



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. LVI, N° 1, 2016

Maracay - Aragua - Venezuela



BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL

Vol. LVI, N° 1, Enero-Julio, 2016

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

(antes Boletín de Malariología y Saneamiento Ambiental)

MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA SALUD

LUISANA MELO
MINISTRA

VICEMINISTERIO DE SALUD INTEGRAL

ASIA VILLEGAS
VICEMINISTRA

DIRECTOR GENERAL DE INVESTIGACIÓN
Y EDUCACIÓN PARA LA SALUD INTEGRAL

MAIQUI FLORES
DIRECTOR

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

JOEL JOSÉ CARABALLO
DIRECTOR

Editores

Darjaniva Molina de Fernández

M. Dora Feliciangeli

José Vicente Scorza

Secretaría Técnica

José Romero (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)

Jorge Ernesto Moreno (IAE-MPPS)

Magda Magris (CAICET)

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)

Omar Verde (Venezuela)

Mario Henry Rodríguez (México)

Para envío de artículos: bolmal2015@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. LVI, Nº 1

Maracay, Aragua, Venezuela

Enero-Julio, 2016

CONTENIDO

ARTÍCULOS ORIGINALES

Prevalencia de enteroparasitos en individuos seropositivos y seronegativos a los virus HTLV-I/II

Prevalence of intestinal parasites in seropositive and seronegative to HTLV I/II viruses

Zulbey Rivero, Ana Niño, Ismael Uribe, Angela Bracho, Marinella Calchi, Rafael Villalobos & Jorge Guíñez 1

Low prevalence of oral protozoa colonization in Portuguese healthy and end-stage renal disease patients undergoing peritoneal dialysis

Baja prevalencia de la colonización oral de protozoos en Portugueses saludables y o pacientes renales del último estadio de enfermedad y que necesitan de diálisis del peritoneo

Inês Correia, Liliana Simões-Silva, Carla Santos-Araujo, Maria João Sousa, Manuel Pestana, Isabel Soares-Silva, Benedita Sampaio-Maia & Joana Barbosa 11

Primer reporte de *Cyclospora cayetanensis* en una comunidad indígena Kariña del municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela

First report of Cyclospora cayetanensis in an indigenous Kariña A community in Sucre state, Venezuela

Erika Gómez Martínez, Lourdes Figuera, Del Valle Guilarte, Zulay Simoni, Marcos Tulio Díaz, Mariolga Berrizbeitia & Sayreth Cerrada 19

Estudio preliminar sobre el comportamiento de *Aedes albopictus* de la region central de Venezuela a insecticidas químicos

Preliminary studies on the behavior of Aedes albopictus from the central region of Venezuela to chemical insecticides

Darjaniva Molina de Fernández, Danny Bastidas Beltrán, Nieves Molina, Luisa Figueroa, Juan Carlos Navarro, Antonio Guerra, Julio González Rivas, Víctor Sánchez & Rodrigo Ramírez 30

Mecanismos de resistencia a la permetrina en dos poblaciones de *Aedes aegypti* del occidente de Venezuela

Mechanisms of Permethrin resistance in two populations of Aedes aegypti in western Venezuela

Leslie Álvarez González, Gustavo Ponce García & Adriana Flores Suarez 43

Genetic structure of Latin American *Aedes aegypti*

Estructura genética de Aedes aegypti latinoamericano

Marifel Carrozza, Yasmin Rubio-Palis & Flor Herrera 53

Revisión de la colección del género <i>Chagasia</i> (Diptera: Culicidae) del Museo Entomológico “Dr. Pablo Cova García”, Maracay, Venezuela <i>Revision of the collection of the genus Chagasia (Diptera: Culicidae) of the Entomological Museum “Dr. Pablo Cova García”, Maracay, Venezuela</i>	
Yasmin Rubio-Palis, Hernán Guzmán, Enrique Pérez & Yarys Estrada	63

NOTAS CIENTÍFICAS

Description of the genital atrium of three <i>Lutzomyia</i> species in the subgenus <i>Psathyromyia</i> (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from the Central Brazilian Amazon <i>Descripción del atrio genital de tres especies de Lutzomyia del subgénero Psathyromyia (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) de la Amazonía Central Brasileña</i>	
Arley Faria José de Oliveira¹, Eric Fabrício Marialva, Jeane Cristine de Oliveira Barbosa, Nair Otaviano Aguiar & Felipe Arley Costa Pessoa	68

A probable hybrid in a specimen of the female <i>Psychodopygus</i> sp. (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Amazonas State, Brazil <i>Un híbrido probable en una hembra Psychodopygus sp. (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) en el estado de Amazonas, Brasil</i>	
Arley Faria José de Oliveira, Nair Otaviano Aguiar & Felipe Arley Costa Pessoa	72

Study of the prevalence of <i>Plasmodium</i> infections by the polymerase chain reaction (PCR) among patients with severe anaemia treated at a rural hospital in southern Ethiopia <i>Prevalencia de infección por Plasmodium mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en pacientes con anemia grave atendidos en un hospital rural de sudeste de Etiopía</i>	
José M. Ramos, Gabre Tissiano, Ashenafi Gosa, Iñaki Alegria & Pedro Berzosa	75

Registros de altitud de mosquitos anofelinos (Diptera: Culicidae: Anophelinae) del Municipio Gran Sabana, estado Bolívar, Venezuela, y nuevos datos altitudinales de importancia <i>Altitude records for anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae: Anophelinae) from the Gran Sabana municipality, Bolivar State, Venezuela, and new relevant altitudinal data</i>	
Jesús Berti, Rodrigo Ramírez, Yarys Estrada, Hernán Guzmán & Lourdes Arias	78

EL HOMBRE Y LA CIENCIA	87
-------------------------------	----

NOTICIAS	89
-----------------	----

Artículos Originales

Prevalencia de enteroparasitos en individuos seropositivos y seronegativos a los virus HTLV-I/II

Prevalence of intestinal parasites in seropositive and seronegative to HTLV I/II viruses

Zulbey Rivero^{1*}, Ana Niño¹, Ismael Uribe¹, Angela Bracho¹, Marinella Calchi¹, Rafael Villalobos² & Jorge Guíñez³

RESUMEN

Para determinar la prevalencia de enteroparásitos en individuos seropositivos a los virus HTLV-I/II, se seleccionaron aleatoriamente 75 donantes que asistieron a los Bancos de Sangre de dos instituciones sanitarias del municipio Maracaibo, Venezuela. Se contactaron personalmente 50 individuos seropositivos a virus HTLV-I/II (grupo muestra) y 25 seronegativos (grupo control), quienes aportaron una muestra fecal para diagnóstico parasitológico. Estas fueron sometidas al examen al fresco con solución salina fisiológica (SSF) al 0,85%, tinción temporal de Lugol y técnica de concentración con formol-éter (Ritchie). Además se realizó cultivo en Agar Nutritivo (método de Arakaki) para investigar la presencia de larvas de *Strongyloides stercoralis*. Se determinó una prevalencia general de enteroparásitos en el grupo muestra de 54% y 44% en el grupo control. Predominó el monoparasitismo entre todos los individuos estudiados. Las especies identificadas fueron: *Blastocystis* spp. 47,3% y 15,4%, *Entamoeba coli* 21% y 15,4%, *Endolimax nana* 13% y 53,8%, Complejo *Entamoeba* 10,5% y 15,4%, *Giardia intestinalis* 5,2% y 0%, y *Entamoeba hartmanni* 2,6% y 0% en el grupo muestra y grupo control, respectivamente. No se detectó *Strongyloides stercoralis* ni otros helmintos intestinales, en los individuos estudiados. *Blastocystis* spp. fue el más frecuente en los pacientes seropositivos (diferencia estadísticamente significativa) que en el grupo control, lo que pudiese relacionarse con una mayor persistencia de este cromista en pacientes coinfectados con HTLV-I/II. Se puede concluir que el estatus serológico del individuo HTLV-I/II positivo parece no influir en la presencia o adquisición de parásitos intestinales.

Palabras clave: Parásitos intestinales, HTLV-I/II, *Blastocystis* spp.

SUMMARY

The prevalence of intestinal parasites in individuals seropositive for the HTLV-I/II virus was studied. A total of 75 donors who attended the blood banks of two health institutions in Maracaibo, Venezuela were randomly selected: 50 patients seropositive for HTLV-I/II (study group) and 25 seronegative individuals (control group). The participants in the study were all contacted personally, after which they provided a fecal sample for parasitological diagnosis. The fresh samples were examined using 0.85% physiological saline solution (PSS), Lugol's solution for temporary staining and the formalin-ether concentration technique (Ritchie). In addition, samples were cultured on nutrient agar (Arakaki method) to determine the presence of *Strongyloides stercoralis* larvae. Overall prevalences of 54% intestinal parasites in the study group and 44% in the control group were found. Monoparasitism prevailed among all the individuals studied. The species identified in the study and control groups were: *Blastocystis* spp. 47.3% and 15.4%, *Entamoeba coli* 21% and 15.4%, *Endolimax nana* 13.0% and 53.8%, *Entamoeba complex* 10.5% and 15.4%, *Giardia intestinalis* 5.2% and 0%, and *Entamoeba hartmanni* 2.6% and 0%, respectively. *Strongyloides stercoralis* and other intestinal helminths were not detected in the individuals studied. *Blastocystis* spp. was significantly more common in seropositive patients than in the control group, which could be associated with a greater persistence of this chromista in patients co-infected with HTLV-I / II. It can be concluded that the positive serological status of HTLV-I / II infected individuals does not seem to influence either the presence or acquisition of intestinal parasites.

Key words: Intestinal parasites, HTLV-I/II, *Blastocystis* spp.

¹ Laboratorio de Parasitología "Lic. Regino Arapé García" de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad del Zulia (LUZ). Maracaibo, Venezuela.

² Cátedra de Medicina Tropical, Escuela de Medicina de de la Universidad del Zulia (LUZ). Maracaibo, Venezuela.

³ Cátedra de Inmunología, Facultad Experimental de Ciencias de de la Universidad del Zulia (LUZ). Maracaibo, Venezuela.

*Autor de correspondencia: zulbeyrivero@mail.com

INTRODUCCIÓN

Las infecciones virales generalmente predisponen al individuo portador, a la coinfección por otros microorganismos que afectan al hombre. Los virus linfotrópicos humanos de células T (HTLV) tipo I y II son retrovirus de ARN monocatenario causantes de diversas patologías e infecciones oportunistas. Los virus linfotrópicos de células T humanas pertenecen a la familia Retroviridae, el HTLV-I fue el primer retrovirus oncógeno humano conocido (Poiesz *et al.*, 1980, Domínguez *et al.*, 2015). El HTLV-I tiene como diana principal los linfocitos TCD4 y el HTLV-II los linfocitos TCD8. El HTLV-I produce una proliferación aberrante de linfocitos CD4, lo cual genera una disfunción selectiva y disminución de la inmunidad celular, a diferencia del VIH que disminuye la cantidad de estas células (Copeland & Henney, 1996). El HTLV una vez que ha infectado a la célula, puede permanecer silente integrado en forma de provirus o comenzar a replicarse. Se cree que el principal mecanismo de transmisión de la infección por HTLV es a partir de mitosis de las células que infecta, esta expansión clonal da lugar a lo que se denomina carga proviral (El HTLV necesita el contacto célula-célula para producir la infección). Los principales mecanismos de transmisión de la infección por virus HTLV son la vía sexual, vía parenteral, por hemocomponentes o uso de drogas inyectables (Tarqui, 2008) y vía vertical (principalmente leche materna) (Moriuchi *et al.*, 2013).

Estos virus infectan predominantemente células T, así como células B, macrófagos, células dendríticas y endoteliales. La mayoría de los infectados son asintomáticos (considerados portadores) y menos del 5% desarrollará alguna de las enfermedades severas asociadas con ésta infección (Arbelaez *et al.*, 2007). El virus HTLV-I produce una depresión de la inmunidad celular que se asocia con frecuencia elevada a Tuberculosis o Hansen (Lepra). La infección por el virus HTLV I, se asocia también con un aumento de la susceptibilidad a la infección por *Strongyloides* sp. y a la resistencia al tratamiento del mismo (Terashima *et al.*, 1999).

Actualmente existe una clasificación de las enfermedades severas asociadas a la infección por HTLV-I, agrupadas en tres categorías: síndromes inflamatorios (paraparesia espástica tropical, uveítis),

enfermedades neoplásicas (leucemia/linfoma de células T) e infecciones oportunistas (hiperinfección por *S. stercoralis* y *Sarcoptes scabiei*), evidenciándose este tipo de complicaciones en menos del 10% de los portadores del virus. Varios estudios han documentado sin explicación alguna una alta prevalencia de Estrongiloidiasis en portadores de HTLV-I. De hecho, las formas severas de Estrongiloidiasis, se asocian en forma significativa, con infección por HTLV-I en adultos y en niños mayores de 5 años (Freites, 2008). Para determinar la infección por los virus HTLV-I/II, generalmente se realiza el diagnóstico inmunológico, el cual se lleva a cabo principalmente en Bancos de Sangre, por ser parte del conjunto de pruebas realizadas a los donantes de sangre. Habitualmente el diagnóstico incluye un método de ELISA, que luego puede ser confirmado con Westernblot o IFI. En la actualidad se evidencia en los trópicos un aumento de los casos de HTLV-I. Según Vásquez (2003), en Chile la seroprevalencia era del 0,3%, en EUA: Los Angeles 0,1% y Washington: 0,06%; en Japón varía del 0 al 20% y en Jamaica del 6%. En Brasil, Porto *et al.* (2002), refieren una seroprevalencia a virus HTLV-I/II de 0,41% en donadores de sangre. León *et al.* 2003, refieren una prevalencia del virus HTLV-I/II en donantes voluntarios de sangre del 0,11% en los años 2000-2001 en Caracas, Venezuela.

A nivel regional, Hassanhi *et al.* (1998) evaluaron la seroprevalencia a virus HTLV I/II en pacientes del Instituto Hematológico de Occidente del estado Zulia e indígenas Barí. Mediante técnicas de ELISA detectaron 0,4% de positividad en los donantes del banco de sangre y 15,4% en los pacientes con trastornos hematológicos; además 3,4% de positividad en los indígenas. Por otro lado, Álvarez *et al.* (2008), refieren que la seroprevalencia de pacientes positivos al virus HTLV-I/II fue del 1.14% en 14.831 individuos estudiados en los años 2005-2007, del Instituto Hematológico de Occidente del estado Zulia. Estos resultados demuestran que los virus señalados, circulan en la población del estado Zulia.

Las infecciones por parásitos intestinales se definen como la presencia en el tracto gastrointestinal de protozoarios y/o helmintos que se benefician de los nutrientes del hospedador cumpliendo en él su ciclo vital o parte del mismo; estas constituyen un importante problema de salud pública, por sus altas tasas de prevalencia y amplia distribución mundial,

sobre todo en las regiones tropicales y subtropicales (Devera *et al.*, 2007). Estas infecciones se producen en el hombre cuando sus hábitos y costumbres se interrelacionan con los ciclos de vida de los protozoarios y helmintos agentes causales de las mismas (Rivero *et al.*, 2009).

La estrongiloidosis es la enfermedad parasitaria intestinal causada por el nemátodo *Strongyloides stercoralis* y ha sido referida como una de las parasitosis intestinales más relacionadas a la infección por el virus HTLV-I (Terashima *et al.*, 1999, Porto *et al.*, 2002, Marcos *et al.*, 2005, Freitas, 2008, Pays 2011, Saavedra *et al.*, 2011). Una de las características más importantes de *S. stercoralis* y que lo diferencia de otros nemátodos humanos, radica en la capacidad única de replicarse dentro del hospedero (autoinfección) y convertirse en un agente potencialmente letal en pacientes inmunocomprometidos (Marcos *et al.*, 2005) y en pacientes con la infección por retrovirus humanos, principalmente el virus linfotrópico de células T tipo 1 (HTLV-I). Este último merece especial atención debido a que es endémico en varios países de Latinoamérica y actualmente es considerada una enfermedad infecciosa emergente en el Perú (Marcos *et al.*, 2005). Existe muy poca información en la literatura, relacionada a la infección por HTLV-I/II y enteroparásitos diferentes a *S. stercoralis*.

Con la finalidad de determinar la presencia de parásitos intestinales en individuos seropositivos a virus HTLV-I/II, se realizó la presente investigación, para evaluar la prevalencia de esta coinfección en pacientes zulianos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población y Muestra

El diseño de la investigación fue prospectivo, experimental y transversal de prevalencia. Se seleccionaron aleatoriamente pacientes que asistieron a los Bancos de Sangre de dos instituciones sanitarias del municipio Maracaibo y que fueron estudiados inmunológicamente para ser donantes. Se revisaron los libros de donantes del Instituto Hematológico de Occidente y del SAHUM (Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo), para seleccionar pacientes para grupo muestra y control. Los grupos muestra y control, se trataron de aparear

en base a la edad, sexo y estatus socioeconómico de sus individuos (Tabla I). Para el grupo muestra se tomaron 50 individuos positivos a los virus HTLV I/II y 25 pacientes seronegativos como grupo control.

Durante los meses de enero 2012 y julio 2013, estos pacientes fueron contactados para que aportaran una muestra de heces. Una vez que el paciente entregaba la muestra de heces, los datos demográficos fueron recolectados en un formato para tal fin (formulario de recolección de datos: edad, sexo, disposición de agua, excretas, tipo de vivienda y algunos aspectos clínicos). Dichos pacientes hasta la fecha, no habían desarrollado alguna de las enfermedades atribuibles a su estatus HTLV positivos; por lo que se consideraron asintomáticos para el momento del estudio. Según información obtenida de los Bancos de Sangre, las muestras de suero de cada paciente donante del SAHUM, fue examinada para anticuerpos anti-HTLV-I/II por técnicas de ELISA, Bioelisa de biokit, Barcelona, España. Mientras que las muestras de los donantes del Instituto Hematológico de Occidente, fue examinada para anticuerpos anti-HTLV-I/II por técnicas de ELISA Murex HTLV-I/II, DiaSorin.

Diagnóstico Parasitológico

Se obtuvo una muestra fecal por individuo en envase grande, plástico, limpio y seco. Cada muestra fue sometida al examen coproparasitológico

Tabla I. Características de los pacientes seropositivos (muestra) y seronegativos (control) a virus HTLV/II. Estado Zulia, Venezuela.

