaciones con respecto al abultamiento del tórax y ennegrecimiento del cuerpo de las larvas muertas por el efecto tóxico de los extractos.

Finalmente, aunque durante la realización de este estudio no se realizó una evaluación fitoquímica a fin de conocer los metabolitos secundarios presentes en los extractos evaluados; otros investigadores han señalado la presencia de esteroides, triterpenos, sesquiterpenlactonas y ácidos grasos tales como 1, 2, 4 trihidroxi-nonadecano y el 1, 2, 4 trihidroxi-heptadecano (Oberlies *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 2007) en los extractos obtenidos a partir de la semilla de aguacate. De acuerdo con Ramos *et al.* (2007), la actividad larvicida está relacionada con triterpenos y sesquiterpenlactonas presentes en el extracto metanólico obtenido a partir de la semilla de *P. americana*; sin embargo, es probable que la actividad larvicida se deba a la combinación exacta de los diferentes componentes presentes en los extractos obtenidos a partir de la planta más que a un compuesto en particular.

Por lo antes expuesto, se concluye que los extractos obtenidos a partir de la semilla y la hoja del aguacate representan una posible alternativa para el control de *Ae. aegypti*, el principal vector del dengue en las Américas.

AGRADECIMIENTOS

Al Sr. Eduardo Valera por donar el material vegetal con el cual se realizaron los ensayos aquí descritos. Al Sr. Jesús González y a la Economista Karen Flores del Laboratorio de Resistencia a Insecticidas de la Dirección de Salud Ambiental del Ministerio del Poder Popular para la Salud, por facilitar el material biológico utilizado durante el desarrollo de estos ensayos. A la Dra. Yasmín Rubio-Palis por la revisión del manuscrito. La ejecución de este trabajo de investigación fue posible gracias al financiamiento del Fondo Nacional para la Ciencia, Investigación y Tecnología (FONACIT) a través de Misión Ciencia, Sub-proyecto 2008000911-1.

REFERENCIAS

- Abe F., Nagafuji S., Okawa M., Kinjo J., Akahane H., Ogura T., Martinez-Alfaro M. A. & Reyes-Chilpa R. (2005). Trypanocidal constituents in plants 5. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in the seeds of *Persea americana*. *Biol. Pharm. Bull.* **28**: 1314-1317.
- Bagavan A., Kamaraj C., Rahuman A. A., Elango G., Zahir A. A. & Pandiyan G. (2009) Evaluation of larvicidal and nymphicidal potential of plant extracts against *Anopheles subpictus* Grassi, *Culex tritaeniorhynchus* Giles and *Aphis gossypii* Glover. *Parasitol. Res.* **104**: 1109-1117.
- Bobadilla M., Zavala F., Sisniegas M., Zavaleta G., Mostacero J. & Taramona L. (2005). Evaluación larvica de suspensiones de *Annona muricata* Linnaeus “guanábana” sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae). *Rev. Peru. Biol.* **12**: 142-152.
- Chowdhury N., Ghosh A. & Chandra G. (2008). *Mosquito larvicidal activities of Solanum villosum berry extract against the dengue vector Stegomyia aegypti*. *BMC Complement. Altern. Med.* Documento en línea. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1472-6882-8-10>. [Consultado: 2013, Septiembre, 20]
- Conti B., Benelli G., Flamini G., Cioni P.L., Profeti R., Ceccarini L., Macchia M. & Canale A. (2012). Larvicidal and repellent activity of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) essential oil against the mosquito *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* **110**: 2013-2021.
- Costa M. S., Cossolin J. F., Pereira M. J., Sant'Ana A. E., Lima M. D., Zanuncio J. C. & Serrão J. E. (2014). *Larvicidal and cytotoxic potential of squamocin on the midgut of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*. *Toxins.* **6**: 1169-1176. Documento en línea. Disponible en: <http://www.mdpi.com/journal/toxins6041169> [Consultado: 2014, Septiembre, 28]
- D'Ambrosio S. M., Han C., Pan L., Kinghorn A. D. & Ding H. (2011). Aliphatic acetogenin constituents of avocado fruits inhibit human oral cancer cell proliferation by targeting the EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK1/2 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **409**: 465-469.
- Dike I. P., Obembe O. O. & Adebisi F. E. (2012). Ethnobotanical survey for potential anti-malarial plants in south-western Nigeria. *J. Ethnopharmacol.* **144**: 618-626.
- Finney D. J. (1971). *Probit Analysis*. 3º ed. Cambridge, England. University Press Cambridge,
- George S. & Vincent S. (2005). Comparative efficacy of *Annona squamosa* Linn. and *Pongamia glabra* Vent. to *Azadirachta indica* A. juss against mosquitoes. *J. Vector Borne Dis.* **42**: 159-163.
- Gómez A., Seccacini E., Zerba E., & Licastro S. (2011). Comparison of the insecticide susceptibilities of laboratory strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **106**: 993-996.
- Grisales N., Poupardin R., Gomez S., Fonseca-Gonzalez I., Ranson H. & Lenhart A. (2013). *Temephos resistance in Aedes aegypti in Colombia compromises dengue vector control*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**: e2438. Documento en línea. Disponible en: <http://www.plosntds.org> [Consultado: 2013, Septiembre, 15]
- Jaenson T. G., Pålsson K. & Borg-Karlson A. K. (2006). Evaluation of extracts and oils of mosquito (Diptera: Culicidae) repellent plants from Sweden and Guinea-Bissau. *J. Med. Entomol.* **43**: 113-119.
- Jiménez-Arellanes A., Luna-Herrera J., Ruiz-Nicolás R., Cornejo-Garrido J., Tapia A. & Yépez-Mulia L. (2013). *Antiprotozoal and antimycobacterial activities of Persea americana seeds*. *BMC Complement. Altern. Med.* **13**: 109. Documento en línea. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/13/109> [Consultado: 2013, Agosto, 18]
- Kamaraj C., Bagavan A., Rahuman A. A., Zahir A. A., Elango G. & Padiyan G. (2009). Larvicidal potencial of medical plant extracts against *Anopheles subpictus* Grassi and *Culex tritaeniorhynchus* Giles (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* **104**: 1163-1171.

- Kamaraj C., Abdul Rahman A., Bagavan A., Abdur Zahir A., Elango G., Kandan P., Rajakumar G., Marimuthu S. & Santhoshkumar T. (2010). Larvicidal efficacy of medicinal plant extracts against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Trop Biomed.* **27**: 211-219.
- Kamaraj C., Bagavan A., Elango G., Zahir A. A., Rajakumar G., Marimuthu S., Santhoshkumar T. & Rahuman A. A. (2011). Larvicidal activity of medicinal plant extracts against *Anopheles subpictus* & *Culex tritaeniorhynchus*. *Indian J. Med. Res.* **134**: 101-106.
- Kihampa C., Joseph C. C., Nkunya M. H., Magesa S. M., Hassanali A., Heydenreich M. & Kleinpeter E. (2009). Larvicidal and IGR activity of extract of Tanzanian plants against malaria vector mosquitoes. *J. Vector Borne Dis.* **46**: 145-152.
- Koua H. K., Han S. H. & d'Almeida M. A. (1998). Histopathology of *Anopheles gambiae* s.l. Giles, 1902 (Diptera, Culicidae) subjected to the larvicidal activity of the aqueous extract of *Persea americana* Miller, 1768 (Lauraceae). *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **91**: 252-256.
- Kovendan K., Murugan K., Panneerselvam C., Mahesh Kumar P., Amerasan D., Subramaniam J., Vincent S. & Barnard D. R. (2012). Laboratory and field evaluation of medicinal plant extracts against filarial vector, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* **110**: 2105-2115.
- Leite J. J., Brito E. H., Cordeiro R. A., Brilhante R. S., Sidrim J. J., Bertini L. M., Morais S. M. & Rocha M. F. (2009). Chemical composition, toxicity and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **42**: 110-113.
- Lima C. R., Vasconcelos C. F., Costa-Silva J. H., Maranhão C. A., Costa J., Batista T. M., Carneiro E. M., Soares L. A., Ferreira F. & Wanderley A. G. (2012). Anti-diabetic activity of extract from *Persea americana* Mill. leaf via the activation of protein kinase B (PKB/Akt) in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* **141**: 517-525.
- Lima E. P., Paiva M. H., de Araújo A. P., da Silva E. V., da Silva U. M., de Oliveira L. N., et al. (2011). *Insecticide resistance in Aedes aegypti populations from Ceará, Brazil*. Parasit. Vectors. **4**: 5. Documento en línea. Disponible en: <http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/5> [Consultado: 2013, Septiembre, 15]
- López R., Frati A. C., Hernández B. C., Cervantes S., Hernández M. H., Juárez C. & Morán S. (1996). Monounsaturated fatty acid (avocado) rich diet for mild hypercholesterolemia. *Arch. Med. Res.* **27**: 519-523.
- Madhu S. K., Shaukath A. K. & Vijayan V. A. (2010). Efficacy of bioactive compounds from Curcuma aromatica against mosquito larvae. *Acta Trop.* **113**: 7-11.
- MPPS (2013). *Boletín epidemiológico N° 52*. Documento en línea. Disponible en: http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=35:2013&Itemid=915 [Consultado: 2014, Febrero, 20]
- Oberlies N. H., Rogers L. L., Martin J. M. & McLaughlin J. L. (1998). Cytotoxic and insecticidal constituents of unripe fruit of *Persea americana*. *J. Nat. Prod.* **61**: 781-785.
- Ojewole J. A., Kamadyaapa D. R., Gondwe M. M., Moodley K. & Musabayane C. T. (2007). Cardiovascular effects of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (avocado) aqueous leaf extract in experimental animals. *Cardiovasc. J. Afr.* **18**: 69-76.
- Peréz D. & Iannaccone J. (2004). Efecto insecticida de sachá yoco (*Paullinia clavifera* var. bullata Simpson) (Sapindaceae) y oreja de tigre (*Tradescantia zebrina* Hort ex Bosse) (Commelinaceae) en el control de *Anopheles benarrochi* Gabaldon, Cova García y López, 1941, principal vector de malaria en Ucayali, Perú. *Ecol. Apl.* **3**: 64-72.
- Raghavendra K., Singh S. P., Subbarao S. K. & Dash A. P. (2009). Laboratory studies on mosquito larvicidal efficacy of aqueous & hexane extracts of dried fruit of *Solanum nigrum* Linn. *Indian J. Med. Res.* **130**: 74-77.

- Ramos F., Oranday A., Rodríguez M. L., Verdes M. J., Flores A. & Ponce G. (2007). Efecto larvicida del extracto de hueso de *Persea americana* var. Hass en *Aedes aegypti* (L.). *Ciencia UANL*. **10**: 25-28.
- Rodríguez M. M., Bisset J. A. & Fernández D. (2007) Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from some Latin American countries. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **23**: 420-429.
- Rodríguez-Carpena J. G., Morcuende D., Andrade M. J., Kylli P. & Estévez M. (2011). Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *J. Agric. Food Chem.* **59**: 5625-5635.
- Rose R. (2001). Pesticide and Public Health: Integrated Methods of Mosquito Management. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 17-23.
- WHO (1981). *Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides*. WHO/VBC/81.807 Geneva: World Health Organization p.7
- Yang Y. C., Lee S. G., Lee H. K., Kim M. K., Lee S. H. & Lee H. S. (2002). A piperidine amide extracted from *Piper longum* L. fruit shows activity against *Aedes aegypti* mosquito larvae. *J. Agric. Food Chem.* **5**: 3765-3767.

Recibido el 18/05/2012
Aceptado el 09/10/2014

Efecto del regulador de crecimiento pyriproxyfen sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) de La Pedrera, Maracay, estado Aragua, Venezuela

Effect of the growth regulator pyriproxyfen on Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) from La Pedrera, Maracay, Aragua, Venezuela

Gianna Martiradonna Ochipinti^{1*}, Jesús Berti¹, Luis Antonio Guerra¹, Marlene Salazar¹, Carmen Zuleima Escobar¹ & José Ángel Gómez¹

RESUMEN

Pyriproxyfen es un análogo sintético de la hormona juvenil ampliamente usado para el control de mosquitos. Esta investigación describe bioensayos realizados en condiciones de laboratorio con una formulación granulada del producto (Sumilarv G-0,5 %), utilizando larvas del IV instar temprano de *Aedes aegypti*. Se realizaron estos bioensayos con el fin de determinar su eficacia y actividad residual a las dosis de 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 y 0,05 ppm sobre larvas *Aedes aegypti* de las cepas La Pedrera y Rockefeller de referencia; las evaluaciones fueron realizadas a 1, 7, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 días después del tratamiento. Los resultados evidenciaron que especímenes tratados, presentaron malformaciones que afectaron su desarrollo y causaron la muerte de los individuos. Fue calculado el porcentaje de mortalidad de larvas, pupas y adultos, asimismo el porcentaje de inhibición de emergencia de adultos. La media aritmética para el porcentaje de mortalidad (% M) en la cepa Rockefeller fue de 76,83 % y para la cepa La Pedrera de 65,37 %. Para el porcentaje de inhibición de la emergencia, la cepa Rockefeller presentó media aritmética de 91,80 %; la cual fue significativamente mayor que la de la cepa La Pedrera, que fue igual a 78,08 %. El producto pyriproxyfen mostró eficacia en la inhibición de la emergencia de adultos con las dosis evaluadas, pero para la dosis de 0,01 ppm fue de menor efecto residual. Los resultados demuestran una mayor eficacia y actividad residual del pyriproxyfen a las dosis de 0,04 y 0,05 ppm hasta los 90 días después del tratamiento; en efecto ambas dosis presentaron elevada eficacia y actividad residual prolongada por 90 días, sugiriendo su uso como alternativa en los programas de control de *Aedes aegypti* y para el manejo integrado de otros mosquitos vectores en Venezuela, como es el caso de *Aedes albopictus*.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, análogos de la hormona juvenil, control bioquímico, Chikungunya, Dengue, larvas, mosquitos, pyriproxyfen, reguladores de crecimiento, vectores.

SUMMARY

Pyriproxyfen is a synthetic juvenile hormone analogue widely used in mosquito control. Bioassays were undertaken to evaluate the efficacy and residual activity of a granular formulation of pyriproxyfen (Sumilarv G- 0.5% in granules) against IV instar *Aedes aegypti* (La Pedrera and Rockefeller reference strains), at doses of 0.01; 0.02; 0.03; 0.04 and 0.05 ppm. Larvae were examined 1, 7, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 days after treatment. The treated specimens showed malformations affecting their development, and higher mortality rates compared to the controls. The percentage mortality of larvae, pupae and adults and the percentage of adult emergence inhibition were calculated. Mortality rates (% M) were 76.83 % (Rockefeller strain) and 65.37 % (La Pedrera strain). The percentage of adult emergence inhibition was significantly higher (91.80 %) in the Rockefeller strain than the La Pedrera strain (78.08 %). Pyriproxyfen produced effective inhibition of adult emergence at all the doses evaluated, but with less residual effect at 0.01 ppm. Doses of 0.04 and 0.05 ppm were the most efficient and persistent over the 90 days of the experiment. The results suggest that pyriproxyfen could be used as an alternative in *Aedes aegypti* control strategies and integrated mosquito vector management programs in Venezuela.

Key words: *Aedes aegypti*, biochemical control, Chikungunya, Dengue, emergence inhibition, insect growth regulators, juvenile hormone analogues, larvae, mosquitoes, pyriproxyfen, vectors.

INTRODUCCIÓN

La fiebre del dengue y el dengue hemorrágico son consideradas las arbovirosis más importantes en humanos, por su impacto en Salud Pública (Gubler,

1989). Los virus del dengue pertenecen al género *Flavivirus* (Flaviviridae) del cual se han identificado cuatro serotipos denominados: DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4 (Knudsen, 1993). La enfermedad puede presentarse en un amplio espectro, desde

¹ Servicio Autónomo Instituto de Altos estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon". Ministerio del Poder Popular para la Salud (IAE/MPPS). Centro de Estudio de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA). Maracay, estado Aragua, Venezuela.

*Autor de correspondencia: gimarochi@hotmail.com

formas inaparentes (más frecuentes), hasta las formas más graves y en ocasiones fatales, como son la Fiebre Hemorrágica del Dengue y/o Síndrome de Choque por Dengue (FHD/SCD) (Knudsen, 1993). Se caracteriza por presentar fiebre, erupción, dolor de cabeza, dolor retro-orbital, dolor muscular, dolor articular y en casos más severos hemorragias que en ocasiones pueden llegar a ser fatales (Homéz *et al.*, 1995).

Los virus son perpetuados en un ciclo que incluye al ser humano y al mosquito vector en centros urbanos de clima tropical, reproduciéndose en viviendas humanas o en los alrededores de éstas (Manrique *et al.*, 1998). Las estrategias de manejo integrado de *Aedes aegypti*, están dirigidas a interrumpir este ciclo, considerándose como herramientas principales, el saneamiento ambiental y la educación sanitaria para lograr la participación comunitaria y eliminación de criaderos positivos y potenciales de este vector; sin embargo es necesario un componente de control químico en las operaciones de control, siendo los insecticidas organofosforados y piretroides los más utilizados (WHO, 1997; Pérez & Molina, 2009). Durante la década de los 70, el uso indiscriminado y continuo de insecticidas organoclorados, trajo como consecuencia el desarrollo de altos niveles de resistencia al DDT y otros organoclorados, por ello se introduce el grupo de los organofosforados para el control larvario, específicamente temefos granulado (abate), aplicado en recipientes de agua doméstica a una dosis de 1ppm (5 gramos de temefos al 1% / 50 L de agua) y el malation para el control de adultos (Álvarez *et al.*, 2006; WHO, 1996).

El uso indiscriminado de insecticidas, ha generado una fuerte presión de selección, desarrollándose poblaciones de mosquitos con individuos genéticamente resistentes a los compuestos químicos. En Venezuela, Mazarri & Georghiou (1995) detectaron poblaciones de *Ae. aegypti* de los estados Aragua y Falcón, resistentes a temefos, malation, pirimifos-metil, clorpirifos, propoxur, permetrina y lambdacialotrina. Por otro lado, Pérez & Fernández (2001), reportan resistencia de la misma especie a los piretroides lambdacialotrina, cyflutrina y deltametrina en poblaciones de *Ae. aegypti* del estado Aragua. En el estado Trujillo Álvarez *et al.* (2006), encuentran una cepa de *Ae. aegypti* resistente al temefos. Posteriormente Pérez & Molina (2009),

determinan en larvas la resistencia al malation de tres cepas de *Ae. aegypti* del estado Aragua, provenientes de los municipios Girardot, Mario Briceño Iragorri y Urdaneta; todas estas cepas resultaron susceptibles a los organofosforados pirimifos metil y temefos, y asimismo al carbamato propoxur.

Debido a la disminución de la susceptibilidad al temefos en *Ae. aegypti* del Brasil, fue necesario adoptar otras estrategias de intervención (Braga *et al.*, 2004) como lo fue, el uso del Bti en los criaderos. Ante esta situación en Venezuela, se presentan como alternativas de control larvario, los reguladores de crecimiento, también conocidos como insecticidas de tercera generación e insecticidas bioquímicos, cuyas características los diferencian de los insecticidas convencionales, por tener bajo nivel de toxicidad para especies no blanco del control, requerir de bajas dosis de aplicación, ser eficientes en el manejo integrado de plagas y retardar la generación de resistencia fisiológica en los mosquitos (Williams, 1967; Carvalho & Antonaci, 2006; Álvarez *et al.*, 2006).

Dentro del grupo de los insecticidas bioquímicos, se encuentran los reguladores de crecimiento de insectos. Estas sustancias son clasificadas como hormonas mímicas (juvenoides) e inhibidores del desarrollo (ecdísoides). Su acción fundamental, se basa en la interrupción del normal crecimiento, desarrollo y reproducción de muchas especies de insectos. Siendo considerados compuestos biológicamente específicos, no tóxicos al hombre, ni a los mamíferos, biodegradables y menos propensos al desarrollo de resistencia fisiológica (Mulla *et al.*, 1986; Aguilera *et al.*, 2001).

En 1989 fue sintetizado en Japón el regulador de crecimiento de insectos Pyriproxyfen (4-henoxyphenyl (RS)-2-(2 pyridyloxy) propyl ether), el cual actúa sobre la fisiología de la morfogénesis, reproducción y embriogénesis del insecto. Su efecto fue evaluado sobre larvas de *Anopheles farauti* con excelentes resultados (Susuki *et al.*, 1989).

En la estrategia del control de formas inmaduras de mosquitos es prioritaria la utilización de productos con baja toxicidad, actividad residual prolongada y elevada eficacia. Los reguladores de crecimiento vienen siendo estudiados y utilizados en muchos países (Carvalho & Antonaci, 2006). En Venezuela, se han realizado estudios en condiciones

de laboratorio sobre la eficacia y persistencia de metopreno, sobre larvas de *Anopheles albimanus* con buenos resultados (Berti & Navarro, 2008); por otro lado, la efectividad y persistencia del Pyriproxyfen fue evaluada en condiciones de laboratorio sobre larvas de *Ae. aegypti*, obteniéndose una mayor eficacia en la fase de pupa y mayor persistencia a la dosis de 0.05 ppm, con porcentaje de inhibición de la emergencia mayores del 90 % hasta los primeros 60 días (Suárez, 2008).

El propósito de este trabajo fue evaluar bajo condiciones de laboratorio la eficacia y actividad residual del regulador de crecimiento Pyriproxyfen (Sumilarv® 0,5 G) a 5 dosis de aplicación, 3 de ellas comerciales, sobre una población colonizada de *Ae. aegypti*, procedente del barrio La Pedrera, Maracay, estado Aragua, tomando como referencia larvas de la misma especie de la cepa de referencia susceptible Rockefeller (Rock).

MATERIALES Y MÉTODOS

Población y muestra

El barrio de La Pedrera, Municipio Girardot, Maracay Edo. Aragua, a una altitud de 515 msnm (10° 16' 33.4" N, 0.67 33' 48.4" W), fue seleccionada para captura de parentales, debido a la presencia de brotes de Dengue de importancia epidemiológica, su ubicación geográfica dentro de la cuenca del río Las Delicias (o Madre Vieja), su alta densidad de población humana, la presencia de problemas en prestación de servicios públicos e irregular y deficiente abastecimiento de agua, lo que obliga a la comunidad a utilizar diversos recipientes para su almacenamiento. La población de este estudio estuvo conformada por un total de 14.480 larvas de *Aedes aegypti*, 7.240 larvas F1 cepa La Pedrera, y 7.240 larvas de la cepa de referencia susceptible Rockefeller. Los experimentos se realizaron en el Centro de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA) del Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon" en Maracay, estado Aragua, Venezuela.

Material biológico

Larvas del cuarto estadio temprano de:

- *Ae. aegypti*, (cepa Rockefeller susceptible referencial) mantenida durante varios años en el insectario del Centro de Investigación en

Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA).

- *Ae. aegypti*, F1 (cepa La Pedrera) provenientes de parentales capturados en La Pedrera.

Establecimiento de colonias de mosquitos cepa La Pedrera en laboratorio

En La Pedrera se realizó la recolección de larvas y pupas de *Ae. aegypti* en diversos recipientes y contenedores utilizados para el almacenamiento de agua. Estas se transfirieron a bolsas plásticas con 500 ml de agua y se trasladaron dentro de cavas al Centro de Investigación mencionado anteriormente. La colonia se estableció bajo condiciones controladas a temperatura de $29,0 \pm 4,0$ °C; humedad relativa de 80,0 5,0 % y fotoperíodo de 12:12 hrs (luz: oscuridad). Para la cría de larvas se utilizó agua corriente de consumo humano; estas se alimentaron diariamente con 20 mg de gatarina Catchow Countrymix® finamente molida. Al alcanzar fase de pupa, fueron transferidas con ayuda de goteros a pequeños recipientes de 250 cc de capacidad con agua y se colocaron en cestos de tela con las siguientes medidas: 26 cm de ancho, 26 cm de alto y 36 cm de largo, debidamente identificadas (Consoli & Oliveira, 1994, modificado).

Para la alimentación de adultos, dentro de cada cesto se ubicó envase con solución de sacarosa al 10%, con una mecha de algodón para permitir a los mosquitos alimentarse sobre ella con facilidad (Consoli & Oliveira, 1994, modificado). A fin de obtener huevos, se les ofreció a las hembras una ingesta sanguínea de ave, inmovilizando una paloma. En el fondo de cada cesto se ubicaron recipientes de 250 cc de capacidad, cuyo interior se cubrió con papel de servilleta con 50 cc de agua potable. Transcurridos 3 días se retiraron los huevos adheridos al papel. Cada día se sacó el papel con los huevos y este fue sustituido por uno limpio. Las larvas (F1) de estas colonias, se utilizaron para la realización de los respectivos bioensayos, según la metodología propuesta por Consoli & Oliveira (Consoli & Oliveira, 1994, modificado).

Preparación de soluciones del regulador de crecimiento pyriproxyfen

Fueron preparadas cinco concentraciones o soluciones acuosas de pyriproxyfen (0,01; 0,02; 0,03; 0,04 y 0,05 ppm) utilizando cinco pipotes plásticos

de 120 litros de capacidad y en cada uno se agregaron 100 litros de agua, más la cantidad de pyriproxyfen 0,5% G pesado de acuerdo a la concentración final respectiva. En el pipote control, solo añadimos 100 litros de agua. Luego se cubrieron los recipientes con tapas para evitar la oviposición de mosquitos externos y se dejó reposar por 24 horas bajo techo y protegidos de la luz solar. Transcurridas 24 horas se procedió a realizar los respectivos bioensayos según la metodología de Suárez (Suárez, 2008).

Bioensayos

- Evaluación de la eficacia y actividad residual de Pyriproxyfen sobre larvas y pupas de *Aedes aegypti*.

Pyriproxyfen se evaluó a cinco dosis o concentraciones (0,01; 0,02; 0,03; 0,04 y 0,05 ppm) sobre larvas y pupas de *Aedes aegypti*. Cada concentración representó un tratamiento. La preparación de las concentraciones se realizó el día cero. Al día siguiente (día uno), las larvas del IV instar temprano, se expusieron a estas dosis. Para lo cual, se empleó contenedores plásticos de 300 ml de capacidad con tapa, en estos se agregó 250 ml de la respectiva solución y 20 larvas de IV instar temprano, siguiendo la metodología propuesta por Suárez (2008). Se realizaron ocho replicaciones por tratamiento con 20 larvas/replicación, para un total de 160 larvas por tratamiento. Los contenedores se revisaban a diario para contabilizar y extraer los especímenes muertos, mientras que, las pupas vivas se colocaban cuidadosamente dentro de vasos plásticos de 57 ml de capacidad, llenos con 1/3 de la solución (respectiva dosis) y cubiertos con tul para observar la emergencia o no del adulto. Por otro lado, cuatro replicaciones de 20 larvas cada una, para un total de 80 larvas, fueron utilizadas como control, las cuales se mantuvieron bajo las mismas condiciones y solo con agua y alimento. En cada concentración y control se determinó el porcentaje de mortalidad de larvas, mortalidad de pupas, inhibición de la emergencia de adultos, y la mortalidad de adultos emergidos. Cada 15 días, hasta los 90 días post-preparación, se realizaron bioensayos para determinar la persistencia del efecto letal de pyriproxyfen. Durante la evaluación no hubo renovación ni incremento de agua perdida. El agua de los pipotes se agitó vigorosamente con una vara de madera, antes tomar las muestras de 250 ml para realizar cada bioensayo. El inicio del bioensayo se registró a partir del momento en que se colocaron las

larvas en los contenedores de cada solución y finalizó el día que murió último individuo del bioensayo respectivo. Las larvas se alimentaron diariamente con alimento para gatos (gatarina Catchow Contrymix® finamente molida).

Diseño y Análisis Estadístico

En cada bioensayo, se aplicó un diseño experimental completamente al azar o aleatorizado. La incapacidad de movimiento de los especímenes tratados, fue el criterio que se utilizó para confirmar inhibición de la emergencia de adultos (Mulla *et al.*, 1974). Varios parámetros fueron calculados con los datos obtenidos en las pruebas y se procedió a expresar los resultados como:

- Porcentaje de mortalidad de larvas (%ML) = $[(Lm / Lexp) \times 100]$
- Porcentaje de mortalidad de pupas (%MP) = $[(Pm / Pm + ad) \times 100]$
- Porcentaje de mortalidad de adultos (%M) = (adultos muertos/total emergidos)
- Porcentaje de inhibición de emergencia de adultos %IE = $[100 - (100 - E/C)]$ donde

E = % de emergencia de expuestos

C = % de emergencia del control

Lm = larvas muertas

Lexp = larvas expuestas

Pm = pupas muertas

Sobre los datos de resultados de porcentajes de mortalidad (%M) y porcentajes de inhibición de la emergencia (%IE) de adultos, se realizó el análisis estadístico mediante un ANAVAR y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, para los efectos principales de los factores cepa, dosis y bioensayos. Los análisis se llevaron a cabo utilizando el programa Minitab 16.0 para Microsoft® Windows®.

RESULTADOS

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA

Porcentaje de mortalidad (incluyendo el control)

El regulador de crecimiento pyriproxyfen, alteró de forma negativa el desarrollo y la metamorfosis de *Ae. aegypti*, tanto para la cepa Rockefeller como para la cepa La Pedrera. Al ser expuestas las larvas

a las cinco dosis del producto, se observó en los especímenes tratados, que fueron afectados durante el proceso de transformación larva-pupa y pupa adulto, presentándose la mayor mortalidad en la fase de pupa (Tabla I).

El análisis de varianza mostró la presencia de diferencias estadísticamente significativas para el porcentaje de mortalidad entre la cepa Rockefeller y la cepa La Pedrera ($P<0,001$), entre las dosis evaluadas (0,01; 0,02; 0,03; 0,04 y 0,05 ppm) ($P<0,001$), entre

Tabla I. Porcentajes de mortalidad de larvas, pupas y adultos de dos cepas de *Aedes aegypti* tratadas con cinco dosis de pyriproxyfen preparado en un único momento para evaluar su persistencia en el tiempo, bajo condiciones de laboratorio.

Dosis*	DPP**	N	Cepa La Pedrera				Cepa Rockefeller			
			Larvas	Pupas	Adultos	Total	Larvas	Pupas	Adultos	Total
0	1	80	0	0	0	0	0	0	0	0
0	7	80	0	0	0	0	0	2,5	0	1,25
0	15	80	1,25	0	1,25	1,25	1,25	2,5	0	3,75
0	30	120	0,83	0,83	0	1,66	0,83	2,5	0	3,33
0	45	120	0	0	0	0	0	2,5	0	2,5
0	60	120	0	0	0	0	0	0,83	0	0,83
0	75	120	0	0,83	0	0,83	0	0,83	0	0,83
0	90	120	0	0,83	0,83	1,66	0	0	0	0
0,01	1	160	0	67,5	23,75	91,25	0	87,5	6,25	93,75
0,01	7	160	0,62	38,12	48,12	86,86	2,5	62,5	31,87	96,87
0,01	15	160	1,25	20	26,87	48,12	4,37	51,87	35	91,24
0,01	30	160	0,62	3,75	36,87	41,24	6,87	66,87	13,2	86,94
0,01	45	120	1,87	11,25	1,25	14,37	2,5	70,62	1,25	74,37
0,01	60	160	0	13,75	6,25	20	0	63,12	1,87	64,99
0,01	75	160	0,62	6,25	2,5	9,37	1,25	11,87	14,37	27,49
0,01	90	160	0	1,87	1,25	3,12	0	0	0,62	0,62
0,02	1	160	0,62	95	4,37	99,99	1,25	98,75	0	100
0,02	7	160	2,5	43,1	33,12	48,72	2,5	81,25	13,75	97,5
0,02	15	120	0,62	36,87	36,87	74,36	8,12	89,37	1,87	99,36
0,02	30	160	0,62	42,5	25,62	68,74	6,25	86,87	5	98,12
0,02	45	160	0,62	8,12	16,25	24,99	0	1,87	0	1,87
0,02	60	160	1,25	72,5	8,75	82,5	0,62	94,37	1,25	96,24
0,02	75	160	0	34,37	13,75	48,12	1,25	65	7,5	73,75
0,02	90	160	0	21,25	40	61,25	0,62	59,37	13,12	73,11
0,03	1	120	0	99,37	0,625	99,99	0,62	98,12	1,25	99,99
0,03	7	160	0	96,2	3,75	99,95	2,5	97,5	0	100
0,03	15	160	1,87	98,12	0	99,99	3,12	90,62	6,25	99,99
0,03	30	160	0,62	94,37	3,75	98,74	8,75	91,25	0	100
0,03	45	160	1,25	74,37	7,5	83,12	0,62	99,37	0	99,99
0,03	60	160	1,25	63,75	13,12	78,12	0	95	1,25	96,25
0,03	75	120	0	51,87	20	71,87	0	90	7,5	97,5
0,03	90	160	0	40,62	12,5	53,12	1,2	97,5	1,2	99,9
0,04	1	160	0	95,62	1,8	97,42	1,25	98,75	0	100

...continua en la pág. 213

...viene de la pág. 212

0,04	7	160	0,62	98,7	0,62	99,94	6,25	93,75	0	100
0,04	15	160	1,25	98,75	0	100	1,25	98,75	0	100
0,04	30	160	0	100	0	100	6,87	93,12	0	99,99
0,04	45	120	0,62	96,87	2,5	99,99	1,25	98,75	0	100
0,04	60	160	0,62	98,75	0	99,37	0	96,87	0,62	97,49
0,04	75	160	0	98,75	0,62	98,74	1,25	98,75	0	100
0,04	90	160	0,62	93,75	4,37	98,74	0	100	0	100
0,05	1	160	1,87	98,12	0	99,99	1,25	98,75	0	100
0,05	7	160	0	98,12	1,87	99,99	3,75	96,25	0	100
0,05	15	120	0,62	98,75	0	99,37	1,87	98,12	0	99,99
0,05	30	160	1,25	98,75	0	100	0	96,25	0	96,25
0,05	45	160	1,87	94,37	1,25	97,49	1,25	98,75	0	100
0,05	60	160	0	100	0	100	0	99,37	0,62	99,99
0,05	75	160	0,62	99,37	0	99,99	0,62	99,37	0	99,99
0,05	90	160	0	98,12	1,87	99,99	0,62	99,37	0	99,99

*Dosis de pyriproxyfen en partes por millón (ppm).

**DPP: días luego de preparada la mezcla de pyriproxyfen.

los bioensayos (1, 7, 15, 30, 45, 60, 75, 90 días), entre las interacciones cepas×dosis ($P<0,001$), cepas×bioensayos ($P<0,001$) y dosis×bioensayos.

Los resultados de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para ambas cepas se muestran en la Tabla II, como era de esperarse, se puede observar que la cepa susceptible Rockefeller, presenta un porcentaje de mortalidad significativamente mayor al de la cepa La Pedrera.

Como se observa en la Tabla III, la mortalidad total no presentó diferencias significativas entre las dosis 0,04 y 0,05 ppm, sin embargo simultáneamente ambas presentan el mayor porcentaje de mortalidad total, es decir durante todo el período de experimentación. A las dosis de 0,01; 0,02 y 0,03 ppm se presentaron porcentajes de mortalidad total decrecientes y con diferencias estadísticamente significativas entre los mismos (Tabla III).

Tabla II. Porcentaje de mortalidad total (%M total) clasificado según las cepas.

Cepa	Media aritmética
Rockefeller	76,83 A
La Pedrera	65,37 B

*Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas al 5% según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Por otro lado con respecto a los bioensayos, se observa que mientras el producto se utilizó con poco tiempo de preparado se presentaron los mayores porcentajes de mortalidad, sin embargo, también se observa que su efectividad decrece en la medida que el producto tiene mayor tiempo de preparado (Tabla IV).