Características Basales	Grupo Muestra n°/%	Grupo Control n°/%
Edad		
X ± DE	31,50 ± 11,46	38,24 ± 12,07
Sexo		
Femenino	16/32	9/36
Masculino	34/68	16/64
Procedencia (Municipio)		
Maracaibo	43	23
San Francisco	3	1
La Cañada de Urdaneta	4	1
Total	50	25

directo, método de concentración con Formol-éter (Melvin & Brooke, 1971) y cultivo en agar o método de Arakaki (Arakaki *et al.*, 1988). Explicando brevemente, este método consiste en colocar una porción de aproximadamente 2 g de heces en el centro de una placa de agar nutritivo (AN), sellar con tirro el borde de la placa e incubar a 37°C por 24-48 horas. Luego de la incubación se observa macroscópica y microscópicamente la placa de Petri, buscando la presencia de caminos larvarios o patrón de colonias en el agar a las 24 y luego a las 48 horas. Si se observan caminos sinuosos en ondas o larvas en el agar, éstas deben recuperarse del mismo agregando SSF o formol al 10% y aspirando este líquido con pipeta Pasteur. El líquido así obtenido se observa al microscopio con objetivos de 10 y 40X, en preparación directa y con lugol. En base a las características morfológicas de la larva se determina si se trata de larvas (rabditoides o filariformes) de *S. stercoralis* o de otra especie de nemátode (Arakaki *et al.*, 1988). Se da como negativo al no observar los caminos larvarios ni las larvas en el agar. La calidad del AN fue comprobada utilizando una muestra de heces conocida, con *S. stercoralis*.

Consideraciones Éticas

Se siguieron las normas de bioética establecidas en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial en su versión adoptada en la LII Asamblea General de Edimburgo (WMA, 2008). Se proporcionó un "Consentimiento Informado", en el que quedó por escrito su deseo de colaborar voluntariamente, la cual firmaron directamente por ser todos mayores de edad. Previo a la recolección de las muestras, se solicitó la colaboración voluntaria de los individuos, recalándose la confidencialidad del estudio. A todos los individuos incluidos, les fue entregado el reporte de los resultados de su examen coproparasitológico.

Análisis Estadístico

A partir de la información obtenida se construyó una base de datos en Excel. Para el análisis de los datos se utilizaron frecuencias relativas (%), representadas en tablas. Para determinar si existía diferencia significativa entre las variables estudiadas, se utilizó el estadístico Ji cuadrado (χ^2) con un margen de seguridad de 95%. Estos cálculos fueron realizados utilizando el programa SPSS versión 10. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Se obtuvieron las muestras fecales de 50 individuos positivos al virus HTLVI/II y 25 de pacientes seronegativos a estos virus. Las edades de los pacientes estudiados variaron de 19 a 63 años, promedio $32 \pm 11,7$. Participaron 14 personas del sexo femenino y 36 del sexo masculino en el grupo muestra. El grupo control estuvo conformado por 9 individuos del sexo femenino y 16 del sexo masculino.

Se determinó una prevalencia de enteroparásitos del 54% (27/50) en los seropositivos, donde 9 individuos (18%) presentaron infecciones por 2 o más especies parasitarias (poliparasitismo). En el grupo control, la prevalencia de enteroparásitos fue del 44% (11/25) y el poliparasitismo del 8% (2/25). No se determinó diferencia significativa entre las prevalencias parasitarias de los dos grupos estudiados (χ^2 : 0,67, $p > 0,05$).

Mediante los exámenes coproparasitológicos efectuados (examen directo, por concentración y agar nutritivo) se obtuvieron los resultados que se evidencian en la Tabla II. En ella se observa únicamente presencia de protozoarios/cromistas, ya

Tabla II. Prevalencia de enteroparásitos/cromistas en pacientes seropositivos (muestra) y seronegativos (control) a virus HTLV/III. Estado Zulia, Venezuela.

	Muestra		Control		p
	n=50	%	n=25	%	
<i>Blastocystis</i> spp.	18	47,3	2	15,4	0,006**
<i>Entamoeba coli</i>	8	21,0	2	15,4	0,337
<i>Endolimax nana</i>	5	13,0	7	53,8	0,05
Complejo <i>Entamoeba</i>	4	10,5	2	15,4	1,00
<i>Giardia intestinalis</i>	2	5,2	0	0	0,311
<i>Entamoeba hartmanni</i>	1	2,6	0	0	0,477

**Significativo, Exacto de Fisher=0,006

que no se detectaron helmintos intestinales. Además se observó, que el microorganismo que predominó en grupo muestra fue *Blastocystis* spp. (47,3%); mientras que en el grupo control fue *Endolimax nana* (53,8%). Se determinó diferencia significativa en la presencia de *Blastocystis* spp. entre grupo muestra y control ($p: 0,006$).

Al evaluar la prevalencia de enteroparásitos por sexo, se aprecia que tanto en los seropositivos (40%) como en los seronegativos (24%), se observó el mayor número de individuos parasitados en el sexo masculino; pero sin diferencia significativa, tal como se aprecia en la Tabla III.

En la Tabla IV se expresa la prevalencia de enteroparásitos según grupo etario (estratificados en escala de 10 años de edad) entre los individuos seropositivos y seronegativos. En ella se destaca que para el grupo muestra, el grupo etario de 19-29 años fue el mayormente parasitado (20%); mientras que en el grupo control, el estrato de 50-59 años presentó al mayor número de individuos parasitados (16%). No se determinó diferencia significativa de las parasitosis entre grupo muestra y control, según la edad.

DISCUSIÓN

A pesar de la importancia que representa la coexistencia de cualquier microorganismo infeccioso

en individuos seropositivos al virus HTLV-I/II, no abunda la literatura relacionada con la prevalencia de enteroparásitos en estos individuos. La comparación de las prevalencias parasitarias entre los grupos aquí estudiados, determinó que no había diferencia significativa entre ellas. Los resultados obtenidos sugieren que los portadores asintomáticos de virus HTLV-I/II, no están predispuestos a alguna infección con parásitos intestinales. Tal situación fue observada con anterioridad por Robinson *et al.* (1991), al estudiar individuos Jamaíquinos seropositivos al HTLV-I. Así mismo, Tarquí (2008), al estudiar la asociación del virus HTLV-I y enfermedades parasitarias como Strongiloidiasis, Leishmaniasis y Tripanosomiasis, señala que no se encontró soporte estadístico para la coinfección virus-parásito, ni distinción de sexo para la infección viral.

Los factores de riesgo para la adquisición de infecciones parasitarias son los mismos en pacientes inmunocompetentes que en los inmunosuprimidos o inmunodeficientes. Lo que determina la posibilidad de adquirir una infección parasitaria son las condiciones higiénico-sanitarias del individuo, condiciones que permitan la existencia de formas evolutivas infectantes del parásito en el entorno del hospedador. Como refieren otras investigaciones (Robinson *et al.*, 1991), la infección con parásitos intestinales ocurre independientemente del estatus HTLV del individuo. La inmunosupresión inducida por el

Tabla III. Prevalencia de enteroparásitos según sexo, en individuos seropositivos y seronegativos a virus HTLV I/II. Estado Zulia, Venezuela.

Género	Muestra			Control			Total
	E	P	%	E	P	%	
Femenino	14	7	14,0	9	5	20,0	23
Masculino	36	20	40,0	16	6	24,0	52
Total	50	27	54,0	25	11	44,0	75

E: Estudiados; P: Parasitados; $\chi^2: 1,433$; GL: 1; $p: 0,231$

Tabla VI. Prevalencia de enteroparásitos según grupo etario, en individuos seropositivos y seronegativos a virus HTLV I/II. Estado Zulia, Venezuela.

Grupo etario	Muestra			Control			Total	
	E	P	%	E	P	%	E	P
19-29	23	10	20,0	8	3	12,0	31	13
30 -39	10	5	10,0	3	2	8,0	13	7
40 -49	12	7	14,0	9	2	8,0	21	9
50 -59	5	4	8,0	5	4	16,0	10	8

E: Estudiados; P: Parasitados; $\chi^2: 3,482$; GL: 3; $p: 0,323$

virus HTLV puede permitir una mayor intensidad de infección de ciertos microorganismos, haciéndola más prolongada y facilitando entonces su detección a través de los métodos parasitológicos. Pero la posibilidad de infectarse, siempre estará determinada por la presencia de formas evolutivas infectantes que puedan ingresar al hospedador por los mecanismos de transmisión ya conocidos, fecal-oral, penetración activa, entre otros. Si las condiciones higiénico-sanitarias son óptimas, aunque sea seropositivo a cualquier virus, el individuo no adquirirá infecciones por enteroparásitos.

La respuesta inmunitaria local y sistémica juegan un rol importante en el establecimiento de la infección, controlando la enfermedad una vez establecida, limitando la severidad y diseminación de la enfermedad y colaborando en la eliminación o control del parásito (Stark *et al.*, 2009). De tal modo, que los pacientes inmunosuprimidos o inmunodeficientes tienen mayor probabilidad de sufrir una enfermedad o sintomatología más severa una vez establecida la infección, pueden desarrollar infección diseminada más que una infección local y son incapaces de eliminar el parásito por sí mismos, permitiendo el establecimiento de estadios de portador crónico. Esto determina que en muchos casos exista una mayor morbilidad y mortalidad por algunas parasitosis en estos pacientes. Es tal la importancia del sistema inmunitario en relación a la cronicidad de las parasitosis, que solo con reconstituir la respuesta celular y humoral del hospedador, se logra su mejoría progresiva (Stark *et al.*, 2009).

Si bien el mecanismo de defensa para el control de la infección por los helmintos es complejo, puede involucrar respuestas tanto Th1 como Th2, ésta última es importante, mediante la producción de moléculas (IL-4, IL-13, IL-5 e Ig E principalmente) y activación de células (basófilos, mastocitos y eosinófilos). La IL-4 e IL-13 al inducir la producción de IgE y la diferenciación de basófilos y activación de mastocitos, pueden incrementar la cantidad de fluidos gastrointestinales, actuando directamente sobre la mucosa intestinal al causar un incremento en la permeabilidad intestinal y disminuyendo la absorción de fluidos, favoreciendo así la eliminación de las larvas y huevos intestinales (Arbeláez *et al.* 2007). Los mastocitos y eosinófilos participan en la defensa contra las larvas que atraviesan los tejidos. La interacción del parásito con complejos

Ig E y mastocitos, conduce a la degranulación de éstos y destrucción del parásito. Además, los eosinófilos pueden destruir los helmintos a través de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Arbeláez *et al.*, 2007).

En los dos grupos estudiados predominó el monoparasitismo, por lo que podemos inferir que los individuos estudiados mantenían condiciones higiénico sanitarias regulares, en comparación a otras comunidades estudiadas en la región donde predominó el poliparasitismo (Calchi *et al.*, 2007, Rivero *et al.*, 2012a). En dichos estudios se refiere una alta contaminación del entorno con formas evolutivas infectantes, lo que permite una constante infección del individuo. Según la encuesta realizada a los individuos estudiados, se corroboró que el 85% de las viviendas se cubría la disposición de excretas por cloacas y solo 15% usaban letrinas. Además, todos obtenían agua por tuberías, pero la mayoría (80%) debía almacenar el líquido en pipas por problemas en la distribución del agua.

Se detectó exclusivamente la presencia de protozoarios intestinales, más no de helmintos. Todos los individuos estudiados eran adultos, esto pudiere relacionarse con el hecho de una menor exposición de los individuos con los suelos contaminados en comparación con los niños, quienes generalmente a través de sus juegos tienen un contacto continuo con tierra que puede estar contaminada con formas infectantes de helmintos. En cambio, los adultos tienen un alto riesgo de transmisión hídrica, la vía más sugerida de contaminación humana con protozoarios. Tal situación ha sido referida por otras investigaciones en individuos adultos (Sánchez *et al.*, 1999, Muñoz *et al.*, 2008, Agudelo *et al.*, 2008, Rivero *et al.*, 2012b).

Es importante destacar la inexistencia de casos de strongiloidiasis en los dos grupos estudiados, principalmente la ausencia del parásito en el grupo de seropositivos; ya que estos han sido referidos como un grupo altamente susceptible a la infección por *S. stercoralis* (Terashima *et al.*, 1999, Porto *et al.*, 2002, Marcos *et al.*, 2005, Freitas, 2008, Pays, 2011, Saavedra *et al.*, 2011). Esto es importante, por el hecho de que se utilizaron técnicas específicas y sensibles para su detección, como lo es el coprocultivo o técnica de Arakaki. A nuestro juicio, no está aumentada la susceptibilidad a la infección,

sino la probabilidad de desarrollar estrongiloidiasis crónicas, diseminadas, masivas y fatales en estos pacientes. Sigue siendo el factor determinante la presencia de larvas filariformes en el entorno del individuo para que se dé la infección, por lo que la presencia de la parasitosis está condicionada más bien por los factores geográficos y ambientales en los cuales puedan desarrollarse las larvas infectantes.

La estrongiloidiasis es endémica en áreas muy específicas de nuestra región y es muy factible que ninguno de los individuos incluidos en el estudio viviese en alguna de éstas áreas endémicas, a pesar que tal situación trato de indagarse a través de la dirección de habitación de los individuos estudiados. Porto *et al.*, 2002, refieren una asociación entre HTLV y estrongiloidiasis, en regiones donde ambas son endémicas y la coinfección puede resultar en un incremento de las formas diseminadas de la parasitosis, así como una estrongiloidiasis recurrente por los ciclos de autoinfección. Por lo antes expuesto, se sugiere como medida preventiva, determinar el status de seropositividad al virus HTLV I/II y virus VIH, en individuos parásitados con *S. stercoralis*, por el alto riesgo de estos pacientes de sufrir infecciones muchos más graves por este nematodo, que cualquier otro individuo inmunocompetente. La infección con el virus HTLV I/II o VIH no deben considerarse predictores de la infección por *S. stercoralis*, sino más bien como predictores de una complicación clínica de la infección por este parásito. Es probable que en aquellas parasitosis intestinales donde no existe capacidad de invasión a órganos, sino que se encuentran confinadas a la luz intestinal, la inmunidad celular del hospedero sea una variable que no influye ni determina la permanencia o proliferación de dicho parásito.

Blastocystis spp. fue el parásito más prevalente en el grupo muestra y presentó una diferencia importante en relación a su presencia en el grupo control. Una probable explicación a su elevada prevalencia en el grupo muestra, podría estar relacionada a una mayor permanencia del parásito en la luz intestinal gracias a una disminución en la protección contra el parásito debida a los virus HTLV I y/o II. Investigaciones de laboratorio han mostrado que la infección con HTLV I puede causar alteración de las interacciones de linfocitos T y B in vitro (Popovic *et al.*, 1984), mientras que menores títulos de IgE han sido observados en individuos seropositivos

al HTLV I (Robinson *et al.*, 1990, Matsumoto *et al.*, 1990).

La elevada prevalencia de *Blastocystis* spp. en humanos ha sido referida en diferentes publicaciones a nivel nacional e internacional (Devera *et al.*, 2003 Amato *et al.*, 2004, Díaz *et al.*, 2006, Muñoz *et al.*, 2008, Goldstein *et al.*, 2012, Rivero *et al.*, 2012b). Este cromista se ha convertido en el microorganismo más frecuente en las muestras fecales humanas en los últimos años y muchos aspectos relacionados con su biología, morfología y papel patógeno son controversiales. Actualmente, este microorganismo es considerado como patógeno o potencialmente patógeno, pues es capaz de provocar manifestaciones clínicas en algunos individuos (Boorom *et al.*, 2008, Tan, 2008, Dogruman *et al.*, 2009, Goldstein *et al.*, 2012). Se ha sugerido que su elevada prevalencia se debe a la amplia distribución del mismo entre diferentes animales que son capaces de transmitirla al humano, por lo que se considera además una antropozoonosis (Tan, 2008). En el grupo control prevaleció *E. nana*, parásito comensal que carece de importancia clínica pues no provoca patologías en el humano, pero que tiene importancia epidemiológica pues se considera índice de contaminación fecal-oral. En cuanto a los parásitos patógenos, *G. intestinalis* se detectó más frecuentemente en el grupo de seropositivos, en comparación al grupo control (5,2% vs 0%), pero tal asociación no fue estadísticamente significativa. Este comportamiento podría responder al hecho de que en los HTLV I/II se mantengan infecciones más “pesadas” y crónicas que los seronegativos, permitiendo así la detección del parásito a lo largo del tiempo. Una situación similar en relación a la prevalencia de la Giardiasis, fue reportada por Robinson *et al.* (1991), en individuos HTLV I positivos Jamaíquinos. En general, la infección por *G. intestinalis* se asocia más frecuentemente con población infantil que con población adulta (Cheng *et al.*, 2002).

Otros protozoarios detectados fueron *Entamoeba coli* y *Entamoeba hartmanni*, los cuales son consideradas amibas comensales. Este grupo de amibas intestinales comparte una serie de características epidemiológicas, presentan una distribución cosmopolita y poseen idéntico mecanismo de trasmisión, siempre ligado a la ingestión de los quistes maduros o infecciosos a través de una trasmisión fecal-oral. La detección de una o

más de estas amibas no patógenas en las heces de una persona, aunque no les confiere relevancia clínica, si la tiene desde la perspectiva epidemiológica, ya que viene a indicar una deficiencia de educación higiénico sanitaria (Sard *et al.*, 2011). Se detectó un bajo porcentaje del complejo *Entamoeba* en ambos grupos de estudio, los valores encontrados son similares a los referidos para adultos de la región por Rivero *et al.* (2012b). Lamentablemente, no pudo determinarse específicamente la presencia de *E. histolytica*, *E. dispar* o *E. moshkovskii*, pues para ello se requiere de herramientas de biología molecular (PCR), que no fueron aplicadas en este estudio.

No se determinó diferencia significativa en la prevalencia de la mayoría de los enteroparásitos entre los individuos seropositivos o seronegativos a los virus HTLV I/II, no existe evidencia que induzca a pensar que el estatus serológico del individuo determine cuales parasitosis intestinales puede o no contraer una persona; en todo caso la coinfección viral permite una complicación del cuadro clínico provocado por el parásito. La coinfección HTLV-enteroparásitos debe ser arduamente vigilada en pacientes con parásitos intestinales intracelulares obligados (coccidios intestinales) o con capacidad de invasión tisular (*Entamoeba histolytica*) ante la posibilidad de diseminación de los mismos. Además, deben desarrollarse investigaciones científicas que estudien estas coinfecciones, ya que, no existen en la actualidad.

Se puede concluir que el estatus serológico del individuo HTLV-I/II positivo parece no influir en la presencia o adquisición de parásitos intestinales.

Conflicto de Intereses

Informamos que durante el desarrollo de la presente investigación, ni los autores ni la institución que representamos incurrimos en ningún tipo de conflicto de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Al personal del Instituto Hematológico de Occidente y del Banco de Sangre del Hospital Universitario de Maracaibo, por la colaboración prestada durante el desarrollo del muestreo para la investigación.

REFERENCIAS

- Agudelo-López S., Gómez-Rodríguez L., Coronado X., Orozco A., Valencia-Gutiérrez C., Restrepo-Betancur L., *et al.* (2008). Prevalencia de parasitosis intestinales y factores asociados en un corregimiento de la costa atlántica Colombiana. *Rev Salud Pública*. **10**: 633-642.
- Álvarez C., Moreno K. & Romero F. (2008). *Seroprevalencia de HTLV Tipo I y II en donantes de sangre de Maracaibo, Estado Zulia en el periodo 2005-2007*. Tesis de Grado. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.
- Amato V., Alarcon R., Gayika E., Ferreira S., Becerra C. & Santos G. (2004). Elevada porcentagem de Blastocistose em escolares de Sao Paulo SP. *Rev Soc Bras Med Trop*. **37**: 354-356.
- Arakaki T., Hasegawa H., Asato R., Ikeshiro T., Kinjo F., Saito A. & Iwanaga M. (1988). A new method to detect *Strongyloides stercoralis* from human stool. *Jpn J Trop Med Hyg*. **16**: 11-17.
- Arbelaez V., Angarita O., Gómez M., Sprocket J. & Mejía M. (2007). Presentación de un caso clínico interinstitucional: Gastroduodenitis severa secundaria e hiperinfección por *Strongyloides stercoralis* en un hombre joven. *Rev Colombiana Gastroenterol*. **22**: 118-125.
- Boorum K., Smith H., Nimri L., Viscogliosi E., Spanakos G., Parkar U., *et al.* (2008). Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasites & Vectors*. **1**: 40.
- Calchi M., Rivero Z., Acurero E., Díaz I., Chourio G., Bracho Á., *et al.* (2007). Prevalencia de enteroparásitos en dos comunidades de Santa Rosa de Agua en Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. *Kasmera*. **35**: 38-48.
- Copeland K. F. & Heeney J. L. (1996). T helper cell activation and human retroviral pathogenesis. *Microbiol Rev*. **60**: 722-742.
- Cheng-Ng R., Castellano J., Díaz O. & Villalobos R. (2002). Prevalencia de Giardiasis en hogares de cuidado diario en el municipio San Francisco, Estado Zulia, Venezuela. *Inv Clin*. **43**: 231-237.

- Devera R., Cermeño J., Blanco Y., Bello M., Guerra X., Sousa M., et al. (2003). Prevalencia de Blastocistosis y otras parasitosis intestinales en una comunidad rural del estado Anzoátegui, Venezuela. *Parasitol Latinoam.* **58**: 95-100.
- 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**: 1-9.
- Díaz I., Rivero Z., Bracho A., Castellanos M., Calchi M., Acurero E., et al. (2006). Prevalencia de enteroparásitos en niños de la etnia yukpa de Toromo, Edo. Zulia, Venezuela. *Rev Med Chile.* **134**: 72-78.
- Dogruman-Al F., Kustimur S., Yoshikawa H., Tuncer C., Simsek Z., Tanyuksel M., et al. (2009). *Blastocystis* subtypes in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **104**: 724-727.
- Domínguez M., Salcedo M. & García-Vallejo F. (2015). Serological and virological evaluation of human T-lymphotropic virus type 1 infection in family groups from Tumaco, Colombia. *Biomédica.* **35**: 337-46.
- Freites A. (2008). Virus linfotrópico T humano 1 (HTLV-1), Estrongyloidiasis y Escabiosis. Infecciones y asociaciones a considerar. *Invest Clin.* **49**: 455-456.
- Goldstein E., Coyle C., Varughese J., Weiss L. & Tanowitz H. (2012). *Blastocystis*: To treat or not to treat. *Clin Infect Dis.* **54**: 105-110.
- Hassanhi M., Rivera S., Weir J., Alcalá de Monzón M. & González M. (1998). Infección por virus linfotrópico T humano (VLTH I/II) en pacientes del banco de sangre e indígenas Barí, Maracaibo, Edo. Zulia, Venezuela. *Kasmera.* **26**: 27-33.
- León G., Quiróz A., López A., Hung M., Díaz A., Goncalvez J., et al. (2003). Seropositividad al virus linfotrópico de células T humanas tipos I y II en donantes del Banco Municipal de Sangre de Caracas y factores de riesgo asociados. *Rev Panam Salud Publica.* **13**: 117-124.
- Marcos L., Terashima A., Samalvides F., Alvarez H., Lindo F., Tello R., et al. (2005). Tiabendazol para el control de la infección por *Strongyloides stercoralis* en una zona hiperendémica en el Perú. *Rev Gastroenterol.* **25**: 341-348.
- Matsumoto T., Miike T., Mizoguchi K., Yamaguchi K., Takatsuki K., Hosoda M., et al. (1990). Decreased serum levels of IgE and IgE-binding factors in individuals infected with HTLV-1. *Experimen Immunol.* **81**: 207-211.
- Melvin D. & Brooke M. (1971). *Métodos de Laboratorio para el diagnóstico de parasitosis intestinales.* 1ª ed. Interamericana. México. 198pp.
- Moriuchi H., Masuzaki H., Doi H. & Katamine S. (2013). Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. *Pediatr Infect Dis J.* **32**: 175-177.
- Muñoz V., Lizarazu P., Limache G. & Condori D. (2008). Blastocistosis y otras parasitosis intestinales en adultos mayores del hogar San Ramón, ciudad de La Paz, Bolivia. *BIOFARBO.* **16**: 9-15.
- Pays J. F. (2011). Combined infection with HTLV-I and *Strongyloides stercoralis*. *Bull Soc Pathol Exot.* **104**: 188-199.
- Poiesz B., Rusceti F., Gazdar A., Bunn P., Minna J. & Gallo R. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* **77**: 7415-7419.
- Popovic M., Flomenberg N., Volkman D., Mann D., Fauci A., Dupont B., et al. (1984). Alteration of T-cell functions by infection with HTLV-I or HTLV-II. *Science.* **226**: 459-462.
- Porto M., Muñoz A., Oliveira J. & Marcelino E. (2002). Implicacoes clínicas e imunológicas da associacao entre o HTLV-1 e a estrongyloidiasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* **35**: 641-649.
- Rivero Z., Maldonado A., Bracho A., Castellanos M., Torres Y., Costa-León L., et al. (2009). Prevalencia de enteroparásitos, rotavirus y adenovirus en niños aparentemente sanos. *Kasmera.* **37**: 62-73.

- Rivero Z., Churio O., Mora A., Calchi M., Acurero E. & Villalobos R. (2012a). Correlación entre geohelminthiasis intestinales y variables químicas, hematológicas e IgE en indígenas de la etnia Yukpa, estado Zulia, Venezuela. *Rev de la Soc Venezolana de Microbiol.* **32**: 55-61.
- Rivero Z., Calchi M., Acurero E., Uribe I., Villalobos R., Fuenmayor A., *et al.* (2012b). Protozoarios y helmintos intestinales en adultos asintomáticos del estado Zulia, Venezuela. *Kasmera.* **40**: 188-196.
- Robinson R., Lindo J., Neva F., Gam A., Blattner W., Terry S., *et al.* (1990). Interaction between HTLV-I and *Strongyloides stercoralis* infection resulting in lowered IgE levels in Jamaica. *West Indian Medic J.* **39**: 35.
- Robinson R., Murphy E., Wilks R., Neva F., Terry S., Hanchard B., *et al.* (1991). Gastrointestinal parasitic infection in healthy Jamaican carriers of HTLV-I. *J Trop Med Hyg.* **94**: 411-415.
- Saavedra S., Lapa W., Tenorio M., Hernández J. & Uribe J. (2011). Hiperinfección por *Strongyloides stercoralis* en un paciente con infección por virus HTLV-I. *Rev Med Panacea.* **1**: 47-49.
- Sánchez A., Mora J. & Hernández F. (1999). Prevalencia de parásitos intestinales en adultos mayores, Hospital Raúl Blanco Cervantes. *Rev Cost Cienc Med.* **20**: 167-173.
- Sard B., Navarro R. & Sanchis G. (2011). Amebas intestinales no patógenas; una visión clinicoanalítica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **29**: 20-28.
- Stark D., Barratt J., van Hal S., Marriot D., Harkness J. & Ellis J. (2009). Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. *Clin Microbiol Rev.* **22**: 634-650.
- Tan K. (2008). New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev.* **21**: 639-665.
- Tarqui K. (2008). *Estudio del virus HTLV-I asociado a enfermedades parasitarias: Estrongyloidosis, Leishmaniosis y Tripanosomiosis en pacientes del Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión" UNMSM.* Tesis de Grado. Universidad Nacional Mayor San Marcos. Lima, Perú.
- Terashima A., Gotuzzo E., Alvarez H., Infante R., Tello R., Watts D., *et al.* (1999). *Strongyloides stercoralis*: Formas Clínicas Severas Asociadas a Infección por HTLV. *Rev Gastro Perú.* **19**: 1-7.
- Vásquez P. (2003). HTLV I (human T-cell lymphotropic virus): something to say. *Rev Chilena Infectol.* **20**: 34-37.
- WMA (2008). *Ethical principles for medical research involving human subjects.* World Medical Association. Declaration of Helsinki: 1-5.

Recibido el 23/10/2015
Aceptado el 29/06/2016

Low prevalence of oral protozoa colonization in Portuguese healthy and end-stage renal disease patients undergoing peritoneal dialysis

Baja prevalencia de la colonización oral de protozoos en Portugueses saludables y o pacientes renales del último estadio de enfermedad y que necesitan de diálisis del peritoneo

Inês Correia¹, Liliana Simões-Silva^{2,3,4}, Carla Santos-Araujo^{5,6}, Maria João Sousa⁵, Manuel Pestana^{2,3,5,7}, Isabel Soares-Silva^{2,3}, Benedita Sampaio-Maia^{1,2,3} & Joana Barbosa^{8,9}

SUMMARY

Infections are a major complication in end-stage renal disease (ESRD) patients undergoing peritoneal dialysis (PD). Because the oral cavity may act as a source of systemic pathogens, some authors advocated specific measures when these patients are submitted to oral interventions, such as the administration of prophylactic antibiotics. Oral protozoa colonization may vary significantly with geographic distribution and to our knowledge no studies were performed in Portugal. The aim of the present study was to evaluate protozoa colonization in the saliva of ESRD patients undergoing PD and of their family members, living in the north of Portugal. Saliva was collected from 39 PD patients with a mean time on PD therapy of 12.7 - 15.9 months, and from 18 healthy volunteers (ESRD family members) for microscopic evaluation of protozoa by Lugol's direct smear and specific staining techniques (Giemsa, Trichrome and Kinyoun). After the analysis of 456 smears obtained from 57 participants, only one PD patient (2.6%) presented an amoeba trophozoite in saliva. In conclusion, very low oral protozoa colonization was found, both on PD patients and family controls, suggesting that the oral protozoa colonization of Portuguese population is low and not significantly modified by the presence of end-stage chronic kidney disease. Further studies are required to address this issue.

Key words: Peritoneal Dialysis, Chronic Kidney Disease, Protozoa, Oral microorganisms, Saliva.

RESUMEN

Las infecciones son la principal complicación en pacientes renales del último estadio (ESRD) y que necesitan de diálisis del peritoneo (PD). Como la cavidad oral puede funcionar como una fuente de patógenos sistémicos, algunos autores indican medidas específicas cuando esos pacientes son sometidos a intervenciones orales, como la administración de antibióticos profilácticos. La colonización oral puede variar significativamente con la distribución geográfica. Según nuestros conocimientos, no han sido realizados estudios similares en Portugal. El principal objetivo fue evaluar la colonización de protozoos en saliva de pacientes ESRD del Norte de Portugal que hacían PD y, también, de sus familiares. Muestras de saliva fueron recogidas de 39 pacientes PD, con tiempo medio de terapia de PD de 12,7-15,9 meses y, también de 18 voluntarios saludables (familiares de ESRD). Las mismas utilizadas para evaluación microscópica de protozoos en laminas con lugol y tinciones específicas (Giemsa, Trichrome and Kinyoun). Después del análisis de 456 laminas, obtenidas de los 57 participantes, solamente en un paciente PD (2.6%) se observó un trofozoito del ameba. En conclusión, se encontró una baja prevalencia de colonización oral de protozoos en el grupo estudiado. Así, la colonización oral de la población Portuguesa por protozoos es baja y no se cambia con la evolución de la enfermedad. Para mejor analizar esta situación, futuros estudios son necesarios.

Palabras clave: Diálisis del peritoneo, Insuficiencia Renal Crónica, Protozoos, Microorganismos del cavidad oral, Saliva.

¹ Faculty of Dental Medicine, University of Porto;

² i3S - Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Portugal;

³ INEB - Instituto de Engenharia Biomédica, Universidade do Porto, Rua Alfredo Allen, 208, 4200- 180 Porto, Portugal;

⁴ Faculty of Medicine, University of Porto;

⁵ Department of Nephrology, São João Hospital Center, EPE;

⁶ Department of Physiology and Cardiothoracic Surgery, Cardiovascular R&D Center, Faculty of Medicine, University of Porto;

⁷ Department of Renal, Urological and Infectious Diseases, Faculty of Medicine, University of Porto;

⁸ Microbiology Department, Faculty of Medicine, University of Porto;

⁹ CINTESIS, Faculty of Medicine, University of Porto.

*Autor de correspondencia: bmaia@fmd.up.pt

INTRODUCTION

Compared to other groups of microorganisms, few parasites colonize the oral cavity. The protozoan flagellate *Leishmania* can rarely, but severely, affect the human oral cavity and it does so indirectly by causing granulomatous growth disfigurements involving the mouth and nose (Bergquist, 2009). Other parasites can cause severe systemic disease after entering through oral cavity, such as *Naegleria fowleri* and *Acanthamoeba* encephalitis that may reach nasal cavity, penetrating the olfactory epithelium and, eventually, invading the brain (Cervantes-Sandoval, Serrano-Luna Jde, Garcia-Latorre, Tsutsumi, & Shibayama, 2008; Kaushal *et al.*, 2008). However, the most frequent human oral protozoa are usually non-pathogenic commensals such as *Entamoeba gingivalis*, followed by *Trichomonas tenax* (Wantland & Lauer, 1970). The oral colonization by these protozoa is associated with poor oral hygiene and with the severity of periodontal disease (Bergquist, 2009; Feki, Molet, Haag, & Kremer, 1981; Ghabanchi, Zibaei, Afkar, & Sarbazie, 2010; Kurnatowska, Dudko, & Kurnatowski, 2004; Pomes *et al.*, 2000; Wantland & Lauer, 1970).

Although literature reports are scarce, recent studies have revealed that oral protozoa colonization is more frequent than previously thought, and that its prevalence may vary significantly with the worldwide geographic distribution (Bergquist, 2009; Ghabanchi, *et al.*, 2010). In central Europe two studies from the 80s report an oral protozoa prevalence between 28% and 85% (Cambon *et al.*, 1979; Feki, *et al.*, 1981) whereas in eastern Europe two more recent studies showed an oral protozoa prevalence of 18% and 37% in Slovakia and Poland, respectively (Kurnatowska, *et al.*, 2004; Vrablic, Tomova, Catar, Randova, & Suttova, 1991). In Iraq and Iran, the prevalence varies between 4% and 46% (Ghabanchi, *et al.*, 2010; Madhi & Saeed, 1993) and, in Borneo, Indonesia, an oral protozoa prevalence of 18% was reported (Palmieri, Halverson, Sudjadi, Purnomo, & Masbar, 1984). In 1970, Wantland reported a prevalence of up to 55% in north of America (Wantland & Lauer, 1970) whereas in central and south America, studies from the 90s, described a prevalence of 21% and 62% in Guatemala and Brazil, respectively (Favoreto Junior & Machado, 1995; Pomes, *et al.*, 2000). To our knowledge no studies were performed so far in Portugal.

Parasitic disease continues to cause significant morbidity and mortality throughout the world (Stark *et al.*, 2009). Specifically protozoa are one of the most important pathogens that affect immune compromised patients (Ferreira, 2000). Individuals with impaired cell immunity such as carriers of the human immunodeficiency virus, patients with haematologic neoplasias, patients submitted to transplant of solid organs or under high-dose corticosteroid therapy are among the most infected by this pathogens group.

Immunosuppressed hosts are more susceptible to acquire infection after microorganisms exposure, and, although not commonly valorised, the oral cavity may act as a source of systemic pathogens (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2008; Kshirsagar *et al.*, 2009; Li, Kolltveit, Tronstad, & Olsen, 2000). Once the infection is established, disease becomes more severe and disseminated, since the patients' immune response has more difficulty in eliminating the parasites, becoming chronic carriers (Stark, *et al.*, 2009). Being the immune system dysfunction a characteristic of end-stage renal disease (ESRD) patients due to uraemia (Kato *et al.*, 2008), parasite colonization can represent a risk factor in ESRD patients. In accordance, the major causes of death in ESRD patients are cardiovascular disease and infections, together accounting for up to 70% of all deaths in this patient population (Kato, *et al.*, 2008). In this population several reports demonstrate the risk of intestinal protozoa colonization (Barazesh, Fouladvand, Tahmasebi, Heydari, & Fallahi, 2015; Gil *et al.*, 2013; Visvesvara *et al.*, 2013). In Brazil, Gil and colleagues reported a prevalence of 51.6% of intestinal parasites in hemodialysis patients, but although the prevalence of colonization did not differ from control patients, ESRD patients were more easily symptomatic than controls (Gil, *et al.*, 2013). In Iran, Barazesh and colleagues reported a 28.4% of hemodialysis patients infected with one or more intestinal parasites (Barazesh, *et al.*, 2015). Blastocystishominis, *Entamoeba coli* and *Cryptosporidium* were the most common parasitic infections in ESRD patients (Barazesh, *et al.*, 2015; Gil, *et al.*, 2013).

Peritoneal dialysis (PD) is a home-based widely used renal replacement therapy, and represents an alternative to hemodialysis (HD), with comparable survival, lower cost, and improved

quality of life (Chaudhary, Sangha, & Khanna, 2011). In PD, the patients peritoneal membrane is used as a dialysis membrane. Sterile dialysis fluid is introduced through a catheter into the abdominal cavity, drained and refreshed several times during the day and throughout the night. Despite the improvements in the last decades, infection-related morbidity is still a significant complication in PD patients, accounting for 16 to 18% of the deaths in this population, as well as catheter loss, transfer to HD or prolonged hospitalization (Bloembergen & Port, 1996; Pereira, Sayegh, & Blake, 2005; Szeto, Wong, Chow, Leung, & Li, 2003). Therefore, prevention of infection is crucial for the success of PD therapy (Barraclough, Hawley, Playford, & Johnson, 2009).

Taking into account that there were no studies evaluating oral protozoa colonization in Portugal and that in ESRD patients undergoing PD the focus of infection should be a major concern, the aim of this study was to evaluate protozoa colonization in saliva of Portuguese healthy individuals and ESRD patients undergoing PD therapy at the Hospital S. João, the main hospital from the North of Portugal.

MATERIAL AND METHODS

Study participants

A group of ESRD patients undergoing PD therapy at the outpatient clinic of the Nephrology Department of “Centro Hospitalar de S. João” (Porto, Portugal) was invited to participate in the present study. Also, non-ESRD family members living at the same house and closest in age were invited to participate as control group. The study was explained orally and a written informed consent was obtained from all participants. The written informed consent as well as the study protocols were in accordance with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983, and were approved by the Ethics Committee of “Centro Hospitalar de S. João”. Exclusion criteria were applied, namely: (a) inability to give informed consent, (b) pregnancy, and (c) severe acute illness. The study sample included 39 PD patients and 18 family volunteers.

Clinical patient information was gathered, including: (a) age, (b) gender, (c) ethnicity, (d) education level, (e) aetiology of renal disease, (f) time on renal replacement therapy (RRT), (g) past

and present peritonitis episodes, and (h) microbial agents responsible for peritonitis episodes. Also, information regarding the water source consumption was obtained.