Porcentaje de mortalidad (excluyendo el control)

El análisis de varianza mostró que hay diferencias significativas para el porcentaje de mortalidad entre la cepa Rockefeller y cepa La Pedrera ($P<0,001$), entre las dosis (0; 0,01; 0,02; 0,03;

Tabla III. Porcentaje de mortalidad (%M total) clasificado según las dosis.

Dosis	Concentración (ppm)	Media aritmética
5	0,05	99,77 A
4	0,04	99,57 A
3	0,03	92,07 B
2	0,02	79,06 C
1	0,01	54,92 D
0	0	1,224 E

*Las medias con letras mayúsculas diferentes presentan diferencias significativas, medias con letras iguales no presentan diferencias significativas, según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey al nivel del 5 %.

Tabla IV. Porcentaje de mortalidad (%M total) para ambas cepas, clasificado según los días post-tratamiento.

Bioensayo	Días Post-tratamiento	Media aritmética
1	1	83,40 A
2	7	79,79 AB
3	15	76,93 BC
4	30	74,83 CD
5	45	71,06 D
6	60	65,16 E
7	75	60,92 F
8	90	57,74 F

*Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas al nivel del 5%, según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

0,04 y 0,05 ppm) ($P<0,001$), entre los bioensayos (1, 7, 15, 30, 45, 60, 75, 90 días) ($P<0,001$) y entre las interacciones cepas×dosis ($P<0,001$), cepas×bioensayos ($P<0,001$) y dosis×bioensayos.

En la Tabla V, se observa que entre 0,04 y 0,05 ppm no se presentaron diferencias estadísticamente significativas y al mismo tiempo ambas dosis presentaron mayor porcentaje de mortalidad que el resto de las dosis; las cuales presentaron porcentajes de mortalidad inferiores y con diferencias estadísticamente significativas entre las mismas (Tabla V).

Por otro lado, con respecto a los bioensayos (días post-tratamiento), podemos observar que las concentraciones con poco tiempo (días) de preparadas y almacenadas, presentaron mayor porcentaje de mortalidad, pero a medida que transcurren los días

Tabla V. Porcentaje de mortalidad para ambas cepas clasificado según las dosis.

Dosis	Concentración (ppm)	Media aritmética
5	0,05	99,77 A
4	0,04	99,57 A
3	0,03	92,02 B
2	0,02	79,06 C
1	0,01	54,92 D

*Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias al nivel del 5%, según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

post-tratamiento su efectividad va disminuyendo (Tabla VI).

Porcentaje de Inhibición de la Emergencia (%IE) de mosquitos adultos

Los resultados del porcentaje de inhibición de la emergencia (%IE) de *Aedes aegypti* en la cepa La Pedrera, se muestran en la Fig. 1. Durante el período de experimentación, las dosis evaluadas presentaron valores de %IE altos, pero a medida que transcurren los días post-tratamiento, estos valores decrecen. Sin embargo, el porcentaje de la inhibición de la emergencia (%IE) en las dosis de 0,04 y 0,05 ppm, fue alto durante todo el periodo de experimentación, variando de 100 a 97,5 %. Mientras que, en la dosis de 0,01 ppm varió de 91,25 a 1,49 %, siendo evidente que con esta concentración perdió totalmente su efectividad a los 90 días. A la dosis de 0,02 ppm, el %IE más alto fue de 100 % y el menor fue de 25 % a los 45 días post-tratamiento. Para 0,03 ppm, el %IE más alto fue de 100 % (a 1 día post-tratamiento) y el menor fue de 52,34 % (a los 90 días post-tratamiento).

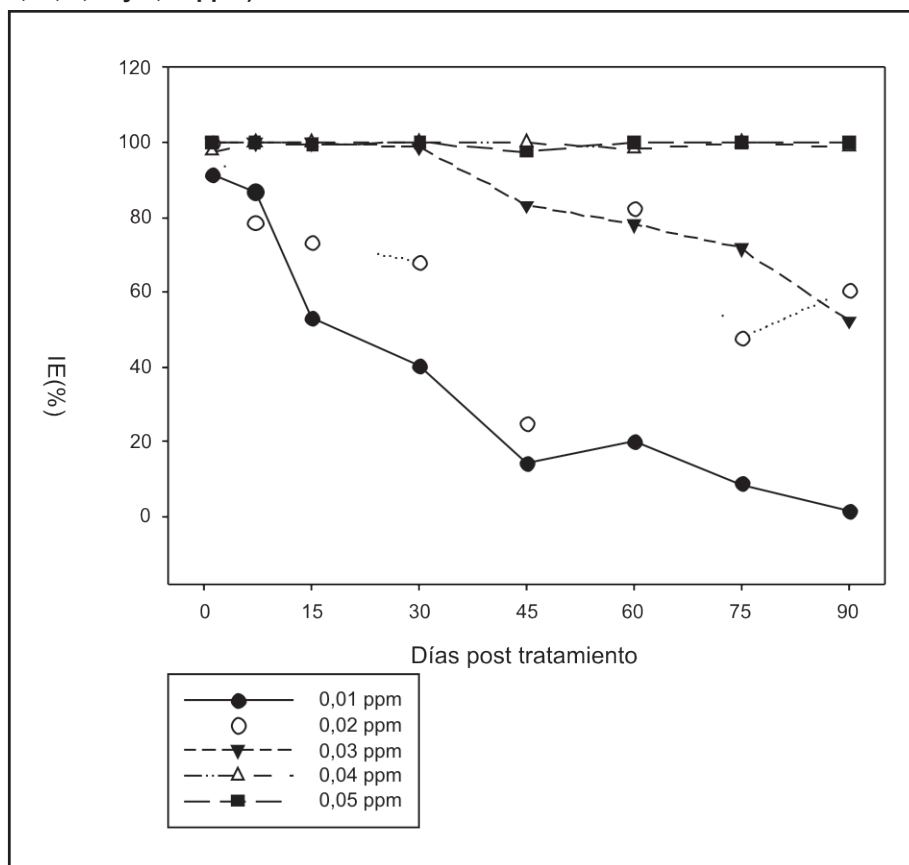
Durante el período de experimentación (90 días) las dosis evaluadas (0,01; 0,02; 0,03; 0,04 y 0,05 ppm) presentaron valores de % IE altos para la cepa Rockefeller, manteniéndose así a medida que transcurren los días post-tratamiento, a excepción de la dosis 0,01 ppm, cuyo % IE varió de 93,75% a 0,63%, siendo evidente que esta concentración perdió su efectividad para esta cepa a los 90 días. La

Tabla VI. Mortalidad promedio de dos cepas de *Aedes aegypti* en función de los días transcurridos después del tratamiento.

Días Post-tratamiento	Mortalidad promedio*
1	98,88 A
7	95,50 AB
15	91,69 BC
30	89,38 CD
45	85,19 D
60	77,94 E
75	72,94 F
90	69,13 F

*Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas nivel al 5%, según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Fig. 1. Porcentaje de Inhibición de la Emergencia (%IE) de adultos de *Aedes aegypti* cepa La Pedrera, por efecto de cinco dosis de pyriproxyfen (0,01; 0,02; 0,03; 0,04 y 0,05 ppm) en condiciones de laboratorio.



inhibición de la emergencia con las dosis de 0,03; 0,04 y 0,05 ppm fue alta, manteniéndose en el 100% hasta los 45 días post-tratamiento; sin embargo esta luego decrece a valores por encima de 95%, manteniéndose alta hasta alcanzar nuevamente valores de % IE del 100% a los 90 días (Fig. 2).

El análisis de varianza mostró, como era de esperarse, la presencia de diferencias estadísticamente significativas para porcentaje de inhibición de la emergencia entre la cepa Rockefeller y la cepa La Pedrera ($P < 0,001$), entre las dosis evaluadas (0; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 y 0,05 ppm) ($P < 0,001$), entre el período de tiempo transcurrido (1, 7, 15, 30, 45, 60, 75, 90 días) ($P < 0,001$) y entre las interacciones cepas×dosis ($P < 0,001$), cepas×bioensayos ($P < 0,001$) y dosis×bioensayos.

Los resultados de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para ambas cepas se presentan

en la Tabla VII, se observa que la cepa Rockefeller presenta un porcentaje de inhibición de la emergencia, como era de esperarse significativamente mayor al de la cepa La Pedrera, lo cual sugiere que esta es más susceptible al producto.

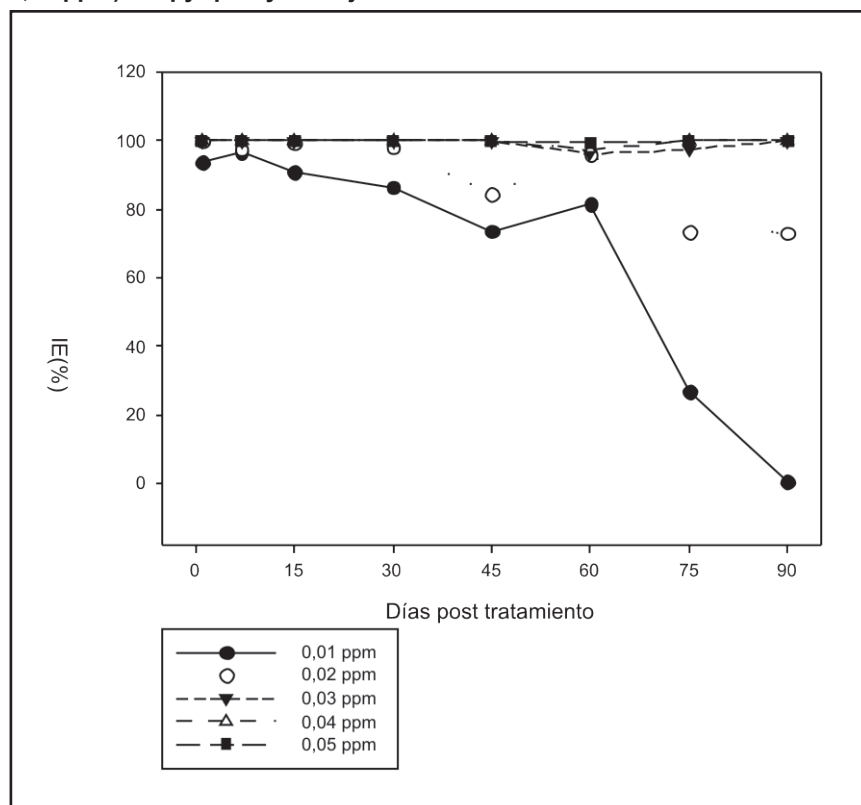
Con respecto a los días transcurridos después del tratamiento, se observa claramente que el producto con poco tiempo de almacenamiento presento mayores porcentajes de emergencia de adultos; sin embargo, también se observa que su

Tabla VII. Porcentaje de inhibición de la emergencia (%IE) de adultos de *Aedes aegypti* clasificado según las cepas Rockefeller y La Pedrera.

Cepa	%IE promedio
Rockefeller	91,80 A
La Pedrera	78,08 B

*Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias al 5%, según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Fig. 2. Porcentaje de Inhibición de la Emergencia (%IE) de adultos de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller, por efecto de cinco dosis (0,01; 0,02; 0,03; 0,04 y 0,05 ppm) de pyriproxyfen bajo condiciones de laboratorio.



efectividad decrece en la medida que el producto tiene mayor tiempo de preparado (Tabla VIII).

Persistencia de pyriproxyfen

La persistencia de la actividad residual del pyriproxyfen durante los 90 días post-tratamiento,

Tabla VIII. Porcentaje de inhibición de la emergencia (% IE) de *Aedes aegypti* clasificado según la duración de los bioensayos.

Días Post-tratamiento	(% IE) promedio
1	98,88 A
7	95,49 AB
15	91,46 BC
30	89,18 CD
60	85,16 D
45	77,83 E
75	72,71 F

*Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias al 5%, según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

mostró un comportamiento variable a las dosis de 0,01; 0,02 y 0,03 ppm, tanto en la cepa La Pedrera (población de campo) como en la cepa Rockefeller (susceptible de laboratorio), mientras que, a las dosis de 0,04 y 0,05 ppm, se observaron respuestas más homogéneas durante los 90 días.

Al analizar el efecto residual del regulador de crecimiento pyriproxyfen sobre individuos de *Ae. aegypti* cepa La Pedrera, se hallaron porcentajes de inhibición de la emergencia (%IE) que oscilaron de 100% a 1,49%, durante todo el período de experimentación, encontrándose menor efecto residual a las dosis más bajas 0,01 y 0,02 ppm. En cambio, con las dosis de 0,04 y 0,05 ppm el porcentaje de inhibición de la emergencia se mantuvo entre 97,5 y 100% durante todo el periodo de experimentación. Este resultado es bastante satisfactorio y sugiere que la persistencia puede ser incluso de hasta 120 días en condiciones de campo en sitios o criaderos bajo sombra parcial o poca luz.

Para la cepa susceptible Rockefeller el porcentaje de inhibición de la emergencia varió entre 100% y 0,63 % para las dosis de 0,01 y 0,02 ppm, con tendencia a ir disminuyendo a medida que transcurren los días post-tratamiento, mientras que para las dosis de 0,03; 0,04 y 0,05 ppm el porcentaje de inhibición de la emergencia se mantuvo en 100 % durante 45 días, a los 60 días presentaron un leve descenso, manteniéndose por encima de 96 %. Posteriormente a los 90 días, el porcentaje de inhibición de emergencia aumenta, manteniéndose en 100 % a las dosis de 0,03, 0,04 y 0,05 ppm. Este resultado sugiere, como era de esperarse que la cepa Rockefeller es más susceptible que la cepa de campo La Pedrera.

DISCUSIÓN

En Venezuela el programa nacional de control de *Aedes aegypti* ha mantenido por mucho tiempo al temephos (Abate) como principal larvicida, en consecuencia las poblaciones de este mosquito se encuentran bajo una continua presión de selección de individuos resistentes a este insecticida organofosforado. La evaluación periódica de la susceptibilidad de los vectores a los insecticidas permite la oportuna escogencia de los químicos a usar en los programas de control, así como una adecuada planificación de las estrategias, para realizar la rotación de insecticidas a fin de mantener poblaciones de vectores susceptibles. Actualmente existen productos que están siendo evaluados como alternativas contra larvas de mosquitos Culicidae, debido a su efectividad y baja dosificación, como son pyriproxyfen y metopreno, ambos ampliamente recomendados por tener baja toxicidad, alto efecto residual y elevada eficacia (Carvalho & Antonaci, 2006).

En algunos países de Asia, se han realizado trabajos en laboratorio y campo que demostraron la alta eficacia del pyriproxyfen como regulador del crecimiento de vectores no sólo de malaria como *Anopheles stephensi* (Susuki *et al.*, 1989); *Anopheles punctimaculus* (Okazawa *et al.*, 1991); sino también contra otras especies de mosquitos como *Culex pipens pallens*, *Aedes aegypti*, *Aedes nigromaculis* y *Culex tarsalis* (Mulla *et al.*, 1986). En estos estudios, al aplicar la dosis de 0,05 ppm se inhibió la emergencia de adultos por más de 5 semanas después del tratamiento, coincidiendo con nuestros resultados, en los cuales la misma dosis inhibió la emergencia en un 100 % hasta por 90 días.

Nayar *et al.* (2002), en Florida, U.S.A compararon la actividad residual de metopreno y pyriproxyfen a dos concentraciones 0,02 y 0,05 ppm en condiciones de laboratorio y campo, sobre las especies *Ae. aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus* y *Aedes taeniorhynchus*. Estos autores observaron con ambas concentraciones que la inhibición de la emergencia de adultos ocasionada por pyriproxyfen fue mayor que la correspondiente al metopreno y que para *Aedes aegypti* 0,05 ppm fue la dosis de pyriproxyfen que logró 100 % de inhibición de la emergencia.

En Brasil, Carvalho y Antonaci (2006), evaluaron la eficacia y efecto residual del pyriproxyfen sobre *Aedes aegypti*. Al comparar el efecto residual entre dos concentraciones, la dosis de 0,05 ppm presentó alta residualidad hasta 90 días, coincidiendo con nuestros resultados, ya que con ambas cepas tratadas (*Aedes aegypti* cepa La Pedrera y cepa Rockefeller) se obtuvieron porcentajes de mortalidad de pupas y de inhibición de la emergencia de adultos de 100 % durante un período de 90 días.

En Venezuela, Berti *et al.* (2007) evaluaron la persistencia del pyriproxyfen usando tres dosis (0,01; 0,05 y 0,25 ppm) durante 12 semanas sobre larvas de *Aedes aegypti*. La concentración de 0,01 ppm sólo fue efectiva en la semana inicial con valores de mortalidad de pupas de 98% en la primera semana, luego en ambos el porcentaje se redujo en las siguientes semanas evaluadas. La dosis de 0,05 ppm fue eficaz durante las primeras 6 semanas, pero a medida que transcurría el tiempo de evaluación registró menor eficacia y disminuyó la persistencia. La concentración de 0,25 ppm, produjo porcentajes de mortalidad de pupas entre 94 y 100 % hasta la semana 12. Esta última concentración, si bien es muy alta (0,25 ppm), es sin embargo cuatro veces menor que la correspondiente al Abate (1 ppm) utilizada en el programa de control de *Aedes aegypti* de Venezuela.

En el estado Trujillo de Venezuela, Suárez *et al.*, (2011), evaluaron la eficacia del pyriproxyfen (Sumilar® 0,5 G) bajo condiciones de laboratorio en tres poblaciones de *Aedes aegypti*. La mortalidad en fase de pupa fue significativamente mayor que la mortalidad a nivel larval. Estos autores (Suárez *et al.*, 2011) demostraron que pyriproxyfen a la dosis de 0,05 ppm actúa eficazmente en los estadios inmaduros tardíos inhibiendo la emergencia de adultos en más del 75% durante las primeras cuatro semanas.

Nuestros resultados coinciden con algunas investigaciones anteriores, sin embargo se contraponen con los resultados obtenidos por Vythilingam *et al.* (2005) bajo condiciones de laboratorio, quienes registraron con las dosis de 0,01 y 0,02 ppm porcentajes de inhibición de la emergencia cercanos a 100% durante cuatro meses (120 días) sobre larvas de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* con remplazo y sin remplazo del 20 % del agua tratada.

En el presente trabajo la persistencia del pyriproxyfen después del tratamiento alcanzó valores de 100% de inhibición de la emergencia durante los 90 días en ambas cepas estudiadas para las dosis de 0,04 y 0,05 ppm, la cual mostró un comportamiento menos homogéneo a las dosis de 0,01 y 0,02 ppm, posiblemente debido a que no deben ser las dosis adecuadas para estas poblaciones y esto podría inducir mecanismos bioquímicos que confieran a largo plazo resistencia al regulador; en vista de los resultados obtenidos, se recomienda usar dosis de 0,04 y 0,05 ppm en estrategias dirigidas al control de larvas de *Aedes aegypti* en Venezuela; ya que en ambas cepas se obtuvieron respuestas homogéneas y porcentajes de inhibición de emergencia $\geq 96,22\%$.

En conclusión el pyriproxyfen presenta gran potencial como alternativa de control en los programas de manejo integrado de vectores en Venezuela. Este puede ser alternado con otros larvicidas como el Abate o el Bti, dentro del programa nacional de control de *Aedes aegypti*. En ese sentido, habrá que tomar en cuenta que la eficacia del producto disminuye en condiciones de campo, debido a los factores climáticos adversos y parámetros físico-químicos del agua, en este sentido habrá que incrementar las dosis de aplicación, sobre todo en los criaderos expuestos totalmente al sol. Sin embargo, la salinidad al parecer no afecta la eficacia del producto; en Corea del Sur, fue evaluada su eficacia a dosis de 0,05 ppm contra *Aedes togoi* (Theobald) en criaderos de alta salinidad, obteniéndose excelentes resultados, con porcentajes de mortalidad de pupas de 100% hasta 40 días post-tratamiento y 74,6% a 51 días del tratamiento (Dong-Kyu, 2001).

CONFLICTO DE INTERESES

No hubo conflicto de intereses durante el desarrollo de este trabajo

REFERENCIAS

- Aguilera L., Marquetti M. & Navarro A. (2001). Actividad biológica del diflubenzuron sobre *Blattella germanica* (Diptera: Blattellidae). *Rev. Cubana Med. Trop.* **53**: 48-52.
- Álvarez L., Briceño A. & Oviedo M. (2006). Resistencia al Temephos en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del occidente de Venezuela. *Rev. Colomb. Entomol.* **32**: 172-175.
- Berti J., González J. & Salazar V. (2007). *Evaluación del Regulador de crecimiento Pyriproxyfen sobre larvas y pupas de Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). XX Congreso Venezolano de Entomología, San Cristóbal, estado Táchira, Venezuela.
- Berti J. & Navarro E. (2008). Efectividad y persistencia de la actividad letal de metopreno sobre pupas de *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Rev. Biomed.* **19**: 27-34.
- Braga I., Pereira J., Da Silva S. & Valle D. (2004). *Aedes aegypti* resistance to Temephos during 2001 in several municipalities in the state of Rio de Janeiro, Sergipe, and Halagaos, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **99**: 199-203.
- Carvalho de Resende M. & Antonaci Gama R. (2006). Persistencia e eficacia do regulador de crescimento pyriproxyfen en condiciones de laboratorio para *Aedes aegypti*. *Rev. Socied. Brasileira Med. Trop.* **39**: 72-75.
- Consoli, R. & De Oliveira R. (1994). *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil* Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brazil. 224 pp.
- Dong-Kyu L. (2001). Field evaluation of an insect growth regulator, pyriproxyfen, against *Aedes togoi* larvae in brackish water in South Korea. *J. Vector Ecol.* **26**: 39-42.
- Gubler D. J. (1989). *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti* borne diseases control in the 1990s. Top down or bottom up. *Amer. Journ. Tropic. Med. Hyg.* **40**: 571-578.

- Homéz J., Soto H. & Méndez P. (1995). *Parasitología Médica*. 2da edición, pp.133-153. Universidad del Zulia (LUZ). Maracaibo, estado Zulia.
- Knudsen, A.B. (1993). *Aedes aegypti* and dengue in the Caribbean. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* **43**: 269-275.
- Manrique P., Delfin H., Parra V. & Ibáñez S. (1998). Desarrollo, mortalidad y sobrevivencia de las etapas inmaduras de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en neumáticos. *Rev. Biomed.* **9**: 84-91.
- Mazarri M. & Georghiu G. (1995). Characterization of resistance to organophosphate, carbamate and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* **11**: 315-322.
- Mulla M. S., Barnard D. R. & Norland R. L. (1974). Insect growth regulators against mosquitoes with notes on nontarget organisms. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* **2**: 314-320.
- Mulla M. S., Darwazeh H. A., Kennedy B. & Dawson D. M. (1986). Insect growth regulators in vector control. *J. Econ. Entomol.* **67**: 329-332.
- Nayar J. K., Ali A. & Zaim M. (2002). Effectiveness and residual activity comparison of granular formulations of insect growth regulators Pyriproxyfen and s-methoprene against Florida mosquitoes in laboratory and outdoor conditions. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* **18**: 196-201.
- Okazawa T., Bakotte B., Kawada H. & Kere N. (1991). Field Evaluation of a new Insect growth regulator, pyriproxyfen (S-31183) against *Anopheles punctimaculus* on North Guadalcanal, Salomon Islands. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.* **7**: 604-607.
- Pérez E. & Fernández D. (2001). Resistance of *Aedes aegypti* to piretroides in municipalities of Aragua State, Venezuela. In: Clark, G., Quiroz M.H (Eds). Mosquito Control and Biology in Latin America-Eleventh Symposium of the American Mosquito control Association. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* **17**: 166-180.
- Pérez E. & Molina de F. D. (2009). Resistencia focal a insecticidas organosintéticos en *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) de diferentes municipios del estado Aragua, Venezuela. *Bol. Malarial. Salud Amb.* **49**: 143-150.
- Suárez J. (2008). *Evaluación de un regulador de crecimiento (Pyriproxifen) en tres poblaciones de Aedes aegypti del Estado Trujillo, Venezuela*. Trabajo especial de grado. Universidad de los Andes, Núcleo Universitario Rafael Rangel, Trujillo, Edo. Trujillo.
- Suárez J., Oviedo M., Álvarez L., González A. & Lenhart A. (2011). Evaluación del regulador de crecimiento Pyriproxifen en poblaciones de *Aedes aegypti* de Trujillo, Venezuela. *Rev. Colombiana de Entomol.* **37**: 91-94.
- Susuki, H., Okazawa T., Kere N. & Kawada, H. (1989). Field evaluation of a new insect growth regulator: pyriproxyfen (S-31183) against *Anopheles farauti*, the main vector of malaria in the Solomon islands. *Jpn. J. Sanit. Zool.* **40**: 253-257.
- Vythiligan I., Belleza M., Rochani H., Tan S. & Tan CH. (2005). Laboratory and field evaluation of the insect growth regulator pyriproxifen (Sumilarv 0.5 G) against dengue vectors. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.* **21**: 296-300.
- WHO (1996). *Report of the WHO informal consultation on the evaluation and testing of insecticides*. Geneva. CTD/WHOPES/IC/96.1.
- WHO (1997). *Dengue Hemorrhagic Fever. Diagnosis, treatment, prevention and control*. 2nd Ed. Geneva, Switzerland.
- Willians, C.M. (1967). Third-generation pesticides. *Sci. Am.* **217**: 13-17.

Recibido el 03/08/2014
Aceptado el 18/11/2014

Propuestas para mejorar el manejo de sustancias peligrosas en los Laboratorios del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo

Proposals for improving the handling of hazardous substances in laboratories at the Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Carabobo University

Cristina De Sousa, Mariangel Blanco, Francy Travieso, Angelina Correia & María Cristina Colmenares

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tiene como finalidad proponer el manejo adecuado de sustancias peligrosas en los laboratorios del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad de Carabobo, de acuerdo a la norma ambiental vigente. El tipo de investigación que se implementó fue documental y de campo. El tiempo de recolección de datos fue de cuatro meses y las herramientas utilizadas para la recolección de los mismos fueron la entrevista, la aplicación de encuesta y el muestreo; se trabajó con una muestra de 54 estudiantes y un técnico y un profesor para cada laboratorio. Se caracterizaron los efluentes una vez tomadas las muestras y también luego de la aplicación de los tratamientos fisicoquímicos (oxidación química para remover la DBO y la DQO) según el parámetro en estudio. Luego de la recolección de datos y el análisis de los resultados se determinó que los laboratorios no están tomando en cuenta un plan de manejo de las sustancias peligrosas que se deben manipular de acuerdo a lo establecido por la normativa legal vigente (Decreto 2635) y que algunos de los efluentes no cumple con los límites máximos permisibles para las descarga a redes cloacales según el Decreto 883. Finalmente se propone mejorar el plan de manejo de sustancias peligrosas mediante el acondicionamiento del depósito de desechos, la elaboración de hojas de seguridad y etiquetas para todos los reactivos, la señalización adecuada dentro de las instalaciones, la incineración de los desechos almacenados en el depósito destinado para ello y el reúso del formol y etanol.

Palabras clave: plan de manejo, sustancia peligrosa, caracterización, desechos, tratamiento.

INTRODUCCIÓN

El empleo de sustancias químicas en los laboratorios de docencia e investigación, así como la fabricación de productos a nivel industrial, ha crecido, ya que la población mundial ha aumentado, y por ende las necesidades de los individuos. Por esta

SUMMARY

The aim of this study was to propose ways to ensure the correct handling of hazardous substances in laboratories at the Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Carabobo University. Both documentary and field data were collected. The survey was completed in four months and consisted of interviews, questionnaires and sampling. A total of 54 students, and one technician and one professor for each laboratory were surveyed. Samples were taken of all effluents and these were characterized before and after physiochemical treatments were implemented (chemical oxidation to remove BDO and CDO) when applicable. The laboratories surveyed did not follow pre-set procedures for the handling of hazardous substances, which should be manipulated according to the provisions of the current legislation (Decree No. 2635). In addition, the concentrations of some of the effluents were higher than the maximum permitted limits for discharge into the sewage system according to Decree No 883. The handling of hazardous substances could be greatly improved by: refurbishing the waste reservoir, drawing up safety data sheets, labelling chemical substances, the use of adequate signage within the facilities, incinerating waste materials stored in the designated warehouse and the reuse of formaldehyde and ethanol.

Key Words: *handling plan, hazardous substances, characterization, waste materials, treatment.*

razón, es fundamental que las actividades en las cuales se emplean estas sustancias se realicen generando el menor impacto ambiental posible. Dichas sustancias se clasifican en no peligrosas y peligrosas, siendo estas últimas definidas como “sustancias líquidas, sólidas o gaseosas que presentan características explosivas, inflamables, reactivas, corrosivas, combustibles,

radiactivas, biológicas perjudiciales, en cantidades o concentraciones tales que representa un riesgo para la salud y el ambiente” (Ley sobre sustancias, materiales y desechos peligrosos, 2001). Para manipular estas sustancias, así como los desechos peligrosos es necesario implementar un plan de manejo que constituye un conjunto de operaciones dirigidas a darle a las sustancias, materiales y desechos peligrosos el destino más adecuado, de acuerdo con sus características, con la finalidad de prevenir daños a la salud y al ambiente (Decreto 2635, 1998). Con la puesta en marcha de las actividades que implica este plan se logra que la manipulación de las sustancias y los desechos de naturaleza peligrosa se realice de la manera adecuada, permitiendo así que las personas que estén en contacto con las mismas disminuyan el riesgo al manipularlas.

En la actualidad existen altos niveles de contaminación lo que ha generado un gran impacto en la sociedad e inquietudes a nivel mundial, ya que gran parte de esta contaminación es provocada por un manejo inadecuado de los desechos peligrosos, los cuales generan problemas a corto, mediano y largo plazo (Montano, 2006). Venezuela en búsqueda de su desarrollo no solo se ha enfocado en el ámbito jurídico y administrativo, sino también en el ambiental con el desarrollo de organizaciones que tienen como fin la protección del medio ambiente con el buen aprovechamiento de sus recursos naturales (López & Urbina, 2011). Una de las normativas vigentes más relevantes es el Decreto para el Control de la Recuperación de Materiales Peligrosos y el Manejo de los Desechos Peligrosos (Decreto 2635, Gaceta Oficial extraordinaria número 5245) que contempla como debe ser el tratamiento para los diferentes tipos de desechos peligrosos. Existe también la Ley sobre Sustancias, Materiales y Desechos Peligrosos, (Ley 55, Gaceta Oficial número 5554), que tiene por objeto regular la generación, uso, recolección, almacenamiento, transporte, tratamiento y disposición final de las sustancias, materiales y desechos peligrosos, así como cualquier otra operación que los involucre con el fin de proteger la salud de las personas y el ambiente. También es importante destacar la caracterización de los efluentes para así conocer si se encuentran dentro de las especificaciones que establecen la Norma para la Clasificación y el Control de la Calidad de las Aguas de la Cuenca del Lago de Valencia (Decreto 3219, Gaceta oficial extraordinaria número 5305) y las Normas para la Clasificación y

el Control de la Calidad de los Cuerpos de Agua y Vertidos o Efluentes Líquidos (Decreto 883, Gaceta oficial extraordinaria número 5021).

La Universidad de Carabobo ubicada en el Municipio Naguanagua del estado Carabobo, inicia sus actividades en el año 1958. Actualmente entre las diversas Facultades que hacen vida en la Universidad, encontramos la Facultad de Ciencias y Tecnología (FACYT), donde funciona el Departamento de Biología, el cual tiene diez años de haberse fundado. Los desechos generados por los laboratorios de dicho Departamento es importante estudiarlos ya que estos pueden ser contaminantes, afectando la salud de las personas que allí laboran y estudian, y producir un mayor impacto en el ambiente. Cabe destacar los laboratorios que forman parte del Departamento de Biología de la FACYT y la disposición final de sus desechos, lo cual se indica a continuación: Los laboratorios de Microbiología y Genética, disponen en la Autoclave. Bioquímica y Biotecnología, llevan sus desechos al Depósito, y los laboratorios restantes: Biodiversidad Animal, Diversidad-Fisiología Vegetal, Ecología Terrestre, Biodiversidad, Fisiología Animal y Ecología Marina, desechan al drenaje. Sin embargo, cabe señalar que los laboratorios de Biodiversidad y Fisiología Animal, solo usan Formol y Etanol para preservar las especies de estudio usadas en sus prácticas, y el de Ecología Marina, utiliza materiales sólidos no peligrosos.

Esta investigación se realiza con la finalidad de plantear la mejor propuesta para tratar los materiales y/o desechos peligrosos de los laboratorios de Biología, de modo que cumplan con lo que establecen las leyes en materia ambiental, para así no dar un uso equivocado a estos desechos, y evitar la contaminación de cuerpos de agua, aire y suelos. Además, se disminuye el riesgo de exposición a este tipo de sustancias, evitándose la posibilidad de contaminación, de cualquier persona que se encuentre en el entorno. Por otro lado, es importante que toda gestión que implique generación o uso de sustancias peligrosas, se realice bajo las condiciones que establecen las leyes, de lo contrario por incurrir en una falta, se pudiera aplicar una sanción pertinente según la gravedad del caso; por lo tanto debido a los motivos expuestos, el alcance de esta investigación es la implementación del plan de manejo de las sustancias peligrosas en los laboratorio del Dpto. de Biología de la FACYT-UC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación según la estrategia es de tipo documental y de campo (Zorrilla, 1993), y de acuerdo al nivel de profundidad es proyectiva (Hurtado, 2008). Dicho trabajo se realizó en las siguientes etapas:

1.- Diagnóstico de las condiciones de los laboratorios del Departamento de Biología de la FACYT con relación al manejo de sustancias peligrosas

Esta fase consistió en visitas a cada uno de los laboratorios que forman parte del Departamento de Biología, recolectándose información mediante entrevistas a los técnicos de cada laboratorio; y así conocer las prácticas que se realizan, las sustancias que emplean y sus características (concentración y cantidad), los tipos de desechos que se generan, su almacenamiento, manejo y disposición final. Además, se realizó un recorrido por el depósito de desechos, y se pudo establecer las condiciones de infraestructura del mismo. Adicionalmente, se aplicó una encuesta a técnicos, profesores y alumnos, de modo de conocer si tenían noción del nivel de peligrosidad de las sustancias que manipulan, cómo manejarlas, y el impacto que estas causan en el ambiente. El cuestionario aplicado constó de 15 preguntas con respuestas dicotómicas a los técnicos y profesores, y 8 preguntas a los estudiantes, con 5 posibilidades de respuesta, tomando en cuenta la frecuencia con que realizaban la acción propuesta. Actualmente los laboratorios de la FACYT de Biología tienen un total de doscientos cuarenta y ocho (248) estudiantes, siendo este valor la población (Tamayo & Tamayo, 1997), debemos tomar en cuenta que hay doce (12) profesores y doce (12) técnicos. La muestra fue de 54 personas y se calculó mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$n = \frac{N \cdot P \cdot Q \cdot Z^2}{P \cdot Q \cdot Z^2 + E^2 \cdot (N + 1)} \quad \text{Ec-1}$$

Dónde: n: tamaño de la muestra, N: tamaño de la población, P: variabilidad positiva (0,50), Q: variabilidad negativa (0,50), Z: nivel de confianza (1,64) y E: precisión o error (0,1) (Cadenas, 1974).

2.- Identificación de las sustancias que se utilizan en cada una de las prácticas en todos los laboratorios

según los niveles de riesgo de acuerdo a la normativa vigente con la finalidad de seleccionar cuales son las sustancias con las que se va a trabajar según el nivel de peligrosidad

Con las visitas a los laboratorios se conoció las sustancias que se utilizan en cada una de sus prácticas, y así realizar una revisión bibliográfica con el apoyo del Anexo C del Decreto 2635, donde se establecen las sustancias peligrosas, tal como lo indica el artículo 5 del mismo. Teniendo conocimiento de cada una de las sustancias en estudio, se procedió a clasificarlas en no peligrosas y peligrosas, y finalmente se establecieron las propiedades fisicoquímicas, el número CAS (Chemical Abstract Service / Servicio de Resúmenes Químicos) y el rombo de seguridad para cada una, así como también se indica el rombo según la ONU con su respectiva clase, tal como lo señala la Norma COVENIN 3060:02.