Sample collection

Saliva was collected from all participants for protozoa analysis. Patients were instructed not to eat, drink or perform the normal oral hygiene at least two hours before the procedure. Samples of stimulated saliva were collected by the spitting of whole-mouth saliva during chewing paraffin pellets for 5 minutes (Ivoclar Vivadent, NY, USA).

Protozoa evaluation

Stimulated saliva was collected from each patient and placed in eightsmears (50µl each). Microscopic evaluation was performed by direct mounts with Lugol’s iodine solution and after staining with Giemsa, Trichrome and Kinyoun techniques, in duplicate. Microscopic observation and photographs were performed using a Leica DM4000B microscope (Wetzlar, Germany) connected to a camera Leica DFC320 with 400x and 1000x amplification. The images were processed using Leica Application Suite software (version 2.3.1 R1).

Data analysis

Statistical analyses were performed by using IBM® SPSS® version 21.0 (Statistical Package for Social Sciences). The categorical variables were described through relative frequencies (%) and analysed by Chi-square independence test. Continuous variables were described using mean ± standard deviation (SD) and analysed by student’s t-test. A $P < 0.05$ was assumed to denote a significant difference.

RESULTS

Demographic data from PD patients and controls are shown in Table I. Control family members were slightly younger and females were more prevalent in controls than in PD patients, although no significant differences were observed regarding age and gender. In general, education level was low in both control and study groups, with no significant differences between groups.

Table I. Demographical data from ESRD patients undergoing peritoneal dialysis (PD) and healthy family members controls.

	PD patients	Controls	Pvalue
Age (years)	45.4±14.6	37.5±16.8	0.800a
Gender			0.082b
Male	51.2%	27.2%	
Female	48.8%	72.2%	
Education level			0.064b
Illiterate	4.9%	0%	
Elementary School	63.4%	38.9%	
High school	9.8%	33.3%	
University	9.8%	16.7%	

Results are shown in prevalence (%) or mean±SD. ^aStudent's t-test and ^bChi-square independence test.

In PD patients, the most prevalent aetiologies of chronic kidney disease were chronic glomerulonephritis (19.5%, with a high prevalence of IgA nephropathy) and diabetic nephropathy (14.6%). The mean time on PD program was 12.7 months. Before the study, 25.6% of the PD patients had previous peritonitis episodes and gram-positive cocci were the most prevalent isolated microorganisms. None of the patients had reported peritonitis caused by fungi or protozoa.

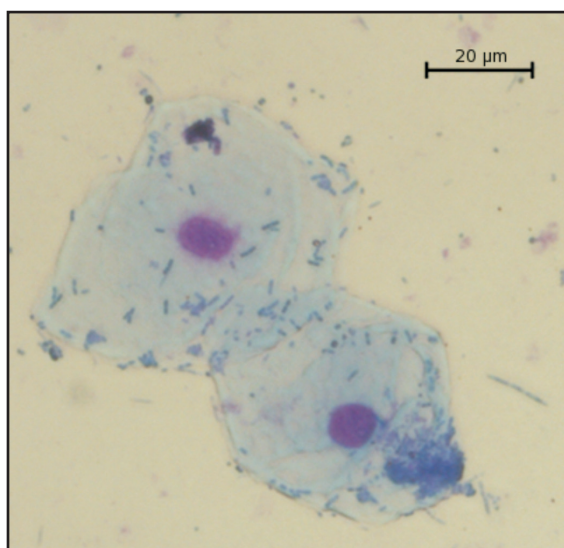
Most participants drank treated water from urban water supply network (68.3%), although 19.5% still used water from private water-well or water-borehole. We were not able to obtain information regarding the water source from 12.2% of PD patients.

In this study, oral protozoa colonization was assessed in stimulated saliva due to the low salivary rates observed in many PD patients. Concerning the microscopic observation of saliva, normal epithelial cells and oral microbiota (cocci, bacilli and, in some cases, yeasts) (Fig. 1) were observed in the wet mounts of all samples. Despite the use of specific staining methods for *E. gingivalis*, *T. tenax*, *Giardia* sp and *Cryptosporidium* sp, an amoeba was observed in only one PD patient (2.6%) (Fig. 2). The respective family member control, as well as all other participants of the study, did not present oral protozoa colonization.

DISCUSSION

This is the first study to evaluate oral protozoa colonization in a Portuguese population of

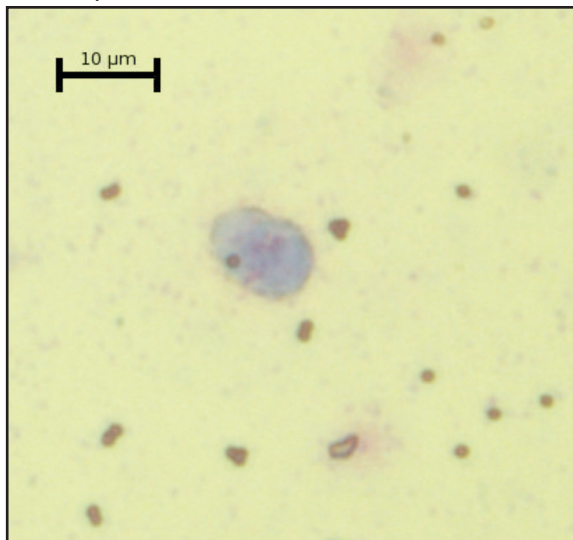
Fig. 1. Microscopic view of saliva samples after giemsa staining, showing an assortment of epithelial cells and bacteria (400x, Leica DFC320).



ESRD patients undergoing PD and respective family controls, as no other study was found in the literature.

It is well known that oral microbial colonization is strongly correlated with oral hygiene, dietary habits and familiar pre disposition; additionally, oral protozoa prevalence is associated with living environment conditions as well as alimentary habits (Almeida *et al.*, 2010; Smith, Caccio, Cook, Nichols, & Tait, 2007). Thus, for this type of studies, the recommended control group should be family members of the patients, as here employed, rather than unrelated healthy individuals (C. Areias *et*

Fig. 2. Microscopic view of saliva sample after trichrome staining, showing a trophozoite of an amoeba with a centrally karyosome, peripheral chromatin and a granular cytoplasm (400x, Leica DFC320).



al., 2012; C. M. Areias, Sampaio-Maia, Guimaraes, Melo, & Andrade, 2011). In addition, evaluation of oral protozoa colonization in PD patients' family members is crucial since they could represent potential source of infection and act as vehicles for opportunistic microorganism transmission.

In this study only one PD patient presented oral protozoa colonization, probably by *Entamoeba gingivalis* due to the fact that is the most frequent amoeba in the oral cavity. Interestingly, protozoa colonization was not observed in his corresponding control. Despite the very low oral protozoa colonization among the studied PD population, no protozoa were observed in the control group, probably suggesting a higher susceptibility of PD patients to protozoa colonization in comparison to non-ESRD individuals.

In particular, the patient presenting an amoeba in saliva was suggested to be immune compromised, given that *Aspergillus fumigatus* and *Acinetobacter baumannii* were identified in his bronchial secretions before his death, 6 months after saliva collection for protozoa isolation. Despite the fact that no peritonitis episodes were described in this patient before the study, two peritonitis occurred one and five months after saliva collection, caused by

Streptococcus sp. and *Escherichia coli* respectively, this last in the context of an intestinal perforation that resulted in the patient's death. Future studies with a larger sample group are required to confirm this difference between health and CKD patients.

It has been previously documented that oral protozoa prevalence may vary significantly with the geographic distribution (Wantland & Lauer, 1970). Despite the fact that no data are available for the Portuguese population this study, performed at the main reference hospital of the North of Portugal, could suggest a low colonization among the northern Portuguese population. In accordance to this, a Portuguese study performed on the water basins and rivers from the north of Portugal reported the existence of a low infection risk for protozoa with surface raw and drinking water samples (Almeida, *et al.*, 2010). However, it is well established that drinking water from private wells or boreholes may represent a significant risk for infection transmission. In our study, 20% of the individuals obtained their drinking water from private wells or boreholes; so, the low rate of protozoa colonization may be explained by the generalized access of our population to water from the public network system. Despite this, the water source of the PD patient colonized by protozoa in saliva was the public network system, what may suggest that others transmission routes may have a significant impact in the oral colonization by these infectious agents.

The low rate of oral protozoa in our PD patients, namely 2.6%, and its absence in their healthy family controls may also be conditioned by the limited number of patients analysed, as well as by the methodology applied. The direct visualization of cells (cysts or trophozoites) in the samples presents lower sensitivity and specificity than other methods, such as immunofluorescence and enzyme immunoassays, culture methods, PCR as well as flow cytometry (J. Barbosa, Costa-de-Oliveira, Rodrigues, & Pina-Vaz, 2008; J. M. Barbosa *et al.*, 2008).

In conclusion, very low oral protozoa colonization was found in this study, suggesting that this may reflect the oral protozoa colonization of Portuguese population. Future studies are required to evaluate the possible higher susceptibility to oral protozoa colonization of ESRD patients undergoing PD.

ACKNOWLEDGEMENTS

LSS is supported by SFRH/BD/84837/2012 and ISS is supported by SFRH/BPD/101016/2014 from FCT/QREN-POPH/FSE. This work was financed by FEDER - Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional funds through the COMPETE 2020 - Operacional Programme for Competitiveness and Internationalisation (POCI), Portugal 2020, and by Portuguese funds through FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia/ Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação in the framework of the project "Institute for Research and Innovation in Health Sciences" (POCI-01-0145-FEDER-007274); and by IJUP projects, University of Porto.

The funding sources had no involvement in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Almeida, A., Moreira, M. J., Soares, S., Delgado Mde, L., Figueiredo, J., Silva, E., *et al.* (2010). Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in drinking water samples in the north of Portugal. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Korean J Parasitol*, **48**: 43-48. **doi:** 10.3347/kjp.2010.48.1.43
- Areias, C., Sampaio-Maia, B., Pereira Mde, L., Azevedo, A., Melo, P., Andrade, C., *et al.* (2012). Reduced salivary flow and colonization by mutans streptococci in children with Down syndrome. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Clinics (Sao Paulo)*, **67**: 1007-1011. **doi:** 10.6061/clinics/2012(09)04
- Areias, C. M., Sampaio-Maia, B., Guimaraes, H., Melo, P., & Andrade, D. (2011). Caries in Portuguese children with Down syndrome. *Clinics (Sao Paulo)*, **66**: 1183-1186. **doi:** 10.1590/S1807-59322011000700010
- Bahrani-Mougeot, F. K., Paster, B. J., Coleman, S., Ashar, J., Barbuto, S. & Lockhart, P. B. (2008). Diverse and novel oral bacterial species in blood following dental procedures. [Randomized Controlled Trial Research Support, N.I.H., Extramural]. *J Clin Microbiol*, **46**: 2129-2132. **doi:** 10.1128/JCM.02004-07
- Barazesh, A., Fouladvand, M., Tahmasebi, R., Heydari, A. & Fallahi, J. (2015). The prevalence of intestinal parasites in hemodialysis patients in Bushehr, Iran. *Hemodial Int*, **19**: 447-451. **doi:** 10.1111/hdi.12272
- Barbosa, J., Costa-de-Oliveira, S., Rodrigues, A. G. & Pina-Vaz, C. (2008). Optimization of a flow cytometry protocol for detection and viability assessment of *Giardia lamblia*. [Evaluation Studies]. *Travel Med Infect Dis*, **6**: 234-239. **doi:** 10.1016/j.tmaid.2008.01.004
- Barbosa, J. M., Costa-de-Oliveira, S., Rodrigues, A. G., Hanscheid, T., Shapiro, H., & Pina-Vaz, C. (2008). A flow cytometric protocol for detection of *Cryptosporidium* spp. *Cytometry A*, **73**: 44-47. **doi:** 10.1002/cyto.a.20502
- Barracough, K. A., Hawley, C. M., Playford, E. G., & Johnson, D. W. (2009). Prevention of access-related infection in dialysis. [Review]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, **7**: 1185-1200. **doi:** 10.1586/eri.09.100
- Bergquist, R. (2009). Parasitic infections affecting the oral cavity. [Review]. *Periodontol 2000*, **49**: 96-105. **doi:** 10.1111/j.1600-0757.2008.00294.x
- Bloembergen, W. E. & Port, F. K. (1996). Epidemiological perspective on infections in chronic dialysis patients. [Comparative Study Review]. *Adv Ren Replace Ther*, **3**: 201-207.
- Cambon, M., Petavy, A. F., Guillot, J., Glandier, I., Deguillaume, J. & Coulet, M. (1979). [A study of the frequency of protozoa and yeasts isolated from the parodontium of 509 subjects (author's transl)]. *Pathol Biol (Paris)*, **27**: 603-606.
- Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna Jde, J., Garcia-Latorre, E., Tsutsumi, V. & Shibayama, M. (2008). Characterization of brain inflammation during

- primary amoebic meningoencephalitis. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Parasitol Int*, **57**: 307-313. doi: 10.1016/j.parint.2008.01.006
- Chaudhary, K., Sangha, H. & Khanna, R. (2011). Peritoneal dialysis first: rationale. [Review]. *Clin J Am Soc Nephrol*, **6**: 447-456. doi: 10.2215/CJN.07920910
- Favoreto Junior, S., & Machado, M. I. (1995). [Incidence, morphology and diagnostic studies of *Entamoeba gingivalis*, Gros, 1849]. [Comparative Study]. *Rev Soc Bras Med Trop*, **28**: 379-387.
- Feki, A., Molet, B., Haag, R., & Kremer, M. (1981). [Protozoa of the human oral cavity (epidemiological correlations and pathogenic possibilities)]. *J Biol Buccale*, **9**: 155-161.
- Ferreira, M. S. (2000). Infections by protozoa in immunocompromised hosts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **95(Suppl 1)**: 159-162.
- Ghabanchi, J., Zibaei, M., Afkar, M. D. & Sarbazie, A. H. (2010). Prevalence of oral *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in patients with periodontal disease and healthy population in Shiraz, southern Iran. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Indian J Dent Res*, **21**: 89-91. doi: 10.4103/0970-9290.62821
- Gil, F. F., Barros, M. J., Macedo, N. A., Junior, C. G., Redoan, R., Busatti, H., et al. (2013). Prevalence of intestinal parasitism and associated symptomatology among hemodialysis patients. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **55**: 69-74.
- Kato, S., Chmielewski, M., Honda, H., Pecoits-Filho, R., Matsuo, S., Yuzawa, Y., et al. (2008). Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease. [Review]. *Clin J Am Soc Nephrol*, **3**: 1526-1533. doi: 10.2215/CJN.00950208
- Kaushal, V., Chhina, D. K., Kumar, R., Pannu, H. S., Dhoria, H. P. & Chhina, R. S. (2008). Acanthamoeba encephalitis. [Case Reports]. *Indian J Med Microbiol*, **26**: 182-184. doi: 10.4103/0255-0857.40539
- Kshirsagar, A. V., Craig, R. G., Moss, K. L., Beck, J. D., Offenbacher, S., Kotanko, P., et al. (2009). Periodontal disease adversely affects the survival of patients with end-stage renal disease. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Kidney Int*, **75**: 746-751. doi: 10.1038/ki.2008.660
- Kumatowska, A. J., Dudko, A. & Kumatowski, P. (2004). [Invasion of *Trichomonas tenax* in patients with periodontal diseases]. *Wiad Parazytol*, **50**: 397-403.
- Li, X., Kolltveit, K. M., Tronstad, L. & Olsen, I. (2000). Systemic diseases caused by oral infection. [Review]. *Clin Microbiol Rev*, **13**: 547-558. doi: 10.1128/CMR.13.4.547-558.2000
- Madhi, N. K., & Saeed, A. T. (1993). *Trichomonas tenax* in Basrah, Iraq. *J Pak Med Assoc*, **43**: 261-262.
- Palmieri, J. R., Halverson, B. A., Sudjadi, S. T., Purnomo, & Masbar, S. (1984). Parasites found in the mouths of inhabitants of three villages of South Kalimantan (Borneo), Indonesia. *Trop Geogr Med*, **36**: 57-59.
- Pereira, B., Sayegh, M., & Blake, P. (2005). Chronic Kidney Disease, Dialysis, & Transplantation: A Companion to Brenner & Rector's The Kidney (2nd Edition ed.).
- Pomes, C. E., Bretz, W. A., de Leon, A., Aguirre, R., Milian, E. & Chaves, E. S. (2000). Risk indicators for periodontal diseases in Guatemalan adolescents. *Braz Dent J*, **11**: 49-57.
- Smith, H. V., Caccio, S. M., Cook, N., Nichols, R. A., & Tait, A. (2007). *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet Parasitol*, **149(1-2)**: 29-40. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.07.015
- Stark, D., Barratt, J. L., van Hal, S., Marriott, D., Harkness, J. & Ellis, J. T. (2009). Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. [Review]. *Clin Microbiol Rev*, **22**: 634-650. doi: 10.1128/CMR.00017-09
- Szeto, C. C., Wong, T. Y., Chow, K. M., Leung, C. B. & Li, P. K. (2003). Are peritoneal dialysis patients

- with and without residual renal function equivalent for survival study? Insight from a retrospective review of the cause of death. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nephrol Dial Transplant*, **18**: 977-982.
- Visvesvara, G. S., Arrowood, M. J., Qvarnstrom, Y., Sriram, R., Bandea, R., Wilkins, P. P., *et al.* (2013). Concurrent parasitic infections in a renal transplant patient. [Letter]. *Emerg Infect Dis*, **19**: 2044-2045. doi: 10.3201/eid1912.120926
- Vrablic, J., Tomova, S., Catar, G., Randova, L. & Suttova, S. (1991). [Morphology and diagnosis of *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* and their occurrence in children and adolescents]. *Bratisl Lek Listy*, **92**: 241-246.
- Wantland, W. W. & Lauer, D. (1970). Correlation of some oral hygiene variables with age, sex, and incidence of oral protozoa. *J Dent Res*, **49**: 293-297.