3.- Caracterización de las sustancias peligrosas para determinar si se encuentran dentro del rango de las especificaciones de la normativa ambiental por medio de la caracterización de los vertidos en las diferentes prácticas

Con las entrevistas a los técnicos de cada laboratorio se conoció la disposición final de los desechos que en estos se producen, seleccionando así los laboratorios de Diversidad y Fisiología Vegetal, Ecología Terrestre y Biodiversidad Animal, cuyos desechos son descartados en el desagüe. Según la naturaleza de los reactivos usados en las prácticas, se estableció los parámetros que se iban a determinar para cada laboratorio, como Demanda Química de Oxígeno (DQO), Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), Cloruros, Sulfatos y Nitrógeno Total. Se tomaron muestras en cada una de las prácticas siguiendo lo establecido en la Norma COVENIN 2709:02, Aguas residuales, industriales. Guía para técnicas de muestreo.

En el caso del Laboratorio Diversidad y Fisiología Vegetal, de la muestra recolectada al final de cada práctica (siete prácticas en total), se tomó una parte para realizar el análisis de DBO y la restante era depositada en un recipiente de plástico y refrigerada, de modo que al finalizar todas las prácticas se realizara los análisis restantes a esta mezcla. Los parámetros fueron determinados en el Centro de Investigación Microbiológicas Aplicadas de la Universidad de

Carabobo (CIMA-UC). Como el análisis de la DBO se debe realizar a las 24 horas siguientes a la toma de la muestra, y el resto de los parámetros se les realizó a la mezcla total; se determinó el DBO promedio (tomando en cuenta las siete muestras tomadas).

La fórmula empleada para la determinación del DBO promedio es:

$$DBO_{prom} = \frac{\sum_{i=1}^7 Vol_{mi} \cdot DBO_{mi}}{Vol_{tot}} \quad (Ec-2)$$

Dónde: DBO (ppm), Vol: volumen (L), mi: muestra i, tot: total

En la ecuación 2, se conocen los que provienen de la caracterización de las muestras individuales, pero se desconoce el volumen total y el de cada muestra, por lo que el volumen recolectado se obtuvo a través de la fórmula del paralelepípedo, ya que el fregadero en el cual se recolectó la muestra posee esta forma geométrica. Se tomaron las dimensiones de largo (39 cm) y ancho (35 cm) del fregadero, y el día de la toma de la muestra, se midió con una cinta métrica la altura a la cual se encontraba el líquido. En consecuencia la ecuación a aplicar es la siguiente:

$$Vol_{mi} = l \cdot a \cdot h \quad (Ec-3)$$

Dónde: l: largo del fregadero (m), a: ancho del fregadero (m) y h: altura del líquido (m).

Debido a que se cuenta con todas las variables necesarias para la determinación del volumen de cada muestra, el cálculo para la primera práctica titulada Nutrición Mineral resultó 7,51L y al sumar los siete volúmenes de las prácticas restantes se obtiene un volumen total de 49,2 L; y finalmente un valor del DBO promedio de 279,01 ppm.

Para los laboratorios de Biodiversidad Animal y Ecología Terrestre, se tomó una sola muestra en cada uno, ya que sólo en una práctica los desechos generados eran descartados en el desagüe; los análisis realizados fueron: DQO, DBO y cloruros para el primero y DBO y DQO para el segundo. Una vez obtenidos los resultados de los parámetros estudiados, se compararon con lo que establece el Decreto 883, “Normas para las Clasificación y

el Control de la Calidad de los Cuerpos de Agua y Vertidos o Efluentes Líquidos”. Finalmente se estableció cuales parámetros excedían el máximo establecido por el Decreto.

4.- *Proponer alternativas de recuperación de los materiales peligrosos, según la normativa ambiental vigente, a fin de seleccionar la que reduce el impacto que estos generan: Para el cumplimiento de este objetivo se procedió a dividir los desechos en tres grupos*

El primero que son todos aquellos desechos que se encuentran almacenado en un depósito destinado para ello, el segundo los que son vertidos en el desagüe y el último aquellos que se utilizan para la preservación de la flora y fauna, y son desechados cuando el volumen no es el requerido.

PRIMER GRUPO: Se realizó la inspección al depósito de desechos observándose las condiciones en las que éste se encontraba, para determinar si cumplía con lo que establece el Decreto 2635 en el capítulo II, artículo 40. Luego se procedió a realizar un inventario de las sustancias que se encuentran almacenadas, tomando en cuenta el etiquetado y envasado según lo establecido en el capítulo II, artículo 17 del mencionado Decreto. Una vez identificadas las sustancias y establecidas las condiciones de almacenamiento, se seleccionó la incineración como operación de manejo de desechos líquidos peligrosos (Castel, 2012). Hay ciertas mezclas como cloroformo-fenol, tolueno-agua que pueden ser separadas mediante un proceso de destilación gracias a sus diferencias entre sus puntos de ebullición (Montenegro, 2003). Para los ácidos y bases se puede realizar una neutralización para que estos pierdan su carácter de peligrosidad. Cabe destacar que en el Decreto 2635, se señala la ubicación y las condiciones de operación de los incineradores para los desechos peligrosos que contienen sustancias orgánicas no halogenadas y halogenadas con más de 1% de halógenos presentes en el Anexo C del mencionado Decreto.

SEGUNDO GRUPO: Una vez identificados los parámetros que excedían lo establecido en el Decreto 883, sección V, artículo 15, se determinó la relación DBO/DQO para seleccionar el tratamiento a aplicar. Dicha relación indica que si el DBO/DQO se encuentra entre 0,1 a 0,6 el tratamiento es fisicoquímico o

combinar fisicoquímico con biológico y si es mayor a 0,6 el tratamiento es biológico (Tchobanoglous *et al.*, 2003). Para el laboratorio de Biodiversidad Animal la relación fue de 0,12 mientras que para el de Fisiología y Diversidad Vegetal fue de 0,55; por lo que el tratamiento para ambos laboratorios es fisicoquímico, el cual consistió en la oxidación química. Se prepararon las muestras para la aplicación de los tratamientos, para lo cual éstas se filtraron y se llevaron a un pH neutro (mediante la adición de hidróxido de sodio). Para el laboratorio de Biodiversidad Animal se trabajó con dos (2) muestras de 250mL cada una y tres (3) para el laboratorio de Diversidad y Fisiología Vegetal, igualmente de 250mL para cada muestra.

- a) Oxidación química (disminución del DQO): Para el laboratorio de Biodiversidad Animal el parámetro fisicoquímico a estudiar es el DQO. La relación de ppm de peróxido de hidrógeno y los ppm de DQO es de 2,2:1 (Sainz, 2005), por lo que se procedió a determinar la cantidad y concentración de peróxido de hidrógeno a agregar para reducir aproximadamente 720 ppm de DQO, ya que el resultado de la caracterización de la muestra fue de 1420 ppm y el límite permisible es de 700 ppm. En una muestra de 250 mL se agregaron 10 gotas de peróxido de hidrógeno al 30% v/v. Como no se conoce ninguna información de una relación entre los ppm de hipoclorito de sodio y los ppm de DQO, pero se sabe que éste igualmente sirve para oxidar la materia orgánica y es un oxidante menos fuerte con respecto al peróxido de hidrógeno (Tchobanoglous, 2003), se trabajó con mayores cantidades de hipoclorito de sodio (100 mL) a un mismo volumen de muestra, de modo de poder evidenciar el mayor poder oxidante del peróxido de hidrogeno con respecto al hipoclorito de sodio. La oxidación química se realizó con la finalidad de disminuir la materia orgánica no biodegradable (MONB), disminuyendo a su vez el DQO, tomando en cuenta la siguiente ecuación:

$$DQO = DBO + MONB(ppm) \quad (Ec-4)$$

- b) Oxidación química (disminución del DBO): Para las tres muestras restantes el parámetro de interés fue la DBO. El tratamiento más recomendable para la disminución de este parámetro es la adición de peróxido de hidrógeno (Tchobanoglous *et al.*, 2003), pero no se dispone de una relación ppm

de peróxido de hidrógeno y ppm de DBO; por lo cual se determinó la cantidad de este oxidante para disminuir aproximadamente 2020 ppm de DBO.

Para conocer la cantidad de ppm a disminuir primeramente se caracterizó una muestra de 250 mL de la muestra total, cuyo resultado fue 3640 ppm. A otra muestra se añadió 50 mL de hipoclorito de sodio (volumen proveniente de los cálculos realizados), y a la última 10 mL de peróxido de hidrógeno, con la finalidad de oxidar la materia orgánica biodegradable, disminuyendo así el parámetro en estudio; no se pudo variar la cantidad de peróxido de hidrógeno a utilizar ya que la cantidad de muestra total no era suficiente para realizar dichas variaciones. Se agregó mayor cantidad de peróxido de hidrógeno con relación al estudio del DQO, ya que no se disponía de una relación entre la cantidad de reactivo a agregar y la DBO, además la cantidad a disminuir era cuatro veces más que en el caso de la DQO. Finalmente, una vez aplicado los tratamientos se realizó nuevamente la caracterización para ver qué tan eficiente fue la aplicación de los mismos.

TERCER GRUPO: Para los laboratorios de investigación se tomaron muestras de las sustancias patrones que allí se utilizan (etanol 70% v/v y formol 4%v/v), con las cuales se realizó la curva de calibración correspondiente a cada una, mediante el uso de un refractómetro marca ABBE. También se tomaron muestras utilizadas para la preservación de la flora y la fauna que se almacena, con el fin de determinar el índice de refracción y conocer así la concentración de cada una. Una vez conocida la concentración de la sustancia problema (muestra a analizar) se puede determinar el volumen de la sustancia patrón a añadir mediante la ecuación 5 y así llevar la concentración de la sustancia problema a la requerida.

$$V_{pat} = \frac{C_{prob} \cdot V_{prob}}{C_{pat}} \quad (Ec-5)$$

Dónde: V_{pat} : volumen del patrón (mL), V_{prob} : volumen de la sustancia problema (mL), C_{pat} : concentración del patrón (%v/v) C_{prob} : concentración de la sustancia problema (%v/v).

5.- Diseñar un plan para el manejo de las sustancias peligrosas en los laboratorios con la finalidad de cumplir con lo que establecen las leyes a nivel ambiental

Según lo establecido en el Decreto 2635, capítulo II, artículo 29 y las actividades que se realizan en los laboratorios de Biología de la FACYT, las actividades a considerar para el plan de manejo de los desechos peligrosos son:

- a) Almacenamiento temporal: Depósito temporal de los desechos peligrosos bajo condiciones controladas y ambientalmente seguras, sin que se contemple ninguna forma de tratamiento ni transformación inducida de los desechos almacenados. Ningún desecho peligroso puede permanecer más de cinco (5) años en un almacén de carácter temporal. Los desechos con riegos de clase 4 ó 5 no pueden permanecer en condiciones de almacenamiento temporal durante más de un año sin haber sido tratados o tomado las medidas necesarias de manera que se haya minimizado el riesgo ambiental y peligro a la salud (Decreto 2635, 1998). En el almacenamiento temporal está contemplado la identificación y recolección de las sustancias peligrosas.
- b) Transporte: Traslado de los desechos en vehículos destinados a este fin, desde los lugares de almacenamiento/generación hasta el sitio donde serán dispuestos, con o sin tratamiento (Betancourt y Pichis, 2004).
- c) Tratamiento: Operaciones realizadas con la finalidad de reducir o anular algunas de las características peligrosas del desecho a fin de facilitar su manejo (Decreto 2635, 1998).
- d) Disposición final: Operación que permite mantener minimizadas las posibilidades de migración de los componentes de un desecho peligroso al ambiente en forma permanente de conformidad con las normas establecidas (Decreto 2635, 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presenta los resultados y análisis de cada uno de los procedimientos realizados en las diferentes etapas de la investigación.

1.- Diagnóstico de las condiciones en los laboratorios con relación al manejo de las sustancias, para conocer cuáles se están tratando de maneras adecuadas y cuáles no

Una vez analizados los resultados de las encuestas aplicadas a los profesores, técnicos y estudiantes, se obtienen las siguientes conclusiones:

- a) Algunas veces los estudiantes manejan sustancias peligrosas.
- b) Se pudo observar que los estudiantes indicaron que siempre tienen acceso a las hojas de seguridad de las sustancias que manipulan en el laboratorio, siendo esto una discrepancia a lo que opinan los técnicos y profesores, ya que estos indican que no existen dichas hojas. Esto puede deberse al hecho de que los estudiantes no conocen qué es una hoja de seguridad, o que no disponen de hojas de seguridad para todas las sustancias que emplean.
- c) Adicionalmente se observa que se ha implementado un plan de manejo de las sustancias peligrosas, que actualmente se lleva a cabo en la mayoría de los laboratorios, y consiste en envasar las sustancias y llevarlas a un depósito de desechos.
- d) De igual forma, se puede acotar que en la mayoría de los laboratorios, tanto los estudiantes como el personal técnico y docente, tienen conciencia del impacto ambiental que generan estas sustancias.
- e) Así mismo, se tiene que el lugar de trabajo es considerado un ambiente seguro.

2.- Identificación de las sustancias que se utilizan en cada una de las prácticas en todos los laboratorios según los niveles de riesgo de acuerdo a la normativa vigente con la finalidad de seleccionar cuales son las sustancias con las que se va a trabajar según el nivel de peligrosidad

En esta fase de la investigación se clasificaron todas las sustancias químicas orgánicas e inorgánicas de acuerdo al nivel de peligrosidad y clase, según lo establecido en el Decreto 2635, tal como lo muestran las Tablas I y II de algunas sustancias; de igual forma dichas sustancias se caracterizaron según sus propiedades fisicoquímicas, el número CAS y su rombo de seguridad, tal como se observa en las Tablas III y IV, de algunas sustancias tanto orgánicas como inorgánicas utilizadas en los laboratorios del Departamento de Biología.

3.- Caracterización de las sustancias peligrosas para determinar si se encuentran dentro del rango de las especificaciones de la normativa ambiental por medio de la caracterización de los vertidos en las diferentes prácticas

En esta etapa se procedió a recolectar las muestras de los laboratorios cuyos vertidos eran descartados directamente al desagüe, siguiendo

Tabla I. Nivel de Peligrosidad y Clase de algunas de las Sustancias Químicas Orgánicas de los Laboratorios del Departamento de Biología según el Decreto 2635.

Sustancia	Nivel de peligrosidad	Nº de Código de las Naciones Unidas	Clase
Acetato de cobre	Peligroso	H4.2	4
Acetato de plomo	Muy peligroso	H6.1	6
Acetato de potasio	Poco peligroso	H10	9
Fenol	Demasiado peligroso	H6.1	6
Fenol-cloroformo	Muy peligrosos	H6.1	6
Orcinol	Peligroso	H6.1	6

Tabla II. Nivel de Peligrosidad y Clase de algunas de las Sustancias Químicas Inorgánicas de los Laboratorios del Departamento de Biología según el Decreto 2635

Sustancia	Nivel de peligrosidad	Nº de Código de las Naciones Unidas	Clase
Ácido clorhídrico	Muy peligroso	H8	8
Ácido fosfórico	Peligroso	H8	8
Ácido nítrico	Muy peligroso	H8	8
Ácido sulfúrico	Muy peligroso	H8	8
Nitrógeno líquido	Muy peligroso	H2	2
Yodo	Muy peligroso	H8	8

lo establecido por la Norma COVENIN 2709:02. Dichas muestras fueron analizadas en el CIMA-UC. Una vez obtenidos los resultados, se llevó a cabo una comparación con lo establecido en el Capítulo III, Sección 5 del Decreto 883, donde se establecen los límites máximos permisibles de los parámetros fisicoquímicos de los efluentes descargados a las redes cloacales.

En el Laboratorio de Ecología Terrestre los parámetros que se determinaron fueron DBO y DQO (Tabla V), los cuales se encuentran dentro de los límites máximos permisibles. La Tabla VI, muestra los valores de DBO obtenidos en las siete prácticas del Laboratorio de Diversidad y Fisiología Vegetal, observándose que en tres prácticas éste excedió el límite establecido; el estudio de los demás parámetros se realizó de la muestra global, por lo que fue necesario el cálculo del DBO promedio, debido a que los demás parámetros se determinaron a la mezcla de las siete prácticas. De manera general, en los laboratorios de Diversidad-Fisiología Vegetal y Biodiversidad Animal, algunos de los parámetros fisicoquímicos determinados se encuentran fuera de las especificaciones que indica el Decreto 883, es por ello que de acuerdo a la naturaleza de las sustancias

se plantearon una serie de alternativas de modo que ayuden a la disminución de dichos parámetros, eligiendo la más pertinente según la factibilidad que estas presentan.

4.- Alternativas de recuperación de los materiales peligrosos, según la normativa ambiental vigente a fin de seleccionar la que reduce el impacto que estos generan

A continuación se presenta la aplicación de la oxidación química a los vertidos de los laboratorios de Diversidad-Fisiología Vegetal y Biodiversidad Animal, donde los parámetros de DBO y DQO determinados a través de la caracterización, superaron el límite estipulado en la normativa ambiental correspondiente. Por otra parte, para los laboratorios de Biodiversidad y Fisiología Animal, que emplean Formol y Etanol para la preservación de la flora y fauna, se plantea la alternativa del reúso de dichas sustancias; para lo cual se dispone de una curva de calibración de Índice de Refracción Vs Concentración para ambos compuestos, y así conocer la concentración de los mismos una vez que el animal o la planta haya absorbido una parte de formol o etanol (según sea el caso), disminuyendo la concentración

Tabla III. Características de algunas de las Sustancias Químicas Orgánicas utilizadas en los Laboratorios del Departamento de Biología.

Sustancia	Fórmula	Numero CAS	Pto. de ebullición (°C)	Solubilidad en agua a 20°C	Rombo de seguridad	Rombo de la ONU / Clase
Acetato de cobre	$\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	6046-93-1	Se descompone	72g/L		 Clase 4
Acetato de plomo	$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	1335-32-6	100 (se descompone)	410g/L		 Clase 4
Acetato de potasio	KCH_3COO	127-09-3	No aplica	256g/100mL		 Clase 4

Tabla IV. Características de algunas de las Sustancias Químicas Inorgánicas utilizadas en los Laboratorios del Departamento de Biología.

Sustancia	Fórmula	Numero CAS	Pto. de ebullición (°C)	Solubilidad en agua a 20°C	Rombo de seguridad	Rombo de la ONU / Clase
Ácido clorhídrico	HCl	7647-01-0	50	Si		 Clase 8
Ácido fosfórico	H_3PO_4	7664-38-2	158	Miscible		 Clase 8
Ácido nítrico	HNO_3	7697-37-2	86	Si		 Clase 8

de la solución patrón, con este último parámetro y conociendo el volumen de la muestra, se determina qué volumen de formol o etanol es necesario agregar de la solución patrón para llegar a la concentración requerida.

En la Tabla VII, se puede observar que el tratamiento más influyente para la disminución de la DBO es con peróxido de hidrógeno, ya que el

valor obtenido fue de 1620 ppm teniendo en cuenta que el valor de la muestra inicial es de 3640 ppm, esto se debe a que éste es un oxidante más fuerte con respecto al hipoclorito de sodio (Brown *et al.*, 2004). Es importante evitar el exceso de peróxido de hidrógeno, ya que las altas concentraciones de radicales $\text{OH}^\bullet$ origina reacciones competitivas que producen efectos inhibidores en la degradación de los compuestos. Cuando el peróxido de hidrógeno

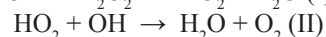
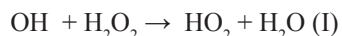
Tabla V. Resultados de la caracterización de los efluentes de los Laboratorios Ecología Terrestre y Biodiversidad Animal.

Laboratorio	Parámetros	Valores obtenidos (ppm)	Límites máximos (ppm), según Decreto 883
Ecología Terrestre (1 practica)	DBO	87,41	350
	DQO	170	700
Biodiversidad Animal (1 practica)	DBO	181,5	350
	DQO	1420	700
	Cloruros	5,5	300

Tabla VI. Resultados de la caracterización de los efluentes del Laboratorio de Diversidad y Fisiología Vegetal.

Práctica	Parámetro	Valores obtenidos (ppm)	Límites máximos (ppm), según Decreto 883
Nutrición Mineral		85	
Nutrición Mineral II		148,5	
Fotosíntesis I		445,8	
Fotosíntesis II	DBO	228,7	350
Fotosíntesis III y IV		350,5	
Fotosíntesis V		293,7	
Fotosíntesis VI		374,5	
	DBO mezcla	3640	350
	DBO promedio	279,01	350
Todas (muestra global)	DQO	52,3	700
	Cloruros	8,4	300
	Nitrógeno total	18,8	40
	Sulfatos	84	400

esta en exceso, captura los radicales hidroxilos, tal como se muestra en las reacciones:



formando un radical menos reactivo, el HO_2 ; se verifica que en las reacciones (I y II) hay consumo del radical hidroxilo, lo que conduce a una disminución del poder oxidativo del proceso; por tal razón debe tenerse en cuenta la necesidad de determinar correctamente las dosis óptimas aplicadas de reactivo para que no se presenten efectos negativos en la eficiencia de degradación de los contaminantes (Rodríguez *et al.*, 2008). La Tabla VIII, muestra los volúmenes de peróxido de

hidrogeno a utilizar para cada una de las prácticas en el Laboratorio de Diversidad y Fisiología Vegetal que estaban fuera del límite de DBO permitido por la normativa.

En la Tabla VII, también se observa que el tratamiento más eficaz para disminuir la DQO es la adición del peróxido de hidrógeno, pero es importante mencionar que ambos tratamientos disminuyeron la DQO de forma que el valor estuviera dentro de lo establecido en el Decreto 883. Se seleccionó como tratamiento a aplicar la adición de peróxido de hidrógeno ya que es menos cantidad de reactivo y mucho más eficiente que el hipoclorito de sodio, puesto que este permite oxidar materia orgánica biodegradable y no biodegradable. La cantidad sugerida para adicionar a

Tabla VII. Resultados de la caracterización a los efluentes de los Laboratorios de Diversidad y Fisiología Vegetal y Biodiversidad Animal después de haber aplicado el tratamiento de oxidación.

Laboratorio	Parámetro	Hipoclorito de Sodio (NaClO)	Peróxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂)
Diversidad-Fisiología Vegetal	DBO (ppm)	2320	1620
Biodiversidad Animal	DQO (ppm)	636	394

Tabla VIII. Cantidad de Peróxido de Hidrógeno a utilizar por practica en el Laboratorio de Diversidad y Fisiología Vegetal

Practica	Cantidad de reactivo (mL)
Fotosíntesis I	34,0
Fotosíntesis III y IV	0,1
Fotosíntesis VI	3,3

Tabla IX. Valores del Índice de Refracción, Concentración y Volúmenes a agregar para las muestras de Formol y Etanol de los Laboratorios de Biodiversidad y Fisiología Animal.

	Laboratorio	Índice de refracción	Concentración (%V/V)	Volumen (mL)
Para las muestras de Formol	Biodiversidad	1,3375	1,95	24,4
	Biodiversidad Animal	1,3390	2,56	32,0
Para las muestras de Etanol	Biodiversidad	1,3605	1,95	1,4
	Biodiversidad Animal	1,3530	2,56	1,8

un muestra de 800 mL (volumen real de la muestra) es de 3mL de peróxido de hidrógeno.

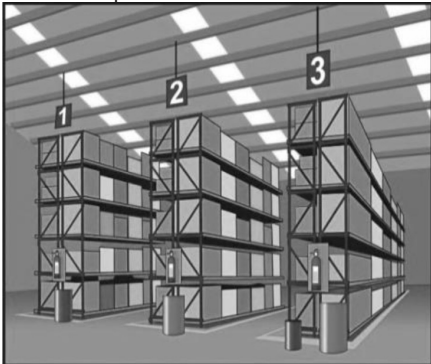
En la Tabla IX, se muestran los índices de refracción, la concentración y los volúmenes a agregar de las soluciones patrones a las muestras analizadas de formol y etanol de modo que éstas vuelvan a tener la misma concentración del patrón. A través de la ecuación 5, se obtiene el volumen a agregar de la sustancia para que la solución mantenga su concentración original. Para el laboratorio de Biodiversidad, para un índice de refracción de formol de 1,3375, empleando la curva de calibración pertinente, la concentración que le corresponde es 1,95%v/v. Se conoce que la concentración de la solución patrón es 4%v/v. El cálculo del volumen es el siguiente:

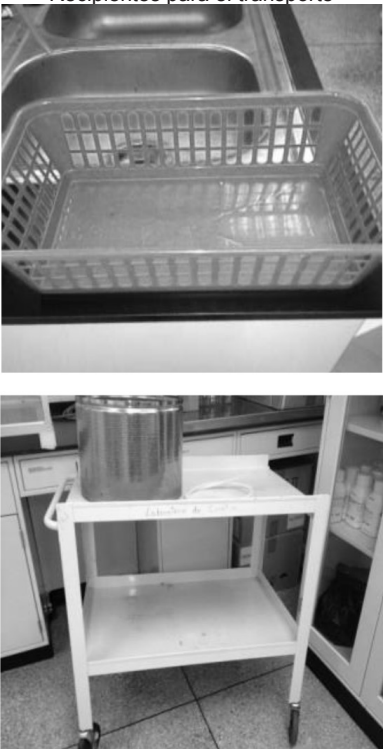
$$V_c = \frac{\left(1,95\% \frac{v}{v}\right) 50mL}{4\% \frac{v}{v}} = 24,38 \text{ mL} \sim 24,4 \text{ mL}$$

De igual forma se procede para determinar los volúmenes de las otras tres muestras restantes.

5.- *Diseñar un plan para el manejo de las sustancias peligrosas en los laboratorios con la finalidad de cumplir con lo que establecen las leyes a nivel ambiental*

A continuación se presentan las propuestas para el mejoramiento del manejo de las sustancias peligrosas de los laboratorios del Dpto. de Biología de la FACYT-UC.

Propuestas para Mejorar el Manejo de Sustancias Peligrosas en los Laboratorios del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad de Carabobo	
Almacenamiento Temporal	
Situación actual	
Depósito de desechos 	Descripción: El Departamento de Biología cuenta con un depósito de desechos, donde se almacenan las sustancias generadas en los distintos laboratorios. Consta de tres estantes de aluminio y un extractor de aire. Algunos de los estantes se encuentran oxidados y los recipientes de almacenamiento no son los adecuados. Ciertos desechos se encuentran derramados en el piso de granito. No posee ventilación, ni la señalización adecuada con respecto a la ubicación de los desechos. Existen también algunas cajas que se encuentran sin identificación.
Propuesta	
Kit para derrames químico  Depósito ideal de desechos 	Descripción: Los estantes deben ser de un material resistente de acuerdo a la característica de peligrosidad de los desechos. El piso debe ser de concreto armado, no resbaladizo y con un recubrimiento de una pintura epóxica. Debe tener: a) Ventilación natural, por lo que se recomienda la instalación de ventanas pequeñas además de dos extractores adicionales. b) La correcta señalización de los estantes, de acuerdo a la incompatibilidad de los desechos. c) Un kit anti derrame de acuerdo a como se almacenan (uno para reactivos químicos y otro para hidrocarburos). d) alarma contra incendio. e) Un extintor de y de un formato de registro de la entrada y salida de desechos en el depósito. Los envases deben estar debidamente identificados y los desechos estar almacenados de acuerdo a la incompatibilidad química.

Propuestas para Mejorar el Manejo de Sustancias Peligrosas en los Laboratorios del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad de Carabobo	
Transporte Interno	
Situación actual	
Recipientes para el transporte 	Descripción: El transporte interno es realizado por cada técnico del laboratorio, empleando la bata, guantes de látex y tapa boca. Si la cantidad de desechos a transportar es pequeña se hace en unas cestas de plástico, en caso contrario se utilizan unos carros metálicos. Los frascos de desechos en algunos casos son de plásticos o vidrio, identificados únicamente con el nombre del desecho y en algunos casos la concentración de los mismos. No están todas las hojas de seguridad de las sustancias que se manipulan en los laboratorios, por lo que el personal no se encuentra bien informado de las sustancias que manipulan. Las tapas no son las adecuadas, muchas de las cuales se encuentran oxidadas. En las instalaciones de la Facultad no existe ninguna señalización indicando las vías de escape en caso de emergencia, ni la ruta utilizada al momento de transportar los desechos al depósito.
Propuesta	
Correcta vestimenta de las personas al transportar los desechos 	Descripción: En cuanto al transporte y señalización se observa el incumplimiento con el Decreto 2635. Los técnicos deben tener la vestimenta adecuada: botas, guantes de seguridad, lentes antiempañante, mascarilla y bata. El carro debe tener barandas a los lados y envases cerrados para evitar el derrame del desecho. Los envases de almacenamiento deben ser un material resistente de acuerdo a las características y cantidad del desecho a almacenar; estos deben tener una etiqueta donde indique: nombre del desecho, nombre del generador, fecha de envasados, cantidad contenida y símbolo de peligrosidad (etiqueta según la normativa). El área debe estar delimitada con la señalización de peligro en los lugares de acceso y de forma visible, según Norma COVENIN 187:92. Se debe disponer de la hoja de seguridad, según Norma COVENIN 3059:02, de cada una de las sustancias que se manipulan en los distintos laboratorios para saber la adecuada manipulación de los mismos y evitar así un accidente laboral y en caso de suceder saber cómo actuar, de acuerdo a las Normas COVENIN 2226:90, 2670:01 y 3402:98.
Correcta forma de transportar los desechos  Recipiente Infecciosos o Riesgo Biológico Recipiente Químicos	

Propuestas para Mejorar el Manejo de Sustancias Peligrosas en los Laboratorios del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad de Carabobo	
Tratamiento	
Situación actual	
Desagüe  Depósito de desecho 	Descripción: Algunos laboratorios utilizan el autoclave para la eliminación de las bacterias de sus desechos biológicos, para ser tratados como un desecho común y descartados en la basura. Los desechos biológicos en la autoclave deben permanecer un tiempo de 30 minutos a una temperatura de 121°C, y una presión de 15 lbf/pulg², de modo de poder garantizar que los mismos pierdan sus características de peligrosidad. Otros laboratorios envasan sus desechos y los llevan al depósito destinado para ellos. Y el resto los descartan directamente al desagüe sin tratamiento previo.
Propuesta	
Aplicación de tratamientos 	Descripción: Según las caracterizaciones algunos parámetros están por encima de lo establecido en el Decreto 883, para la disminución de la DQO se debe realizar la oxidación química empleando peróxido de hidrógeno como agente oxidante. Para la disminución de la DBO se aplica el mismo tratamiento utilizando el mismo reactivo. Para los laboratorios que usan formaldehído y etanol deben emplear las curvas de calibración para el reúso de estas sustancias.

Propuestas para Mejorar el Manejo de Sustancias Peligrosas en los Laboratorios del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad de Carabobo	
Disposición Final	
Situación actual	
Desagüe  Depósito de desecho 	Descripción: Actualmente existen tres tipos de disposición final dentro de los laboratorios de Biología. Un primer grupo vierte sus desechos directamente en el desagüe, un segundo grupo envasa los desechos y los lleva al depósito destinado para los mismos y un último grupo también desecha el reactivo en el desagüe una vez que este ya no cubre en totalidad el animal o planta que estén almacenando (esto se realiza en un periodo largo de tiempo)
Propuesta	
Incineración de desechos líquidos 	Descripción: De acuerdo a lo observado se consideró que para el primer grupo de laboratorios, previamente se debe aplicar el tratamiento sugerido antes de descartar los desechos por el desagüe, para el segundo grupo se deben incinerar todos los reactivos que tengan un tiempo mayor 5 años en el depósito destinado para los mismos, y por último para el tercer grupo se recomienda el reúso de los reactivos mediante el uso de las curvas de calibración de los mismos.

Propuestas para Mejorar el Manejo de Sustancias Peligrosas en los Laboratorios del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad de Carabobo	
Normativas dentro de los Laboratorios	
Situación actual	
Etiquetado de los recipientes 	Descripción: Actualmente las personas que laboran dentro de los laboratorios solo utilizan la bata y algunos guantes de látex. Algunos reactivos se encuentran identificados con la etiqueta de fábrica y otros solo tienen el nombre. No existe un registro de entrada y salida de los reactivos así como tampoco su respectiva hoja de seguridad. No hay señalización correspondiente acerca de los riesgos de la manipulación de los reactivos ni de los instrumentos a utilizar en casos de emergencia (ducha lava ojos y de cuerpo completo)
Propuesta	
Señalización 	Descripción: Se recomienda la implementación de un plan de manejo de las sustancias, en cuanto a la vestimenta, señalización (según Norma COVENIN 187:92), hojas de seguridad (según Norma COVENIN 3059:02), etiquetado de los envases; así como los equipos de protección en caso de un accidente (según Normas COVENIN 2226:90, 2670:01 y 3402:98). También se recomienda el uso de registro de formatos de entrada y salida de reactivos de manera de llevar un mejor control de los mismos. El personal Docente y Técnico debe ser adiestrado según la Norma COVENIN 3061:02.

Finalmente, se puede concluir que la oxidación química con peróxido de hidrógeno fue el tratamiento fisicoquímico escogido para la disminución de la DBO y la DQO. Por otra parte, se debe incinerar los desechos que se encuentran en el depósito; y la implementación de los diferentes tratamientos es factible, ya que es de fácil ejecución y no requiere de un personal ajeno al Dpto. de Biología de la FACYT-UC.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos que no existieron conflicto de intereses durante la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a todo el personal del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo por su valiosa colaboración en la realización del presente trabajo de investigación.

REFERENCIAS

- Betancourt L. & Pichis L. (2006). *Plan de Manejo de Desechos Sólidos en la Gestión Ambiental Empresarial*. [On-line] Consultado en: <http://www.monografias.com/trabajos19/manejo-desechos-solidos/manejo-desechos.shtml>
- Brown T., Lemay E., Bursten B. & Burdge J. (2004). *Química la Ciencia Central*. 9na edición. Prentice Hall. México.
- Cadena M. (1974). *Estadística Básica*. [On-line] Consultado en: <http://www.monografias.com/trabajo15/estadistica.shtml>.
- Castel E. (2012). *Sistemas de Tratamiento Térmico: La Incineración*. 2da edición. Ediciones Díaz de Santos. México.
- Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela 5.554 Extraordinario. Ley 55 (2001). *"Ley Sobre Sustancias, Materiales y Desechos Peligrosos"*. Caracas, Venezuela.