Recibido el 28/11/2015
Aceptado el 28/07/2016

Primer reporte de *Cyclospora cayetanensis* en una comunidad indígena Kariña del municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela

First report of Cyclospora cayetanensis in an indigenous Kariña A community in Sucre state, Venezuela

Erika Gómez Martínez¹, Lourdes Figuera^{2,3*}, Del Valle Guilarte², Zulay Simoni¹, Marcos Tulio Díaz¹, Mariolga Berrizbeitia⁴ & Sayreth Cerrada²

RESUMEN

Cyclospora cayetanensis es un protozoario emergente, considerado un patógeno importante causante de diarrea endémica y epidémica en niños y adultos en todo el mundo. En el estado Sucre, son escasas las investigaciones dedicadas al diagnóstico de los coccidios intestinales y se desconocen los aspectos epidemiológicos asociados con estos parásitos. En este sentido, se realizó un estudio en la comunidad indígena Kariña de Piñantal, estado Sucre, Venezuela, con la finalidad de determinar la prevalencia de las enteroparasitosis haciendo énfasis en los coccidios intestinales. Para ello, se recolectaron 141 muestras fecales de individuos de ambos géneros con edades comprendidas entre 0 y 60 años. El diagnóstico parasitológico se realizó mediante el examen directo, técnica de filtración de formol al 5%, dicromato de potasio al 2,5%, coloración de Kinyoun y micrometría ocular. La prevalencia de enteroparasitosis fue de 82,98%, destacándose el cromista *Blastocystis* spp. (60,80%), *Endolimax nana* (24,70%) y *Ascaris lumbricoides* (25,53%). De los coccidios intestinales evaluados, sólo se encontró *Cyclospora cayetanensis* (10%), resultando los individuos menores de 20 años los más afectados (85,71%); esta alta prevalencia de *C. cayetanensis* refleja precarias condiciones de vida asociadas con insalubridad y falta de educación en la población indígena Kariña. De los individuos con ciclosporiasis, sólo el 36% presentó diarrea y el 64% restante resultaron portadores asintomáticos, lo que representa un riesgo epidemiológico que debe ser tomado en cuenta por los organismos sanitarios competentes para la implementación del diagnóstico de coccidios de forma rutinaria, contribuyendo así a la prevención de brotes.

Palabras clave: *Cyclospora cayetanensis*, enteroparasitosis, indígenas, coccidios intestinales.

SUMMARY

Cyclospora cayetanensis is an emerging protozoan pathogen considered as a major cause of endemic and epidemic diarrhea in children and adults worldwide. In Sucre state, Venezuela, few investigations have focused on the diagnosis of intestinal coccidia, and the epidemiological aspects associated with these intestinal parasites are unknown. The prevalence of enteroparasitosis, in particular intestinal coccidian, was studied in an indigenous Kariña community in Piñantal, Sucre state, Venezuela. A total of 141 fecal specimens were collected from individuals of both sexes, aged between 0 and 60 years. Parasitological diagnosis was done by direct examination, filtration technique with 5% formalin, 2.5% potassium dichromate, Kinyoun stain and ocular micrometry. The total prevalence of intestinal parasites was 82.98% with the chromista *Blastocystis* spp. (60.8%), *Endolimax nana* (24.7%) and *Ascaris lumbricoides* (25.53%), being the most abundant species. Of the evaluated intestinal coccidia, only *Cyclospora cayetanensis* (10%) was found, with individuals under 20 years old being the most affected (85.71%). The high prevalence of *C. cayetanensis* reflects inadequate living conditions associated with poor health and a lack of education among the indigenous Kariña population. Of the individuals infected with *Cyclosporiasis*, only 36% had diarrhea and the remaining 64% were asymptomatic carriers, these latter representing an epidemiological risk. This should be taken into account by the competent health authorities and the diagnosis of coccidia conducted routinely in order to reduce outbreaks.

Key words: *Cyclospora cayetanensis*, enteroparasitosis, indigenous, intestinal coccidia.

¹ Laboratorio de Parasitología. Departamento de Biomedicina. Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas "Dra. Susan Tai", Universidad de Oriente, Venezuela.

² Laboratorio de Especialidades Parasitológicas, Departamento de Bioanálisis, Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Venezuela.

³ Laboratorio de Biología Molecular. Departamento de Biomedicina. Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas "Dra. Susan Tai", Universidad de Oriente, Venezuela.

⁴ Postgrado en Biología Aplicada, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

*Autor de correspondencia: lourdesfiguera2268@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

Las enteroparasitosis constituyen un grave problema de salud pública en las poblaciones rurales de los países tropicales y subtropicales en vías de desarrollo, afectando principalmente a la población infantil, generando efectos nocivos sobre la salud tales como desnutrición, anemia, retraso en el crecimiento y disminución en el rendimiento físico y mental (PAHO/OMS, 2003; Ezeamama *et al.*, 2005).

La presencia, persistencia y diseminación de los parásitos intestinales están directamente asociadas con condiciones socioeconómicas y ambientales naturales. Las primeras están referidas a la pobreza económica familiar, características culturales, ausencia de saneamiento ambiental, inadecuados hábitos higiénicos, contaminación fecal del suelo y alimentos, viviendas inadecuadas, baja escolaridad y deficiente suministro de agua potable (Cardona-Arias *et al.*, 2014). Las condiciones ambientales naturales están relacionadas con las características climatológicas (temperatura, humedad, precipitación) y del suelo, las cuales favorecen la maduración y viabilidad de los geohelminos y algunos coccidios intestinales (Maldonado *et al.*, 2008)

Actualmente, dentro de las enteroparasitosis que afectan al hombre se incluyen las causadas por los coccidios intestinales, los cuales son protozoarios intracelulares obligados que pertenecen a la familia Eimeriidae y al phylum Apicomplexa, reconocidos como patógenos emergentes y reemergentes principalmente del tracto gastrointestinal tanto en individuos inmunocompetentes como en inmunosuprimidos (Botero & Restrepo, 2012).

Los coccidios intestinales se agrupan en 4 géneros que pueden parasitar al humano: *Cryptosporidium*, *Cystoisospora*, *Cyclospora* y *Sarcocystis* (Goodgame, 1996). Éstos producen manifestaciones clínicas que varían desde infecciones asintomáticas o sintomáticas donde puede presentarse desde una diarrea acuosa y voluminosa pero autolimitada, esteatorrea, fiebre, cefalea, dolor abdominal, y pérdida de peso en individuos inmunocompetentes, hasta diarrea crónica, caquexia e inclusive la muerte en individuos inmunosuprimidos por diversas causas (Goodgame, 2003; Nuñez *et al.*, 2003).

El diagnóstico de los coccidios intestinales se basa en la demostración de los ooquistes en las muestras fecales por métodos directos y por diferentes técnicas de coloración, siendo la de Ziehl-Neelsen modificada o Kinyoun una de las técnicas más utilizadas que permite la visualización de los ooquistes como estructuras ácido-alcohol resistentes, pero no es solicitada por el médico interconsultante (Chacón *et al.*, 2009).

La identificación de los cuatro géneros se basa principalmente en el tamaño de los ooquistes y en algunos aspectos morfológicos diferenciales. Los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. miden de 4-6 μm , los de *Cyclospora cayetanensis* miden de 8-10 μm , los de *Cystoisospora belli* miden entre 20-33 μm y los de *Sarcocystis* spp. miden entre 15-19 μm (Clarke y McIntyre, 2001). En este sentido, es importante sugerirle al médico y hacer énfasis que aquellos individuos con síntomas gastrointestinales crónicos, independientemente de su estado inmunológico, deben realizarse la coloración especial (Ziehl-Neelsen modificada o Kinyoun) recomendada, la cual no está incluida en el análisis coproparasitológico convenido por los laboratorios clínicos de la red asistencial, permitiendo así que las coccidiosis intestinales puedan ser diagnosticadas y lograr la administración de un tratamiento efectivo.

En Venezuela, se han llevado a cabo diversos estudios sobre coccidios intestinales en los estados: Bolívar, Falcón, Zulia y el Distrito Capital (Devera *et al.*, 2005a; Tutaya *et al.*, 2006; Tedesco *et al.*, 2012; Chacín-Bonilla *et al.*, 2003; Chacón *et al.*, 2009; Cazorla *et al.*, 2012; Rivero-Rodríguez *et al.*, 2013); sin embargo, en el estado Sucre, son escasas las investigaciones realizadas sobre los coccidios intestinales en individuos inmunocompetentes y en poblaciones indígenas que viven en áreas rurales y que constituyen los grupos con condiciones de vida más vulnerables a las parasitosis intestinales. En este sentido, se realizó un estudio en una comunidad indígena Kariña del estado Sucre, Venezuela, con el propósito de determinar la prevalencia de las enteroparasitosis haciendo énfasis en los coccidios intestinales, de los cuales existe un subregistro de casos y así aportar nuevos datos epidemiológicos que contribuyan a dilucidar la situación real de las coccidiosis intestinales en el Oriente del país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Se realizó un estudio de tipo prospectivo y transversal en el centro poblado Piñantal, en el municipio Sucre, parroquias Santa Fe y Raúl Leoni, durante los meses febrero-octubre del año 2009, en la zona conocida como la Meseta de Santa Fe, situado al oeste del estado Sucre a unos 74 Km de la ciudad de Cumaná. La población se encuentra localizada a 10°09'56.90'' de latitud norte y 6.4°18'17.58'' de longitud oeste, a una altura de 336 msnm. Corresponde a una zona rural boscosa habitada exclusivamente por una comunidad indígena Kariña, cuya principal actividad económica de subsistencia es la agricultura (cultivos de maíz, plátano, frijol, ocumo chino, ñame, yuca y auyama), carente de los servicios básicos como agua potable, aseo, entre otros.

Muestra poblacional

En una primera etapa del muestreo se llevó a cabo la sensibilización de la población. Para esto, se realizaron conversaciones con las autoridades de la comunidad organizada y posteriormente, se dictaron sesiones educativas con el propósito de informarles los objetivos del estudio, fomentando así su mayor participación y colaboración. Previo consentimiento verbal y aceptación de participación voluntaria, se recolectaron 141 muestras fecales de individuos de ambos géneros y todas las edades, excluyendo aquellos que habían recibido tratamiento antiparasitario un mes antes de realizar el estudio.

A cada individuo se le aplicó una encuesta epidemiológica cumpliendo con los parámetros establecidos en la declaración de Helsinki (CIOMS, 1993).

Recolección de las muestras fecales

A todos los habitantes de la comunidad indígena Kariña, se les entregó un recolector de heces, explicándoles las indicaciones para realizar una adecuada toma de muestra. Se obtuvo una muestra única de heces de cada individuo por evacuación espontánea, se colocó 1 gramo de heces en un vial con formol al 5% para su preservación y otro gramo de heces en viales con dicromato de potasio al 2,5% para el estudio de coccidios intestinales. Posteriormente,

todas las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Parasitología del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas “Dra. Susan Tai” de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, hasta el momento de su análisis. Es importante mencionar que el presente trabajo de investigación fue realizado en una población indígena muy lejana, de difícil acceso y la recolección de muestras de heces seriadas resulta un proceso muy complicado.

Diagnóstico parasitológico

Todas las muestras de heces fueron examinadas mediante el examen directo con solución salina fisiológica 0,85% y lugol (Botero y Restrepo, 2012), la técnica de formol al 5% con la finalidad de conservar o preservar las estructuras parasitarias (trofozoítos y quistes de protozoarios y huevos y larvas de helmintos) (Navajas *et al.*, 2004) y dicromato de potasio al 2,5% para la conservación e inducción de la maduración de los ooquistes de coccidios intestinales (Huiza *et al.*, 2004; Vásquez *et al.*, 2000). En este sentido, las muestras sometidas a dicromato de potasio al 2,5% fueron colocadas a temperatura ambiente y aerobiosis, realizando una revisión microscópica interdiaria durante 10 días.

Se realizó la coloración de Kinyoun (Tello-Casanova, 2000) a los frotis de heces frescas y a las muestras sometidas a esporulación en dicromato de potasio al 2,5% en la búsqueda de ooquistes ácido alcohol resistentes compatibles con la morfología de los coccidios intestinales: *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium* spp. y *Cystoisospora belli*, confirmándose el diagnóstico mediante micrometría ocular.

Análisis de los datos

Los resultados se presentaron en tablas de prevalencia expresados en porcentaje. Se aplicó la prueba ji cuadrada (χ^2) a un nivel de confiabilidad del 95% (Wayne, 2002) para establecer las posibles asociaciones entre los parásitos encontrados y los datos epidemiológicos evaluados tales como: edad, género, ocupación, grado de instrucción, disposición de las excretas, obtención y consumo de agua, uso de calzado y presencia de animales.

RESULTADOS

De los 141 individuos evaluados en la comunidad indígena Kariña de Piñantal del municipio Sucre, estado Sucre, se demostró una prevalencia de enteroparasitosis de 82,98% y un poliparasitismo de 41,84%, predominando el cromista *Blastocystis* spp. y los protozoarios (68,79%), con respecto a los helmintos (26,95%).

El grupo de edades más afectado estuvo conformado por niños entre 0 y 9 años tanto por el cromista *Blastocystis* spp. como por protozoarios y helmintos con 34,04% y 17,02%, respectivamente (Tabla I). El 61,86% de los individuos parasitados correspondieron al sexo femenino.

De todos los parásitos intestinales identificados, se destaca el cromista *Blastocystis* spp. con una frecuencia de 60,28%. Entre los protozoarios intestinales se encontraron *Endolimax nana* (24,70%), *Entamoeba coli* (22,70%) y *Giardia duodenalis* (18,44%). Los helmintos más prevalentes fueron *Ascaris lumbricoides* (25,53%), *Trichuris trichiura* (9,22%) y Ancylostomídeos (7,09%). Adicionalmente, se detectó mediante la técnica de formol al 5%, la presencia de un caso de *Hymenolepis nana* (0,71%) y *Taenia* sp. (0,71%), (Tabla II).

De todos los coccidios intestinales evaluados solo se encontró *Cyclospora cayetanensis*. La prevalencia de este coccidio se evidenció en el 5% (7 casos) de los individuos analizados mediante la coloración de Kinyoun realizada a los extendidos

de heces frescas. Sin embargo, empleando la técnica de esporulación en dicromato de potasio al 2,5%, se encontró un total de 14 individuos infectados, representando una prevalencia real de 10% de este coccidio intestinal. Todos los hallazgos de *C. cayetanensis* fueron confirmados por micrometría ocular (Fig. 1).

Es importante destacar que de los 14 individuos infectados con *C. cayetanensis*, solo 5 (36%) presentaron diarrea en el momento de realizar la recolección de la muestra de heces; el 64% restante correspondieron a individuos sin ninguna manifestación clínica aparente.

Fig. 1. Ooquiste inmaduro de *Cyclospora cayetanensis* visualizado en una muestra fecal con solución salina fisiológica al 0,85% (1000X).



Tabla I. Prevalencia de parásitos intestinales por grupos de edades de la población indígena Kariña de Piñantal, municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela, 2009.

Grupos de edad (años)	Cromista y/o protozoarios		Helmintos	
	N°	%	N°	%
0-9	48	34,04	24	17,02
10-19	23	16,31	6	4,26
20-29	11	7,80	2	1,42
30-39	8	5,67	4	2,84
40-49	3	2,13	1	0,71
50-59	4	2,84	1	0,71
60 y más	0	0	0	0
Total	97	68,79	38	26,95

Tabla II. Prevalencia de parásitos intestinales en habitantes de la población indígena Kariña de Piñantal, municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela, 2009.

Parásitos intestinales	n	%
Cromista		
<i>Blastocystis</i> spp.	85	60,28
Protozoarios		
<i>Endolimax nana</i> *	34	24,70
<i>Entamoeba coli</i> *	32	22,70
<i>Giardia duodenalis</i>	26	18,44
Complejo <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	6	4,26
<i>Iodamoeba büstchlii</i> *	2	1,42
Helmintos		
<i>Ascaris lumbricoides</i>	36	25,53
<i>Trichuris trichiura</i>	13	9,22
Ancylostomídeos	10	7,09
<i>Hymenolepis nana</i>	1	0,71
<i>Taenia</i> sp.	1	0,71

*protozoarios comensales

Con respecto a la distribución de *C. cayetanensis* según la edad, el sexo y la ocupación de los individuos en la población indígena Kariña de Piñantal, el 85,71% se encontró en el grupo de los menores de 20 años, el 71,43% pertenecían a individuos del sexo femenino y el 85,71% eran estudiantes de primaria (Tabla III).

Los parásitos asociados a la presencia de *C. cayetanensis*, fueron: *Blastocystis* spp. (79%), *Endolimax nana* (43%) y *Trichuris trichiura* (14%) (Tabla IV).

Tabla III. Individuos infectados con *Cyclospora cayetanensis* por grupos de edad en la población indígena Kariña de Piñantal, municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela, 2009.

Grupos de edad (años)	Muestras examinadas	N° de individuos con <i>C. cayetanensis</i>	%
0-9	75	8	57,14
10-19	30	4	28,57
20-29	14	1	7,14
30-39	12	0	0
40-49	3	0	0
50-59	6	1	7,14
60 y más	1	0	0
Total	141	14	100

En relación a las variables epidemiológicas evaluadas (disposición de excretas, obtención de agua, consumo de agua, uso de calzado y presencia de animales) y su posible asociación con la infección por *C. cayetanensis*, solo se encontró asociación estadística significativa con la disposición de la basura con una probabilidad mayor al 95%.

Tabla IV. Parásitos asociados a *Cyclospora cayetanensis* en habitantes de la población indígena Kariña de Piñantal, municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela, 2009.

Parásitos intestinales	n	%
Protozoarios		
<i>Endolimax nana</i> *	6	43
<i>Entamoeba coli</i> *	4	29
<i>Giardia duodenalis</i>	2	14
Complejo <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	2	14
<i>Iodamoeba büstchlii</i> *	1	7
Cromista		
<i>Blastocystis</i> spp.	11	79
Helmintos		
<i>Trichuris trichiura</i>	2	14
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1	7

*protozoarios comensales

DISCUSIÓN

La alta prevalencia de parasitosis intestinal (82,98%) aunado al poliparasitismo (41,84%) encontrado en los individuos de la comunidad indígena Kariña de Piñantal del municipio Sucre, estado Sucre, refleja una gran susceptibilidad a las enteroparasitosis, probablemente asociado con múltiples factores que incluyen el inadecuado saneamiento ambiental, ausencia de sistemas para la eliminación de las excretas, falta de suministro de agua potable, falta de educación, precarias condiciones socioeconómicas y deficientes medidas higiénico-sanitarias. Esta prevalencia es comparable a las reportadas en otras comunidades indígenas venezolanas por Bracho *et al.*, 2014 y Rivero *et al.*, 2007 en el estado Zulia, y Devera *et al.*, 2005b en el estado Delta Amacuro. Asimismo, en comunidades indígenas de otros países subdesarrollados o en vías de desarrollo, se han registrado elevadas prevalencias de enteroparasitosis, tal es el caso de Colombia (Bermúdez *et al.*, 2013), Brasil (Borges *et al.*, 2009) y Argentina (Navone *et al.*, 2006). Adicionalmente, en el presente trabajo de investigación es relevante señalar que al emplear el examen directo de las heces se encontró una prevalencia de parasitosis intestinal de 78,01%, la cual aumentó a 82,98% al implementar la técnica del formol, es decir, hubo un incremento en un 5% de la prevalencia de las enteroparasitosis, por lo que se recomienda la utilización de esta técnica en los trabajos de campo que incluyan el análisis parasitológico de las heces, ya que tiene la ventaja de ser económico, fácil de aplicar, permite preservar las diferentes formas evolutivas y además elimina residuos fecales de la muestra que interfieren con la visualización microscópica de los parásitos intestinales, evitando obtener falsos negativos.