- Gaceta Oficial de la República de Venezuela 5.245 Extraordinario. Decreto 2635 (1998). *"Normas para el Control de la Recuperación de Materiales Peligroso y el Manejo de los Desechos Peligrosos"*. Caracas, Venezuela.
- Gaceta Oficial de la República de Venezuela 5.305 Extraordinario (1999). Decreto 3219. *"Normas para la Clasificación y el Control de las Aguas de la Cuenca del Lago de Valencia"*, Caracas, Venezuela.
- Gaceta Oficial de la República de Venezuela 5.021 Extraordinario. Decreto 883. *"Normas para la Clasificación y el Control de la Calidad de los Cuerpos de Agua y Vertidos o Efluentes Líquidos"*. Caracas, Venezuela.
- Hurtado J. (2008). *Metodología de la Investigación, una comprensión Holística*. Quiron - Sypal. Caracas, Venezuela.
- López M. & Urbina E. (2011). *Diseñar el Plan de Acción para el Manejo de las Sustancias Peligrosas en las Áreas Clínicas de Imagenología y Endodoncia de la Facultad de Odontología*. Tesis de Grado, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.
- Montano M. (2006). *Manejo de los Residuos Biológicos Infecciosos Sólidos, Generados por Alumnos de la UABC y Dentistas ubicados en la Zona Centro de la Ciudad de Mexicali*. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, México.
- Montenegro A. (2003). *Notas para la Historia de la Destilación*. Tébar. Madrid, España.
- Norma Venezolana COVENIN 187 (1992). *"Colores, Símbolos y Dimensiones para Señales de Seguridad"*. 1era revisión. Editorial FONDONORMA. Caracas, Venezuela.
- Norma Venezolana COVENIN 2226 (1990). *"Guía para la Elaboración de Planes para el Control de Emergencias"*. Editorial FONDONORMA. Caracas, Venezuela.
- Norma Venezolana COVENIN 2670 (2001). *"Materiales Peligrosos. Guía de Respuesta a Emergencia"*. 3era revisión. Editorial FONDONORMA. Caracas, Venezuela.
- Norma Venezolana COVENIN 2709 (2002). *"Aguas Naturales, Industriales y Residuales. Guía para las Técnicas de Muestreo"*. 1era revisión. Editorial FONDONORMA. Caracas, Venezuela.
- Norma Venezolana COVENIN 3059 (2002). *"Materiales Peligrosos. Hoja de Datos de Seguridad de los Materiales (HDSM)"*. 1era revisión. Editorial FONDONORMA. Caracas, Venezuela.
- Norma Venezolana COVENIN 3060 (2002). *"Materiales Peligrosos. Clasificación, Símbolos y Dimensiones de Señales de Identificación"*. 1era revisión. Editorial FONDONORMA. Caracas, Venezuela.
- Norma Venezolana COVENIN 3061 (2002). *"Materiales Peligrosos. Guía para el Adiestramiento de Personas que Manejan, Almacenan y/o Transportan Materiales Peligrosos"*. 1era revisión. Editorial FONDONORMA. Caracas, Venezuela.
- Norma Venezolana COVENIN 3402 (1998). *"Materiales Peligrosos. Directrices para la Atención de Incidentes y Emergencias"*. Editorial FONDONORMA. Caracas, Venezuela.
- Rodríguez T., Botelho D. & Cleto E. (2008). *Tratamiento de Efluentes Industriales de Naturaleza Recalcitrante Usando Ozono, Peróxido de Hidrogeno y Luz Ultravioleta*. Universidad Militar de Nueva Granada, Colombia.
- Sainz J. (2005). *Tecnología para la Sostenibilidad. Procesos y Operaciones Unitarias en Depuración de Aguas Residuales*. EOI. Madrid. España.
- Tamayo T. & Tamayo M. (1997). *Estadística*. Reverte. México.
- Tchobanoglous G., Burton F., Trillo J. & Trillo I. (2003). *Ingeniería de las Aguas Residuales. Tratamiento y Reúso*. 4ta edición. McGraw Hill. España.
- Zorrilla A. (1993). *Introducción a la Metodología de la Investigación*. McGraw Hill. España.

Recibido el 26/06/2014
Aceptado el 06/11/2014

Reporte Epidemiológico

Evolución espacial y temporal de la malaria en el municipio Sifontes del estado Bolívar, Venezuela. 1980-2013

Spatial and temporal evolution of malaria in the municipality of Sifontes, Bolívar State, Venezuela. 1980-2013

Jorge E. Moreno^{1,2}, Yasmin Rubio-Palis^{1,3}, Ángela R. Martínez⁴ & Porfirio Acevedo^{3,4}

RESUMEN

La malaria es endemo-epidémica en el estado Bolívar, con brotes epidémicos frecuentes debido a causas naturales y antrópicas. En el municipio Sifontes, ubicado en el noreste del estado, durante el último decenio se ha registrado un aumento considerable de los casos, cerrando 2013 con 46.610 casos, 71% % de la malaria del estado y 61% del país. Este es un foco meso-endémico de malaria inestable donde la transmisión ocurre durante todo el año, con brotes epidémicos estrechamente relacionados con la minería aurífera. A partir de 1983, gran parte de la malaria en Venezuela depende de la generada en el estado Bolívar, y esta a su vez de la generada en el municipio Sifontes. La revisión de la data de malaria del estado en el periodo 1980-2013 reveló la existencia de dos niveles epidemiológicos, uno basal y otro adicional, este último ligado a la minería aurífera; sin embargo, no se encontró correlación con la lluvia, para el nivel basal ($R = 0,41$, $P = 0,78$) ni para el nivel epidémico ($R = 0,41$; $P = 0,32$). Asimismo, la proyección geográfica de los datos reveló la naturaleza focal de la enfermedad en el municipio, el cual reúne todas las condiciones epidemiológicas, ambientales, climáticas y sociales para ser considerado un foco caliente. Las características espaciales y temporales de la malaria en el municipio Sifontes lo configuran como el foco de malaria más importante en Venezuela, el cual debe ser priorizado en los planes de control de la enfermedad.

Palabras clave: epidemiología, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, foco caliente

SUMMARY

Malaria is endemo-epidemic in Bolívar state with frequent epidemic outbreaks occurring due to both natural and anthropic factors. The Sifontes municipality, located in the northeastern corner of the state, has reported a considerable increase in the number of cases over the last decade; with 46.610 cases registered during 2013. This represents 71% of the number of malaria cases reported for the state and 61% for the country in this same year. Sifontes municipality is a meso-endemic focus of unstable malaria, and transmission occurs throughout the year with epidemic outbreaks tightly linked to gold mining activities. Since 1988 the increase in the number of cases reported in Venezuela has been determined by the number of cases reported in Bolívar state which, in turn, is correlated with the number of cases reported in Sifontes. A review of malaria data between 1980 and 2013 reveals the existence of two epidemiological categories: a base level and an additional level, the latter associated with gold mining; nevertheless, there was not correlation whit the rainfall for basal ($R = 0,41$, $P = 0,78$) or additional level ($R = 0,41$; $P = 0,32$). In addition, a geographic plotting of the data revealed the focal nature of malaria in the municipality, which to gather all environmental, climatic, social and epidemiological factors that have produced conditions typical of a hot spot. The spatial and temporal characteristics of malaria in the Sifontes municipality demonstrates that this is the most important malaria focus in Venezuela, and must be prioritized when designing strategies for the control of this disease.

Key words: epidemiology, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, hot spot.

¹ Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon", Ministerio del Poder Popular para la Salud (IAE/MPPS), Maracay, estado Aragua, Venezuela.

² Centro de Investigaciones de Campo "Dr. Francesco Vitanza" (IAE/MPPS). Tumeremo, estado Bolívar, Venezuela.

³ Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Universidad de Carabobo, Sede Aragua. Venezuela.

⁴ Instituto de Salud Pública del Estado Bolívar, Ciudad Bolívar, estado Bolívar. Venezuela.

*Autor de correspondencia: jorermo@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La malaria es de naturaleza endemo-epidémica en el estado Bolívar, los brotes epidémicos son frecuentes debido a causas naturales y antrópicas. A partir de 1988 se instaló en el estado una epidemia la cual, a pesar de algunos descensos, se mantiene hasta 2013 con una fuerte tendencia al incremento [Dirección de Salud Ambiental del Estado Bolívar (DSAEB), 1995-2013; Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), 2013].

El municipio Sifontes, ubicado en el noreste del estado Bolívar, es considerado uno de los principales focos de malaria en Venezuela. Durante el decenio 2004-2013, se ha registrado un aumento considerable de los casos con una fuerte tendencia al incremento, superando la casuística por mucho el nivel de epidemia. Durante el año 2013 se reportaron en el municipio 46.610 casos, lo cual representó 70,6% de la malaria del estado y 60,8% del país, cifras record de malaria para este foco endémico (MPPS, 2013).

Esta región pertenece al área malárica meridional de Venezuela, que incluye los estados Bolívar y Amazonas, situados ambos al sur del país, en la frontera con Brasil, Colombia y Guyana (Gabaldon *et al.*, 1975). Este es un foco meso-endémico de malaria inestable (Snow & Gilles, 2002, Villegas *et al.*, 2011), donde la transmisión ocurre durante todo el año con brotes epidémicos provocados principalmente por factores antrópicos. En efecto, la evidencia indica que la actividad económica principal de la región, la minería aurífera, está estrechamente relacionada con la morbilidad malárica, debido a la fuerte intervención ambiental derivada del uso inadecuado de la tierra, lo cual ocasiona alteración del suelo y la hidrología superficial y crea ambientes propicios para la cría de anofelinos, e induce cambios en el patrón de comportamiento de las especies de anofelinos (Moreno *et al.*, 2000; 2007; 2009). El área ha sido considerada de alto riesgo a malaria donde ésta es considerada una enfermedad ocupacional, debido a su estrecha relación con la minería (Aché, 1998). Al igual que en otras regiones, la variabilidad de la malaria de esta área, es el resultado de la conjugación de una serie de factores ambientales y sociales tales como clima, vectores, parásitos y poblaciones humanas (Haines & McMichael, 1997; McMichael & Haines, 1997).

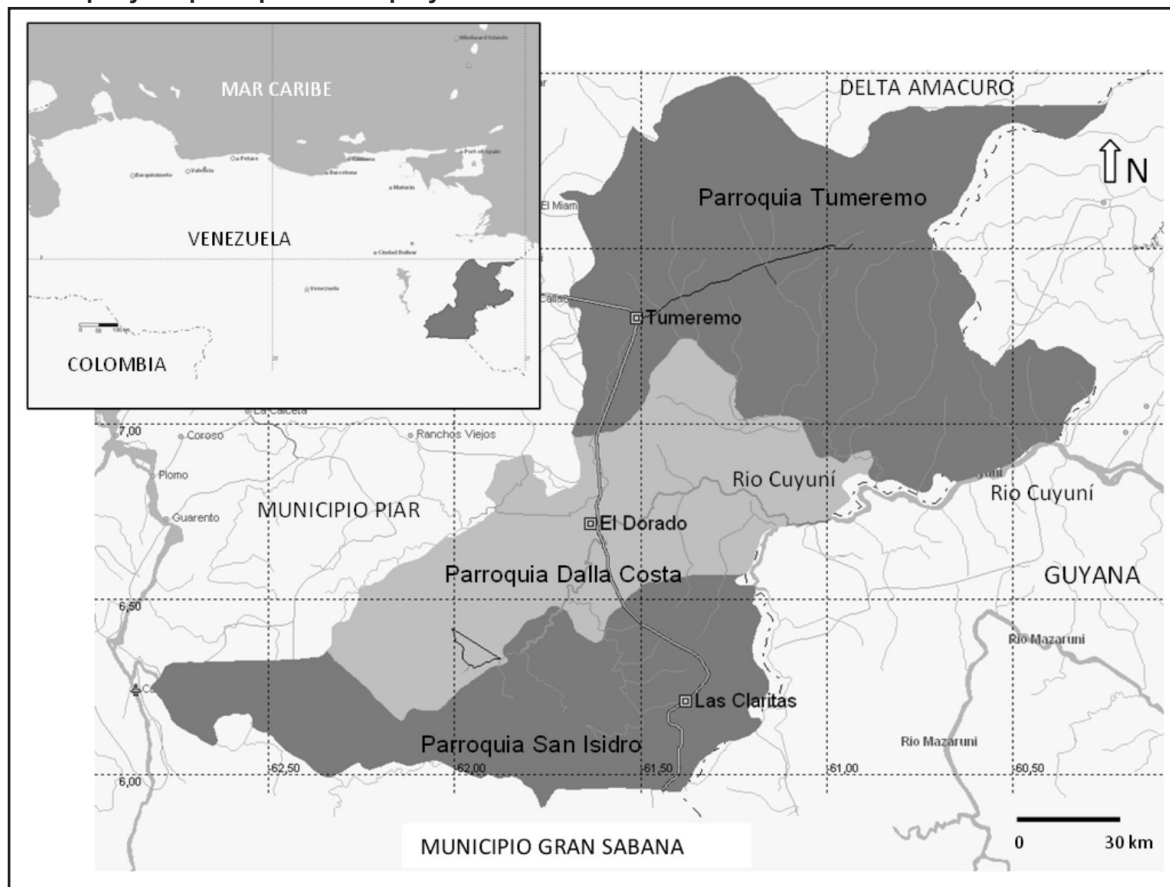
De manera concomitante, las estrategias clásicas de control de vectores, fundamentadas en el rociamiento intradomiciliario y las aplicaciones espaciales de insecticidas, han resultado insuficientes para resolver el problema. Esto es debido principalmente al comportamiento exofílico de los vectores, al fenómeno de la resistencia a los insecticidas y a graves problemas operativos en el programa de control (Cáceres, 2011; Molina *et al.*, 1997). Adicionalmente, existen factores sociales propios de las comunidades mineras, tales como la construcción de viviendas provisionales que no poseen superficies adecuadas para el rociamiento, hábitos laborales que exponen a las personas a la picada de anofelinos y alta movilidad. En este trabajo, a partir de la data anual generada por la Dirección General de Salud Ambiental (DGSA, 1936-2000) y la data semanal generada por el Servicio de Vigilancia Epidemiológica de la DSAEB (1995-2013), se hace un análisis retrospectivo de la malaria en el estado Bolívar y el municipio Sifontes durante el lapso 1980-2013, con el objeto de describir sus variaciones temporales y espaciales, con lo cual se pretende aportar nuevos elementos para el diseño de estrategias de control ajustadas a las variaciones de la enfermedad.

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA ENDÉMICA

El municipio Sifontes del estado Bolívar abarca 24.392 km² y está ubicado en el extremo oriental del estado (lat 6° 00' - 7° 54' N, long 60° 44' - 61° 39' W). Geopolíticamente está dividido en tres parroquias: Tumeremo al norte, donde se encuentra la capital del municipio del mismo nombre; Dalla Costa en el centro, cuya capital es El Dorado y San Isidro al sur, un conglomerado urbano formado por las comunidades de Las Claritas, Ciudad Dorada y San Isidro (Fig. 1). Este territorio coincide casi en su totalidad con la cuenca del Cuyuní-Yuruarí, formada por la confluencia de los dos ríos y que tiene una extensión de 50.000 km², de los cuales aproximadamente 12.000 se encuentran fuera del territorio venezolano (Fig. 1). Propiamente, se trata de tres cuencas: la del río Yuruarí, la del Cuyuní hasta la confluencia con el Venamo y la del río Botanamo al norte (Hernández, 1987).

El municipio Sifontes se encuentra incluido dentro de la región Colinas, la cual representa una transición entre los ecosistemas de tierra baja y los montanos, con un relieve suave y altitudes inferiores a los 1.000 m, en la cual se distinguen dos subregiones

Fig. 1. División política del municipio Sifontes y su ubicación relativa en Venezuela. El polígono del municipio y las parroquias están proyectados en TrackMaker®.



del Escudo Guayanés (Huber & Oliveira-Miranda, 2010). La primera en el norte, denominada Subregión C.2., correspondiente a la parroquia Tumeremo, está conformada por un sistema de colinas y sierras bajas premontanas, caracterizada por una vegetación heterogénea y una pluviosidad media anual que varía entre 1.200 y 2.000 mm. Desde el punto de vista florístico y fisionómico, la cobertura vegetal varía desde bosques siempreverdes húmedos (ombrófilos) hasta bosques ribereños deciduos (caducifolios), alternando con sabanas ralas y vegetación saxícola sobre afloramientos rocosos. La segunda es la Subregión C.3., que cubre al resto del municipio y está conformada por el sistema de sierras bajas y colinas Imataca-Cuyuní, el cual pertenece a la provincia fitogeográfica Guayana oriental, que abarca desde el río Amacuro bajo en Venezuela, hasta el límite entre la Guayana Francesa y Brasil (Berry *et al.*, 1995; Huber, 1995; Huber & Oliveira-Miranda, 2010). Esta subregión está cubierta por diferentes tipos de bosques pluviales muy densos y altos (Huber & Oliveira-Miranda, 2010).

Según la clasificación de Koeppen, referida por Hernández (1987), esta zona presenta un tipo climático de sabana con ocho a nueve meses de lluvia, una temporada lluviosa entre abril y septiembre con un pico en junio y una temporada seca o menos lluviosa entre octubre y marzo, el acumulado anual promedio registrado en el en el decenio 1993-2005 fue de 1.276 mm para el área norte (C.2.) y 1.472 mm para el sur (C.3.), mientras que la temperatura media mensual para el mismo periodo fluctuó entre 22 y 26°C [Ministerio del Ambiente y Recursos Naturales Renovables (MARNR), 1993-2005]. Desde el punto de vista eco-epidemiológico la zona entra en la categoría de malaria en bosques bajos interiores (Osborn *et al.*, 2004; Rubio-Palis & Zimmerman, 1997). El área se encuentra considerablemente afectada por actividades antrópicas tales como la minería, la explotación maderera y la ganadería, siendo sus principales manifestaciones la disminución de cobertura vegetal, la fragmentación de hábitats, la sedimentación de los ríos, la contaminación mercurial de sus humedales, la erosión del suelo y la

destrucción de la hidrología superficial (Rodríguez, 1999).

Según el último censo del Instituto Nacional de Estadísticas de Venezuela (INE, 2011) el municipio Sifontes tiene una población de 50.082 habitantes, de la cual 69% vive en las áreas urbanas de Tumeremo capital y en las poblaciones de El Dorado y Las Claritas (Fig. 1). El resto es población rural distribuida en los centros poblados criollos e indígenas ubicados a lo largo de la carretera troncal 10, ó dispersa por todo el territorio en pequeños campamentos improvisados ubicados en áreas boscosas llamados *minas*. Las *minas* son conglomerados de tiendas provisionales, precarias e incompletas construidas fundamentalmente de madera y plástico, habitadas por un número que varía entre algunas decenas y cientos de personas dedicadas exclusivamente a la explotación aurífera. Asimismo, según el INE (2011), hay en el municipio 8.746 (17,5%) indígenas, la mayoría de la etnia Pemón, quienes habitan en numerosos poblados ubicados a lo largo de la carretera troncal 10 y ejes fluviales de las parroquias Dalla Costa y San Isidro, cuya actividad principal es la agricultura de conuco. Hacia el norte, en la parroquia Tumeremo, en la reserva forestal de Imataca habita un pequeño grupo indígena de la etnia Kariña, los cuales viven en conglomerados de chozas de bahareque y se dedican principalmente a la caza, pesca, recolección y a la agricultura de subsistencia. Durante los últimos cinco años, se ha observado un incremento importante de actividad minera en ambas etnias indígenas.

Acerca de los vectores de malaria en este foco, Moreno *et al.* (2000), en un estudio de identificación de criaderos de anofelinos reportaron la presencia de 12 especies de *Anopheles*, de las cuales han sido involucradas en la transmisión *Anopheles darlingi* Root y *An. albitarsis* Lynch Arribalzaga *sensu lato* (= *An. marajoara* Galvao & Damasceno), teniéndose a *An. nuneztovari* Gabaldon *s.l.* como un vector potencial por su abundancia y ubicuidad y a *An. neomaculipalpus* Curry como vector en áreas selváticas (Moreno *et al.*, 2004; 2005; 2007).

Comportamiento anual de la malaria en el estado Bolívar en el lapso 1980-2013

Las tasas de prevalencia de malaria más elevadas en Venezuela se registraron en el periodo que va de 1936 a 1945, desde la fundación de la

Dirección de Malariología hasta la introducción del DDT en la campaña de erradicación (Gabaldon, 1949). Durante ese periodo, la tasa de prevalencia anual se mantuvo entre 200 y 500 casos de malaria por cien mil habitantes, comenzando un pronunciado declive a partir de 1945, y manteniéndose por debajo de 100 a partir de 1948 (DGSA, 1936-2000). Casi toda la malaria registrada en Venezuela en ese periodo hasta 1970, estuvo ligada a los focos ubicados al norte del río Orinoco, pero ese año se registra el primer brote epidémico de importancia en el estado Bolívar, en la región de Guaniamo en el municipio Cedeño, el cual eleva las tasas de prevalencia nacional nuevamente por encima de 200 casos por cien mil habitantes. A partir de allí la malaria se hace endemo-epidémica en el estado Bolívar, y es mantenida bajo control hasta 1987, cuando ocurre el brote de El Dorado en el municipio Sifontes (actualmente Las Claritas, Parroquia San Isidro), que junto con el brote del estado Sucre, elevan la tasa de malaria nacional por encima del umbral de 200 por cien mil habitantes una vez más (DGSA, 1936-2000).

La Fig. 2 resume la evolución anual de los casos de malaria en Venezuela, el estado Bolívar y el municipio Sifontes entre 1980 y 2013. En el estado Bolívar la malaria se mantiene alrededor de 200 casos durante los tres primeros años. A partir de 1984 el número de casos se eleva abruptamente por encima de 3.000, mostrando desde entonces un comportamiento que refleja claramente dos patrones: un nivel basal endémico representado por aquellos años en los cuales la malaria se mantiene por debajo de 10.000 casos anuales (1993-2003), y un nivel de malaria adicional representado por los años en que hubo brotes epidémicos. El primer brote ocurrió entre 1988 y 1991, cuando se produjo en el estado una epidemia que tuvo en promedio más de 26.000 casos anuales, con un pico superior a 30.000 casos en 1988 y un tope de 23 muertes en 1989. En el decenio 1993-2002 hubo un descenso significativo en la casuística, con un promedio anual ligeramente superior a 7.000 casos, de los cuales en promedio 60,2% correspondió a *Plasmodium vivax*, 40,8% a *P. falciparum* y 0,4% a infecciones mixtas (*P. vivax* + *P. falciparum*). Durante este periodo se inició una estrategia de control basada en la coordinación intersectorial mediante un convenio entre la Gobernación del Estado Bolívar, la Corporación Venezolana de Guayana y el entonces Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (= MPPS), lo cual podría haber incidido en el descenso de la

casuística. Una segunda epidemia se inicia a partir de 2004 manteniéndose hasta 2013, registrándose en promedio más de 31.000 casos anuales en el lapso, de los cuales en promedio 74,0% correspondió a *P. vivax*; 26,0% a *P. falciparum* y menos de 2,0% a infecciones mixtas (DSAEB, 1995-2013). Al final del periodo, el año 2013 el estado Bolívar cerró con 65.980 (86,0%) casos de 76.621 registrados en Venezuela, cifras record para el estado y el país (MPPS, 2013).

En el periodo completo, entre 1980 y 2013, se reportaron en Venezuela 997.884 casos acumulados de malaria, de los cuales 586.350 (58,8%) se originaron en el estado Bolívar (DGSA, 1936-2000; DSAEB, 1995-2013). En ese periodo hubo en el estado un promedio general de poco más de 17.000 casos anuales de malaria, promedio sesgado debido al comportamiento variable de la malaria expuesto anteriormente, lo cual queda evidenciado en los valores del rango y promedios obtenidos por nivel. En el nivel basal endémico se reportaron en promedio 7.769 casos anuales, con un rango que va de 3.682 a 13.146; mientras que en el nivel epidémico hubo en promedio 28.179 casos anuales de malaria, con un rango de 21.340 a 65.980. No obstante, al hacer una revisión exhaustiva de los datos, se revelan algunas particularidades en la evolución de la malaria, que hacen sospechar la existencia de más casos de los reportados en el periodo bajo íter epidémico que va de 1993 a 2002. Al estratificar por clasificación de casos de este periodo, se evidencia como en los años 1995 a 1998, los casos autóctonos representan sólo una proporción menor del total anual, llegando los casos importados de otros estados del país y del exterior, a alcanzar cifras que van de 36% en 1998 a 65% en 1997, valores que sugieren un manejo espurio de los datos (DSAEB, 1995-2013).

En cuanto a la fórmula parasitaria, hubo en el estado durante el lapso 1980-2013 un promedio anual de 12.010 (66,4%) casos de *P. vivax* y 4.683 (32,8%) casos de *P. falciparum*, mientras que los casos mixtos representaron en promedio sólo 1,2% de la casuística total en el periodo. De nuevo, al realizar el análisis estratificando por niveles de malaria, la formula parasitaria en el lapso se altera notablemente, siendo los promedios en el nivel endémico para *P. vivax* y *P. falciparum*, 5.091 (62,1%) y 2.731 (38,6%) casos respectivamente, mientras que en el nivel epidémico los promedios se elevan a 23.296 (73,3%) y 8.210 (24,2%) casos para ambas especies, lo cual representa

un incremento de 11,2 puntos porcentuales de *P. vivax* y una disminución de 14,4 para *P. falciparum*. La relación proporcional de los casos de *P. falciparum* con respecto al total de los casos, cambia según la condición de la malaria; ésta especie tiende a aumentar cuando hay menos casos y disminuye marcadamente durante las epidemias, tal es el caso del periodo 1983-1987, al comienzo de la serie, cuando los casos de *P. falciparum* llegaron a ser hasta seis veces más que los de *P. vivax*, en una casuística siempre inferior a 5.000 casos (Fig. 3). Asimismo, la variación en la proporción interanual de *P. falciparum* tiende a ser menor que la de *P. vivax*, por cuanto los incrementos y decrementos de *P. falciparum* son menos bruscos, con excepción del periodo señalado, 1983 a 1987, cuando la proporción de esta especie supero la cifra de 50% del total de los casos, alcanzado un pico de 84% durante 1984. Entre los años 1980 a 2013, se reportaron 264 muertes por malaria, distribuidas en un rango de una a 26 personas fallecidas por año, estas últimas en el año 1998 (DGSA, 1936-2000; DSAEB, 1995-2013).

A partir de 1983 hasta 2013, la mayor parte de los casos anuales de malaria reportados en el estado Bolívar se originaron en el municipio Sifontes. En el lapso 1990-2013 el municipio sumó 279.649 casos acumulados, con un promedio anual de 11.652, lo que representó 56,4% de la malaria total producida por todos los municipios del estado en ese lapso (Tabla I). Los municipios con más malaria acumulada después de Sifontes en el lapso fueron Angostura (= Raúl Leoni) (9,3%), Cedeño (8,8%), Piar (7,8%), Sucre (7,7%), y Gran Sabana (7,2%), cuya suma alcanza a 40,8% del total, mientras que los demás municipios en conjunto representan menos de 3% de la malaria del estado (Tabla I).

Comportamiento de la malaria en el municipio Sifontes en el lapso 1980-2013

La evolución de la malaria anual en el municipio Sifontes en el lapso 1980-2013 mostrada en la Fig. 2, sigue un patrón muy similar al observado para el estado Bolívar (DGSA, 1936-2000; DSAEB, 1995-2013). La casuística en el municipio salta de tres casos (1,4%) en 1982 a 391 (61,0%) en 1983, pasando a 2.855 (77,5%) casos al año siguiente. La primera epidemia se produce en el lapso 1988-1991, con un pico en el primer año de 20.070 casos, generándose en promedio 16.141 casos anuales en el lapso. La segunda epidemia se produce en 2004, cuando la casuística salta

Tabla I. Casos de malaria anuales en el estado Bolívar por municipio en el lapso 1990-2013.

Municipio	Acumulado	Mínimo	Máximo	Promedio	%
Cedeño	43.353	56	4.316	1.806	8,75
Heres	2.881	10	279	120	0,58
El Callao	2.331	5	385	97	0,47
Piar	38.656	111	6.210	1.611	7,80
Pedro Chien	27	0	16	1	0,01
Roscio	842	0	245	35	0,17
Angostura*	46.216	486	3.944	1.926	9,33
Sucre	37.963	321	3.125	1.582	7,66
Gran Sabana	35.462	0	4.988	1.478	7,16
Caroni	8.120	0	1.655	338	1,64
Sifontes	279.649	1.310	42.981	11.652	56,44
Estado Bolívar	495.500	4.852	60.335	20.646	100,00

Fuente: Dirección de Salud Ambiental del Estado Bolívar 1090-2013.

*Anteriormente Municipio Raúl Leoni

de 5 a 15.000 casos, manteniéndose así hasta 2008 con un promedio de 13.850 casos anuales en el lapso. Nuevamente, en 2009 hay un incremento importante con un registro de 19.408 casos, generándose en promedio 28.656 casos anuales durante el último quinquenio (2009-2013), contra 13.850 reportado en el quinquenio anterior (2004-2008), lo que representa un incremento de 2,7 veces en el quinquenio, cerrando el año 2013 con un pico histórico para el municipio de 42.981 casos, según la data del estado Bolívar (Fig. 2). No obstante, según la data del MPPS (2013), adicionando los casos de malaria diagnosticados en

otros lugares del país procedentes de Sifontes, para este año hubo en el municipio 46.610 casos, para un total de 65.980 en el estado, representando esto 70,6% de la malaria del estado y 60,8% del país. El acumulado en el estado Bolívar en el quinquenio 2009-2013 fue de 219.636 casos de malaria, de los cuales 147.773 (67,3%) fueron reportados por el municipio Sifontes, distribuidos en 102.767 (69,5%) para la parroquia San Isidro, 38.696 (26,2%) para la parroquia Dalla Costa y 6.310 (4,3%) para la parroquia Tumeremo. Durante 2013 la parroquia San Isidro, incluyendo los casos diagnosticados en otros estados, reportó 33.385

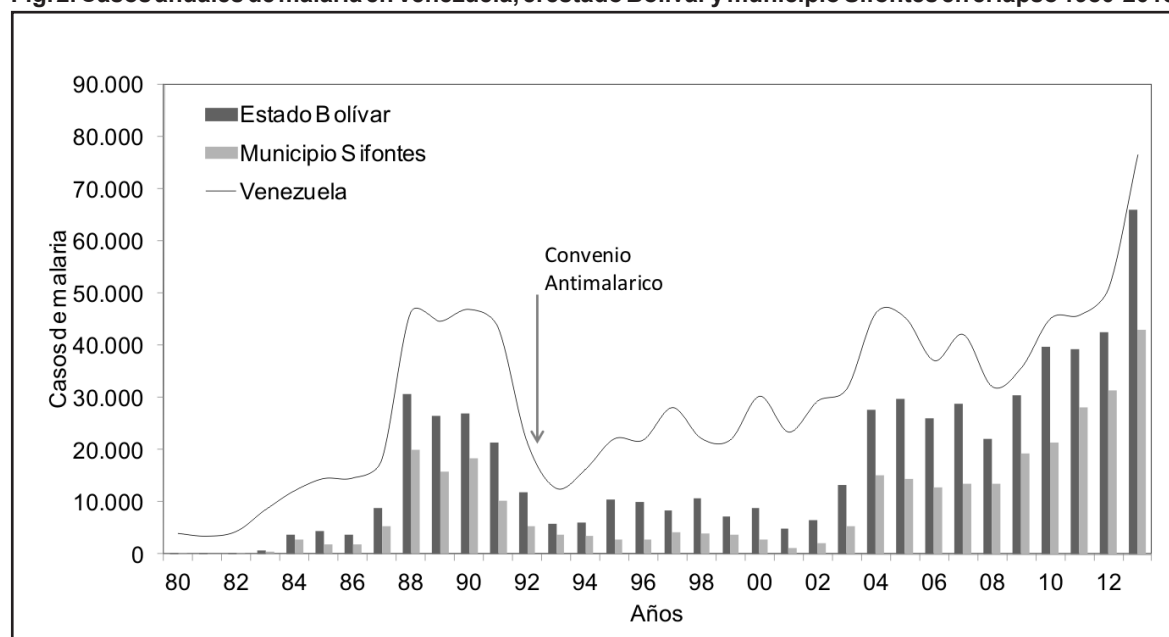
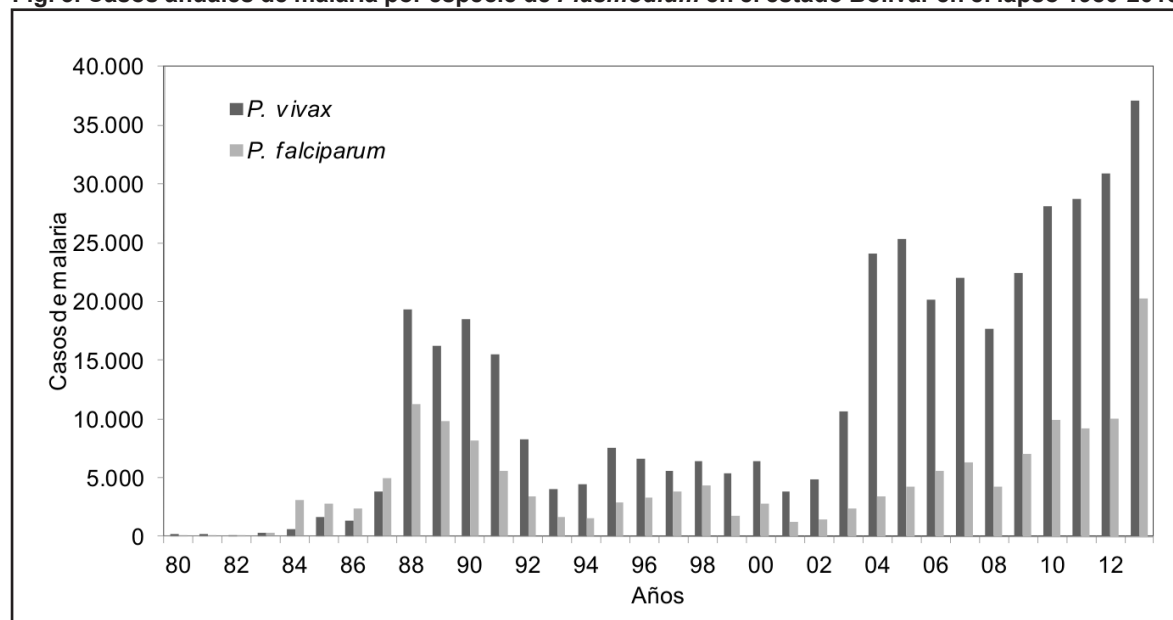
Fig. 2. Casos anuales de malaria en Venezuela, el estado Bolívar y municipio Sifontes en el lapso 1980-2013.

Fig. 3. Casos anuales de malaria por especie de *Plasmodium* en el estado Bolívar en el lapso 1980-2013.

casos, 71,6% de la malaria del municipio y 50,6% de la del estado, mientras que Dalla Costa reportó 11.881 (25,5%) casos (MPPSS, 2013). Espacialmente la malaria en el municipio se distribuye a lo largo de los ejes fluviales y caminos, fundamentalmente en las parroquias San Isidro y Dalla Costa, pero en los últimos cinco años las localidades con mayor prevalencia de malaria se han concentrado en el área de Las Claritas, un área muy pequeña de la parroquia San Isidro, dedicada exclusivamente a la minería aurífera, convirtiéndola en el foco caliente más importante en Venezuela (Fig. 4).

En promedio, la malaria anual del municipio representó 59,3% de la malaria del estado durante los lapsos epidémicos. En el lapso intermedio inter-epidémico 1992-2003, en promedio se originaron en el municipio 3.185 casos anuales de malaria, siendo los valores extremos 5.330 casos durante 1992 y 1.228 en 2001, representado esto en promedio 40,5% de la malaria anual del estado. La proporción más elevada de malaria en el municipio con respecto al estado registrada en la serie completa fue 77,5% (2.855 casos) en 1984, mientras que la proporción más elevada en un periodo epidémico fue 68,5% (18.473 casos) en 1990, siendo la proporción más baja 25,3% durante 2001 cuando solo se reportaron 1.228 casos. Es importante señalar que entre 1980 y 1982 solo se reportaron cuatro casos de malaria en el municipio Sifontes, cifra que se incrementó a 391 durante 1983.

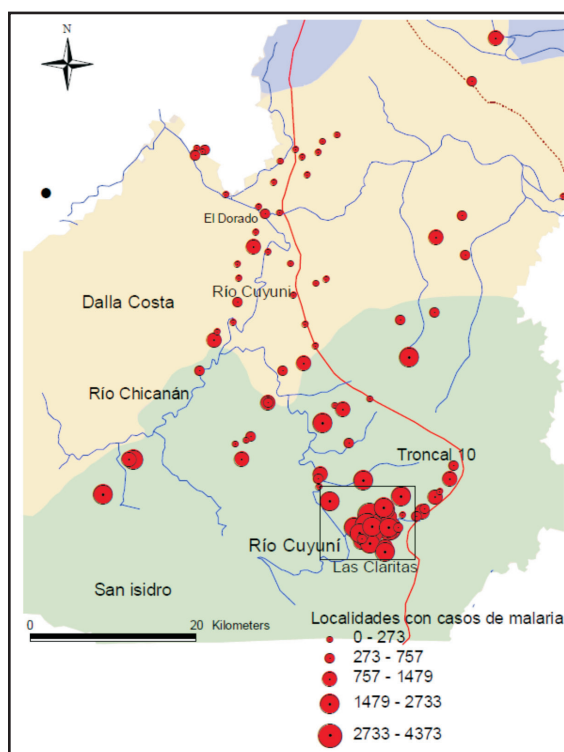
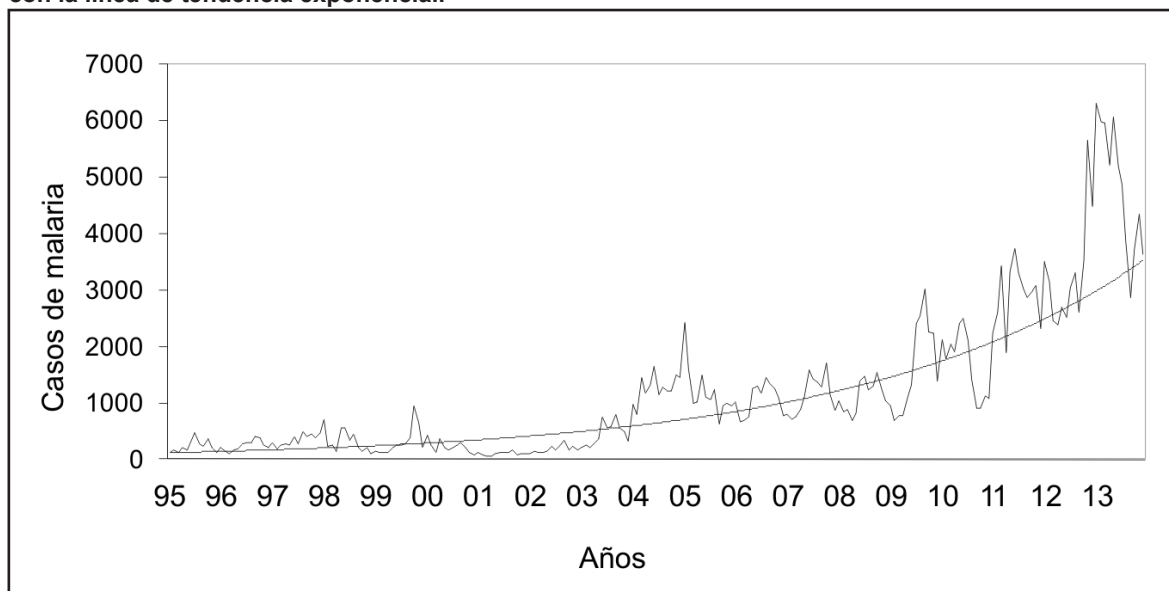
Fig. 4. Casos de malaria acumulados por localidad en el lapso 2009-2013 en las áreas de explotación aurífera de las cuencas media y alta del río Cuyuní y sus afluentes, en las parroquias Dalla Costa y San Isidro. En el recuadro interior el área de Las Claritas.

Fig. 5. Serie de tiempo de los casos de malaria mensuales en el municipio Sifontes en el lapso 1995-2013 con la línea de tendencia exponencial.

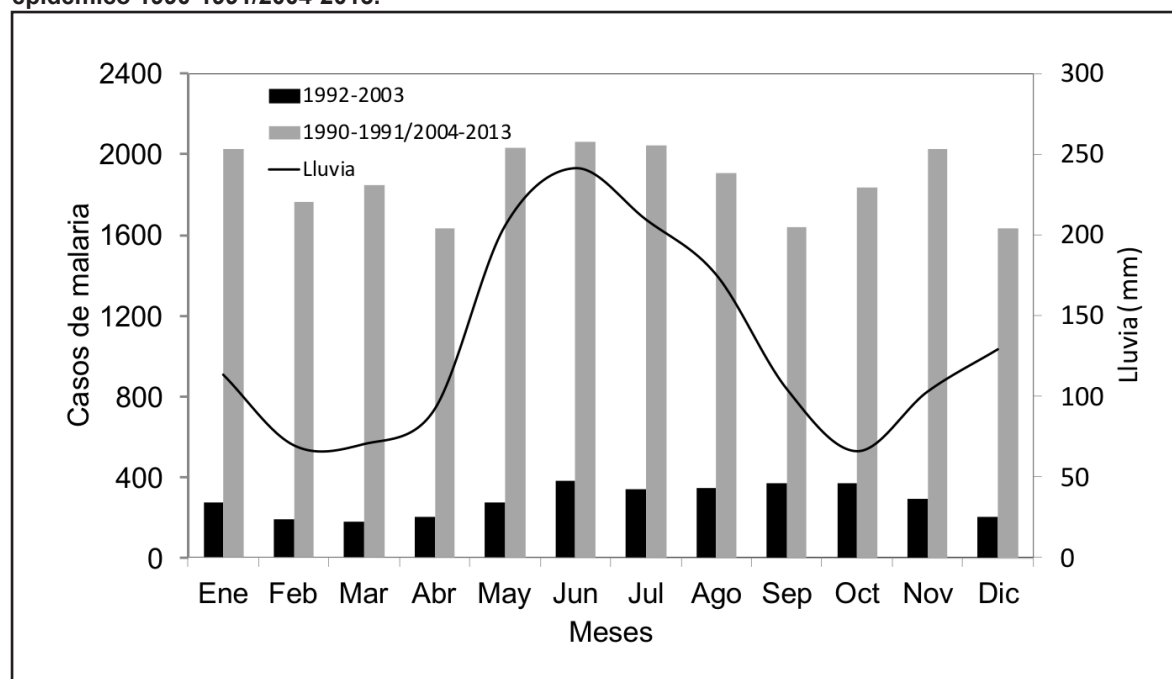


En cuanto a la casuística por especie de plasmodio en el municipio Sifontes, durante el lapso 1995-2013, se reportaron 100.715 (44,4%) casos acumulados de *P. vivax*, 27.267 (12,0%) casos de *P. falciparum* y 2.408 (1,1%) de infecciones mixtas. En este lapso la proporción anual promedio para *P. vivax* y *P. falciparum* fue de 66,4% y 32,8% respectivamente, mientras que los casos mixtos representaron sólo 1,2 % de la casuística anual en el municipio (DSAEB, 1995-2013). A partir de 2003 se comenzaron a reportar en el municipio casos de *P. malariae*, contándose 219 casos hasta 2010, con un rango que va de 1 a 53 por año, mientras que en el estado Bolívar se reportaron 243 entre 2001 y 2010 (DSAEB, 1995-2013).

La serie de tiempo anual, permite ver un claro patrón de comportamiento de la malaria en el municipio, que está definido por periodos epidémicos seguidos de periodos inter-epidémicos intercalados (Fig. 2). La tendencia y la diferencia marcada en la casuística entre los dos periodos en el municipio, se puede apreciar con más facilidad al graficar la serie mensual de malaria en el lapso 1995-2013 (Fig. 5). La serie mensual evidencia con mayor exactitud el patrón endemo-epidémico de la malaria en el municipio caracterizada por agudos picos mensuales, y confirma la tendencia de los últimos años a un pronunciado incremento a partir del año 2004, el cual se ha acelerado en los últimos cuatro años y la cual ajusta bien a una

línea de tendencia exponencial. En esta serie, el primer pico mensual se presenta en enero de 2005 con 2.421 casos, el segundo pico más elevado superó los 3.000 casos y ocurrió en septiembre de 2009, luego entre mayo y agosto de 2011 la malaria se mantuvo siempre por encima de 3.000 casos con un pico en junio cuando alcanzo la cifra de 3.725. Este evento fue un preludio del pico epidémico que se dispara a partir de noviembre de 2011, cuyo pico supero los 6.000 casos en enero de 2013 (Fig. 5). Esta situación se sostuvo durante todo el año 2013 con un promedio cercano a 5.000 casos mensuales. Sin embargo, tanto la serie anual como la serie mensual, grafican un perfil endemo-epidémico de la malaria en el municipio con bajadas y subidas abruptas, si bien la tendencia en los últimos años es al incremento. Al realizar una estratificación temporal del promedio mensual de los casos acumulados de malaria en el lapso 1990-2013, separando los años epidémicos (1990-1991 y 2004-2013) de los no epidémicos (1992-2003), se confirman los dos niveles epidemiológicos diferentes, el basal y el epidémico, derivados de las diferencias en los promedios mensuales de malaria de los años en que hubo epidemia con respecto a los demás años de la serie (Fig. 6). El periodo de malaria basal es aquel cuyos valores mensuales promedio fluctúan entre 200 y 400 casos aproximadamente, mientras que en el periodo epidémico están entre 1.600 y 2.000 casos mensuales. En promedio hubo 1.078 casos mensuales de malaria en el lapso completo, 285 en el nivel basal

Fig. 6. Promedios mensuales de malaria en el municipio Sifontes en los lapsos endémico 1992-2003 y epidémico 1990-1991/2004-2013.



y 1.872 en el nivel epidémico, lo cual representa un incremento de 6,7 veces durante las epidemias de malaria. En cuanto a la relación de la casuística mensual de malaria con la lluvia en el municipio mostrada en la Fig. 6, el análisis de correlación de Pearson (Statistica for Window, 1996), demuestra la ausencia de correlación significativa entre ambas variables para el nivel basal ($R = 0,41$, $P = 0,78$) y para el nivel epidémico ($R = 0,41$; $P = 0,32$).

DISCUSIÓN

Al observar la curva de evolución de la malaria en Venezuela esta parece estar estrechamente relacionada con fenómenos políticos y socioeconómicos nacionales y mundiales. La historia de la malaria en Venezuela claramente puede dividirse en tres etapas: la primera de 1936 a 1945, desde fundación de la Dirección de Malariología hasta el fin de la Segunda Guerra Mundial y la aparición del DDT, durante la cual se establecen las bases de la campaña de erradicación y se logran avances importantes, a pesar de las elevadas tasas de morbilidad en los llanos y región central del país (Gabaldon, 1949; Bouma & Dye, 1997); la segunda entre 1945 y 1970, marcada por la consolidación y el éxito de la campaña de erradicación, durante la cual se registra una caída drástica de la morbilidad y

mortalidad nacional por malaria (Gabaldon, 1969; Gabaldon *et al.*, 1975; Bouma & Dye, 1997); y la tercera, desde 1970 hasta el presente, la cual coincide con una etapa de desmejoramiento socioeconómico sostenido y progresivo del país. Esta situación trajo como consecuencia el aumento de las migraciones hacia el sur del río Orinoco y el comienzo de las explotaciones de minerales preciosos en esta área, principalmente oro y diamantes, y el resurgimiento de la malaria en el país.

Al analizar la evolución anual de la malaria en el estado Bolívar, lo primero que se evidencia en los datos es que a partir de 1983 la malaria en el estado depende en gran medida de la malaria generada en el municipio Sifontes, excepto en el periodo 1993-2002, cuando el estado Sucre tenía la incidencia más elevada del país (Cáceres, 2011). En términos proporcionales la malaria producida por el municipio Sifontes en ese lapso, supera ampliamente toda la malaria producida por el resto de los municipios del estado en conjunto. Al revisar la distribución espacial de los casos de malaria en los diez municipios del estado Bolívar, se observa que entre 1990 y 2013 más de la mitad de la malaria acumulada se produjo en el municipio Sifontes, particularmente en la parroquia San Isidro. Esta distribución demuestra claramente la naturaleza

focal de la enfermedad en el estado, probablemente condicionada por factores humanos y ambientales, confirmando la hipótesis de que el patrón espacial de la malaria es heterogéneo y de naturaleza focal, lo que a la vez condiciona la aparición de nuevos focos (Grillet *et al.*, 2009). Situaciones similares han sido descritas en Perú, donde se reportaron brotes de malaria en la jungla norte asociados a los patrones de movimiento de los comerciantes de madera, en el sur vinculados a la extracción de oro, y en la costa a la producción de arroz debido a deficiencias en el drenaje de los sistemas de irrigación (Chowell *et al.*, 2009). En el caso del municipio Sifontes, ha sido suficientemente documentado que la malaria está claramente asociada a la minería artesanal de oro, actividad que combina la presencia de personas susceptibles provenientes de áreas no endémicas, presencia de mosquitos vectores y alteración medioambiental (Aché, 1998; Cáceres, 2011; 2013; Moreno *et al.*, 2000; 2007).

La serie de tiempo mensual de malaria en el lapso también revela el carácter endemo-epidémico de la enfermedad en el municipio. El perfil de la malaria aquí, definido por periodos epidémicos de picos abruptos, seguidos de largos periodos inter-epidémicos intercalados, es el característico de una zona de malaria inestable de baja endemicidad (Bruce-Chwatt, 1980). La endemicidad de la malaria en esta área se establece en 1983, debido a factores socioeconómicos ligados a la explotación artesanal de oro, lo cual provoca la migración masiva de personas de diferentes lugares del país hacia esta zona, muchos de ellos provenientes de otras regiones endémicas del país y del exterior, lo que constituye un ejemplo de cómo los factores demográficos de las poblaciones humanas juegan un rol determinante en la transmisión de la malaria (Bouma, 2003; Chaves, 2007; Hay *et al.*, 2002; Shanks *et al.*, 2005). En esta zona se ha configurado un foco de malaria muy particular, propio de áreas de frontera económica donde el factor humano es preponderante sobre el factor ambiental o climático, de tal manera que, tal como lo demuestran los resultados de correlación en este trabajo, los casos no necesariamente están relacionados con la lluvia, a diferencia de la malaria del norte del río Orinoco antes de 1945, la cual presentaba una marcada estacionalidad, claramente asociada a los picos de lluvia, y en menor grado la de los estados Amazonas y Sucre (Gabaldon, 1949; Bouma & Dye, 1997; Grillet *et al.*, 2014). Esta situación coincide con lo que Gabaldon (1969, 1971), definió como *malaria inaccesible* o *inabordable*, configurado por

poblaciones humanas tales como mineros e indígenas, cuyas principales características son la alta movilidad, la carencia de residencia fija y viviendas provisionales e incompletas construidas con materiales perecederos que los exponen a la picada de los mosquitos; por lo tanto, la malaria se debe más a aspectos culturales que a factores entomológicos o ambientales (Gabaldon, 1969; Gabaldon *et al.*, 1975).

La observación de la evolución de la malaria en el municipio Sifontes, evidencia la existencia de dos niveles epidemiológicos, un nivel basal no epidémico representado por aquellos años en los cuales la malaria se mantiene alrededor de 300 casos mensuales y un nivel epidémico, con años en los que el promedio mensual está alrededor de 2.000 casos. El comportamiento endemo-epidémico de la malaria en esta zona pudiera estar relacionado con el concepto de *malaria adicional* definida por Gabaldon (1949), como la malaria producida por vectores que se reproducen en habitats creados por el hombre, en adición a la malaria basal producida por vectores que se reproducen en criaderos de origen natural. En esta área, los criaderos artificiales, y en consecuencia la *malaria adicional*, pueden estar siendo generados por la alteración del paisaje y de la hidrología superficial ocasionada por la actividad minera que se inicia a principios de la década de los 80's. Esta actividad, que se ha incrementado desproporcionadamente en la última década, ha propiciado la aparición de charcas y lagunas con características adecuadas para la reproducción de *An. darlingi* el principal vector de malaria en este foco, y otras especies oportunistas adicionales tales como *An. albicans* s.l. y *An. nuneztovari* s.l. (Moreno *et al.*, 2000; 2004; 2007). Sin embargo, la existencia de criaderos adicionales no explica por sí sola la situación de malaria; esta condición ambiental, combinada con factores climáticos y las migraciones humanas temporales y compulsivas ocasionadas por las actividades mineras llamadas *bullas*, origina una *malaria adicional* en forma de brotes epidémicos que caracterizan el perfil epidemiológico de la malaria en este foco. Este fenómeno se ve reflejado en el perfil de la serie de tiempo mensual (Fig. 5), cuyos picos epidémicos no son cíclicos, lo que sugiere que hay factores antrópicos que alteran la forma cíclica característica del perfil endemo-epidémico; por tal motivo, la malaria en esta zona ha sido catalogada como una enfermedad ocupacional (Aché, 1998).

En cuanto a la casuística de malaria por especie de *Plasmodium*, en el área coexisten las tres especies de parásitos humanos que hay en América, con una clara predominancia de *P. vivax* con respecto a *P. falciparum*. La proporción promedio de *P. vivax* es de 60% en condiciones de malaria basal, pero durante los brotes epidémicos la proporción de esta especie aumenta a 70%, lo cual significa que las epidemias ocurren a expensas de *P. vivax*. La otra especie de parásito, *P. malariae* tiene una presencia marginal en el área, entre 1990 y 2000, solo cinco casos de esta especie fueron diagnosticados en el estado Bolívar, todos ellos considerados importados del estado Amazonas y de Guyana. En 2001 Pacheco *et al.* (2001) reportaron la aparición de seis casos autóctonos en el municipio Sifontes, y desde entonces se diagnosticaron 219 casos hasta 2011 (DSAEB, 1995-2013). Posiblemente debido a que la mayoría de los casos de esta especie son asintomáticos y a las bajas parasitemias detectadas, es muy probable que la baja casuística reportada en Sifontes sea debida a fallas en el diagnóstico, tal como ha sido reportado por Magris *et al.* (2007a) en el Alto Orinoco, estado Amazonas. En general, la prevalencia de esta especie es baja en casi todos los focos donde ha sido reportada, estando en el municipio Sifontes siempre por debajo de 0.1%; sin embargo, Magris *et al.* (2007b) reportaron una prevalencia de 17% en el municipio Alto Orinoco del estado Amazonas. *Plasmodium malariae* es una especie de zonas boscosas acerca de la cual se sabe muy poco en cuanto a su prevalencia real y su dinámica de transmisión, requiriéndose de mayor investigación al respecto, debido a que las infecciones por esta especie parecieran estar incrementándose en diversas áreas de su distribución geográfica en la cuenca amazónica (Galardo *et al.*, 2007; Magris *et al.*, 2007a; Pacheco *et al.* 2001). Sobre su dinámica vectorial, Galardo *et al.* (2007) reportaron tasas de infección de *P. malariae* inferiores a 1,0% en varias especies de mosquitos, mientras Magris *et al.* (2007a) reportaron 25,0% de *An. darlingi* positivo a proteína circunsporozoito de *P. malariae* en el estado Amazonas.

La estacionalidad de la malaria ha sido descrita como la acumulación de la mayoría de los casos en unos pocos meses, y que ocurre en áreas donde la transmisión tiene un comienzo y un final en el lapso de un año, definiéndose picos estacionales de malaria usualmente asociados a factores ambientales (Roca-Feltrer *et al.*, 2009). Desde este punto de vista, hay sitios que no presentan estacionalidad,

sitios con leve estacionalidad y otros con marcada estacionalidad. Según Roca-Feltrer *et al.* (2009), en los sitios sin estacionalidad, 50% de la malaria ocurre en seis meses del año, mientras que en los sitios de marcada estacionalidad 75% de los casos de malaria ocurren en el mismo lapso o menos; en el caso del municipio Sifontes, los casos están uniformemente distribuidos durante todo el año, sin acumulaciones y sin diferencias notables entre las estaciones del año. Esta distribución uniforme de la casuística de malaria a lo largo del año representa una contradicción, ya que según Smith *et al.* (1993), esta es una característica de sitios donde hay altas tasas de transmisión, y donde en consecuencia la prevalencia de malaria no varía por estación. En este sentido, según Roca-Feltrer *et al.* (2009) las zonas de alta transmisión son aquellas que tienen tasas entomológicas de inoculación (TEI's) superiores a 100 picadas infectivas por persona por año (pipa), mientras que Griffin *et al.*, (2010) han descrito zonas de alta transmisión en África cuyas TEI's varían entre 586 y 675 pipa. En el caso del municipio Sifontes fue reportada una TEI de 4,2 pipa (Moreno *et al.*, 2009), similar a la de 3,0 pipa reportada por Griffin *et al.* (2010) para una zona de baja transmisión. Esta contradicción puede ser explicada al considerar que, si bien la abundancia de *An. darlingi* es muy baja, las tasas de infección reportadas por Moreno *et al.* (2009) para el municipio son similares a las reportadas para el municipio Alto Orinoco, un área considerada de alta transmisión (Magris *et al.*, 2007a). Esto también significa, que debe haber otros factores diferentes a las tasas de transmisión que expliquen la elevada prevalencia de malaria en el municipio, tales como la concentración de grandes grupos de personas en áreas muy pequeñas por mucho tiempo.

Las características espaciales y temporales de la malaria en el municipio Sifontes, lo configuran como el foco más importante en Venezuela, ya que reúne todas las condiciones epidemiológicas, ambientales, climáticas y sociales descritas por Grillet *et al.* (2009) para un foco caliente en el cual se está originando constantemente malaria durante todo el año. Si bien en este trabajo solo se hace un análisis descriptivo de la malaria en el municipio Sifontes, constituye una aproximación válida y necesaria que resume su evolución desde que aparecieron los primeros casos en el estado Bolívar en 1980 hasta el año 2013. En este se describe el perfil endemo-epidémico de la malaria en el estado Bolívar y el municipio Sifontes y se resaltan sus principales características, como

la carencia de estacionalidad y la existencia de dos niveles epidemiológicos, uno basal y el otro adicional, ligado este último a la minería. Asimismo, el trabajo revela la naturaleza focal de la enfermedad y la predominancia de factores antrópicos por encima de variables entomológicas y ambientales. También demuestra, como a partir de 1983 gran parte de la malaria en Venezuela depende de la malaria generada en el estado Bolívar, y esta a su vez de la del municipio Sifontes, lo cual constituye unos sus principales aportes, dada la importancia de este hecho en la toma de decisiones y la implementación de planes de control eficaces y eficientes.

Por último, es importante subrayar una limitación importante que tiene el trabajo, y es que este fue realizado con la base de datos de malaria del estado Bolívar (DSAEB), que contiene solo los casos que se diagnostican en el estado, excluyendo los casos del estado y del municipio que son diagnosticados en el resto del país, incluidos en la base de datos de la DGSA, a la cual los autores no tuvieron acceso. Sin embargo, si bien es cierto que hay una diferencia entre la data local y la nacional esto no invalida el análisis, debido a que la diferencia no es tan grande como para cambiar significativamente los resultados en cuanto a la formula parasitaria, distribución porcentual de la malaria entre municipios, tendencias temporales ni distribución espacial. A pesar de la diferencia en las dos bases de datos, las estadísticas siguen siendo consistentes y en consecuencia, se puede afirmar que con cualquiera de las dos las conclusiones del trabajo serían las mismas.

Conflicto de Intereses

Los autores declaramos que no se presentó ningún conflicto de intereses durante la realización del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Salud Ambiental del Estado Bolívar por el suministro de la data epidemiológica de malaria regional y nacional correspondiente al periodo de estudio. Este trabajo fue posible gracias al financiamiento parcial del Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon" y del Inter-American Institute for Global Change Research (CRN-048).

REFERENCIAS

- Aché A. A. (1998). Situación actual de la malaria en Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **38**: 68-72.
- Berry P. E., Huber O & Holst B. K. (1995). Floristic Analysis and Phytogeography. pp. 161-191. En: *Flora of the Venezuelan Guayana. Vol. 1 Introduction*. Eds. Berry P. E., Holst B. K. & Yatskievych K. Missouri Botanical Garden. St. Louis. Timber Press. Portland. Oregon, USA.
- Bouma M. J. (2003). Methodological problems and amendments to demonstrate effects of temperature on the epidemiology of malaria. A new perspective on the highland epidemics in Madagascar, 1972-1989. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **97**: 133-139.
- Bouma M. J. & Dye C. (1997). Cycles of malaria associated with El Niño in Venezuela. *JAMA.* **278**: 1772-1774.
- Bruce-Chwatt L. J. (1980). *Essential Malariology*. London: Williams Heinemann Medical Books Ltd.
- Cáceres G. J. L. (2011). La Malaria en el estado Bolívar, Venezuela: 10 años sin control. *Bol. Mal. Salud Amb.* **51**: 207-214
- Cáceres G. J. L. (2013). Récord de incidencia malárica en Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **53**: 88-98
- Chaves L. F. (2007). *Casas Muertas and Oficina N° 1*: internal migrations and malaria trends in Venezuela 1905-1945. *Parasitol. Res.* Doi 10.1007/s00436-006-0427-1.
- Chowell G., Munayco C. V., Escalante A. A. & Mckenzie F. E. (2009). The spatial and temporal patterns of falciparum and vivax malaria in Peru: 1994-2006. *Malaria Journal.* **8**: 142 doi:10.1186/1475-2875-8-142
- Dirección de Salud Ambiental del Estado Bolívar [DSAEB] (1995-2013). Servicio de Vigilancia Epidemiológica del Estado Bolívar, Registros epidemiológicos, Ciudad Bolívar, Venezuela.
- Dirección General de Salud Ambiental [DGSA] (1936-2000). Coordinación de Vigilancia

- Epidemiológica, *Registros epidemiológicos*, Maracay, Venezuela.
- Gabaldon A. (1949). The nationwide campaign against malaria in Venezuela. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **43**: 113-164.
- Gabaldon A. (1969). Global eradication of malaria: changes of strategy and future outlook. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **18**: 641-656.
- Gabaldon A. (1971). Metodología para programas de erradicación de la malaria. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **11**: 285-313.
- Gabaldon A., Guzmán G. M. & Sifontes R. (1975). Necesidades en el campo de la investigación del programa nacional de erradicación y control de la malaria. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **15**: 263-285.
- Galardo A. K. R., Arruda M., D'Almeida A. A. R., Wirtz R., Lounibos L. P. & Zimmerman R. H. (2007). Malaria vector incrimination in three rural riverine villages in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **76**: 461-469.
- Griffin J. T., Hollingsworth T. D., Okell L. C., Churcher T. S., White M., *et al.* (2010). Reducing *Plasmodium falciparum* Malaria Transmission in Africa: A Model-Based Evaluation of Intervention Strategies. *PLoS Med.* **7**: e1000324. doi:10.1371/journal.pmed.1000324
- Grillet M-E., Martínez J. E. & Barrera R. (2009). Focos calientes de transmisión de malaria: Implicaciones para un control orientado y efectivo en Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **49**: 7-22.
- Grillet M-E., El Souki M., Laguna F., León J. R. (2014). The periodicity of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in Venezuela. *Acta Tropica.* **129**: 52-60.
- Haines A. & McMichael A. J. (1997). Climate change and health: implications for research, monitoring and policy. *BMJ.* **315**: 870-874.
- Hay S. I., Rogers D. J., Randolph S. E., Stern D. I., Cox J., Shanks G. D. *et al.* (2002). Hot tropic or hot air? Climate change and malaria resurgence in East African highlands. *Trends in Parasitol.* **18**: 530-534.
- Hernández G. R. (1987). *Geografía del estado Bolívar*. Academia Nacional de la Historia, CVG Siderúrgica del Orinoco, C. A. Italgráfica, S. R. L. Caracas, Venezuela.
- Huber O. (1995). Vegetation. pp. 97-160. En: *Flora of the Venezuelan Guayana Vol. 1: Introduction*. Eds. Berry P. E., Holst B. K. & Yatskievych K. Missouri Botanical Garden: St. Louis, Missouri & Timber Press. Portland, Oregon, USA.
- Huber O. & Oliveira-Miranda M. E. (2010). Ambientes Terrestres de Venezuela. pp. 29-89. En: *Libro Rojo de los Ecosistemas Terrestres de Venezuela 2010*. Eds. Rodríguez J. P., Rojas-Suárez F. & Hernández D.G. Documento en línea: http://cmsdata.iucn.org/downloads/rodriguez_et_al_2010_lretv_2_.pdf . (Consultado: 2014, Junio 18).
- Instituto Nacional de Estadística [INE] (2011). XIV Censo nacional de población y vivienda 2011. Documento en línea: <http://www.redatam.ine.gov.ve/Censo2011/Index.html> (Consultado: 2014, abril 28).
- Magris M., Rubio-Palis Y., Alexander N., Ruiz B., Galvan N., Frias D. *et al.* (2007b). Community-randomized trial of Lambda-cyhalothrin-treated hammock nets for malaria control in Yanomami communities in the Amazon región of Venezuela. *Trop. Med. Int. Health.* **12**: 1-12.
- Magris M., Rubio-Palis Y., Menares C. & Villegas L. (2007a). Vector bionomics and malaria transmission in the Upper Orinoco river, Southern Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **102**: 303-311.
- McMichael A. J., Haines A. (1997). Global climate change: the potential effects on health. *BMJ.* **315**: 805-809.
- Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales Renovables [MARNR] (1993-2005) *Registros climatológicos, estaciones de Anacoco y Fuerza Aérea Venezolana*. Tumeremo, Venezuela.

- Ministerio del Poder Popular para la Salud [MPPS] (2013). *Boletín Epidemiológico*. (Semana epidemiológica N° 52). Caracas, Venezuela.
- Molina de Fernández D., Saume R. F., Bisset J., Hidalgo O., Castillo M., Anaya W. *et al.* (1997). Establecimiento de una línea de susceptibilidad de la fase adulta de *Anopheles* spp. a insecticidas químicos. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **37**: 55-69.
- Moreno J., Rubio-Palis Y. & Acevedo P. (2000). Identificación de criaderos de anofelinos en un área endémica del estado Bolívar, Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **40**: 21-30.
- Moreno J. E., Rubio-Palis Y., Páez E., Pérez E. & Sánchez V. (2007). Abundance, biting behavior and parous rate of anopheline mosquito species in relation to malaria incidence in gold-mining areas in southern Venezuela. *Med. & Vet. Entomol.* **21**: 339-349.
- Moreno J. E., Rubio-Palis Y., Páez E., Pérez E., Sánchez V. & Vaccari E. (2009). Malaria entomological inoculation rates in gold mining areas of southern Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **104**: 764-768.
- Moreno J., Rubio-Palis Y., Sánchez V. & Mariani D. (2004). Primer registro de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *nuneztovari* Gabaldon, 1940 (Diptera: Culicidae) en el estado Bolívar y sus implicaciones eco-epidemiológicas. *Entomotrópica.* **19**: 55-58.
- Moreno J. E., Rubio-Palis Y., Sanchez V., Mariani D. 2005. *Anopheles* (*Anopheles*) *neomaculipalpus*: a new malaria vector in the Amazon basin? *Med. & Vet. Entomol.* **19**: 329-333.
- Osborn F. H., Rubio-Palis Y., Herrera M., Figuera A. & Moreno J. E. (2004). Caracterización ecoregional de los vectores de malaria de Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **44**: 77-92.
- Pacheco M., Villegas L., Páez E. & Moreno J. (2001). Re-emergencia de *Plasmodium malariae* en el estado Bolívar [Abstract]. *Bol. Vzlan. Infectol.* **11**: 5.
- Roca-Feltrer A., Armstrong S. J. R. M., Smith L. & Carneiro I. (2009). A simple method for defining malaria seasonality. *Malaria Journal.* **8**: 1-14.
- Rodríguez A. R. (Comp.) (1999). *Conservación de humedales de Venezuela. Inventario, diagnóstico ambiental y estrategia*. Comité Venezolano de la UICN. Caracas, Venezuela.
- Rubio-Palis Y. & Zimmerman R. H. (1997). Ecoregional classification of malaria vectors in the neotropics. *J. Med. Entomol.* **34**: 499-510.
- Shanks G. D., Hay S. I., Omuambo J. A. & Snow R. W. (2005). Malaria in Kenya's western highlands. *Emerg. Infect. Dis.* **11**: 1425-1432.
- Smith T., Charlwood J. D., Kihonda J., Mwankusye S., Billingsley P., Meuwissen J., *et al.* (1993). Absence of seasonal variation in malaria parasitaemia in an area of intense seasonal transmission. *Acta Trópica.* **54**: 55-72.
- Snow R. W. & Gilles H. M. (2002). The epidemiology of malaria. pp. 94-106. En: *Essential Malariology*. Ed. Warrell D. A. & Gilles H. M. 4ta. ed. Arnold. London, New York, New Delhi.
- Statistica for Windows (1996). *Release 5.1. StatSoft; Inc.* 1984-1996. Tulsa.
- Villegas L., Hernández N. & Guevara M. E. (2011). Epidemiología de la malaria en Venezuela. pp. 43-64. En: *Fundamentos en el diagnóstico y control de la malaria*. SA IAE "Dr. Arnoldo Gabaldon" Eds.

Recibido el 29/07/2014
Aceptado el 25/11/2014

Notas Científicas

Nuevos registros de vectores potenciales de Fiebre Amarilla y Mayaro para el estado Guárico, Venezuela. Primer registro de *Haemagogus janthinomys* Dyar para los Llanos centrales de Venezuela

New records of potential yellow fever and mayaro vectors from Guarico State, Venezuela. First record of Haemagogus janthinomys Dyar from the central plains of Venezuela

Elvira Sánchez-González^{1,2}, Jonathan Liria^{1,3}, Rodrigo Ramírez⁴, Manuel Muñoz⁵ & Juan-Carlos Navarro^{5*}

RESUMEN

Se reportan *Haemagogus anastasionis* Dyar y *Hg. equinus* Theobald, con base en capturas realizadas en un área rural del municipio Roscio, estado Guárico y se señala por primera vez la presencia de *Hg. janthinomys* para la subregión de los Llanos Centrales. Este hallazgo, constituye un factor de riesgo potencial en la emergencia y transmisión de arbovirosis, por lo que se recomienda a los organismos de salud del estado realizar la vigilancia entomológica y epidemiológica respectiva en el área.

Palabras clave: alphavirus, arbovirosis, Culicidae, flaviviridae, mosquitos, vectores.

SUMMARY

Haemagogus anastasionis Dyar and *Hg. equinus* Theobald were captured from a rural area in the Roscio municipality, Guarico State, Venezuela, and *Hg. janthinomys* was reported for the first time from the central lowland plains subregion of Venezuela. These findings represent potential risk factors for the emergence of arboviruses and their transmission. We thus recommend that the respective health authorities undertake entomological and epidemiological surveillance in this region.

Key words: alphavirus, arboviruses, Culicidae, flaviviridae, mosquitoes, vectors.

Los mosquitos (Diptera: Culicidae), se encuentran representados por más de 3.000 especies en el mundo (WRBU, <http://www.mosquitocatalog.org>, Consultado en: marzo 3, 2014). En Venezuela, la familia Culicidae incluye 315 especies, distribuidas en 23 géneros (Navarro *et al.*, 2007. *Zootaxa*. **1547**: 1-19;

Del Ventura *et al.*, 2013. *Bol. Malariol. Salud Amb.* **53**: 165-182), siendo *Haemagogus* Williston de importancia epidemiológica, debido a las implicaciones vectoriales en la transmisión y mantenimiento del virus de la Fiebre Amarilla (YFV) y del virus Mayaro (MAYV) en los respectivos ciclos selváticos (enzoóticos).

¹ Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo. Valencia, estado Carabobo. Código Postal 2005, Venezuela.

² Departamento de Biología de Organismos, División de Ciencias Biológicas, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Distrito Capital. Código Postal 1080, Venezuela.

³ Laboratorio Museo de Zoología de la Universidad de Carabobo.

⁴ Centro de Investigaciones en Enfermedades Endémicas. Laboratorio de Entomología. Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios Dr. Arnoldo Gabaldón (MPPS). Maracay, Venezuela.

⁵ Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Laboratorio Biología de Vectores y Parásitos, Centro de Ecología y Evolución, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

*Autor de correspondencia: jcnovac@gmail.com

En el ciclo enzoótico, los primates de los géneros *Alouatta*, *Ateles*, *Cebus* y *Pithecia*, actúan como hospedadores o posibles reservorios del virus, mientras que el humano se considera como un hospedador accidental al introducirse en bosques primarios y secundarios, donde los mosquitos vectores desarrollan su ciclo de vida (Barret & Higgs, 2006. *Annu. Rev. Entomol.* **52**: 109-129; Vasconcelos, 2003. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **36**: 275-293).