Con respecto a la prevalencia de las enteroparasitosis en individuos según el grupo de edades, se encontró que los más afectados por protozoarios (34,04%) y helmintos (17,02%) correspondieron a los niños con edades comprendidas entre 0 y 9 años. Este grupo constituyó uno de los más susceptibles debido a que por su corta edad están más expuestos al contacto con las diversas formas infectantes de los parásitos, ya que no tienen el conocimiento sobre los hábitos higiénico-sanitarios adecuados, el consumo de agua hervida y además realizan frecuentemente actividades recreativas en los suelos contaminados. Los individuos parasitados

más afectados correspondieron al sexo femenino (61,86%), lo cual no se podría atribuir a una susceptibilidad diferencial, sino probablemente esté relacionado con factores ocupacionales y de comportamiento humano.

En el presente estudio hubo un predominio de los protozoarios sobre los helmintos, hallazgo que viene demostrándose en la gran mayoría de los estudios coproparasitológicos realizados en Venezuela (Bracho *et al.*, 2014; Brito-Nunez y Arocha, 2014; Suárez-Díaz *et al.*, 2013) y en otros países de América Latina (Bermúdez *et al.*, 2013; Pascual *et al.*, 2010; Menghi *et al.*, 2007). Esto podría atribuirse al consumo de agua no potable que facilita la diseminación de los quistes de protozoarios y al uso de drogas antihelmínticas que suministran en las jornadas de desparasitación masiva particularmente en las zonas rurales. Con respecto a la biodiversidad parasitaria, prevaleció el único parásito humano del reino Chromista *Blastocystis* spp. con un 60,28% (Tabla II). Este resultado concuerda con diversas investigaciones realizadas a nivel nacional (Maldonado *et al.*, 2008; Velasco *et al.*, 2010; Suárez-Díaz *et al.*, 2013; Brito-Nuñez y Arocha, 2014) e internacional (Borges *et al.*, 2009; Malheiros *et al.*, 2011; El Safadi *et al.*, 2014;). El rol patogénico de *Blastocystis* spp. ha sido muy polémico y controversial debido a que está presente tanto en individuos asintomáticos como sintomáticos. En la actualidad, estudios experimentales que incluyen ensayos en modelos animales y cultivos celulares han permitido demostrar que *Blastocystis* spp. está asociado con diversas manifestaciones gastrointestinales y dérmicas, y podría constituir un patógeno oportunista en individuos inmunosuprimidos (Sadaf *et al.*, 2013; Wawrzyniak *et al.*, 2013; Tamallee *et al.*, 2014; Elghareeb *et al.*, 2015). Asimismo, Scanlan 2012, señala que la patogenicidad de *Blastocystis* spp. está asociada principalmente a una gran variabilidad genética, lo que sugiere un patrón de variación intraespecífica (subtipos genéticos) caracterizado mediante diversas herramientas de biología molecular. Adicionalmente, se encontraron los protozoarios comensales *Endolimax nana* (24,70%) y *Entamoeba coli* (22,70%) (Tabla II), los cuales no ejercen ningún daño en el intestino del hospedador pero su hallazgo tiene gran importancia desde el punto de vista epidemiológico debido a que su presencia en las heces son indicadores de contaminación fecal del agua y alimentos de consumo, reflejando las precarias

condiciones higiénico-sanitarias y el bajo nivel de instrucción que prevalece en los individuos de la comunidad indígena Kariña de Piñantal. Es relevante señalar que el 18,44% de los individuos estaban parasitados por *Giardia duodenalis* (Tabla II) sin presentar las manifestaciones clínicas características que produce este protozoo patógeno; no obstante, podría constituir un factor de riesgo potencial que podría inducir el desarrollo de lesiones en la mucosa intestinal conllevando a procesos de malabsorción y esteatorrea favoreciendo el deterioro del estado nutricional de los pobladores afectando su salud (Muhsen *et al.*, 2014).

Los geohelminthos más prevalentes fueron *Ascaris lumbricoides* (25,53%) seguido de *Trichuris trichiura* (9,22%) (Tabla II). Estos resultados coinciden con los reportados en otras localidades indígenas en nuestro país por Bracho *et al.* (2014) y Devera *et al.* (2006). Estas son especies parasitarias muy comunes que generalmente están asociadas, debido a que guardan similitud en las rutas de infección y en los ciclos biológicos externos. Los ancylostomídeos ocuparon el tercer lugar con una prevalencia de 7,09%; resultado que difiere de los encontrados por Guilarte *et al.*, 2014 en el estado Sucre y Rivero *et al.*, 2007 en el estado Zulia, quienes reportaron una elevada prevalencia de ancylostomídeos, 79,06% y 30,89%, respectivamente. Es evidente que en la comunidad de Piñantal existe un alto grado de fecalismo ambiental, indicativo de suelos contaminados con heces humanas donde coexisten las diferentes formas evolutivas de los geohelminthos, que constituyen el principal foco de infección al hospedador cuando ingiere huevos embrionados de *A. lumbricoides* o *T. trichiura* con tierra, alimentos o aguas no tratadas, o por la penetración directa a través de la piel de las larvas filariformes de los ancylostomídeos cuando los individuos tienen el hábito de permanecer descalzos por largos periodos de tiempo.

Por otra parte, es importante mencionar el caso de un individuo parasitado por *Taenia* sp. en esa comunidad. Este hallazgo tiene gran repercusión desde el punto de vista epidemiológico debido a que el bajo nivel de instrucción y el hábito de defecar a campo abierto va a permitir la diseminación de los huevos de este céstode en los suelos, representando la principal fuente de infección para los animales domésticos entre ellos los cerdos, que constituyen los hospedadores intermediarios de este parásito,

trayendo graves consecuencias a la salud de los humanos por el riesgo a adquirir una patología conocida como neurocisticercosis, que afecta al sistema nervioso central y además puede ocasionar la muerte (Enander *et al.*, 2010; Fica *et al.*, 2012).

Se encontró una alta prevalencia del coccidio intestinal *C. cayetanensis* (10%). Esta es similar a la reportada por Devera *et al.*, 2005a en una comunidad indígena del estado Bolívar, Venezuela; sin embargo, contrasta con la reportada por Rivero *et al.*, 2013 (0,69%) en una comunidad indígena del estado Zulia, Venezuela, y en poblaciones indígenas de otros países de América Latina como Colombia donde se encontró una prevalencia de 0,7% (Cardona-Arias *et al.*, 2014) y Argentina 2% (Navone *et al.*, 2006). En el estado Sucre, son escasos los estudios realizados sobre coccidios intestinales, por lo tanto, esta prevalencia de *C. cayetanensis* (10%) constituye el primer reporte realizado en una comunidad indígena Kariña del municipio Sucre, estado Sucre. Es importante destacar que esta prevalencia fue obtenida utilizando la técnica de esporulación en dicromato de potasio al 2,5%, la cual permitió realizar una revisión interdiaria de la muestra de heces durante 10 días con la finalidad de visualizar los ooquistes maduros de este coccidio intestinal, confirmándose el hallazgo con la coloración de Kinyoun y micrometría ocular. Por ende, se recomienda la incorporación de estas técnicas en las investigaciones que involucren el estudio de los coccidios intestinales en muestras fecales, ya que nos permiten aumentar la sensibilidad de detección evitando el subregistro de esta parasitosis.

Es significativo mencionar que solo el 36% de los individuos parasitados por *C. cayetanensis* presentaron diarrea en el momento de la recolección de la muestra de heces y el 64% restante no tenían ninguna manifestación clínica aparente. La presencia de individuos asintomáticos o portadores sanos es frecuente y podría estar asociado al desarrollo de una protección inmunológica parcial por la exposición constante con el coccidio sobre todo en áreas endémicas, tal como ha sido señalado por otros autores (Pape *et al.*, 1994; Chacín-Bonilla *et al.*, 2003; Chacín-Bonilla, 2010; Devera *et al.*, 2005a). Asimismo, Tutaya *et al.*, 2006 demostraron que la mayoría de los casos de coccidiosis cursaban de forma asintomática en un estudio realizado en habitantes del Barrio 6 de Noviembre ubicado al norte de Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela.

Con respecto a la edad de los 14 individuos infectados con *C. cayetanensis*, se demostró que el 85,71% correspondieron a los menores de 20 años, de los cuales el 57,14% eran menores de 9 años (Tabla III). En este sentido, Chacín-Bonilla, 2012, menciona que en diversos países incluyendo a Venezuela se ha observado consistentemente que la ciclosporiasis es más frecuente en niños, predominando en el grupo de edades entre 1 a 9 años (López *et al.*, 2003; Ortega y Sánchez, 2010; Cazorla *et al.*, 2014). Las razones que expliquen este hallazgo no están claras, pero se sugiere que la mayor susceptibilidad encontrada en la población infantil podría deberse a que los niños están en mayor contacto directo con las formas infectantes del parásito que se encuentran en el agua y los suelos contaminados al jugar o comer tierra. En este sentido, se evidenció que la comunidad de Piñantal está rodeada por la represa del Turimiquire y que los niños frecuentemente realizan travesías en canoas que los expone a la ingesta de agua del embalse. El contacto con la tierra ha sido considerado un importante factor de riesgo para la ciclosporiasis en Perú (Madico *et al.*, 1997), Guatemala (Bern *et al.*, 1999), África (El-Karamany *et al.*, 2005) y en Venezuela (Chacín-Bonilla *et al.*, 2007). Por lo tanto, es muy importante la educación de la madre en lo que respecta a una adecuada higiene personal, consumo de agua de buena calidad y hábitos de cuidado del niño para intentar disminuir la prevalencia de este coccidio intestinal.

Las variables epidemiológicas analizadas en esta población indígena, permitieron evidenciar que a pesar de no encontrar asociación estadística significativa con estas variables, la mayoría de los individuos parasitados con *C. cayetanensis* defecan a campo abierto (80%), obtienen y toman el agua directamente del embalse (60%) y además conviven con animales dentro y fuera de sus viviendas (80%). Todas estas variables epidemiológicas constituyen factores predisponentes para la adquisición de la ciclosporiasis, tal como ha sido señalado por Chacín-Bonilla *et al.*, 2007 quienes determinaron diversos factores de riesgo, entre ellos vivir en áreas de pobreza extrema, residir en ranchos o casas pequeñas, usar el área del patio para defecar y el contacto con tierra contaminada con heces humanas, sugiriendo que esta última variable constituye un mecanismo muy importante en la dinámica de la transmisión de esta coccidiosis intestinal.

En conclusión, se determinó una alta prevalencia de enteroparasitosis destacándose *C. cayetanensis* dentro de los coccidios intestinales evaluados en la comunidad indígena Kariña de Piñantal, estado Sucre, Venezuela. Esta realidad social representa una problemática multifactorial que refleja principalmente deficiencias en el saneamiento ambiental y falta de educación en esta comunidad. En ese sentido, es importante activar e incluir los programas masivos de desparasitación en las políticas de desarrollo y disminución de la pobreza con la finalidad de promover la prevención de las enfermedades parasitarias y de esta manera se contribuye a garantizar la salud de la población venezolana.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan que no hubo conflicto de intereses con persona o institución alguna en ninguna de las etapas de ejecución de este trabajo.

REFERENCIAS

- Bermúdez A., Flórez O., Bolaños M., Medina J. & Salcedo-Cifuentes M. (2013). Enteroparasitismo, higiene y saneamiento ambiental en menores de seis comunidades indígenas. Cali-Colombia. *Rev. Salud Pública*. **15**: 1-11.
- Bern C., Hernández B., López M., Arrowood M., Álvarez de Mejía M., de Mérida A., Hightower A., Venczel L., Herwaldt B. & Klein R. (1999). Epidemiologic studies of *Cyclospora cayetanensis* in Guatemala. *Emerg. Infect. Dis.* **5**: 766-774.
- Borges J., Rodríguez R., Amato V. & Gakiya E. (2009). Parasitoses intestinais de indígenas da comunidade Mapuera (Oriximiná, Estado do Pará, Brasil): elevada prevalência de *Blastocystis hominis* e encontro de *Cryptosporidium* sp e *Cyclospora cayetanensis*. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* **42**: 348-350.
- Botero D. & Restrepo M. (2012). *Parasitosis humanas*. 5a edición. Corporación para Investigaciones Biológicas: Medellín, Colombia.
- Bracho M., Rivero-Rodríguez Z., Rios P., Atencio T., Villalobos P. & Rodríguez L. (2014). Parasitosis intestinales en niños y adolescentes de la etnia

- Yukpa de Toromo, estado Zulia, Venezuela: Comparación de los años 2002 y 2012. *Kasmera*. **42**: 41-51.
- Brito-Núñez N. & Arocha M. (2014). Prevalencia de parásitos intestinales en indígenas Warao de Cambalache, estado Bolívar, Venezuela. *Rev. Biomed.* **25**: 48-53.
- Cardona-Arias J., Rivera-Palomino Y. & Carmona-Fonseca J. (2014). Salud indígena en el siglo XXI: parásitos intestinales, desnutrición, anemia y condiciones de vida en niños del resguardo indígena Cañamomo-Lomapieta, Caldas-Colombia. *Méd. Uis.* **2**: 29-39.
- Cazorla D., Acosta M. & Morales P. (2012). Estudio clínico-epidemiológico de coccidiosis intestinales en una población rural de región semiárida del estado Falcón, Venezuela. *Invest. Clin.* **53**: 273-288.
- Cazorla D., Leal G., Escalona A., Hernández J., Acosta M. & Morales P. (2014). Aspectos clínicos y epidemiológicos de la infección por coccidios intestinales en Urumaco, estado Falcón, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **53**: 273-288.
- 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. & Sanchez Y. (2007). Epidemiology of *Cyclospora cayetanensis* infection in San Carlos Island, Venezuela: strong association between socio-economic status and infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **101**: 1018-1024.
- Chacín-Bonilla L. (2010). Epidemiology of *Cyclospora cayetanensis*: A review focusing in endemic areas. *Acta Trop.* **115**: 181-193.
- Chacín-Bonilla L. (2012). Estudio clínico-epidemiológico de coccidiosis intestinales en una población rural de región semiárida del estado Falcón, Venezuela. *Invest. Clin.* **53**: 419-421.
- Chacón N., Contreras R., Marquez W., Salinas R. & Romero J. (2007). Importancia de la referencia médica en el diagnóstico de parasitosis intestinales por métodos coproparasitológicos. *Rev. Fac. Med.* **30**: 90-96.
- 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.
- Clarke S. & McIntyre M. (2001). Acid-fast bodies in faecal smears stained by the modified Ziehl-Neelsen technique. *Br. J. Biomed. Sci.* **58**: 7-10.
- Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) (1993). *Pautas éticas internacionales para la conservación y experimentación biomédica en seres humanos*. Ginebra.
- Devera R., Blanco Y. & Cabello E. (2005a). Elevada prevalencia de *Cyclospora cayetanensis* en indígenas del estado Bolívar, Venezuela. *Cad. Saude Púb.* **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., Mago Y. & Al Rumhein F. (2006). Parasitosis intestinales y condiciones socio-sanitarias en niños de una comunidad rural del Estado Bolívar, Venezuela. *Rev. Biomed.* **17**: 311-313.
- Elghareeb A., Younis M., El Fakahany A., Nagaty I. & Nagib M. (2015). Laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. in diarrheic patients. *Trop. Parasitol.* **5**: 36-41.
- El-Karamany E., Zaher T. & El-Bahnasawy M. (2005). Role of water in the transmission of cyclosporiasis in Sharkia Governorate, Egypt. *J. Egypt Soc. Parasitol.* **35**: 953-962.
- El Safadi D., Gaayeb L., Meloni D., Cian A., Poirier P., Wawrzyniak I., Delbac F., Dabboussi F., Delhaes L., Seck M., Hamze M., Riveau G. & Viscogliosi E. (2014). Children of Senegal River

- Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC. Infect. Dis.* **14**: 164.
- Enander R., Ramírez-Amaya A., Enander R. & Gute D. (2010). Neurocysticercosis: risk and primary prevention strategies update. *Int. J. Environ. Health Res.* **20**: 329-65.
- Ezeamama A., Friedman J., Acosta L., Bellinger D., Langdon G., Manalo D., Olveda R., Kurtis J. & McGarvey S. (2005). Helminth infection and cognitive impairment among filipino children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **72**: 540-548.
- Fica C., Castro A., Soto M., Flores A., Oelker C. & Weitzel T. (2012). Neurocysticercosis: una enfermedad desatendida en Chile. *Rev. Chile Infectol.* **29**: 72-81.
- Guilarte D., Gómez E., El Hen F., Garantón A. & Marín L. (2014). Aspectos epidemiológicos y hematológicos asociados a las parasitosis intestinales en indígenas Waraos de una comunidad del estado Sucre, Venezuela. *Interciencia.* **39**: 116-121.
- Goodgame R. (1996). Understanding intestinal sporeforming protozoa: *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Isospora* and *Microsporidia*. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **1**: 66-73.
- Goodgame R. (2003). Emerging causes of traveler's diarrhea: *Cryptosporidia*, *Microsporidia*, *Isospora* and *Cyclospora*. *Ann. Intern. Med.* **124**: 429-41.
- Huiza A., Espinoza Y., Rojas R., Sevilla, C., Alva P., 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.* **4**: 239-242.
- López A., Bendik J., Alliance J., Roberts J., da Silva A., Moura I., Arrowood M., Eberhard M. & Herwaldt B. (2003) Epidemiology of *Cyclospora cayetanensis* and other intestinal parasitosis in a community in Haiti. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 2047-2054.
- Madico G., McDonald J., Gilman RH., Cabrera L. & Sterling C. (1997). Epidemiology and treatment of *Cyclospora cayetanensis* infection in Peruvian children. *Clin. Infect. Dis.* **24**: 977-981.
- Maldonado I. A., Rivero-Rodríguez Z., Chourio-Lozano G., Díaz A. I., Calchi-La Corte M., Acurero E., Bracho A. & Bárcenas B. J. (2008). Prevalencia de enteroparásitos y factores ambientales asociados en dos comunidades indígenas del estado Zulia. *Kasmera.* **36**: 53-66.
- Malheiros A., Stensvold R., Graham C., Braga G. & Shaw J. (2011). Short Report: Molecular characterization of *Blastocystis* obtained from members of the indigenous Tapirapé ethnic group from the Brazilian Amazon Region, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **85**: 1050-1053.
- Menghi C., Iuvaro F., Franco R., Dellacasa M. & Gatta C. (2007). Investigación de parásitos intestinales en una comunidad aborigen de la provincia de Salta. *Med.* **67**: 705-708.
- Muhsen K., Cohen D. & Levine M. (2014). Can Giardia lamblia infection lower the risk of acute diarrhea among preschool children? *J. Trop. Pediatr.* **60**: 99-103.
- Navajas R., González-Castelao G., Fenoy S. & Del Águila C. (2004). Diarrea del viajero por *Cyclospora cayetanensis* en España: a propósito de un caso. *Enf. Emerg.* **1**: 33-37.
- Navone G., Gamboa M., Oyhenart E. & Orden A. (2006). Parasitosis intestinales en poblaciones Mbyá-Guaraní de la Provincia de Misiones, Argentina: aspectos epidemiológicos y nutricionales. *Cad. Saúde Pública.* **22**: 089-1100.
- Núñez F., González O., Gozález I., Escobedo A. & Cordoví R. (2003). Intestinal coccidia in cuban pediatric patients with diarrhea. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **4**: 539-542.
- Ortega Y. & Sanchez R. (2010). Update on *Cyclospora cayetanensis*, a food-borne and waterborne parasite. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**: 218-234.
- PAHO/OMS (2003). *Helmintiasis Intestinales. Manejo de las Geohelminthiasis.* Montevideo, Uruguay.