Entre las especies involucradas en el ciclo enzoótico se encuentran *Hg. janthinomys*, *Hg. albomaculatus* Theobald, *Hg. leucocelaenus* Dyar & Shannon, *Hg. equinus*, así como *Hg. capricornii* Lutz (Cardoso *et al.*, 2010. *Emerg. Infect. Diseases.* **16**: 1918-1924; Vasconcelos, 2003. *Op. cit.*; Mondet *et al.*, 2002. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2**: 47-50; De Rodaniche & Galindo, 1956. *Am. J. Trop. Med.* **61**: 232-237), siendo *Hg. janthinomys* el principal involucrado por diversos autores en la transmisión de MAYV (Muñoz & Navarro, 2012. *Biomedica.* **32**: 286-302).

La distribución geográfica de *Haemagogus* abarca la región neotropical, incluyendo el Norte de Suramérica, las islas del Caribe y América Central, donde se encuentran 19 de las 28 especies que conforman el género (Arnell, 1973. *Contrib. Amer. Entomol. Inst.* **52**: 209-229). En Venezuela se han reportado nueve especies, siete de ellas en el subgénero *Haemagogus* y dos incluidas en el subgénero *Conopostegus* Dyar (Navarro, 1998. *Bol. Entomol. Venez.* **13**: 187-194; Sutil, 1980. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **20**: 1-32; Arnell, 1973. *Op. cit.*), con la inclusión reciente de *Hg. (Conopostegus) clarki* Galindo, Carpenter & Trapido para el país, (Liria & Navarro, 2009. *Bol. Mal. Salud Amb.* **49**: 283-292).

En los Llanos venezolanos se ha señalado la presencia de cinco especies: *Hg. anastasionis*, *Hg. celeste*, *Hg. equinus*, *Hg. janthinomys* y *Hg. lucifer* (Howard, Dyar & Knab) (Muñoz *et al.*, 2010. *Rev. Biomed.* **21**: 163-177; Liria & Navarro, 2009. *Op. cit.*). Todas estas, a excepción de *Hg. janthinomys* han sido registradas para la subregión definida como Llanos Centrales (Huber & Alarcón, 1988. Ministerio del Ambiente y de los recursos Naturales Renovables. The Nature Conservancy). Esta subregión abarca la zona septentrional y meridional de los estados Guárico y Cojedes, y el extremo suroeste de Anzoátegui.

Como parte de un estudio de vigilancia y prevención de arbovirus re-emergentes, se realizó un muestreo puntual durante el mes de junio de 2010 en el Fundo La Lomita, localizado en las coordenadas 9° 45' N; 67° 26'16" W, sector Los Cedritos I, Municipio Roscio, estado Guárico, Venezuela (Fig. 1). Esta localidad presenta una elevación de 351 m y vegetación característica de los Llanos Centrales altos, con terrenos no inundables cubiertos por sabanas de montaña y matorrales (Huber & Alarcón, 1988. *Op. cit.*). En la zona se evidencia fragmentación de la vegetación, debido a la intervención humana (asentamientos rurales y espacios para la cría de ganado bovino).

Los mosquitos fueron recolectados en su fase adulta en el horario diurno (8:30-16:00 h) al posarse en la ropa de los investigadores debidamente protegidos. Para la captura de los mismos, se utilizaron aspiradores de vidrio manuales diseñados para tal fin. Posteriormente los ejemplares fueron trasladados al Laboratorio de Biodiversidad Animal, Departamento de Biología, Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad de Carabobo, Venezuela, donde fueron identificados a partir de su morfología externa utilizando claves taxonómicas para adultos (Liria & Navarro, 2009. *Op. cit.*; Chaverri, 2004. http://www.inbio.ac.cr/EN/papers/culicidae_hembra/clave.htm. Consultado en: enero 17, 2014).

Los culicidos identificados corresponden a las especies *Haemagogus (Haemagogus) equinus*, *Hg. (Hae.) anastasionis* y *Hg. (Hae.) janthinomys* (Fig. 2). Los especímenes se encuentran depositados en la colección de Invertebrados del Laboratorio Museo de Zoología de la Universidad de Carabobo (MZUC), bajo los siguientes datos de captura: Venezuela, Guárico, Roscio, Fundo La Lomita, 351 m, 10° 52'37"N 68° 8'43"W, sector Los Cedritos I. Cebo humano. Recolectores: Equipo Lab. Biodiversidad Animal-UC.

Las especies de *Haemagogus* son de hábitos diurnos y predominantemente selváticos, con el desarrollo de sus fases inmaduras en fitotelmatas como huecos de árboles e internodos de bambú, aunque algunos estudios muestran su capacidad para colonizar recipientes artificiales como neumáticos y trampas para oviposición (Arnell *Op. cit.*; Ramírez *et al.*, 2004. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública.* **24**: 40-25; Chadee *et al.*, 1981. *Mosquito News.* **41**: 568-569).

Fig. 1. Registros de tres especies de *Haemagogus* en estados de los Llanos venezolanos.

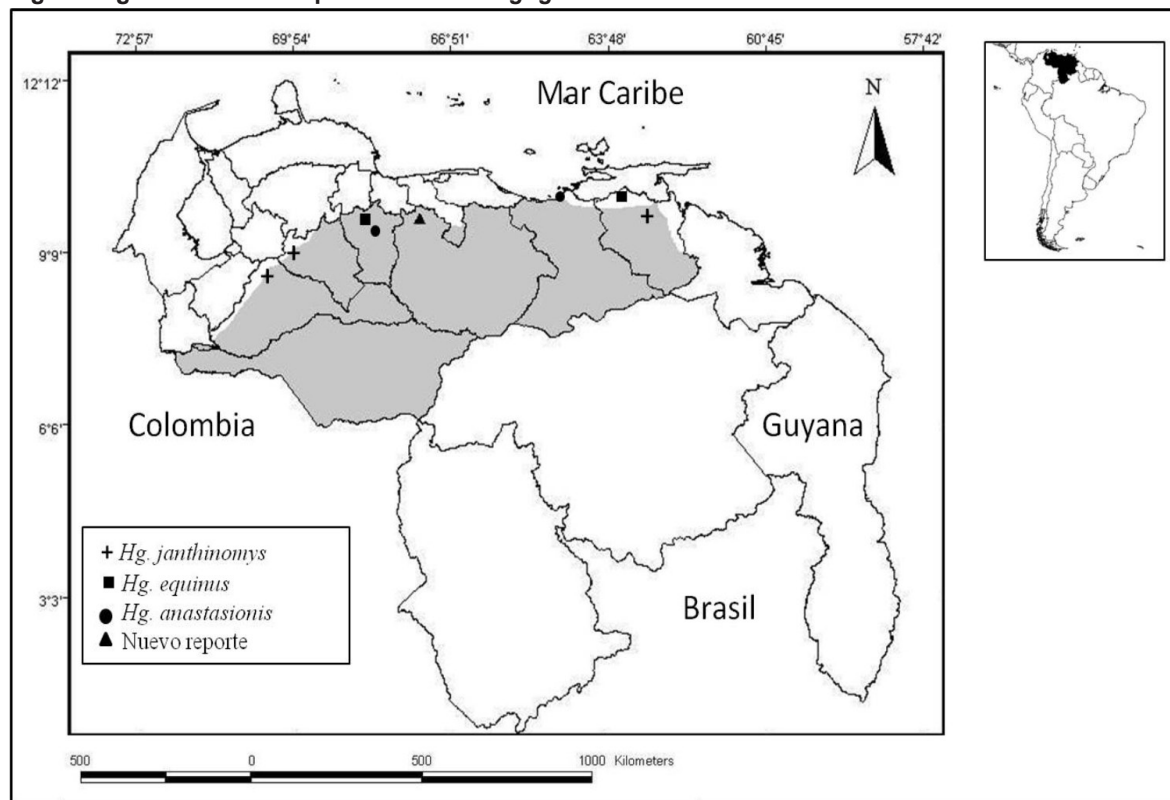
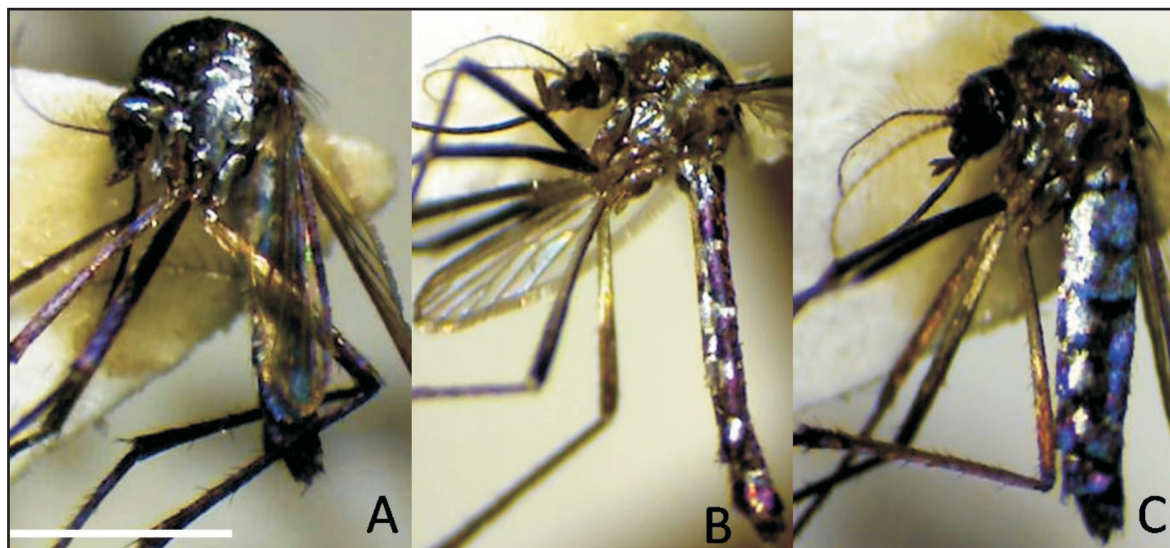


Fig. 2. Mosquitos reportados en la localidad de estudio: A) *Hg. anastasionis*; B) *Hg. equinus*; C) *Hg. janthinomys*. Escala= 2mm.



Haemagogus janthinomys suele presentar una distribución vertical desde el sotobosque al dosel, con preferencias hacia este último (Galindo *et al.*, 1955. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **48**: 158-164; Ramírez *et al.*, 2004. *Op. cit.*). Esta especie es considerada el vector más importantes del YFV y del MAYV. Por su parte, *Hg. equinus* es considerado un vector secundario del YFV, junto a otras especies pertenecientes al género *Sabethes* Robineau-Desvoidy (Vasconcelos, 2003. *Op. cit.* Barrett & Higgs *Op. cit.*).

Las especies reportadas representan un factor epidemiológico importante para el estado Guárico, ya que se ha señalado que las infecciones por YFV provenientes del foco de San Camilo, en el estado Apure, pueden extenderse hacia esta región (Valero 2003, *Invest Clin.* **44**: 269-271.; Ministerio del Poder Popular Para la Salud, 2012. http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_pocadownload&view=category&download=721:manualdefiebre amarilla&id=22:manualesguiasyprotocolosdevigilanciaepidemiologica&Itemid=915. Consultado en: marzo 15, 2014).

Así mismo, la presencia de factores determinantes para el mantenimiento del ciclo enzoótico de la YFV y MAYV tales como, asentamientos humanos, monos araguatos o aulladores, marsupiales arborícolas, y zonas boscosas periféricas a las zonas residenciales permiten recomendar acciones de vigilancia que incluyan la recolección sistemática de mosquitos adultos, para el aislamiento de arbovirus u otros agentes etiológicos asociados a enfermedades zoonóticas,

así como la vigilancia serológica en humanos y animales domésticos y selváticos que pudieran estar involucrados en los respectivos ciclos de transmisión.

La presencia de estas especies en el estado Guárico, principalmente *Hg. janthinomys*, cuyas hembras actúan como principales vectores de importantes arbovirosis tropicales (fiebre amarilla y fiebre Mayaro) constituye sin duda, un riesgo potencial de transmisión de las mismas para la región de los Llanos centrales de Venezuela. Este hallazgo, muestra la importancia de profundizar estudios en el país sobre la distribución geográfica y aspectos ecológicos de mosquitos vectores y su posible relación epidemiológica con las enfermedades emergentes y reemergentes.

CONFLICTO DE INTERESES

No surgieron conflictos de intereses en el desarrollo de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A los señores Héctor Manuel Silva (Universidad de Carabobo) y Nelson Moncada (IZET-UCV), por su valiosa colaboración en el traslado y apoyo en los sitios de muestreo. Al personal de la Dirección de Salud Ambiental del Estado Guárico por la colaboración prestada. Por último al señor Epifanio por el hospedaje durante el transcurso del muestreo. Financiado mediante proyecto Misión Ciencia FONACIT N° 2008001911-4 a JCN, JL.

Recibido el 23/04/2014
Aceptado el 10/08/2014

Primer registro de *Anopheles (Stethomyia) nimbus* (Theobald, 1902) para el estado Bolívar, Venezuela

First record of Anopheles (Stethomyia) nimbus (Theobald, 1902) for Bolívar state, Venezuela

Jesús Berti^{1*}, Yarys Estrada¹, Hernán Guzmán¹ & Lourdes Arias¹

RESUMEN

En el presente trabajo se registra por primera vez la presencia de *Anopheles nimbus* (Theobald, 1902) en el estado Bolívar. Con el registro de la nueva localidad aumenta a cinco, el número de entidades federales de Venezuela donde la especie está presente, estas son: Amazonas, Cojedes, Monagas, Yaracuy y Bolívar.

Palabras clave: *Anopheles*, larvas, criaderos, distribución geográfica, Gran Sabana, estado Bolívar, mosquitos, Venezuela.

SUMMARY

We report the presence of *Anopheles nimbus* (Theobald, 1902) for the first time in Bolívar state. This new register increases the geographical distribution of this species in Venezuela to five states: Amazonas, Cojedes, Monagas, Yaracuy and Bolívar.

Key words: *Anopheles*, breeding sites, geographical distribution, Gran Sabana, Bolívar state, mosquitoes, Venezuela.

En la Gran Sabana, estado Bolívar, Venezuela (Fig. 1), entre enero y diciembre del 2012 y 2013, se realizaron capturas de mosquitos adultos (método de cebo humano), así como también la búsqueda y recolección de larvas y pupas en criaderos naturales y artificiales. Entre las comunidades visitadas tenemos: Santa Elena de Uairén (capital), Manak-Krú, Maurak, Waramasén, Colinas de la Laguna, Altamira, San Antonio del Morichal, Kinok-Pon Parú, Chiricayén, Chiririka, Waiparú, Betania, Kamaiwa, La Primavera, El Paují, y El Paraíso, un campamento vacacional. Por otro lado, hubo capturas de larvas y mosquitos en las márgenes de los ríos Chiririka, Waiparú, Uairén y Kukenán.

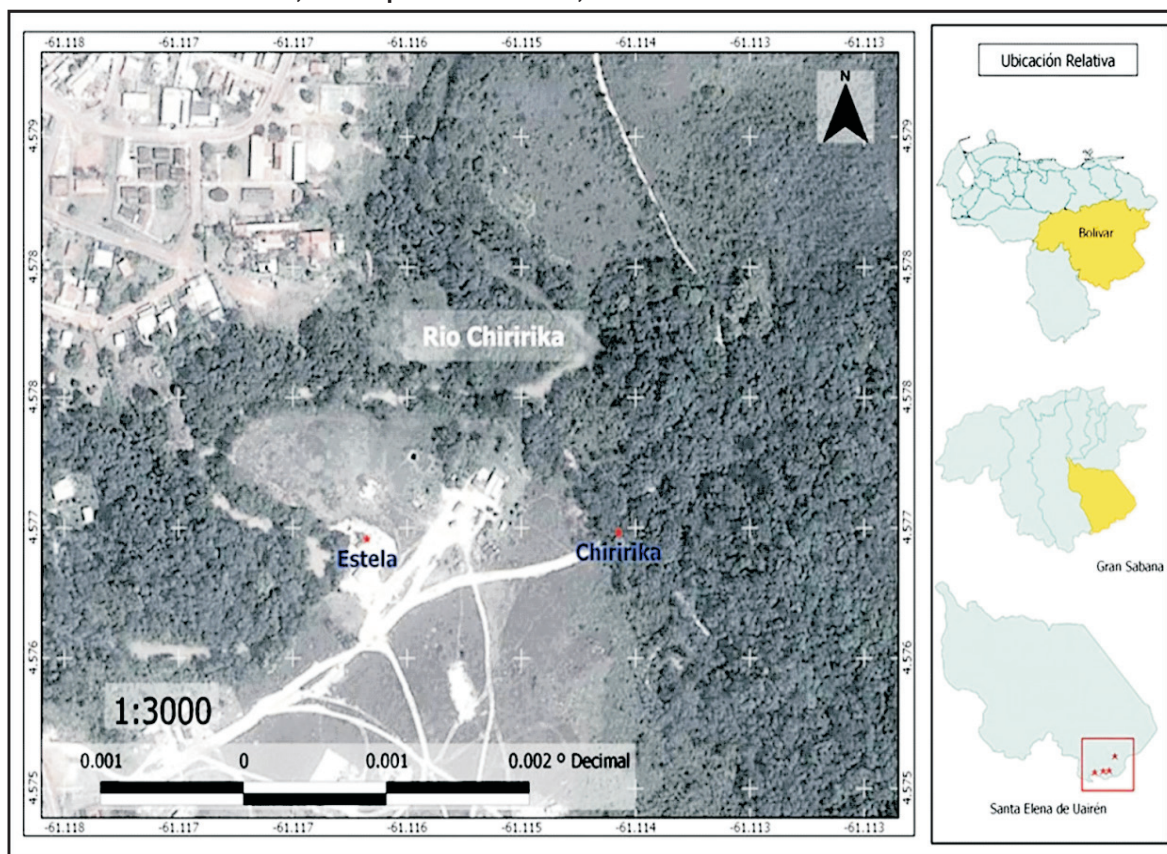
El subgénero *Stethomyia*, al cual pertenece la especie *Anopheles nimbus* (Theobald) ha sido muy poco estudiado. Este subgénero se distribuye en América en 11 países: Bolivia, Brasil, Costa Rica, Colombia, Guyana, Guyana Francesa, Panamá, Perú,

Surinam, Trinidad and Tobago y Venezuela. En Venezuela, según Rubio-Palis (2005. *Bol. Malariol. Salud Amb.* **45**: 1-10) están presentes solo tres de las 5 especies del subgénero *Stethomyia*, que son: *Anopheles kompi* Edwards 1930; *Anopheles thomasi* Shannon, 1933 y *Anopheles nimbus* (Theobald, 1902). Esta última es una especie que ha sido muy poco estudiada. No obstante, se sabe que sus criaderos se encuentran dentro de la selva en las márgenes de quebradas, manantiales o ríos muy sombreados con poca corriente, donde hay presencia de algas, en aguas estancadas, transparentes y no contaminadas (Cova-García. 1951. *Publicac. Div. Malariol.* **10**: 7-226). Asimismo, este autor señala que la especie pica al ser humano con poca frecuencia y no ha sido señalada como vector de enfermedades tropicales (Cova-García. 1951. *Op. cit.*). Hasta 1980, de las tres especies del subgénero *Stethomyia*, solo *Anopheles kompi* estaba registrada para el estado Bolívar (Sutil, 1980. *Publicac. Div. Endemias Rurales*, 37 pp.). En

¹ Centro de Estudio de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA). Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon" (IAE). Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS). Maracay, Estado Aragua. Venezuela.

*Autor de correspondencia: jbertimoser@yahoo.com

Fig. 1. Imagen satelital señalando la ubicación del lugar de la captura de larvas del IV instar de *An. nimbus* en el río Chiririka, municipio Gran Sabana, estado Bolívar.



1998, Berti *et al.* (1998. *Bol. Entomol Venez.* **13**: 17-26) señalaron por primera vez la presencia de *Anopheles thomasi* Shannon en el estado Bolívar. Por su parte, *Anopheles nimbus* hasta el presente reporte, solo estaba registrada en Amazonas, Cojedes, Monagas y Yaracuy (Cova García, 1951. *Op. cit.*; Sutil, 1980. *Op. cit.*). Con el nuevo registro en el municipio Gran Sabana, estado Bolívar, aumenta a cinco el número de entidades federales de Venezuela donde la especie está presente. La misma, se encuentra distribuida en los siguientes países de América: Bolivia, Brasil, Colombia, Guyana, Trinidad & Tobago y Venezuela. La localidad tipo de la especie fue señalada por Theobald, como Cabacaburi, en el Río Pomeroon de la antigua Guyana inglesa (British Guiana) hoy territorio en reclamación, la Guyana Esequiba.

Los tres ejemplares del IV instar de la fase larval, fueron capturados en las orillas sombreadas del río Chiririka (Fig. 1), coincidiendo con el tipo de hábitat señalado por Cova-García (1951. *Op. cit.*); las

mismas estaban asociadas con larvas de *Chagasia bonneae* Root y *Chagasia ablusa* Harbach. Fueron identificadas usando la clave para larvas propuesta por Navarro (Navarro, 1996. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **36**: 25-43) y están depositadas (3 larvas de IV instar) en la colección de Culicidae del Laboratorio de Entomología del Centro de Estudio de Enfermedades Endémicas del Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon", estado Aragua; con los siguientes datos: Venezuela, Bolívar, Gran Sabana, Chiririka, Río Chiririka, 896 msnm, 4° 34' 36" N; 61° 06' 52" W. Captura de larvas. 14-XI-2012. Recolector: Y. Estrada. Determinación: Y. Estrada y J. Berti. No fueron realizadas crías asociadas, debido a la poca cantidad de larvas.

En la Fig. 1, se puede observar la imagen satelital con la ubicación del sitio donde fue realizada la captura de larvas de la especie. La vegetación de la zona es del tipo denominado bosques ombrófilos sub-montanos siempre verdes (Huber 1995.

Fig. 2 . Microfotografía que muestra en detalle las ramificaciones del pelo 1-P en número desde 11 hasta 14 (10X Objetivo 40= 400 At.).



Geographical and physical features. pp. 1–61. En: *Flora of the Venezuelan Guayana*. Eds. Berry E, Holst B & Yatskievych K. 2ª Ed.). Éstos son bosques densos con sotobosque bien desarrollado y elementos leñosos dominantes (arbustos, árboles, palmas) medio-altos, que ocupan zonas con altitudes entre 600 a 1.200 msnm. Entre las especies de plantas características de estos bosques tenemos: *Tabebuia insignis*, *Tabebuia rosea*, *Tabebuia chrysantha*, *Virola surinamensis*, *Protium heptaphyllum*, *Alexa confusa*, *Anaxagorea petiolata*, *Simaruba amara*, *Byrsonima stypulacea*, *Stegolepis perligulata*, *Pourouma bolivarensis*, entre otras (Huber, 1995. *Op. cit.*). Generalmente son árboles altos (entre 20 y 30 m), con presencia de abundantes epifitas (especialmente bromeliáceas). Esta región amazónica, presenta una temperatura media de 22°C (18°C a 24°C) y una precipitación entre 1.500 y 5.700 mm, con un promedio de 1.900 mm a 2.500 mm; estos bosques se caracterizan por un clima de constante lluvia, con un promedio de 205 días de lluvia por año; por lo cual se mantienen en constante estado de alta humedad y bajas temperaturas (Huber, 1995. *Op. cit.*).

Este trabajo contribuye al conocimiento de la fauna de Culicidae la región de la Amazonia venezolana, al ampliar la distribución geográfica

conocida de una especie muy poco estudiada y aportar información sobre las características de su hábitat larval. Si bien la especie, no ha sido señalada como vector de enfermedades tropicales (Cova-García. 1951. *Op. cit.*); también es cierto que la detección de especies silvestres de ambientes selváticos en ambientes periurbanos, es de mucho interés para comprender el impacto de la ocupación de la región de la Amazonia (Brasil-Venezuela) sobre la diversidad biológica del área amazónica.

Las características taxonómicas señaladas en la clave de Navarro (Navarro, 1996. *Op. cit.*), permitieron la sencilla determinación de la especie, estas características son básicamente las siguientes: En primer lugar, la larva no presenta pelos palmeados abdominales, la cual es una característica del subgénero *Stethomyia*; en segundo lugar, en la parte dorsal del tórax de la larva, *An. nimbus* tiene el pelo 1-P con ramificaciones en número de 11 a 14 (Fig. 3); lo cual la diferencia claramente de *An. kompi*, que apenas tiene entre 6 y 8 ramas en el pelo 1-P (Navarro, 1996. *Op. cit.*). En la larva de *An. thomasi*, este pelo es sencillo y no presenta ramificaciones (Navarro, 1996. *Op. cit.*).

CONFLICTO DE INTERESES

Los Autores manifestamos que no se presentaron conflictos.

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Aura Suárez, epidemióloga del distrito VII, municipio Gran Sabana, estado Bolívar por su apoyo incondicional. Al Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldon”, Dirección de Investigación por el financiamiento del proyecto “Biodiversidad y distribución espacial de mosquitos (Diptera: Culicidae) del Municipio Gran Sabana, estado Bolívar”.

Recibido el 21/04/2014
Aceptado el 04/11/2014

Primer registro de *Panstrongylus rufotuberculatus* (Hemiptera: Reduviidae) para el estado Mérida, Venezuela

First record of Panstrongylus rufotuberculatus (Hemiptera: Reduviidae) in Mérida State, Venezuela

Francys Avendaño-Rangel*, Klever Rey, Elis Aldana & Eliecer Lizano

RESUMEN

Se señala la presencia de *Panstrongylus rufotuberculatus* (Hemiptera: Reduviidae) capturados en horas nocturnas, al ser atraídos por la luz, dentro y fuera de dos viviendas de una zona de bosque seco de la población de Chiguará, aproximadamente a 1100 msnm, en el Municipio Sucre del estado Mérida (Venezuela), lo que representa el primer reporte de esta especie para dicho estado. Los ejemplares encontrados son adultos, no infectados con *Trypanosoma* spp. Se discute la importancia epidemiológica de dicho hallazgo.

Palabras clave: *Panstrongylus rufotuberculatus*, *Trypanosoma cruzi*, Enfermedad de Chagas, Estado Mérida.

SUMMARY

Panstrongylus rufotuberculatus (Hemiptera: Reduviidae) is recorded for the first time from Mérida State (Venezuela). The insects were captured during the night, attracted by the light, from the inside and outside of two dwellings surrounded by a dry forest at 1100 m.a.s.l., in the town of Chiguará, Sucre municipality, Mérida state (Venezuela). The specimens found were adults not infected with *T. cruzi*. The epidemiological significance of this finding is discussed.

Key words: *Panstrongylus rufotuberculatus*, *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, Mérida State.

Los triatomínos son insectos de gran importancia debido a su capacidad de transmisión de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) agente causal de la enfermedad de Chagas en humanos, la cual es un problema de salud pública tanto en las zonas rurales como urbanas. Se calcula que en todo el mundo hay más de 8 millones de personas infectadas por *T. cruzi* y que aproximadamente 100 millones están en riesgo de contraer la enfermedad (WHO, 2002. Control of Chagas disease. Technical Report. Series 905. Geneva; Schmunis, 1999. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **97**: 93-101).

Se han descrito a nivel mundial más de 140 especies de triatomínos organizados en 14 géneros y 5 tribus (Lent & Wygodzinsky, 1979, *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* **163**: 125-520; Galvão, Carcavallo, Rocha & Jurberg, 2003. *Zootaxa.* **202**: 1-36;). Para Venezuela se han reportado 23 especies encontrándose entre los principales vectores de *T. cruzi* a *Rhodnius prolixus*

Stal, 1859, como vector principal, *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) y *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) como vectores secundarios (Schofield & Galvão, 2009. *Acta Trop.* **110**: 88-100; Ayala, 2009. *Entomotropica.* **24**: 105-109. Torres *et al.*, 2010. *Biomédica.* **30**: 72-81; Cazorla-Perfetti *et al.*, 2010. *Avances Cardiol.* **30**: 347-369; Aldana *et al.*, 2011. *Biomédica.* **31**: 108-117).

Panstrongylus rufotuberculatus (Champion, 1899) es una especie de amplia distribución geográfica, en América: se ha reportado en Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Panamá, Perú, México y Venezuela (Lent & Wygodzinsky, 1979, *loc. cit.*; Wolff & Castillo, 2002, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **97**: 297-300; Galvão *et al.*, 2003. *Zootaxa.* **202**: 1-36). En Venezuela se ha reportado en los estados Aragua, Anzoátegui, Cojedes, Carabobo, Falcón, Guárico, Lara, Monagas, Portuguesa, Miranda, Yaracuy, Trujillo, Zulia, Sucre, Táchira,

Laboratorio de Entomología "Herman Lent". Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. estado Mérida, Venezuela

*Autor de correspondencia: francysav@ula.ve

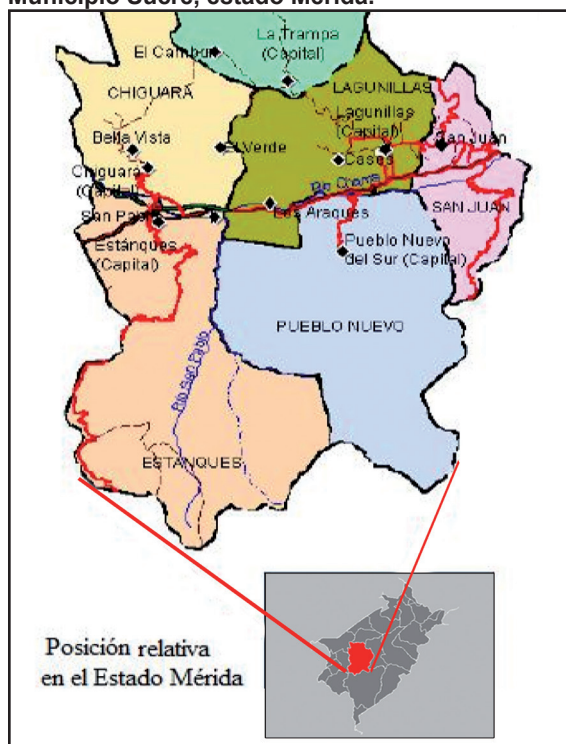
Distrito Capital, Amazonas y Delta Amacuro (Cova-García & Suarez., 1959. Estudio de los Triatominos en Venezuela. *Min. San. Asist. Soc. Caracas*; Carcavallo *et al.*, 1999. Geographical distribution and alti-latitudinal dispersion. En: *Atlas of Chagas' Disease Vectors in the Americas*. Eds. Carcavallo *et al.* 3: 747-792. FioCruz Editorial, Rio de Janeiro, Brasil; Zabala-Jaspe *et al.*, 2009. *Bol. Mal. Salud Amb.* 49: 309-311. Cazorla-Perfetti *et al.*, 2010, *loc. cit.* Morocoima *et al.*, 2012. *Bol. Mal. Salud Amb.* 52: 135-138).

Tradicionalmente a *P. rufotuberculatus* se le conoce como una especie de hábitos silvestres, se alimenta principalmente de carnívoros, primates, animales domésticos y del ser humano (Lent & Wygodzinsky, 1979, *loc. cit.*). En Venezuela, se ha encontrado a esta especie domiciliada en el estado Lara, reportándose la presencia de huevos y adultos infectados dentro de la vivienda humana (Traviezo-Valles *et al.*, 2008. *Bol. Mal. Salud Amb.* 48: 99-101). Asimismo, en Colombia y Perú también se ha demostrado la domiciliación de esta especie (Wolff & Castillo, 2002, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97: 297-300; Marín *et al.*, 2007, *Cad. Saúde Pública.* 23: 2235-2238).

En este trabajo se registra, de acuerdo a nuestra revisión bibliográfica, *P. rufotuberculatus* por primera vez en el estado Mérida, Venezuela. Durante los meses de Diciembre 2013 a Julio 2014 se encontraron siete ejemplares de dicha especie, cuatro machos y tres hembras, en dos casas de la población de Chiguará en el Municipio Sucre del Estado Mérida. Esta población se encuentra ubicada a una latitud 8°20'00"N a 8°17'36"N, una longitud 71°24'20"O a 71°24'20"W (Fig. 1), y una altitud entre 400 y 1200 msnm. Chiguará cuenta con una temperatura media anual de 21,5°C y precipitación media anual de 700mm, presenta una variedad de climas y vegetación que incluye desde un bosque xerófilo en la zona más baja, hasta los bosques húmedos en sus zonas altas (Picón Medina, 1990. *El caso Chiguará: Una experiencia de desarrollo autogestionario*. Tesis de Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez, Caracas).

Los ejemplares de *P. rufotuberculatus* fueron capturados por miembros de la comunidad previamente instruidos sobre el papel de los triatominos en la transmisión de la Enfermedad de

Fig. 1. Ubicación de la localidad de Chiguará en el Municipio Sucre, estado Mérida.



Chagas y sobre cómo realizar una captura segura. De los ejemplares capturados cuatro de estos fueron encontrados en áreas domiciliarias, tales como, sala, cocina y habitación; y los otros tres en paredes exteriores del peridomicilio, las capturas se hicieron en horas nocturnas siendo los insectos atraídos por las luces de las viviendas, las cuales se encuentran en una zona semi-urbana ubicada en la unidad ecológica bosque caducifolio seco (Fig. 2) (Ataroff & Sarmiento 2003, *Mapas de Unidades Ecológicas del Estado Mérida*, CD-ROM Dep. Legal IF 23720025741998X, ISBN 980-11-0670-0 Biblioteca Nacional, Caracas), donde la principal actividad comercial es la ganadería de carne y de leche y en menor proporción agrícola, tal como la siembra de café, cambur y apio.

Los insectos fueron colectados en envases plásticos con su debida identificación, consistente en: nombre del colector, lugar, fecha y hora de captura. Posteriormente fueron facilitados a un voluntario de recepción de triatominos en esta comunidad, siendo entregados siete ejemplares adultos, de los cuales tres (dos machos y una hembra) estaban vivos. Dichos insectos fueron trasladados al Laboratorio

Fig. 2. Vegetación en alrededores de las viviendas donde se capturaron *Panstrongylus rufotuberculatus*, perteneciente a la unidad ecológica bosque caducifolio seco.



de Entomología “Herman Lent” de la Facultad de Ciencias (ULA) donde se les identificó según las claves dicotómicas de Lent & Wygodzinsky (1979, *loc. cit.*), cumpliendo con las características descritas para esta especie, presentando una coloración general negra o café, tubérculos en el pronoto color rojizo, con manchas de color rojo claro en el conexivo, tórax y patas, en cada segmento del conexivo posee una mancha negra o café oscuro en la parte central, hemielitros con manchas marrón oscuro (Fig. 3).

Seguidamente, aquellos ejemplares que llegaron vivos al laboratorio fueron alimentados con sangre de ave (gallina) para luego practicarles un examen del contenido intestinal y determinar la presencia de *Trypanosoma* spp. Por lo tanto se aplicó una breve presión en el abdomen con el fin de obtener

Fig. 3. *Panstrongylus rufotuberculatus* hembra, negativo para *Trypanosoma cruzi*, capturado en Chiguará, Municipio Sucre del estado Mérida.



una pequeña muestra de heces que fue recogida en un portaobjetos y observada en un microscopio de luz a 40X y 100X.