- Pape J., Verdier R., Boncy J. & Johnson W. (1994). *Cyclospora* infection in adults infected with HIV: clinical manifestations, treatment, prophylaxis. *Ann. Intern. Med.* **121**: 654-657.
- Pascual G., Iannacone J., Hernández A. & Salazar N. (2010). Parásitos intestinales en pobladores de dos localidades de Yurimaguas, Alto Amazonas, Loreto, Perú. *Neotrop. Helminthol.* **4**: 127-136.
- 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.
- Rivero-Rodríguez Z., Maldonado A., Bracho A., Gotera J., Atencio R., Leal M., Sánchez R. & Silva C. (2007). Enteroparasitosis en indígenas de la comunidad Japrería, estado Zulia, Venezuela. *Interciencia.* **32**: 270-273.
- Sadaf H., Khan S., Kanwal N., Tasawer B. & Ajmal S. (2013). *Blastocystis* hominis-potential diarrhoeal agent: a review. *Int. Res. J. Pharm.* **4**: 1-5.
- Scanlan P. 2012. *Blastocystis*: past pitfalls and future perspectives. *Trends Parasitol.* **28**: 327-334.
- Suárez-Díaz O., Atencio A., Carruyo M., Fernández P., Villalobos R., Rivero Z., Maldonado A., Bracho A., Ruiz A., González M., Briceño O., Quintero M. & Suárez M. (2013). Parasitosis intestinales y tisulares y su relación con la eosinofilia en una comunidad indígena Yukpa de la Sierra de Perijá. Estado Zulia. *Kasmera.* **41**: 27-41.
- Tamalee R., Stark D., Harkness J. & Ellis J. (2014). Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathogens.* **6**: 17.
- 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.
- Tello-Casanova R. (2000). Coccidiosis. *Diagnóstico.* **39**: 116-119.
- 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.
- Vásquez O., Jiménez R., Campos T., Valencia S., Romero R., Gamez V. & Martínez I. (2000). Infección por *Cyclospora cayetanensis*. Diagnóstico de laboratorio. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **1**: 45-52.
- Velasco J., Gonzalez F., Diaz T., Pena-Guillen J. & Araque M. (2011). Profiles of enteropathogens in asymptomatic children from indigenous communities of Merida, Venezuela. *J. Infect. Dev. Ctries.* **5**: 276-285.
- Wawrzyniak I., Poirier P., Viscogliosi E., Dionigia M., Texier C., Delbac F. & El Alaoui H. (2013). *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Therap. Adv. Infect. Dis.* **5**: 167-178.
- Wayne, D. (2002). *Bioestadística*. Cuarta edición. Editorial Limusa, S.A. México D.F. México.

Recibido el 11/01/2016
Aceptado el 15/06/2016

Estudio preliminar sobre el comportamiento de *Aedes albopictus* de la region central de Venezuela a insecticidas químicos

Preliminary study on the behavior of Aedes albopictus from the central region of Venezuela to chemical insecticides

Darjaniva Molina de Fernández^{1*}, Danny Bastidas Beltrán¹, Nieves Molina, Luisa Figueroa¹, Juan Carlos Navarro³, Antonio Guerra¹, Julio González Rivas¹, Víctor Sánchez¹ & Rodrigo Ramírez

RESUMEN

Aedes albopictus es un competente vector del virus chikungunya, zika y de la mayor parte de los virus de encefalitis equina, capaz de transmitir al menos 24 arbovirus, susceptible a la infección (vertical y horizontalmente) por los serotipos del virus dengue. El objetivo fue realizar un estudio preliminar sobre el comportamiento frente a insecticidas organosintéticos de *Ae. albopictus* de diferentes localidades de tres estados centrales del país, durante el período 2012-2014. Se realizaron pruebas biológicas con botellas tratadas con insecticidas, según el método del CDC e igualmente evaluación bioquímica para identificar los mecanismos de detoxificación enzimáticos in vitro y mecanismos de resistencia in vivo con el sinergista butóxido de piperonilo (PB). Todas las cepas evaluadas presentaron sensibilidad al DDT (200 µg/mL) y cuatro de ellas a lambdacialotrina (6,25 µg/mL), solo una, Santos Michelena (SM) presentó valores de sobrevivencia. También esto fue observado con: malatión (100 µg/mL) con una mortalidad en 30 minutos de 42,6% para Carabobo; 46,2% Distrito Capital (DC); 69,6% Zamora y 75,5% Mario Briceño Iragorry (MBI), solo resultó sensible SM. En cuanto a fenitrotion se encontraron valores de sobrevivencia con mortalidades en 30 minutos de 72,2%; para Carabobo, 30,7% DC y 45,8% MBI; solo expresaron sensibilidad Zamora y SM. En las cepas Carabobo y DC se observó el efecto sinérgico FS = 3 y FS = 1,3, respectivamente. Se presume que los valores de sobrevivencia encontrados para insecticidas organofosforados pudiera asociarse con el incremento de esterasas alfa (α) y beta (β), en menor medida por la acetilcolinesterasa insensible (ACHei) y las oxidasas con la sobrevivencia a lambdacialotrina en la cepa SM, lo cual podría comprobarse en estudios futuros a realizarse sobre resistencia a insecticidas. Los resultados encontrados en el presente trabajo, constituyen la base para su inicio a corto plazo en *Ae. albopictus* de Venezuela y la región, a fin de contribuir en la eficacia de las medidas de control químico de esta especie de importancia médica.

Palabras clave: *Aedes albopictus*, esterasas, insecticidas, resistencia, susceptibilidad.

SUMMARY

Aedes albopictus is a competent vector of chikungunya virus, zika and most of the equine virus, capable of transmitting at least 24 arboviruses, susceptible to infection (vertically and horizontally) by serotypes of the dengue virus encephalitis. The objective was to conduct a preliminary study on the behavior against *Ae. albopictus* organosintetic insecticides from different locations in three central states of the country during the period 2012-2014. Bioassays with insecticide-treated bottles were performed according to the method of the CDC and also biochemical evaluation to identify the mechanisms of detoxification enzyme in vitro and in vivo mechanisms of resistance to the synergist piperonyl butoxide (PB). All strains tested showed sensitivity to DDT (200 µg / mL) and four of them lambdacyhalothrin (6.25 mg / mL), only one, Santos Michelena (SM) presented values of survival. This was also observed: malathion (100 µg / mL) with a mortality time (30 min) of 42.6% for Carabobo; 46.2% Capital District (DC); Zamora 69.6% and 75.5% Mario Briceño Iragorry (MBI) was sensitive only SM. As fenitrothion survival values encountered in the mortalities time (30 min) 72.2%; for Carabobo, 30.7% and 45.8% MBI DC; only expressed sensitivity Zamora and SM. In DC strains Carabobo and the synergistic effect was observed FS = 3 and FS = 1.3, respectively. It is presumed that the survival values found for organophosphate insecticides may be associated with increased esterase alpha (α) and beta (β), to a lesser extent insensitive acetylcholinesterase (ACHEI) and oxidases with survival to lambdacialotrine in strain SM, which could be verified in future studies to be carried out on insecticides resistance. The results found in the present work, constitute the basis for its short-term start in *Ae. albopictus* from Venezuela and the region, in order to contribute to the effectiveness of chemical control measures of this species of medical importance.

Keywords: *Aedes albopictus*, esterases, insecticide, resistance, susceptibility.

¹ Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA). S.A. Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon" (IAE-MPPS). Maracay, Venezuela

² Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

³ Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales, Quito, Ecuador

*Autor de correspondencia: darja2410@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) conocido como mosquito tigre asiático, es un insecto originario del sureste asiático responsable de la transmisión de 24 arbovirosis, entre ellas el virus dengue (DENV) (Reiter, 1998; Ibañes-Bernal, 1997), fiebre amarilla, encefalitis del este (EEEV), chikungunya (CHIKV), mayaro (Gratz, 2004) y zika (OPS & OMS, 2015). Históricamente, *Ae. aegypti* ha sido asociado como vector principal del virus dengue; *Ae. albopictus* mantiene un papel secundario en la transmisión de ciclos epidémicos en humanos. Ambas especies de mosquitos tienen un papel dual en la transmisión del virus chikungunya, una enfermedad que ha emergido recientemente en forma epidémica en Asia, países del Océano Índico y sureste de Europa (Charrel *et al.*, 2007) y el continente Americano (OPS, 2013). *Ae. albopictus* posee una plasticidad genética, fisiológica y ecológica capaz de adaptarse a pequeñas cantidades de agua, tiene un rango de vuelo rara vez superior a 500 metros además se ha encontrado compartiendo nichos ecológicos con *Ae. aegypti*, (Hawley, 1988). Se distribuye desde su país de origen hacia el continente de África, Europa meridional, algunas islas del Océano Pacífico y América (Hawley, 1988; Moore & Mitchell, 1997; Gratz, 2004). En América se detectó la presencia de *Ae. albopictus* a partir de los años ochenta en países como Estados Unidos y Brasil (Forattini, 1986; Mitchell, 1995). En Venezuela, fue reportado por primera vez en la ciudad de Caracas por Navarro *et al.*, (2009), seguidamente se ha reportado en el estado Aragua, en los municipios Santos Michelena localidad de Tiara (Ramírez *et al.*, 2012) y Mario Briceño Iragorry (Martiradonna *et al.*, 2013), en los estados Guárico y Monagas (Quinto *et al.*, 2013) y más recientemente en Bolívar (Rubio-Palis *et al.*, 2015). A esta especie se le considera uno de los vectores más invasores de la última década con la mayor dispersión geográfica a nivel mundial (Benedict *et al.*, 2007). Al no contar aún con una vacuna efectiva para estos virus, las estrategias de control de estos vectores de enfermedades se basan principalmente en el saneamiento ambiental, la educación sanitaria, la participación social que permita lograr acciones sostenibles en el tiempo, con el fin de eliminar los hábitats y como última opción el control químico vectorial, considerándose fundamentalmente durante brotes epidémicos (Rodríguez, 2000). Sin embargo el control de las especies de mosquitos ha presentado

dificultades, lo cual ha traído como consecuencia la expansión de virus a muchas áreas endémicas, por lo que el uso de los insecticidas sigue siendo crucial e indispensable, para contribuir en la reducción de los riesgos de la transmisión de las arbovirosis como el dengue y el chikungunya (Grieco *et al.*, 2007). Los insecticidas organosintéticos de varias clases han sido usados en Venezuela para el control vectorial de mosquitos transmisores de dengue. Entre estos químicos, los organofosforados en diferentes tipos de formulaciones y en menor frecuencia los piretroides. Sin embargo combinaciones de piretroides en algunos casos con sinergistas como el butóxido de piperonilo, son formulaciones comúnmente usadas a nivel doméstico.

El uso inadecuado o excesivo de la herramienta química en el control vectorial, ha traído como consecuencia la selección de poblaciones de vectores resistentes a insecticidas, lo cual ha derivado preocupación e interés debido a que la biología de *Ae. albopictus* es similar a la de *Ae. aegypti*, es frecuentemente recolectado en recipientes naturales y artificiales donde coexisten con otras especies (Hawley, 1988); existiendo la probabilidad de que *Ae. albopictus* este siendo fuertemente presionado con insecticidas químicos, empleados para el control de *Ae. aegypti* pudiendo esto generar resistencia de una forma indirecta. La resistencia es un problema creciente que imposibilita el control vectorial de estas especies, para una mejor comprensión del fenómeno es necesario el monitoreo con el fin de seleccionar los insecticidas de forma adecuada, y por ende el éxito en los programas de control vectorial. Existen estudios donde se ha reportado resistencia de *Ae. albopictus* a insecticidas así: en Vietnam a malatión, en Malasia a fenitrotión, en Madagascar a fenitrotion; también se ha reportado resistencia en África, India, Sur este de Asia, Filipinas y Japón al organoclorado DDT (Brown, 1986 Somboon *et al.*, 2003, Thanispong *et al.*, 2008, Kamgang *et al.*, 2011, Momi & Prafulla 2014). La llegada y colonización de *Ae. albopictus* se data en América, en 1985 específicamente en Texas, USA (Mitchell, 1995). En el continente americano es escasa la información en resistencia de *Ae. albopictus*. Los casos registrados en América han sido reportados en Estados Unidos, donde encontraron resistencia al DDT y malatión, y susceptibilidad a los piretroides (Marcombe *et al.*, 2014), otro estudio realizado en Brasil con insecticidas biológicos concluyó que *Ae. albopictus* presenta una respuesta diferente a *Ae. aegypti* (Duque & Navarro, 2005). Hasta ahora

no existen casos registrados de resistencia en Sur América, por ello nos hemos planteado como objetivo estudiar la resistencia a insecticidas organosintéticos en *Ae. albopictus* en localidades procedentes del centro de Venezuela, con la finalidad de contar con información necesaria para su control.

MATERIALES Y MÉTODOS

La muestra para los bioensayos estuvo comprendida por mosquitos adultos de *Ae. albopictus*, obtenidos a partir de material inmaduro (larvas y pupas) recolectado de recipientes en los que el agua se conservó por períodos superiores a una semana, sin ser renovada como: tanques sin tapa, pipotes, latas, floreros y otros semejantes, ubicados en los solares y preferiblemente en lugares sombreados de los cementerios y algunos jardines de las diferentes localidades, seleccionadas por ser los primeros lugares en reportar la presencia de *Ae. albopictus*. Para ello, se aplicaron los métodos sugeridos por la Organización Mundial de la Salud, utilizando cucharones, goteros y succionadores (OMS, 1993). El material fue trasladado al Laboratorio de Biología de Vectores y Reservorios del Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA), perteneciente al Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldon” (IAE).

Poblaciones de estudio

Durante el año 2012, se capturaron en el estado Aragua: municipios Santos Michelena (SM), 10°7'56.34"N, 67° 9'16.67"O; para el año 2013, en Mario Briceño Iragorry (MBI) 10°16'45.69"N, 67°35'44.43"O y para el año 2014, en Zamora 10° 5'58.00"N, 67°36'54.41"O. De igual manera, en el estado Carabobo: municipio Naguanagua, 10°16'13.4"N, 067°34'50.0"O y Montalbán 10°12'42.28"N, 68°19'34.39"O. Durante el año 2013, se recolectaron en el Distrito Capital, municipio Sucre, estado Miranda: Parque Generalísimo Francisco de Miranda, 10°29'42.60"N, 66°50'32.84"O, Jardín Botánico de la Universidad Central de Venezuela (UCV) 10°29'49.23"N, 66°53'29.51"O y Cementerio General del Sur 10°28'47.08"N, 66°55'24.47"O.

Cría de mosquitos

Las larvas colectadas fueron colocadas en cubetas plásticas rotuladas que contenían agua

decolorada, las condiciones de cría fueron 28°C +/- 2°C de temperatura, 70% +/- 5% de humedad relativa y un fotoperiodo de 12:12 (luz: oscuridad). Las larvas fueron alimentadas con un compuesto de Ictiosan® alimento para peces y levadura de cerveza. Las pupas se colocaron en envases plásticos pequeños se introdujeron en una jaula de tela tipo dopiovelo con estructura de hierro, luego fueron llevadas a un ambiente húmedo a 25°C, una vez en la jaula pasaron a su fase adulta donde los mosquitos quedaron atrapados. En la jaula los mosquitos machos se alimentaron con solución azucarada al 10% y las hembras se alimentaron cada tres días con sangre de *Columba livia* (paloma doméstica).

Para las oviposuras se introdujo en la jaula un envase plástico de 250 mL el cual contenía papel absorbente blanco y un volumen de agua de 200 mL. El papel absorbente fue retirado en 72 horas y después rotulado con sus respectivos datos de origen, fecha y generación filial. Una vez seco, se almacenó en recipientes de plástico hermético. Posteriormente, un número de huevos suficientes se colocaron en agua para su eclosión y así se repitió el ciclo hasta la obtención de adultos de la generación filial 1, 2 y 3 (F1, F2 y F3) los cuales fueron utilizados para los bioensayos (Alarcon-Elbal *et al.*, 2010)

Insecticidas

Organoclorado: DDT (98%), organofosforados: malatión (96%) y fenitrotión (99,5%), piretroide lambdacialotrina (70%), en presentación grado técnico, sin valor comercial, y suministrados por Insecticidas Internacionales Compañía Anónima (INICA®). Los insecticidas fueron evaluados, a la dosis diagnósticas determinadas en el laboratorio de evaluación de insecticidas del CEEESA (Molina de Fernández *et al.*, 2013).

Pruebas Biológicas

Se realizaron siguiendo el método de las botellas del CDC (Brogdon y McAllister, 1998). Los mosquitos adultos *Ae. albopictus* fueron expuestos a botellas de vidrio tipo Wheaton de 250 ml, tratadas con soluciones cetónicas de insecticidas, las cuales se usaron como cámaras de prueba para detectar la resistencia o susceptibilidad a los insecticidas en mosquitos adultos. Estas fueron preparadas en el Laboratorio de Evaluación de Insecticidas del

CEEESA, IAE “Dr. Arnoldo Gabaldon” siguiendo metodología estandarizada por Figueroa *et al.*, (2006). Los ensayos se realizaron en el Laboratorio antes referido, a temperaturas aproximadas de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ y humedad relativa de $55\% \pm 5$. Se expusieron aproximadamente 15 ± 2 mosquitos adultos hembras por botella de tres días de edad entre F1 y F3, alimentados exclusivamente con solución azucarada al 10%. Se evaluaron cuatro réplicas por cada concentración de insecticida y dos réplicas como grupo control en el cual solo se trató la botella con acetona. Cada bioensayo se realizó por triplicado el mismo día de ejecución. Se registró la mortalidad cada 15 min hasta el tiempo en el que se logró el 100% de mortalidad, de esta manera se determinó el efecto del insecticida en función del tiempo de exposición. La mortalidad en el control, entre 5 y 20% se corrigió aplicando la fórmula de Abbot (1925). Se relacionaron las variables tiempo-mortalidad, graficando los porcentajes de mortalidad en el eje de las abscisas (X) y el tiempo en el eje de las ordenadas (Y), haciendo uso de Excel® 97-2003; obteniendo la línea gráfica de la tasa de mortalidad de la cepa a cada insecticida en el mismo plano, correspondiente a la dosis diagnóstica.

La determinación de mecanismos de resistencia a insecticidas in vivo, con el sinergista Butóxido de piperonilo (PB), se realizó solo en aquellas cepas que resultaron resistentes al malatión, por lo que fueron expuestas a una mezcla del insecticida malatión (100 $\mu\text{g}/\text{L}$) con una concentración subletal de (PB), (1 $\mu\text{g}/\text{L}$), siguiendo el método de las botellas del CDC (Brogdon & McAllister, 1998). Se calculó el Factor de sinergismo (FS) determinado por el coeficiente de la relación de los valores del tiempo de mortalidad del insecticida solo entre el tiempo de mortalidad de la mezcla insecticida sinergista, cuyo valor mayor a uno ($\text{FS} > 1$) es indicativo de sinergismo, es decir de la inhibición de la actividad enzimática por el sinergista (Vassena *et al.*, 2000).