El presente hallazgo representa el primer registro de la especie *P. rufotuberculatus* para el estado Mérida, sin embargo, dicha especie ha sido registrada en estados vecinos, tales como Táchira, Trujillo y Zulia. El hecho de que no haya sido reportado antes en el Estado Mérida puede deberse a diversos factores, por ejemplo: i) Bajas densidades poblacionales de esta especie en la zona; ii) Carencia de muestreos en el área de estudio y iii) La presencia de esta especie en esta zona puede ser relativamente reciente. A pesar de que *P. rufotuberculatus* ha sido asociado principalmente a hábitats silvestres, esta especie también tiene la capacidad de colonizar domicilios humanos, tal como ha sido reportado por Wolff & Castillo (2002) en Colombia, donde encontraron 100% de domiciliación de esta especie y una tasa de infección de 4,5%; y además Traviezo-Valles *et al.* (2008, *loc. cit.*) encontraron ejemplares de esta especie dentro de viviendas en el estado Lara-Venezuela, los cuales se encontraban infectados con *T. cruzi*, resaltando su capacidad vectorial.

Estos hallazgos conllevan a revisar la importancia epidemiológica de *P. rufotuberculatus* en la población de Chiguará en el Municipio Sucre del estado Mérida, en vista de su capacidad de infestar domicilios y aunado al hecho de que en dicha comunidad además de *P. rufotuberculatus*, también han sido encontrados recientemente por habitantes de la comunidad ejemplares de *Rhodnius pictipes* Stal, 1872, *Eratyrus mucronatus* Stal, 1859, *T. maculata* y *P. geniculatus*, este último infectado naturalmente con *Trypanosoma* spp. (datos no publicados), lo cual nos señala que es necesario evaluar la importancia epidemiológica de *P. rufotuberculatus* y otras especies en la transmisión de la enfermedad de Chagas en esta comunidad, debido a la emergencia de especies de triatomos considerados tradicionalmente como silvestres, pero que en la actualidad debido a la modificación de sus hábitats naturales por actividades humanas, tales como construcción de urbanismos y agricultura, se encuentran adaptándose a dichos cambios, provocando la dispersión de estos insectos y por ende una posible domiciliación, aumentando por consiguiente el riesgo de transmisión vectorial de *T. cruzi* en esta localidad.

Esta nota es de importancia para la comunidad científica ya que: i) Amplía el conocimiento sobre la fauna de triatominos en el estado Mérida; ii) Se evidencia la importancia de la participación comunitaria en el control y vigilancia de triatominos; iii) La captura de triatominos dentro de viviendas demuestra la capacidad de dispersión e infestación de domicilios de esta especie; iv) Se evidencia la necesidad de realizar investigaciones entomo-epidemiológicas en la población de Chiguará y en comunidades aledañas, que permitan determinar los factores de riesgo asociados a la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas para poder

desarrollar estrategias de control vectorial en estas comunidades.

AGRADECIMIENTOS

A los habitantes de la población de Chiguará por su participación continua en la campaña de concientización sobre el control de triatominos y prevención de la Enfermedad de Chagas.

Recibido el 07/10/2014
Aceptado el 02/11/2014

Noticias



Colección de Parásitos Maláricos y otros Haemosporidios en aves “Dr. Arnoldo Gabaldon”

En el Laboratorio de Biología de Vectores y Reservorios (LBVR) del Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas de Salud Ambiental (CEEESA) del Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldon” (IAE), se encuentra la **Colección de Parásitos Maláricos y otros Haemosporidios en Aves “Dr. Arnoldo Gabaldón”**. Ésta constituye un aporte a la investigación científica y a la docencia de postgrado, que permite: 1) el estudio de la biogeografía y distribución espacio temporal de parásitos de las familias Plasmodiidae, Haemoproteidae, Leucocytozoidae y Garniidae; 2) taxonomía basada en caracteres morfológicos, morfométricos y genéticos; 3) especiación de parásitos hemáticos intracelulares; 4) impacto ambiental sobre la relación hospedador-parásito; 5) cambios inducidos e invasiones parasitarias múltiples, en eritrocitos de aves, como fenómeno para incrementar su éxito de transmisión.

Esta colección se inició a partir del material biológico estudiado por Dr. Arnoldo Gabaldon, desde el año 1972 hasta 1992, sobre hematología e histología aviaria (Gabaldon, 1975. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **15**: 161-200). Contando con la ayuda de sus grandes colaboradores Gregorio Ulloa y Alba de Montocurt, en los años 1972 y 1973 se examinaron 3998 aves, reportando infecciones por *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Trypanosoma* y *Leucocytozoon*. Se identifican 15 especies de aves, perteneciente a quince géneros diferentes infectadas con *Plasmodium*

(Gabaldon *et al.*, 1974. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **14**: 80-103).

En 1975, en el segundo año de investigación se estudian 8565 especímenes de aves, con *Plasmodium* en otras ocho especies. En este mismo trabajo y como anticipando una labor comprehensiva, se elabora una lista de mosquitos Culicidae y Anophelinae, señalando que, para esa fecha, se conocían en Venezuela 54 especies, algunas de las cuales podrían ser transmisores de malaria aviaria (Gabaldon *et al.*, 1975. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **15**: 73-92).

En la búsqueda compulsiva del modelo malárico, con el apoyo de dos nuevos asistentes entomólogos, Juan Pulido y Ezequiel Sutil, además de Gregorio Ulloa se adelanta, adelanta una encuesta sobre eventuales transmisores, identificando localidades de los estados Portuguesa y Apure en unos 28.079 mosquitos entre 72.000 capturados en trampas establos cebadas con gallos, patos y pavos. Hasta el nivel de especies se identificaron siete *Anopheles* spp., dos *Aedes* spp., once *Culex* spp., dos *Mansonia* spp. y seis *Psorophora* spp., muchas de ellas fueron identificadas tras las crías de cohortes para estudios de larvas y machos (Gabaldon *et al.*, 1977. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **17**: 3-8).

Posterior al fallecimiento del Dr. Gabaldon, como homenaje y recuerdo, en 1998, El Fondo Editorial Interfundaciones y las Fundaciones: Venezolana para la

Salud, Universidad Metropolitana y Eugenio Mendoza, deciden publicar los estudios realizados sobre el tema, en el libro titulado: *Malaria Aviaria en un País de la Región Neotropical, Venezuela*, cuyo texto es basado primordialmente, en su trabajo de incorporación a la Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales presentado el 29 de mayo de 1985. El mismo es un tributo al gran esfuerzo realizado por el Dr. Gabaldon, en el otoño de su vida, en el estudio de parásitos aviarios para establecer un modelo que facilitara la enseñanza del interesante ciclo vital completo de los parásitos maláricos, estando dirigido principalmente a rescatar la profesión del malariólogo, pues, sostenía que la observación directa de este ciclo debe entusiasmar a muchas mentes jóvenes indagadoras.

A partir del 2010, en el Laboratorio de Biología de Vectores y Reservorios (LBVR), se inician actividades para la recuperación y organización de la colección conformada por 221 láminas originales (Extendidos de sangre de aves capturadas en campo, con presencal de al menos una forma parasitaria) y 22.989 réplicas (Extendidos de sangre de aves utilizadas como modelo animal para el desarrollo del ciclo biológico, con presencal de al menos una forma parasitaria). Además, en el año 2012, un nuevo grupo de trabajo, liderizado por el Dr. José Romero

retoma las investigaciones de hemoparasitos en aves silvestre, contribuyendo con más de quinientas láminas originales para la colección.

Este patrimonio parasitológico constituye sin duda un valioso apoyo para contribuir a la formación de talento humano a nivel de pre y post grado; intercambios científicos y apoyo diagnóstico a unidades operativas con competencias en salud y biodiversidad e impacto del cambio climático. Podrá consultarse de manera presencal en la sede del LBRV y virtual a través de página web dinámica: <http://www.iaesp.edu.ve/index.php/coleccion-parasitos>, convirtiéndose en referencia nacional e internacional.

La Junta Administradora está conformada por:

Dra. Tulia Hernández Muñoz

Directora (E) Ejecutiva IAE,

Dra. Maria Naranjo

Directora (E) de Investigación IAE

Dra. Darjaniva Molina de Fernández

Coordinadora CEEESA / IAE

M.V. MSc. José Romero Palmera (Responsable),

Jefe LBVR / CEEESA / IAE

Dr. Jorge Moreno (Asesor Científico),

Coordinador del Centro de Investigaciones de Campo

“Dr. Francesco Vitanza” / IAE

Revista de revistas

❑ CARBAJAL-DE-LA-FUENTE A. L. & YADÓN Z. E. (2013). **A Scientometric Evaluation of the Chagas Disease Implementation Research Programme of the PAHO and TDR** (*Una evaluación cienciométrica de la implementación del Programa de Investigación de la Enfermedad de Chagas de la OPS y TDR*). *PLoS Negl Trop Dis.* **7(11)**: e2445. doi: 10.1371/journal.pntd.0002445.

Leishmaniasis Transmitters Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; Laboratory of Eco-Epidemiology, Department of Ecology, Genetics and Evolution, (IEGEB-CONICET) University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

El Programa Especial de Investigaciones y Entrenamiento sobre Enfermedades Tropicales (TDR) es un programa mundial de colaboración científica independiente, copatrocinado por el Fondo de las Naciones Unidas, el Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo, el Banco Mundial y la Organización Mundial de la Salud. La estrategia del TDR se basa en la gestión de la investigación de las enfermedades infecciosas de la pobreza, el empoderamiento de los países endémicos, la investigación sobre necesidades prioritarias desatendidas, y la promoción de la colaboración científica en apoyo a los esfuerzos mundiales para combatir las principales enfermedades tropicales. En 2001, en vista de los logros obtenidos en la reducción de la transmisión de la enfermedad de Chagas a través de la Iniciativa del Cono Sur y de la mejora en las actividades de control de Chagas en algunos países de las Iniciativas de los países Andinos y de América Central, el TDR transfirió el Programa de Implementación de la Investigación de la Enfermedad de Chagas (CIRP) a la Unidad de Enfermedades transmisibles de la Organización Panamericana de la Salud (CD / OPS). Este trabajo presenta una evaluación cienciométrica de los 73 proyectos de 18 países de América Latina y Europa que fueron otorgados por CIRP / OPS / TDR entre 1997 y 2007. Se analizaron todos los informes

finales de los proyectos financiados y publicaciones científicas, informes técnicos, y actividades de capacitación de recursos humanos derivadas de los mismos. Se presentan y discuten los resultados sobre el número de proyectos financiados, los países y las instituciones involucradas, el análisis de género, el número de artículos publicados en revistas científicas indexadas, principales temas financiados, patentes inscritas y las especies de triatomíneos estudiados. Los resultados indican que la iniciativa CIRP / OPS / TDR ha contribuido de manera significativa, en el período 1997-2007 al conocimiento de la enfermedad de Chagas, así como a la capacidad individual y al reforzamiento institucional.

❑ RUBIO-PALIS Y., BEVILACQUA M., MEDINA D. A., MORENO J. E., CÁRDENAS L., SÁNCHEZ V., ESTRADA Y., ANAYA W. & MARTÍNEZ A. (2013). **Malaria entomological risk factors in relation to land cover in the Lower Caura River Basin, Venezuela.** (*Factores entomológicos de riesgo a malaria en relación a la cobertura vegetal en la Cuenca baja del río Caura, Venezuela*). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **108**: 220-228.

Dirección de Salud Ambiental, Ministerio del Poder Popular para la Salud. Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela.

A fin de explorar los efectos de la deforestación y las diferencias resultantes en la cobertura vegetal sobre parámetros entomológicos tales como composición de especies de anofelinos, abundancia, tasa de ataque, paridad y tasa entomológica de inoculación (TEI), se seleccionaron tres comunidades en la cuenca baja del río Caura, estado Bolívar, Venezuela. Se realizaron capturas de mosquitos toda la noche entre Marzo 2008 y Enero 2009 utilizando trampas de luz CDC y Mosquito Magnet® Liberty Plus. Se realizaron capturas de mosquitos con atrayente humano entre 06:00 y 10:00 pm, cuando los anofelinos son más activos. Se identificaron cuatro tipos de vegetación. No se encontró

correlación entre el Índice Parasitario Anual y el tipo de vegetación. La comunidad con menor cobertura boscosa presentó la mayor abundancia de anofelinos, tasa de ataque y diversidad de especies. *Anopheles darlingi* y *Anopheles nuneztovari* fueron las especies más abundantes y se capturaron en las tres comunidades. Ambas especies mostraron patrones de actividad horaria inéditas. La comunidad con mayor cobertura boscosa de El Palmar reportó la mayor TEI. Los resultados confirman observaciones previas en cuanto al impacto de la deforestación y los cambios resultantes en la cobertura vegetal sobre la transmisión de malaria son complejos y varían localmente.

□ GRIFFING S. M., VILLEGAS L. & UDHAYAKUMAR V. (2014). **Malaria Control and Elimination, Venezuela, 1800s-1970s** (*Control y Eliminación de la Malaria, Venezuela, 1800-1970*). *Emerg Infect Dis.* **20(10)**: 1697-704.

Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA; ICF International, Calverton, Maryland, USA; Centro de Investigación de Campo Dr. Francesco Vitanza, Bolívar, Venezuela.

Venezuela tuvo el número más alto de casos de malaria humana en Latinoamérica antes del 1936. Durante 1891-1920, la malaria era endémica en más de 600.000 km² del país; las tasas de mortalidad por malaria conllevaron a una disminución de la población durante 1891-1920. Ningún patógeno, incluyendo el virus de la influenza que causó la pandemia del 1918, causó más muertes que la malaria durante 1905-1945. Los primeros informes de la erradicación de la malaria en Venezuela ayudaron a provocar el interés mundial en la erradicación global. Describimos los primeros enfoques de la epidemiología de la malaria en Venezuela y cómo el país desarrolló un eficiente programa de control con un enfoque de erradicación. Arnoldo Jabalón era un hacedor de políticas clave durante este proceso de desarrollo. El dirigió el control de la malaria en Venezuela a partir de finales de los 1930 hasta finales de la década de los 1970 y contribuyó a la planificación del programa de malaria de la Organización Mundial de la Salud. Discutimos cómo estos esfuerzos ayudaron a reducir la incidencia de la malaria en Venezuela y cómo su enfoque se apartó de directrices de la Organización Mundial de la Salud.

□ CONVIT J., SCHULER, H., BORGES R., OLIVERO V., DOMÍNGUEZ-VÁZQUEZ A., FRONTADO H. & GRILLET M. E.* (2013).

Interruption of *Onchocerca volvulus* transmission in Northern Venezuela (*Interrupción de la transmisión de *Onchocerca volvulus* en el Norte de Venezuela*). *Parasites & Vectors* **6**: 289, doi: 10.1186/1756-3305-6-289.

Instituto de Biomedicina "Jacinto Convit". Universidad Central de Venezuela - Ministerio del Poder Popular para la Salud (UCV-MPPS), Caracas, Venezuela. *Laboratorio de Biología de Vectores y Parásitos, Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Apartado Postal 47072, Caracas 1041-A, Venezuela. mariaeugenia.grillet@gmail.com.

Introducción. La oncocercosis es causada por la filaria *Onchocerca volvulus* y transmitida por especies de moscas negras (simúlidos) pertenecientes al género *Simulium*. En Latinoamérica, la infección ha sido previamente descrita en 13 focos regionales distribuidos en 6 países (Brasil, Colombia, Ecuador, Guatemala, México y Venezuela) donde más de 370000 personas se encuentran actualmente en riesgo de contraer la infección. Desde el 2001, el control de esta enfermedad en Venezuela se ha basado en la administración masiva de Mectizan (ivermectina), bajo un régimen semestral, a toda la población en riesgo. Este reporte presenta las primeras evidencias empíricas de la interrupción de la transmisión de *O. volvulus* por parte de *Simulium metallicum* en un total de 510 comunidades endémicas de los dos focos del norte de Venezuela, después de haber transcurrido 10-12 años de tratamiento. Metodología. Una serie de estudios entomológicos y epidemiológicos a profundidad fueron realizados desde 2001-2012 en comunidades previamente seleccionadas (centinelas y extra-centinelas) de los focos Nor-central (NC) y Nor-oriental (NO) de oncocercosis en Venezuela, a fin de monitorear el impacto del tratamiento con ivermectina. Resultados. Desde 2007-2009, los indicadores entomológicos en ambos focos confirmaron que no había hembras positivas (cabezas) a la infección con larvas infectantes (L3) de *O. volvulus* de un total de 112637 hembras examinadas de *S. metallicum*. Los límites superiores del intervalo de confianza de la tasa de infectividad en el vector estuvieron por debajo del nivel umbral de 1% durante 2009 (NC) y 2012 (NO). Adicionalmente, después de 14 (NC) y 22 (NO) rondas de tratamiento, el potencial estacional de transmisión de *S. metallicum* estuvo por debajo de su umbral crítico de 20 L3 por persona por estación. Análisis serológicos en niños menores de 15 años demostraron que no había anticuerpos para este parásito (Ov-16) de un total de 6590

individuos examinados. Finalmente, los estudios epidemiológicos hechos durante 2010 (NC) y 2012 (NO) mostraron evidencias de la ausencia de infección del parásito en piel y/o oftalmológica. Conclusiones. Estos resultados cumplen con los criterios de la OMS acerca de la ausencia de transmisión del parásito y ausencia de morbilidad ocular y de piel por parte de esta infección en esta área endémica que representa el 91% de la población previamente expuesta en el país. En consecuencia, los dos focos de oncocercosis del norte de Venezuela están actualmente bajo fase de vigilancia post-tratamiento

□ VELASCO-SALAS Z. I., SIERRA G. M., GUZMÁN D. M., ZAMBRANO J., VIVAS D., COMACH G., WILSCHUT J. C., TAMI A.* (2014). **Dengue seroprevalence and risk factors for past and recent viral transmission in Venezuela: A comprehensive community-based study.** (*Seroprevalencia del dengue y factores de riesgo para la transmisión viral en el pasado y reciente en Venezuela: Un estudio integral basado en la comunidad*). *Am J Trop Med Hyg.* **91(5)**: 1039-48. doi: 10.4269/ajtmh.14-0127. Epub 2014 Sep 15.

Department of Medical Microbiology, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands; Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela; Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales, Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela; Laboratorio de Inmunoserología Viral, Departamento de Virología, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel," Ministerio del Poder Popular para la Salud, Caracas, Venezuela; Unidad de Proyectos de Aragua, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela; Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela * a.tami@umcg.nl.

La transmisión del dengue en Venezuela se ha tornado perenne y uno de los principales problemas de salud pública en el país. El aumento en la frecuencia y magnitud de las epidemias recientes, conllevó a un estudio basado en la comunidad de corte transversal que incluyó a 2.014 individuos pertenecientes a barrios con alta incidencia de dengue en Maracay, Venezuela. Los resultados indicaron una alta seroprevalencia del dengue (77,4%) con un 10% de personas infectadas recientemente. El análisis de regresión logística multivariada mostró que factores socioeconómicos relacionados a la pobreza (lugar de la vivienda y tiempo viviendo en

ella, hacinamiento, tamaño de la vivienda y vivir en un rancho) y factores/limitantes relacionados con potenciales criaderos intradomiciliarios de mosquitos (almacenamiento de agua y neumáticos usados) se asociaron con un aumento en el riesgo de adquirir una infección por dengue. Nuestros resultados sugirieron que la transmisión ocurre principalmente en los hogares. La combinación de un aumento en el hacinamiento, densidad poblacional, viviendas en condiciones precarias y el almacenamiento de agua en recipientes debido a los continuos problemas de los servicios públicos en Maracay, son los factores que probablemente determinen la permanente transmisión del dengue y el fracaso de los programas de control del vector.

□ HOFSTEDE S. N.¹, TAMI A.², VAN LIERE G. A.¹, BALLÉN D.⁴ & INCANI R. N.². (2014). **Long-term effect of mass chemotherapy, transmission and risk factors for *Schistosoma mansoni* infection in very low endemic communities of Venezuela.** (*Efectos a larga data de la quimioterapia en masa, transmisión y factores de riesgo para la infección por *Schistosoma mansoni* en comunidades de baja endemicidad en Venezuela*). *Acta Trop.* **140C**: 68-76. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.08.003

¹Faculty of Earth, Life Sciences, VU University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands, ²Department of Parasitology, Faculty of Health Sciences, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela; ³Department of Medical Microbiology, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands, ⁴Unidad de Trematodiasis, Center for Microbiology and Cellular Biology, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Altos de Pipe, Miranda State, Venezuela; ⁵Department of Parasitology, Faculty of Health Sciences, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela. rincani@uc.edu.ve

La prevalencia de la infección por *Schistosoma mansoni* en Venezuela ha cambiado de alta a baja debido fundamentalmente a las actividades de control exitosas aplicadas en el pasado que incluyeron quimioterapia en masa y aplicaciones de molusquicidas. Este estudio examina el impacto de la quimioterapia en masa sobre la transmisión de *S. mansoni* y los factores de riesgo para la infección, 12 años luego de la aplicación en masa de Praziquantel en Venezuela. Dos comunidades rurales relativamente aisladas del estado Carabobo fueron estudiadas, una con (Manuare) y otra sin (Los Naranjos) control de caracoles vectores. Se realizó un estudio de corte transversal de casas seleccionadas

al azar incluyendo 226 (Manuare) y 192 (Los Naranjos) habitantes participantes. La prevalencia de *S. mansoni* se determinó usando una combinación de métodos coprológico (Kato-Katz) y serológicos (Prueba de Precipitación Circumoval, Inmunoensayo de la Fosfatasa Alcalina y Western blot). Data sobre factores de riesgo epidemiológicos y socioeconómicos fueron obtenidos a través de encuestas estructuradas individuales. Análisis univariado y modelos de regresión logística multivariados identificaron factores de riesgo independientes para la infección. Los cursos de agua de las zonas fueron examinados por la presencia de caracoles vectores *Biomphalaria glabrata*. Solo un participante resultó positivo a la coprología. Las prevalencias globales de acuerdo con los resultados de los tests combinados fueron:

32.7% en Manuare y 26.6% en Los Naranjos. En niños menores de 12 años, es decir, aquéllos nacidos luego de la quimioterapia en masa, se encontró una prevalencia más baja (12.7% en Manuare y 13.2% en Los Naranjos). Las variables socio demográficas asociadas con la infección en ambas comunidades fueron: mayor edad (>25 años), contacto con aguas en sitios específicos y el ser un campesino/trabajador no especializado. Se concluye que el tratamiento en masa aplicado 1 vez a comunidades endémicas indujo una reducción importante y de larga duración de la infección por *S. mansoni*, independientemente de la aplicación de medidas de control de caracoles. Sin embargo, persiste aún una baja transmisión de *S. mansoni* en las áreas tratadas, la cual se asoció con factores de riesgo similares en ambas comunidades.

INDICE ACUMULADO POR AUTORES, Vol. LIV, 2014

A

Abou Orm S.: 95
Acevedo, P.: 47, 236
Acosta M. E.: 38
Acosta Quintero M.: 159
Agrela I.: 95, 199
Aldana E.: 257
Alvarez-González L.: 58
Amaya W.: 47
Antequera I.: 38
Aparicio G.: 120
Apgáua G.: 68
Arias L.: 254
Arrivillaga J.: 103
Ascanio Y.: 47
Avendaño-Rangel F.: 257

B

Barrios M.: 120
Ballen D.: 120
Benitez R.: 129
Benitez W.: 103
Berti J.: 107, 208, 254
Blanco M.: 220
Bonfante-Cabarcas, R.: 8
Briceño A.: 58

C

Cabrera M.: 129
Campos Bueno, P.: 88
Cardozo A.: 129
Carrero J.: 129
Castrillo A.: 129
Cazorla Perfetti D.: 38, 159
Cesari I.: 120
Colmenares M. C.: 220
Coriano H.: 174
Correia A.: 220
Cuevas E.: 138

D

Delgado D.: 129
De Sousa C.: 220
Díaz N.: 20
Durán González R.: 68

E

Enriquez S.: 103
Errante R.: 174
Escalona Nelo A.: 159
Escobar C. Z.: 208
Estrada Y.: 100, 107, 254

F

Feliciangeli M. D.: 1, 118
Fernández A.: 29
Ferrer A.: 129
Flores M.: 103
Flores Suarez A. E.: 58

G

Galindo W.: 129
Giganti E.: 129
Girón M. E.: 138
Gómez J. A.: 208
Guerra L. A.: 208
Guerrero B.: 138
Guerrero De Abreu A. M.: 150
Guevara J.: 47
Guzmán H.: 47, 100, 107, 186, 254

H

Hernández Nava J.: 159
Herrera F.: 95, 199
Herrera L.: 174
Hidalgo, J.: 199

J

Jiménez A.: 95
Justi Luvizotto M.: 88

L

Leal Rojas G.: 159
Lima G.: 68
Liria J.: 250
Lizano E.: 257
Lugo D.: 129

M

Martínez A.: 47, 236
Magris M.: 68, 186
Medina B.: 103
Marín Franco J. L.: 150
Martelli Moreira E.: 88
Martínez A. R.: 236
Martiradonna Ochipinti G.: 208
Mendonça Guimarães R.: 88
Mendoza I.: 129
Metzger W. G.: 68
Mitchell M.: 174
Mogollón N.: 8
Morales-Moreno P.: 38, 159
Moreno J. E.: 47, 236
Morocoima A.: 174
Muñoz M.: 250

N

Navarro J. C.: 186, 250
Navas P.: 38

O

Ortega M. E.: 129
Oviedo M.: 50

P

Pérez C.: 103
Pérez-Aguilar M. C.: 8
Pettersson L.: 47
Ponce-García G.: 58

Q

Quiñones O. M.V.: 150

R

Ramírez R.: 107, 250
Ramírez-Álvarez R.: 100, 186
Rey K.: 257
Rivas R.: 174
Rivero S.: 174
Rondón-Mercado R.: 8
Rodríguez N.: 29
Rodríguez O. L.: 129
Rodríguez V.: 174
Rodríguez-Acosta A.: 138
Rubio-Palis Y.: 100, 186, 236
Rojas T.: 87

S

Salazar M.: 208
Sánchez E. E.: 138
Sánchez M.: 111
Sánchez V.: 47
Sánchez-González E.: 250
Saucedo M.: 138
Sequera P. E.J.: 150
Suárez A.: 186
Suarez A. M.: 189

T

Tapia F.: 20
Torres N.: 95
Travieso F.: 220

U

Urdaneta-Morales S.: 174
Uzcátegui N. L.: 138

V

Vaca F.: 103
Vivas-Martínez S.: 68

Z

Zerpa O.: 20, 129

INDICE ACUMULADO

POR MATERIA, Vol. LIV, 2014

PARASITOLOGÍA

Antígenos parasitarios de <i>O</i> -Glicosilación incompleta: Un enfoque inmunoterapéutico contra el cáncer (Rondón-Mercado R. et al.)	8
Expresión de TLR2, 4, 9 y presencia de células tipo NK CD56 positivas en lesiones de pacientes con diferentes formas clínicas de leishmaniasis cutánea americana (Díaz N. L. et al.)	20
La transfección del gen de ATPasa (tipo vacuolar) de <i>Leishmania mexicana</i> incrementa la virulencia en aislado no virulento de <i>Leishmania enriettii</i> (Fernández A. & Rodríguez N.)	29
Contaminación de billetes con enteroparásitos en Coro, estado Falcón, Venezuela (Morales Moreno P. et al.)	38
¿Es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) una alternativa al diagnóstico microscópico de la malaria en el estado Bolívar, Venezuela? Comparación de ambos métodos (Abou Orm S. et al.)	95
Enzimas y glicoproteínas presentes en extractos de vermes adultos de <i>Fasciola hepática</i> (Ballén D. et al.) ..	120
Células inflamatorias en la secreción nasal y citocinas proinflamatorias Th1, Th2, Th17 y reguladoras en el suero de pacientes con leishmaniasis cutánea Americana (Cabrera M. et al.)	129
Biochemical and biological characterization of lancehead (<i>Bothrops venezuelensis</i> Sandner 1952) snake venom from the Venezuelan Central Coastal range (Sánchez E. E. et al.)	138
<i>Achatina fulica</i> Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda, Achatinidae) carrier of helminths, protozoa and bacteria in northeast Venezuela (Morocoima A. et al.)	174

EPIDEMIOLOGÍA

Leishmaniasis en Venezuela: Situación actual, acciones y perspectivas para el control vectorial en el marco de un programa de control multisectorial (Feliciangeli M. D. et al.)	1
Conocimientos, actitudes y prácticas del personal de salud y de una muestra reducida de pacientes relacionados con la adherencia al tratamiento antimalárico, Municipio Atures, Estado Amazonas, Venezuela (Durán González R. et al.)	68
O impacto do consumo de agrotóxicos na prevalência de desfechos perinatais no Brasil (Mendonça Guimarães R. et al.)	88
Parásitos patógenos en arena de playa y su relación con condiciones ambientales, en un balneario de Puerto Cabello, Venezuela 2012-2013 (Guerrero A. et al.)	150
Aspectos clínicos y epidemiológicos de la infección por coccidios intestinales en Urumaco, estado Falcón, Venezuela (Cazorla Perfetti D. et al.)	159

Evolución espacial y temporal de la malaria en el municipio Sifontes del estado Bolívar, Venezuela. 1980-2013 (Moreno J. et al.)	236
--	-----

ENTOMOLOGÍA

Evaluación de la trampa Mosquito Magnet® con y sin octenol para capturar mosquitos (Diptera: Culicidae) (Rubio-Palis Y. et al.)	100
Primer registro de <i>Lutzomyia tuberculata</i> Mangabeira, 1941 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) en el Ecuador (Arrivillaga J. et al.)	103
Primer registro de <i>Johnbelkinia ulopus</i> (Dyar & Knab, 1906) (Diptera: Culicidae) en el estado Bolívar, Venezuela (Berti J. et al.)	107
Abundancia y diversidad de Culicinae (Diptera: Culicidae) del Alto Orinoco, Amazonas, Venezuela (Rubio Palis Y. et al.)	186
Nuevos registros de vectores potenciales de Fiebre Amarilla y Mayaro para el Estado Guárico, Venezuela. Primer registro de <i>Haemagogus janthinomys</i> Dyar para los Llanos centrales de Venezuela (Sánchez-González E. et al.)	250
Primer registro de <i>Anopheles (Stethomyia) nimbus</i> (Theobald, 1902) para el estado Bolívar, Venezuela (Berti J. et al.)	254
Primer registro de <i>Panstrongylus rufotuberculatus</i> (Hemiptera: Reduviidae) para el estado Mérida, Venezuela (Avendaño-Rangel F. et al.)	257

CONTROL

Evaluación preliminar de la eficiencia de <i>Bacillus sphaericus</i> en un área endémica a malaria del estado Bolívar, Venezuela (Moreno J. et al.)	47
Mecanismos asociados a la resistencia al derribo “kdr” a la deltametrina en <i>Aedes aegypti</i> del occidente de Venezuela (Álvarez González L. et al.)	58
Efecto larvicida de extractos metanólicos obtenidos de semillas y hojas de <i>Persea americana</i> (Miller) (aguacate) sobre <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus) (Agrela I. et al.)	199
Efecto del regulador de crecimiento pyriproxyfen, sobre <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) de La Pedrera, Maracay, estado Aragua, Venezuela (Martiradonna Ochipinti G. et al.)	208

SALUD AMBIENTAL

Propuestas para mejorar el manejo de sustancias peligrosas en los laboratorios del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo (De Sousa C. et al.)	220
---	-----

LISTA DE ÁRBITROS

El Comité Editorial del *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* agradece su valiosa colaboración a los Árbitros del Vol. LIV, 2014

- Alberto Aché**, Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldon” (IAE), Ministerio de Poder Popular para la Salud (MPPS), Maracay, estado Aragua, Venezuela.
- Elis Aldana**, Laboratorio de Entomología Herman Lent, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes (ULA). Mérida, Venezuela.
- Gustavo Benaim**, Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Sartenejas, Baruta, Caracas 1080 e Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV), Colinas de Bello Monte, Caracas, Venezuela.
- Jesús Berti**, Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA), Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldon” (IAE), Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), Maracay, estado Aragua, Venezuela.
- Isaac Blanca**, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela.
- Helena L. Brochero**, Universidad Nacional de Colombia, Área de Entomología Facultad de Agronomía, Sede Bogotá, Colombia.
- Maira Cabrera**, Sección de Inmunoparasitología, Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela.
- José Luis Cáceres**, Unidad de Investigación y Estudios en Salud Pública. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo (UC), sede Aragua Maracay, Venezuela.
- Leiliane Coelho André**, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.
- Leonardo De Sousa**, Laboratorio de Toxinología, Grupo de Investigación en Toxinología Aplicada y Animales Venenosos, Escuela de Ciencias de la Salud, Núcleo de Anzoátegui, Universidad de Oriente (UDO), Venezuela.
- Domenica Carolina Cannova**, Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo (UC), Valencia, Venezuela.
- Ana M. Espino**, Lab. of Immunology and Molecular Parasitology, Department of Microbiology, San Juan, Puerto Rico.
- Zelandia Fermin**, Laboratorio de Inmunología Celular, Instituto de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela (UCV). Caracas, Venezuela.
- Elizabeth Ferrer**, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco J. Triana Alonso” (BIOMED), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo (UC), Sede Aragua, Maracay, Venezuela.
- Adriana Flores**, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Entomología Médica, Av. Universidad s/n. San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico.
- Loredana Gonçalves Paredes**, Laboratorio de Inmunología de Parasitosis (LABINPAR), Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes (ULA), Mérida, Venezuela.
- Eduardo Gómez Landires**, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica Santiago de Guayaquil. Ecuador.
- Maria Eugenia Grillet**, Laboratorio de Biología de Vectores, Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela.
- Ricardo Guerrero**, Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela.
- Tomás Hermoso**, Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela.
- Nicolas Hernandez Gallo**, Epidemiología y Salud Pública Veterinaria, Maestría en Ciencias Veterinarias, Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia.
- Renzo Nino Incani**, Laboratorio de Investigaciones en Bilharzia, Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Sede Carabobo, Universidad de Carabobo (UC), Valencia, Venezuela.

Susana Licastro, Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN) CITEDEF - UNIDEF (MINDEF/ CONICET) J.B.LaSalle 4397, Buenos Aires, Argentina.

Jonathan Liria, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo (UC), Valencia, Venezuela.

Bruno Lomonte, Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Clara Beatriz Ocampo D., Unidad de Biología y Control de Vectores, Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Biomédicas (CIDEIM), Cali, Colombia.

Rodolfo Marcano, Instituto de Zoología Agrícola, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela (UCV), Maracay, Venezuela.

Carlos Brisola Marcondes, Departamento de Microbiología e Parasitología/CC, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Trindade, 88040-900 Florianópolis (SC), Brasil.

José Alejandro Martínez-Ibarra, Área de Entomología Médica, Centro Universitario del Sur, Universidad de Guadalajara, Jalisco, Mexico.

Milena Mazzarri, Laboratorio de Control de vectores, Dirección General de Salud Ambiental (DGSA), Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) , Maracay, Venezuela.

Darjaniva Molina de Fernández, Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA), Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldon” (IAE), Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), Maracay, estado Aragua, Venezuela.

Victor Mora Arellano, Escuela de Ciencias de la Salud “Dr Francisco Battistini Casalta”, Departamento de Ciencias Fisiológicas/ Sección Bioquímica, Universidad de Oriente, Ciudad Bolívar, Venezuela.

Juan Carlos Navarro, Laboratorio de Biología de Vectores, Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Armando Notz, Instituto de Zoología Agrícola, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela (UCV), Maracay, Venezuela.

Oscar Noya, Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela.

Victor Alberto Olano, Instituto de Salud y Ambiente. Universidad El Bosque, Bogotá. D.C. Colombia

José Enrique Perez, Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

Mary Carmen Perez-Aguilar, Laboratorio de Enzimología de Parásitos (LEP) y Laboratorio de Inmunología de Parasitosis (LABINPAR). Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes (ULA). Mérida, Venezuela.

Wanderlei Pignati, UFMT/ISC.Universidade Federal de Mato Grosso/Instituto de Saúde Coletiva, Cuiabá MT, Brasil.

Jean-Pierre Pointier, Laboratoire Ecosystemes Aquatiques Tropicaux et Méditerranéens,CNRS-EPHE-CRIOBE, Université de Perpignan, Biologie et Ecologie Tropicale et Méditerranéenne, Perpignan Cedex, France.

José Luis Ramirez, Centro de Biotecnología, Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Sartenejas, Baruta, Caracas 1080, Venezuela.

Gustavo Rossi, Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) (CCT La Plata-CONICET-UNLP), La Plata, Argentina.

Omar Santiarraga, The University of Texas Medical Branch, Infectious Diseases, Galveston, Texas, U.S.A.

Martha C. Suárez-Mutis, Laboratório de Doenças Parasitárias, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil.

Yasmin Rubio-Palis, Dirección General de Salud Ambiental (DGSA), Ministerio del Poder Poular para la Salud (MPPS). Universidad de Carabobo (UC). Sede Aragua, Maracay, Venezuela.

Zuberly Rivero, Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis, Cátedra Práctica Profesional de Parasitología, LUZ; Maracaibo, Venezuela.

Rhaiza Ruiz, Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela.

Majira Sojo-Milano, Control de Vectores, Dirección General de Salud Ambiental (DGSA), Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), Maracay, estado Aragua, Venezuela.

Ana Soto Vivas, Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldon” (IAE), Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), Maracay, estado Aragua, Venezuela

Elizabeth Valdivieso Blanco, Laboratorio de Biología Celular de Parásitos, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela.

Mario Vargas, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Florencio M. Ubeira, Facultades de Farmacia y Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, España.

Eglee L. Zent, Laboratorio de Ecología Humana, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas, Venezuela.

Robert Zimmerman, Facultad de Educación, Universidad de Arizona, Tucson, Arizona, U.S.A.

BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL

GUÍA PARA LOS AUTORES

Presentación y redacción

Las contribuciones deben ser inéditas, escritas en español, inglés o portugués.

Cada trabajo se acompañará de una declaración firmada por el autor de correspondencia, en la que se especifique que no ha sido publicado previamente, que no se presentará en otra revista antes de conocer la decisión de publicación del Boletín y que el manuscrito ha sido leído y aprobado por todos los autores. Se deberá usar caracteres de estilo Times New Roman o Arial que midan 12 puntos. Todos los márgenes serán de una pulgada (2,4 cm).

La primera página debe incluir el título del trabajo, breve y específico, con máximo de 15 palabras, a continuación los nombres y los apellidos completos de todos los autores, nombre de la institución a la cual pertenecen y la dirección postal. Indicar el autor de correspondencia y su dirección electrónica.

Todos los artículos tendrán título y resumen en español e inglés. Es necesario también un título corto para su inclusión en el encabezado de las páginas pares. Los resúmenes, con un máximo de 15–20 líneas, son contentivos de los aspectos más relevantes y principales conclusiones del trabajo. No deben utilizarse en los resúmenes abreviaturas, referencias o notas a pie de página. Al pie del resumen se incluirá una lista de 3 hasta 5 palabras claves, en español e inglés, que reflejen el contenido del documento. Se utilizarán como palabras claves únicamente aquellas que son aceptadas por bases de datos internacionales, las cuales pueden ser consultadas en las siguientes direcciones:

Palabras claves (Español): <http://decs.bvs.br/E/homepagee.htm>
Key Words (Inglés): <http://www.nlm.nih.gov/mesh/>

En el texto de los artículos originales se deberá seguir el siguiente orden: Resumen en español, Introducción, Materiales y métodos, Consideraciones Éticas, Resultados, Discusión, Conflicto de Intereses, Agradecimientos, Título y Resumen en inglés, Referencias y Anexos (Tablas y Figuras) en hojas aparte.

En las investigaciones en humanos, animales y el ambiente, deben ser tomados en consideración acuerdos internacionales sobre los aspectos éticos, por tanto debe ser expresamente citada en el trabajo la revisión y aprobación por un Comité de Bioética debidamente identificado.

Los artículos incluirán en los Agradecimientos, los apoyos recibidos de instituciones públicas o privadas para la realización del estudio, así como las relaciones personales o institucionales que han contribuido en la obtención y análisis de los resultados.

Para las referencias bibliográficas citadas en el texto se utilizará el nombre del autor y el año de la publicación entre paréntesis.

Ejemplo: (Scorza, 1988)

Si se trata de dos autores, ambos serán citados.

Ejemplo: (Scorza & Rojas, 1990)

Cuando son más de dos autores, se citará el nombre del primer autor, seguido por *et al.*, y el año correspondiente de la publicación.

Ejemplo: (Scorza *et al.*, 1988)

En el caso que los autores sean sujeto de la oración, solamente el año se escribirá entre paréntesis.

Ejemplo: Scorza *et al.* (1999) demostraron que.....

Referencias bibliográficas

1. Revisiones, Artículos Originales y Reportes Epidemiológicos:

La presentación de las referencias bibliográficas, se hará en orden alfabético y de acuerdo a las siguientes normas:

- Revistas o publicaciones periódicas: apellido (s) del autor (es), inicial del nombre (s), (año), título del artículo, abreviatura de la revista (en cursiva), volumen (en negrita) y número de las páginas.

Ejemplo:

Scorza J. V. & Rojas E. (1990). La leishmaniasis tegumentaria venezolana: problemática contemporánea en el estado Trujillo. Soluciones. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **30**: 1-6.

Cuando se trata de seis ó más autores, figurarán los apellidos e iniciales de los primeros 6 y se añadirá la expresión *et al.*

Si el trabajo es publicado en un Suplemento debe citarse.

Ejemplo:

Bonfante G. R., Urdaneta I., Alvarado J., Anzola N. H., Torrealba J., Saldivia M. E. *et al.* (1995). Phlebotomine sand flies in five endemic leishmaniasis foci in Lara state, Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **35** (Supl. 1): 53-62.

- Libros: apellido (s) del autor (es), inicial (es) del nombre (s), (año), título del libro, ediciones, casa editora y lugar de publicación (ciudad, país).

Ejemplo:

Mosqueda C. G. (1974). *Hipótesis estadística con aplicaciones*. 2ª edición. Ed. Sobre Visión CA. Caracas, Venezuela.

- Capítulo de un libro: apellido (s) del autor (es), inicial (es) del nombre (s), (año), título del capítulo. página (s). En: Título del libro (en cursiva), apellido (s) e inicial (es) del editor del libro, edición, casa editora, lugar de publicación (ciudad), país.

Ejemplo:

Bertelli A., Donati L. & March J. (1968). Proteases inflammatory reaction. pp. 66-75. En: *Inflammation Biochemistry and Drug Interaction*. Eds. Bertelli A. & Houck J. C. 2ª ed. Excerta Med. London, U.K.

- Tesis de grado no publicada: apellido (s) del autor (es), inicial del nombre (s) (año). título (en cursiva). tesis de maestría o tesis doctoral. universidad. ciudad, país.

Ejemplo:

Solis T. A. (2000). *Diagnóstico de la resistencia a insecticidas en cepas de Ae. aegypti (Diptera: Culicidae) de diferentes regiones de República Dominicana*. Trabajo de grado de Maestría, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.

- Trabajo presentado en Congreso: apellido (s) del autor (es), inicial del nombre (s) (año). título (en cursiva). nombre del congreso. ciudad, país.

Ejemplo:

Delgado O., Blanca I., Silva S., Coraspe V., Perez A. & Marquez M. E. (1999). *Evaluación de la respuesta inmune celular en pacientes con Toxocariasis*. XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología. Acapulco, México.

- *Documento en línea*: apellido (s) del autor (es), inicial del nombre (s) (año). título (en cursiva). documento en línea: <http://www.ejemplo.com> (consultado: año, mes, día).

Ejemplo:

Moreno Landera L. A. & Gutierrez Delgado J. A. (2001). *Remedios y creencias de medicina popular en la Merindad de Campoo*. Documento en línea: http://www.vacarizu.es/Cuadernos/Cuaderno_26/Remedios_y_creencias.htm (Consultado: 2008, Diciembre 22).

2. Notas Científicas:

Las referencias bibliográficas deben ser incluidas en el texto, citándose, hasta dos autores: (apellido (s) del autor (es), inicial del nombre (s) (año). revista (en cursiva). volumen (en negrita) y número de las páginas). Cuando son más de dos autores: (apellido del primer autor, inicial del nombre (s) *et al.* (en cursiva) (año). revista (en cursiva). volumen (en negrita) y número de las páginas).

Ejemplo: (Barrera *et al.*, 1979. *Acta Cient. Venez.* **30**: 418–424).

Citas tales como “datos no publicados” y “comunicación personal” no deben ser incluidas en la lista de referencias, serán incluidas en el texto (en cursiva). En relación a Trabajos en prensa, sólo pueden ser colocados en la lista de referencias, artículos ya aceptados y se citará la revista.

Los autores deben ajustarse al contenido de los Códigos de Nomenclatura Internacional y al Sistema de Medidas Internacionales (SI). Este último se basa en el sistema métrico decimal según el cual los símbolos de las unidades no toman la terminación del plural (5 km y no 5 kms) ni van seguidos de punto (10 mL y no 10 mL.).

Tablas y Figuras

Las tablas y figuras, deben estar referidas oportunamente en el texto y serán debidamente identificadas con el número en el orden correlativo, títulos, fuentes (cuando sea necesario) y leyendas.

Las figuras se presentarán utilizando símbolos claros que permitan identificar puntos que requieran ser resaltados o reducidos. Se identificarán con su número y en hojas apartes se presentarán las leyendas correspondientes.

Las fotografías o imágenes deben ser escaneadas o digitalizadas a una resolución no menor a 300 dpi y guardadas bajo el formato o extensión JPG; de no poder cumplir con estos requerimientos enviar original de la fotografía o imagen con su debida protección o sobrecubierta. En casos especiales se considerará la posibilidad de la publicación de las figuras, fotografías o imágenes en color.

En el caso de las microfotografías y dibujos, tratar de la misma manera que las fotografías e imágenes y señalar el aumento o escala correspondiente. En relación a Mapas y Planos, cada uno en una hoja aparte con su leyenda correspondiente en un formato de 11,3 x 18,4 cms. como máximo.

La extensión de los artículos no debe ser mayor de 20 páginas en papel tamaño carta (28 x 21,5 cm), escritas a doble espacio.

Envío de los artículos

Los trabajos deben ser enviados a los editores del Boletín preferiblemente por vía electrónica (bolmal2012@gmail.com) o por correo aéreo o terrestre en sobre contentivo de la carta dirigida a los Editores y el artículo en un CD en lenguajes compatibles con Microsoft® Windows®, con original y una (1) copia.

Igualmente, para el envío de toda correspondencia relacionada o solicitando constancias, referencias, sugerencias, observaciones y otros deberán dirigirse a la atención al Editor, por correo especial a la dirección:

Boletín de Malariología y Salud Ambiental,

Av. Bermúdez Sur, Maracay, Edo. Aragua -Venezuela.

Teléfonos: (58-0243) 2325633 / 2320833 / 2322645.

Fax: (58-0243) 2325633

E-mail: bolmal2012@gmail.com

Sobre el arbitraje y la aceptación de los artículos

Los trabajos sometidos para publicación en el Boletín de Malariología y Salud Ambiental serán sometido a un proceso de revisión y arbitraje. El plazo para la respuesta a los autores dependerá de la complejidad del tema y de la disponibilidad de los especialistas en el área.

En una primera revisión el Comité Editorial seleccionará los artículos con base en los criterios generales y objetivos de la revista. Seguidamente el artículo es enviado a dos (2) especialistas en el área específica. Los Editores y el Comité Editorial estarán atentos a los posibles conflictos de interés que puedan inhabilitar los árbitros para evaluar un determinado manuscrito.

Estos examinarán la calidad científica del manuscrito independientemente y emitirán su opinión razonada, recomendando o no la aceptación del artículo para la publicación. El trabajo con las observaciones y sugerencias de los árbitros será devuelto al Autor de correspondencia quien deberá enviar la nueva versión con una explicación detallada sobre los cambios efectuados, acatando las recomendaciones o, de no aceptarlas, argumentando las razones del porqué no las aceptan.

Es competencia del Comité Editorial la decisión final acerca de la publicación del artículo, una vez que haya verificado el cumplimiento de las condiciones señaladas y analizado la respuesta de los autores.

Toda decisión se comunicará por escrito al Autor de correspondencia con la mayor rapidez posible.

Después del arbitraje, los manuscritos se someterán a un procesamiento editorial que puede incluir, en caso necesario, su condensación y la supresión o adición de cuadros, ilustraciones y anexos. La versión editada (prueba de imprenta) se remitirá al Autor principal para su revisión y aprobación y para que conteste cualquier pregunta adicional del editor.

El Boletín de Malariología y Salud Ambiental se reserva todos los derechos legales de los manuscritos aprobados para su publicación, así como el derecho de hacer los ajustes y cambios que aseguren la calidad de la publicación. Sin embargo, no se hace responsable de los conceptos u opiniones expresados en el trabajo. Los originales no se devolverán en ningún caso.

Los Editores, el Comité Editorial y los árbitros se declaran formalmente no autorizados para utilizar con fines privados o particulares, la información obtenida a través de la revisión de los manuscritos. Así mismo, se respetará el derecho a la confidencialidad de los revisores y editores.

Una vez publicado el trabajo, el autor de correspondencia recibirá vía e-mail la versión PDF.

BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Apresentação e redação

As contribuições devem ser inéditas, escritas em espanhol, inglês ou português.

Cada trabalho deve ser acompanhado de duas declarações assinadas pelo autor indicado para correspondência, nas quais seja especificado que o trabalho não foi publicado previamente, e que o mesmo não será apresentado em outra revista antes que seja conhecida a decisão do Boletim e ainda que o manuscrito foi lido e aprovado por todos os autores.

Deve ser utilizada fonte estilo Times New Roman ou Arial tamanho 12. Todas as margens devem medir 2,4 cm.

A primeira página deve incluir (1) o título do trabalho, breve e específico, com o máximo de 15 palavras, (2) o nome completo de todos os autores, (3) nome da(s) instituição(ões) de origem, cidade, estado, país e (4) endereço para correspondência e e-mail do autor principal.

Todos os artigos devem conter título e resumo em espanhol e inglês. É necessário também um título resumido para inclusão no cabeçalho das páginas pares. Os resumos não devem ultrapassar 15-20 linhas, devendo conter os aspectos mais relevantes e as principais conclusões do trabalho. Não devem ser incluídos no resumo abreviaturas, referências ou notas de rodapé. Ao final devem ser incluídas 3 a 5 palavras-chave em espanhol e inglês. Usar obrigatoriamente termos do "Medical Subject Headings, do Index Medicus" (podem ser consultados na página eletrônica: www.decs.bvs.br para termos em português, espanhol e inglês ou a página eletrônica: www.nlm.nih.gov/mesh para termos somente em inglês).

O texto dos artigos originais deverão seguir a seguinte ordem: resumo em português, introdução, materiais e métodos, resultados, discussão, agradecimentos, título e resumo em inglês, referências e anexos (tabelas e figuras) em folhas a parte.

Nas investigações com seres humanos, animais e ambiente, devem ser considerados os acordos internacionais sobre os aspectos éticos, sendo expressamente citada a revisão e aprovação por um comitê de ética devidamente identificado.

Os artigos devem incluir nos agradecimentos os apoios recebidos de instituições públicas ou privadas para a realização do estudo, assim como as relações pessoais ou institucionais que tenham contribuído para a obtenção ou análise dos resultados.

Para as referências bibliográficas citadas no texto deve ser utilizado apenas o nome do autor e o ano da publicação entre parênteses. **Exemplo:** (Scorza, 1988).

No caso de dois autores, ambos serão citados.

Exemplo: (Scorza & Rojas, 1990).

Quando são mais de dois autores, será citado o nome do primeiro autor, seguido por *et al.*, e o ano correspondente a publicação. **Exemplo:** (Scorza *et al.*, 1988).

No caso em que os autores são sujeito da oração, apenas o ano virá entre parênteses. **Exemplo:** Scorza *et al.* (1999) demonstraram...

Referências

1. *Revisão, Artigos Originales y Relatórios Epidemiológicos:*

Deve ser feitas em ordem alfabética e de acordo as seguintes normas:

- *Revistas ou publicações periódicas:* sobrenome do (s) autor (es), iniciais do (s) nome (s), (ano), título do artigo, abreviatura da revista (em itálico), volume da revista (em negrito) e número das páginas.

Exemplo:

Scorza J. V. & Rojas E. (1990). La leishmaniasis tegumentaria venezolana: problemática contemporánea en el estado Trujillo. Soluciones. *Bol. Dir. Malar. San. Amb.* **30**: 1-6.

Quando se trata de 6 ou mais autores, especifica-se os sobrenomes e iniciais dos 6 primeiros e se utiliza a expressão *et al.*

Se o trabalho citado é proveniente de suplemento deve-se especificar.

Exemplo:

Bonfante G. R., Urdaneta I., Alvarado J., Anzola N. H., Torrealba J., Saldivia M. E. *et al.* (1995). Phlebotomine sand flies in five endemic leishmaniasis foci in Lara state, Venezuela. *Bol. Dir. Malar. San. Amb.* **35 (Supl. 1)**: 53-62.

- *Livros:* sobrenome do (s) autor (es), iniciais do (s) nome (s), (ano), título do livro, número da edição, editora, lugar da publicação (cidade, país).

Exemplo:

Mosqueda C. G. (1974). *Hipótesis estadística con aplicaciones*. 2ª edición. Ed. Sobre Visión CA. Caracas, Venezuela.

- *Capítulo de livro:* sobrenome do (s) autor (es), iniciais do (s) nome (s), (ano), título do capítulo. Páginas. Em: título do livro (em itálico), sobrenome do (s) autor (es), iniciais do (s) nome (s), número da edição, editora, lugar da publicação (cidade, país).

Exemplo:

Bertelli A., Donati L. & March J. (1968). Proteases inflammatory reaction. pp. 66-75. En: *Inflammation Biochemistry and Drug Interaction*. Eds. Bertelli A. & Houck J. C. 2ª ed. Excorta Med. London, U.K.

- *Tese de grado não publicada:* sobrenome do autor, iniciais do (s) nome (s), (ano). título (em itálico). tese de mestre ou doutorado, universidade. cidade, país.

Exemplo:

Solis T. A. (2000). *Diagnóstico de la resistencia a insecticidas en cepas de Ae. aegypti (Diptera: Culicidae) de diferentes regiones de República Dominicana*. Trabajo de grado de Maestría, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.

- *Trabalho apresentado no Congresso:* sobrenome do (s) autor (es), iniciais do (s) nome (s), (ano). título (em itálico). nome do congresso. cidade, país.

Exemplo:

Delgado O., Blanca I., Silva S., Coraspe V., Perez A. & Marquez M. E. (1999). *Evaluación de la respuesta inmune celular en pacientes con Toxocariasis*. XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología. Acapulco, México.

- *Documento "on-line"*: sobrenome do (s) autor (es), iniciais do (s) nome (s), (ano). título (em itálico). documento on-line: <http://www.exemplo.com> (consultado: ano, mês, dia).

Exemplo:

Moreno Landera L. A. & Gutierrez Delgado J. A. (2001). *Remedios y creencias de medicina popular en la Merindad de Campoo*. Documento en línea: http://www.vacarizu.es/Cuadernos/Cuaderno_26/Remedios_y_creencias.htm (Consultado: 2008, Diciembre 22).

2. Notas Científicas:

As referências devem ser incluídas no texto quando um ou dois autores, citando: sobrenome do (s) autor (es), iniciais do (s) nome (s), (ano). revista (em itálico). volume (negrito) e número de páginas). Quando mais de dois autores: (primeiro sobrenome do autor, inicial do nome (s) *et al.* (em itálico) (ano). revista (em itálico). volume (negrito) e número de páginas).

Ejemplo: (Barrera *et al.*, 1979. *Acta Cient. Venez.* **30**: 418–424).

Citações de dados não publicados ou de comunicações pessoais não devem ser incluídas na lista de referências, devem ser incluídas e especificadas no texto (em itálico). Em relação a trabalhos não publicados no prelo esses só podem ser colocados na lista de referências se forem artigos já aceitos, citando a revista.

Os autores devem seguir ao conteúdo dos Códigos de Nomenclatura Internacional e ao Sistema de Medidas Internacionais (SI). Esse último se baseia no sistema métrico decimal, segundo o qual os símbolos das unidades não assumem a terminação no plural (5 km e não 5 kms) nem são seguidos por pontos (10 mL e não 10 mL.)

Tabelas e Figuras

As tabelas e figuras devem estar referidas oportunamente no texto e serem devidamente identificadas com número, e em ordem, títulos, fontes (se necessário) e legendas.

As figuras devem ser apresentadas utilizando símbolos claros que permitam identificar pontos que necessitam ser destacados ou reduzidos. Devem ser identificadas com número e apresentadas em folhas a parte com as legendas correspondentes.

As fotografias ou imagens devem ser escaneadas ou digitalizadas em uma resolução igual ou superior a 300dpi e salvas no formato JPG; caso não seja possível cumprir esses requisitos pede-se enviar o original da fotografia ou imagem protegida ou envelope. Nos casos especiais será considerada a possibilidade da publicação das figuras, fotografias ou imagens em cores.

No caso de microfotografias e desenho, usar o mesmo procedimento recomendado para fotografias e imagens e indicar a ampliação ou escala correspondente. Em relação a mapas e planos, cada um deve ser colocado em uma folha à parte com a legenda correspondente com o formato máximo 11,3 x 18,4 cm.

A extensão dos artigos não deve ultrapassar 20 páginas em papel tamanho carta (28 x 21,5 cm), com espaço duplo.

Envio dos artigos

Os trabalhos devem ser enviados aos editores do Boletim preferencialmente por via eletrônica (bolmal2012@gmail.com) ou por correio, acompanhado de carta dirigida aos editores e o artigo impresso (original e cópia) além do arquivo em CD (em linguagem compatível com Microsoft®, Windows®).

Do mesmo modo, o envio de toda correspondência relacionada ou solicitação de declarações, referências, sugestões, observações e outros devem ser direcionadas aos cuidados do editor, por correio ao endereço:

Boletín de Malariología y Salud Ambiental,
Av. Bermúdez Sur N° 93, Maracay, Edo. Aragua -Venezuela.
Telefonos: (58-0243) 2325633 / 2320833 / 2322645.

Fax: (58-0243) 2325633

E-mail: bolmal2012@gmail.com

Sobre o julgamento e aceitação dos artigos

Os trabalhos submetidos para publicação no Boletim de Malariologia e Saúde Ambiental serão submetidos a um processo de revisão julgamento. O prazo para resposta aos autores dependerá da complexidade do tema e da disponibilidade dos especialistas na área.

Em uma primeira revisão o Comitê Editorial selecionará os artigos com base nos critérios gerais e objetivos da revista. E seguida o artigo é remetido a dois especialistas na área específica. Os editores e o Comitê Editorial estarão atentos aos possíveis conflitos de interesses que possam comprometer os pareceristas para a avaliação de determinado manuscrito.

Os pareceristas examinarão a qualidade científica do manuscrito independentemente e emitirão sua opinião justificada, recomendando ou não a aceitação do artigo para a publicação. O trabalho com as observações e sugestões dos pareceristas serão devolvidos ao autor indicado para correspondência, que deverá enviar a nova versão com o relato detalhado das alterações efetuadas, das recomendações acatadas e das recomendações não aceitas com respectiva argumentação.

Ao Comitê Editorial compete a decisão final acerca da publicação do artigo, uma vez que atendidas todas as condições indicadas e analisadas a resposta dos autores.

Toda decisão será comunicada por escrito ao autor da correspondência no menor prazo possível.

Após o julgamento, os manuscritos serão submetidos ao processo editorial que pode incluir, se necessário, a condensação e a supressão ou adição de quadros, ilustrações e anexos. A versão editada (prova de impressão) será remetida ao autor principal para sua revisão e aprovação, sendo necessária resposta a qualquer indagação adicional do editor.

Ao Boletim de Malariologia e Saúde Ambiental se reservam todos os direitos legais dos manuscritos aprovados para sua publicação, assim como o direito de fazer ajustes e modificações que assegurem a qualidade da publicação. Entretanto, não se responsabiliza por conceitos ou opiniões expressos no trabalho. Os originais não serão devolvidos em hipótese alguma.

Os editores, o Comitê Editorial e os pareceristas se declaram formalmente não autorizados a utilizar com fins privados ou particulares, a informação obtida através da revisão dos manuscritos. Além disso, serão respeitados os direitos a confidencialidade dos revisores e editores.

Uma vez publicado o trabalho o autor da correspondência receberá via e-mail a versão em PDF.

BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Style and format

Contributions should be unpublished and written in Spanish, English or Portuguese.

Each work should be accompanied by a signed declaration by the corresponding author in which he specifies that the work has not been previously published and that it has not been presented to another publication prior to a decision about publishing in the Bulletin of Malariology and Environmental Health and that the manuscript has been read and approved by all the authors. Font should be Times New Roman or Arial, 12 points. All margins should be 2.4 cm (0.9 inch).

The first page should include the title of the work, brief and specific, with a maximum of 15 words, the complete names of all the authors, the name of the institution for each author and the postal address. The corresponding author and his electronic address should be indicated.

All articles will have a title and abstract in Spanish and English. A short title is necessary for the running title in the headers of the even pages. The abstracts, with a maximum length of 15—20 lines, summarize the most relevant aspects and the principal conclusions of the work. Abbreviations or footnotes should not be used in the abstract. At the end of the abstract, there should be a list of 3 to 5 key words, in Spanish and English, which reflect the content of the document. Use only key words that are accepted by international data bases, which can be consulted at the following site:

Key words (Spanish): <http://decs.bvs.br/E/homepage.htm>

Key words (English): <http://www.nlm.nih.gov/mesh/>

The text of articles should be in the following order: Abstract in Spanish, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgement, Title and Summary in English, References and Annexes (Tables and Figures on separate pages).

In investigations of humans, animals and the environment, consideration should be given to international accords on ethical aspects, which should be expressly cited the work with review and approval by a properly identified Bioethics Committee.

Articles will include in the Acknowledgement the support received from public or private institutions for completion of the study as well as the people or institutions which have contributed in the obtaining and analysis of the results.

For bibliographic references cited in the text, place the name of the author and the year of publication in parentheses: (**Scorza, 1988**)

Two-author citations are cited as follows:
(**Scorza & Rojas, 1990**)

When there are more than two authors, cite the name of the first author, followed by *et al.* and the year of publication of the cited reference; e.g. (**Scorza et al., 1988**)

In the event the authors may be the subject of a sentence, only the year is placed in parentheses; e.g. **Scorza et al. (1999)** demonstrated that....

References

1. Reviews, Original Articles and Epidemiological Reports:

Bibliographical references will be listed in alphabetical order in the following manner:

- Journal or periodical publication: name(s) of author(s), initial of the first name(s), (year). title of the article, abbreviated name of the journal in italics, volume in bold type, and the page numbering.

Example:

Scorza J. V. & Rojas E. (1990). La leishmaniasis tegumentaria venezolana: problemática contemporánea en el estado Trujillo. Soluciones. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **30**: 1-6.

When there are 6 or more authors, list the names and initials of the first 6 and add *et al.* If the work is published in a supplement, this is to be cited.

Example:

Bonfante G. R., Urdaneta I., Alvarado J., Anzola N. H., Torrealba J., Saldivia M. E. *et al.* (1995). Phlebotomine sand flies in five endemic leishmaniasis foci in Lara state, Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **35** (Supl. 1): 53-62.

- Book: List the name(s) of the author(s), initials of first name(s), (year). title of the book, edition, publishing house and place of publication (city and country). **Example:**

Mosqueda C. G. (1974). *Hipótesis estadística con aplicaciones*. 2ª edición. Ed. Sobre Visión CA. Caracas, Venezuela.

- Chapter in a book: list the name(s) of author(s), initial(s) of first name(s), (year). title of the chapter, and page(s). Give book title (in italics), name(s) and initial(s) of the editor(s) of the book, the edition, the publishing house, and place of publication (city and country).

Example:

Bertelli A., Donati L. & March J. (1968). Proteases inflammatory reaction. pp. 66-75. En: *Inflammation Biochemistry and Drug Interaction*. Eds. Bertelli A. & Houck J. C. 2ª ed. Excerpta Med. London, U.K.

- Unpublished degree thesis: name of author, initial(s) of first name(s), (year). title (in italic). degree thesis. university. city, country.

Example:

Solis T. A. (2000). *Diagnóstico de la resistencia a insecticidas en cepas de Ae. aegypti (Diptera: Culicidae) de diferentes regiones de República Dominicana*. Trabajo de grado de Maestría, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.

- Paper presented at Congress: List the name(s) of the author(s), initials of first name(s), (year). title (in italic). congress name. city, country.

Example:

Delgado O., Blanca I., Silva S., Coraspe V., Perez A. & Marquez M. E. (1999). *Evaluación de la respuesta inmune celular en pacientes con Toxocariasis*. XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología. Acapulco, México

- *Document "on line"*: List the name(s) of the author(s), initials of first name(s), (year), title (in italics), document on line: <http://www.example.com> (downloaded: year, month, day).

Example:

Moreno Landera L. A. & Gutierrez Delgado J. A. (2001). *Remedios y creencias de medicina popular en la Merindad de Campoo*. Documento en línea: http://www.vacarizu.es/Cuadernos/Cuaderno_26/Remedios_y_creencias.htm (Consultado: 2008, Diciembre 22).

2. Scientific Notes:

References should be included in the text, citing for one or two authors: (name(s) of the author(s), initial of the name (s), (year), journal (in italics), volume (bold) and number of pages). If more than two authors: name of the first author, initials of first name(s) *et al.* (in italics) (year), title (in italics), journal (in italics), volume (bold) and number of the pages).

Example: (Barrera *et al.*, 1979. *Acta Cient. Venez.* **30**: 418–424).

Citations such as “no date of publication” and “personal communication” should not be included in the list of references and should be shown in the text in italics. Regarding works in press, only articles already accepted and cited in the article may be placed in the list of references.

Authors should arrange the content to conform to the Code of International Nomenclature and International System of Measurement (SI). This is based on the metric system in which units do not have plural endings (5 km not 5 kms) nor are they followed by periods (10 mL not 10 mL.).

Tables and Figures

Tables and figures should be referred to appropriately in the text and will be properly identified in correlative order: titles, sources (when necessary) and legends.

Presented figures will use clear symbols that need to be highlighted or reduced. They will be identified with their number, corresponding legends will be put on separate pages.

Photographs or pictures should be digitized or scanned with a resolution of no less than 300 dpi and saved in JPG format; if these requirements cannot be met, the photographs or pictures should be sent with appropriate protective cover. In special cases, the possibility of publishing photographs or pictures in color will be considered.

Microphotographs and drawings will be treated in the same manner as photographs and pictures and enlargement or scale indicated. Maps and plans should be on a separate page with their corresponding legend with a maximum size of 11.3 x 18.4 cm (4.45 x 7.25 inch).

Papers should be no longer than 20 pages on paper 28 x 21.5 cm (8.5 x 11 inch) as a maximum size.

Article submission

Preferably papers should be sent to the editors of the Bulletin electronically (bolmal2012@gmail.com) or by air or terrestrial mail in an envelope with a letter directed to the editors and with the article on a CD in language compatible with Microsoft® Windows® with the original and one (1) copy.

Likewise, all related correspondence or documentary proof, references, suggestions, remarks and other matters should be directed by mail to the editor at the following address:

Boletín de Malariología y Salud Ambiental,
Av. Bermúdez Sur, Maracay, Ed. Aragua – Venezuela.
Telephone: (58-0243) 2325633 / 2322645.
Fax: (58-0243) 2325633
E-mail: bolmal2012@gmail.com

Review and acceptance of articles

Articles submitted for publication in the Bulletin of Malariology and Environmental Health will undergo a process of review and refereeing. The period for responding to authors will depend on the complexity of the paper and the availability of specialists in the field.

In the first review the Editorial Committee will select articles on the basis of the general criteria and objectives of the Bulletin. Next the article will be sent to two (2) specialists in the specified area. The editors and the Editorial Committee will seek to avoid possible conflicts of interest that could disqualify referees from evaluating a particular manuscript.

These specialists will evaluate the scientific quality of the manuscript and will submit their reasoned opinions, recommending, or not recommending, acceptance of the article for publication. The work with the observations and suggestions of the referees will be returned to the corresponding author who will send a new version with a detailed explanation of the changes made, accepting the recommendations or not and presenting the reasons for not accepting them.

The Editorial Committee has the final decision concerning the publication of the article once they have verified compliance with indicated conditions and have analyzed the response of the authors.

All decisions will be sent by letter to the corresponding author as quickly as possible.

After the review, manuscripts will be subject to an editorial process which may include, in the event it is necessary, its condensation and the deletion or addition of charts, illustrations and annexes. The edited version (galley proof) will be sent to the principal author for his review and approval and his reply to any additional questions from the editor.

The Bulletin of Malariology and Environmental Health reserves the legal rights to the manuscripts approved for its publication as well as the right to make adjustments or changes which will insure the quality of the publication. However, it is not responsible for the ideas or opinions expressed in the work. The originals will not be returned under any circumstances.

The editors, the Editorial Committee and the referees formally state they are not authorized to use for private or personal ends information obtained through review of the manuscripts. In the same way they will respect the right of confidentiality of the reviewers and editors.

Once the work is published, the corresponding author will receive by e-mail a PDF version.

BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL

(ISSN-1690-4648)

(antes: Boletín de Malariología y Saneamiento Ambiental)

El Boletín de Malariología y Salud Ambiental es una revista científica que publica artículos sobre diferentes aspectos de la Medicina Tropical (incluyendo patología, estudios clínicos, experimentales y terapéuticos, estudios sociales, epidemiología y control), Parasitología (protozoología, helmintología, entomología, malacología, bioquímica, inmunología, biología molecular, genética), Ingeniería Sanitaria y Salud Ambiental.

Es objetivo de la revista publicar nuevos conocimientos y metodologías para el entendimiento de la dinámica de la transmisión de enfermedades infecciosas virales y parasitarias y sus vectores, dentro de su contexto eco- y socio-epidemiológico, en apoyo y para el diseño y manejo oportuno de los programas de prevención y control y la salud ambiental.

El Boletín de Malariología y Salud Ambiental es una publicación periódica semestral con un (1) volumen y dos(2) números (Julio y Diciembre) por año, distribuida nacional e internacionalmente en formato impreso y en formato electrónico a través de la siguiente dirección de Internet: <http://www.iaes.edu.ve>

El Boletín está estructurado en nueve Secciones

- I.- Forum.** Discusión acerca de análisis de situaciones, programas, proyectos o intervenciones en salud.
 - II.- Revisiones** sobre los temas de competencia del Boletín.
 - III.- Artículos Originales.** Aportes inéditos en las áreas antes mencionadas de Medicina Tropical, Parasitología, Ingeniería Sanitaria, Salud Ambiental.
 - IV.- Reportes Epidemiológicos.** Actualización de los datos epidemiológicos sobre distribución geográfica y demográfica, prevalencia e incidencia.
 - V.- Notas Científicas y/o Tecnológicas.** Comunicaciones cortas sobre hallazgos y/o resultados preliminares, nuevas técnicas y metodologías.
 - VI.- El Hombre y la Ciencia.** Biografía de Científicos que se han destacado a nivel nacional y/o internacional en el área de la Salud y del Saneamiento Ambiental.
 - VII.- Revista de revistas.** Resúmenes de artículos publicados en otras revistas o de Trabajos Especiales de Grado.
 - VIII.-Cartas al Editor.** Comunicaciones dirigidas a la redacción relacionadas con tópicos de interés para difusión en el Boletín de Malariología.
 - IX.- Noticias.** Información sobre reuniones científicas nacionales e internacionales, Congresos, Simposios, Talleres y otros eventos relevantes.
-



Servicio Autónomo
Instituto de Altos Estudios
Dr. Arnoldo Gabaldon