Criterio de mortalidad

Situación en la que el insecto se encuentra sin ningún movimiento evidente de cualquier apéndice después de la observación por un mínimo de 3 segundos.

Pruebas Bioquímicas

Para determinar in vitro resistencia metabólica y no metabólica (alteración en sitio blanco ACHEi) se realizaron pruebas en placas para microtitulación. Estas consistieron en detectar la presencia de mecanismos de resistencia específicos en insectos individuales que podrían aclarar posibles causas de la resistencia. Cada mosquito fue triturado en 50 μL de solución tampón pH 7,5 y 0,05 M y se le añadió 0,5 mL de la misma solución. Se tomaron alícuotas de 50 μL de cada muestra que fueron colocadas en placas para microtitulación de 96 pocillos. Se evaluaron cinco sistemas enzimáticos que confieren resistencia a insecticidas; esterasas alfa (α) y beta (β), acetilcolinesterasa normal (AChE), acetilcolinesterasa inhibida (ACHEi) y oxidasas. Los sustratos utilizados en cada caso incluyen alfa y betanaftil acetato para las esterasas no específicas, el yoduro de acetiltiocolina se usó para evidenciar la presencia de la AChE y para la ACHEi además se utilizó el insecticida carbamato propoxur y para las oxidasas se utilizó el TMBZ (3,3',5,5'-Tetrametil Benzidina). Se midieron los valores de absorbancia en un lector de ELISA (Ensayo Inmuno Absorbente Ligado a Enzimas), Multiskan Plus de Fisher Scientific, empleando filtros de 405 nm para AChE y ACHEi, para las esterasas y oxidasas, se empleó un filtro de 620 nm (Brogdon *et al.*, 1997; Hemingway J. 1998; Figueroa *et al.*, 2006., Molina de Fernández y Figueroa, 2009). A los valores de absorbancia se les aplicó estadística descriptiva, Análisis de Varianza de una sola vía, no paramétrico de Kruskal Wallis a un nivel de significación del 95% ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS

Pruebas Biológicas

En la Fig. 1 se presentan los resultados obtenidos con el insecticida DDT (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), donde se evidencia que todas las cepas evaluadas presentaron el 100% de mortalidad a los 45 min. En la Fig. 2 se presentan los resultados con el insecticida malatión (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), encontrándose que la cepa Santos Michelena (SM) presentó el 100% de mortalidad en el menor tiempo de exposición (30 min), el resto de las cepas expresaron menores porcentajes: 42,6% para Carabobo; 46,2% Distrito Capital (DC); 69,6% Zamora y 75,5%, Mario Briceño Iragorry (MBI). Carabobo y Zamora

Fig. 1. Datos tiempo-mortalidad en adultos de *Aedes albopictus* de la región central de Venezuela expuestos al insecticida organoclorado DDT a una concentración de 200 µg/ml por botella.

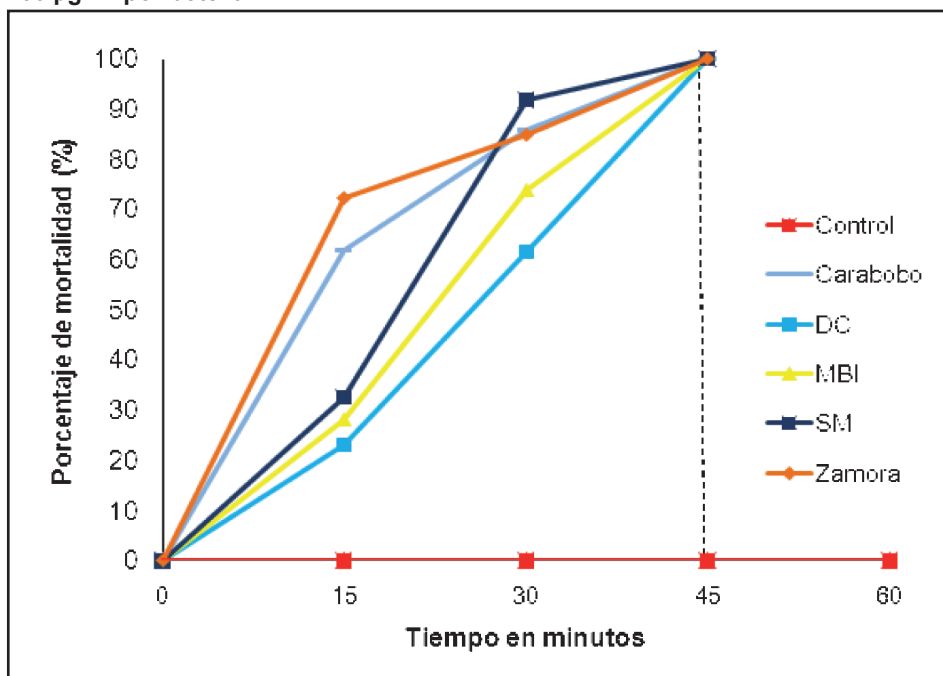
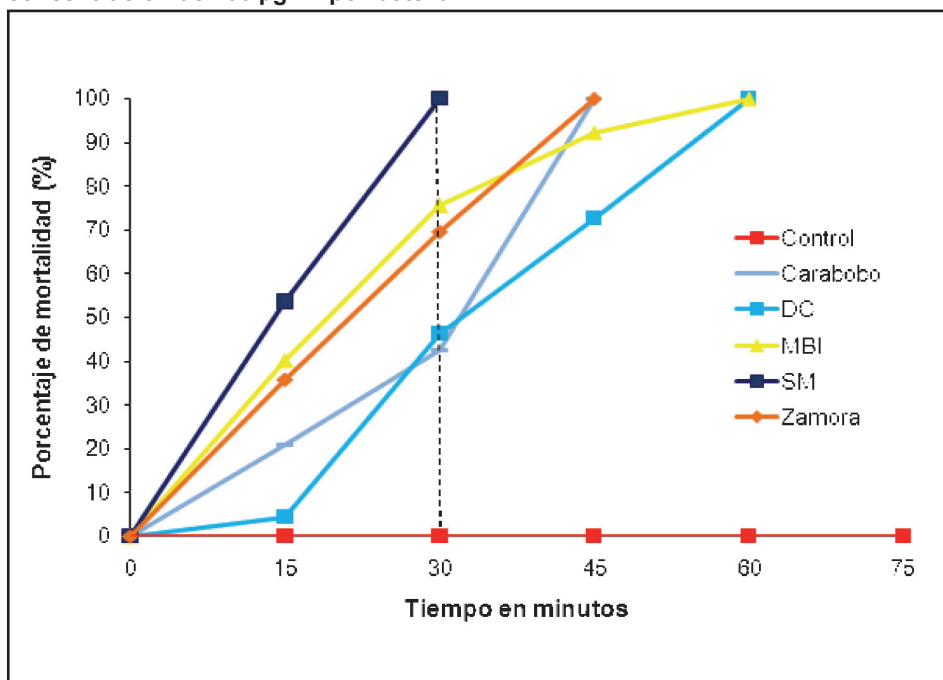


Fig. 2. Datos tiempo-mortalidad en adultos de *Aedes albopictus* de la región central de Venezuela expuestos al insecticida organofosforado malatión a una concentración de 100 µg/ml por botella.



obtuvieron el 100% de mortalidad a los 45 min; DC y MBI a los 60 min.

En la Fig. 3 se muestran los resultados con el insecticida fenitrotion (100 µg/mL), visualizándose que las cepas SM y Zamora presentaron el 100% de mortalidad en 30 min; el resto de las cepas expresaron valores de: 72,2% para Carabobo; 30,7% Distrito Capital (DC) y 45,8% Mario Briceño Iragorry (MBI). Carabobo mostró el 100% de mortalidad a los 45 min; DC y MBI a los 60 min.

En la Fig. 4 se presentan los resultados al evaluar el insecticida piretroide lambdacialotrina (6,25 µg/mL) encontrándose que cuatro de las cepas evaluadas presentaron el 100% de mortalidad a los 15 min, y la cepa SM presentó el 100% de mortalidad a los 30min.

En las Figs. 5 y 6 se presentan los resultados de la determinación de los mecanismos de resistencia a insecticidas in vivo. Al evaluar la cepa Carabobo (Fig. 5) frente al insecticida malatión solo y con la mezcla malatión + el sinergista (PB), siendo una de las cepas que presentó el menor porcentaje de mortalidad al malatión (42,6% en 30 min). Se

evidenció el efecto sinérgico, al obtener en la cepa el 100% de mortalidad en 45 min con el malatión solo y con la mezcla malatión + el sinergista (PB), en 15 min obteniendo un FS=3. En la Fig. 6 se observa en la cepa DC también un efecto sinérgico con una mortalidad a los 60 min con el insecticida solo; y con el sinergista a los 45 min, se obtuvo un FS = 1,3. Los tiempos de mortalidad obtenidos al evaluar el malatión sin PB, disminuyeron como consecuencia de la acción del sinergista tanto en la cepa Carabobo como en la cepa DC.

Pruebas Bioquímicas

En la Tabla I se presenta un resumen de los resultados de los mecanismos de resistencia a insecticidas in vitro, representados por la media de las absorbancias y sus valores de desviación estándar, para cada una de las determinaciones realizadas, se muestran los valores en la cepas evaluadas. La cepa SM fue la que presentó los niveles más bajos de esterasas α y β , AChe y AChe_i, y los niveles más altos de oxidasas. Los niveles de esterasas (α) fueron mayores en las cepas: MBI y Zamora y el análisis de Kruskal Wallis demostró que existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$)

Fig. 3. Datos tiempo-mortalidad en adultos de *Aedes albopictus* de la región central de Venezuela expuestos al insecticida organofosforado fenitrotion a una concentración de 100 µg/ml por botella

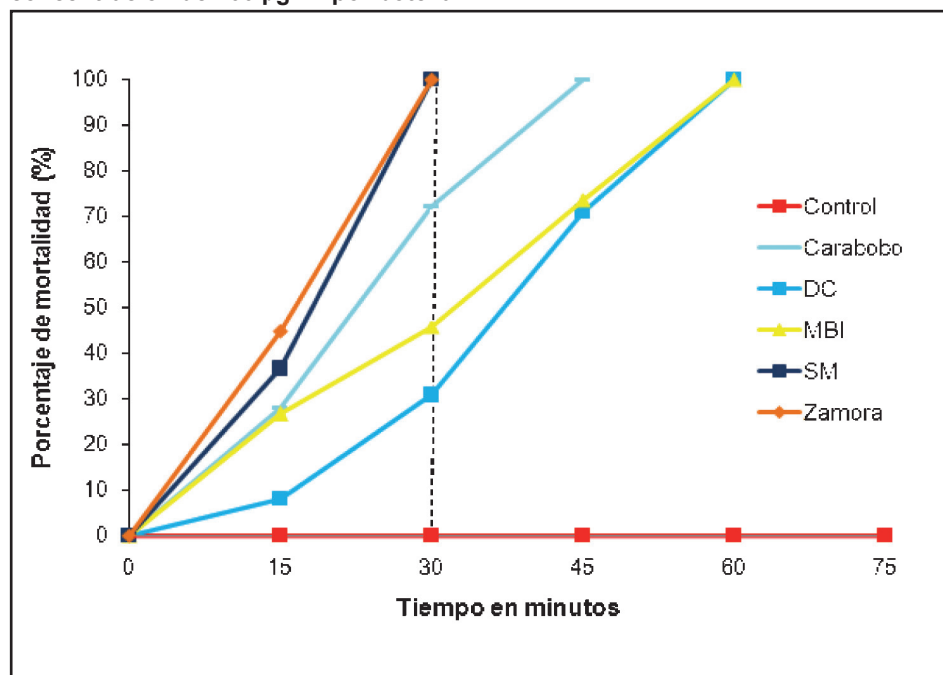


Fig. 4. Datos tiempo-mortalidad en adultos de *Aedes albopictus* de la región central de Venezuela expuestos al insecticida piretroide lambdacialotrina a una concentración de 6,25 µg/ml por botella.

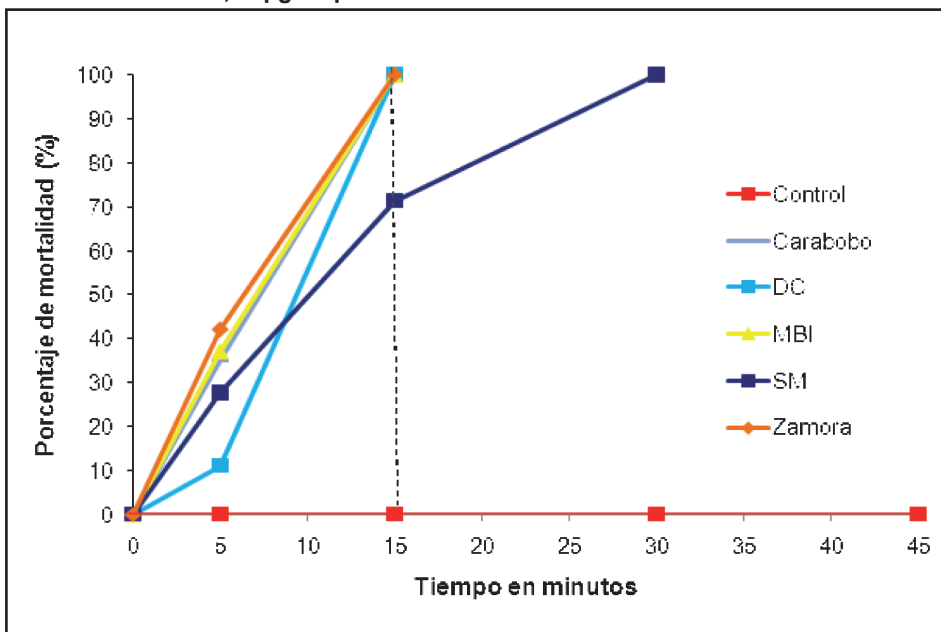


Fig. 5. Datos tiempo-mortalidad en adultos de *Aedes albopictus* cepa Carabobo expuestos al insecticida organofosforado malation (100 µg/ml) y el sinergista butóxido de piperonilo (PB) (1µg/ml) .

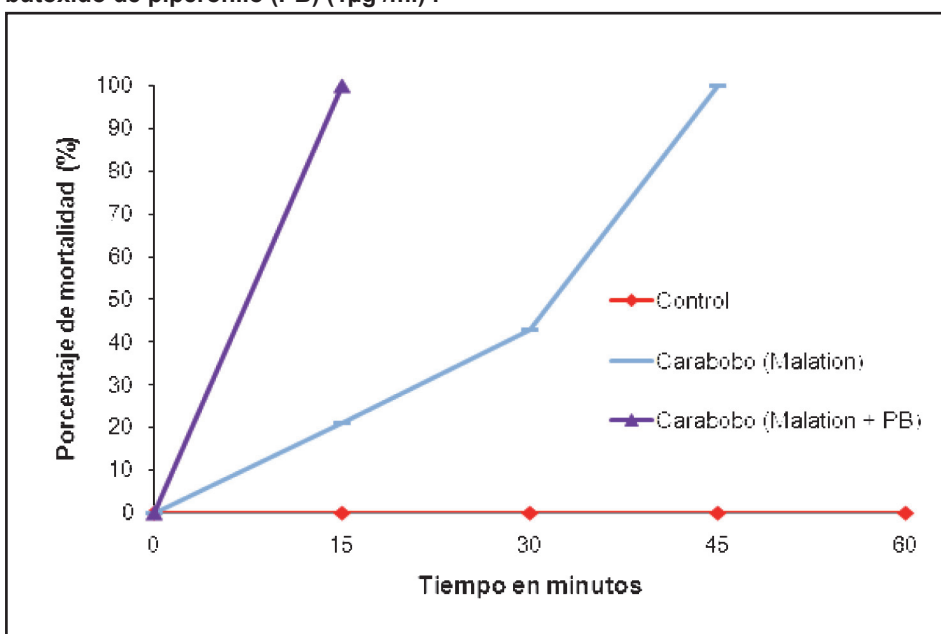
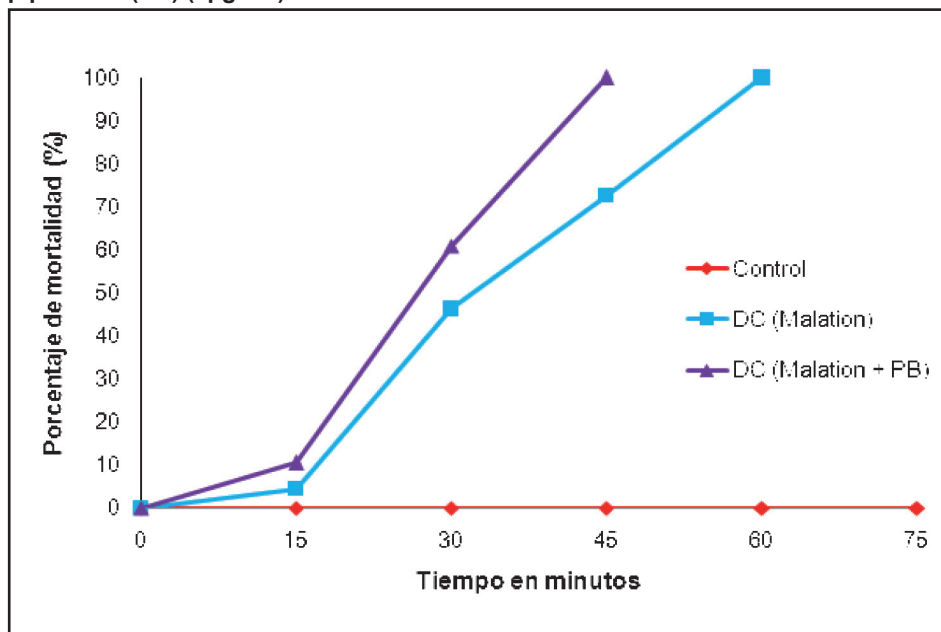


Fig. 6. Datos tiempo-mortalidad en adultos de *Aedes albopictus* cepa DC expuestos al insecticida organofosforado malation (100 µg/ml) y el sinergista butóxido de piperonilo (PB) (1µg /ml).



entre las cepas. Así tenemos que SM, Carabobo y DC, pertenecen al mismo grupo. Con respecto a las esterasas (β) existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre las cepas, solo Carabobo y DC son estadísticamente iguales, los niveles más altos se encontraron en MBI y Zamora. En cuanto a las AChE y AChEi se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$), donde solo se encontraron valores mayores de AChE y AChEi en DC y Zamora y para AChEi en Carabobo. Al evaluar las oxidasas se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre las cepas, solamente las cepas DC, MBI, pertenecen al mismo grupo, los niveles más bajos se observaron en la cepa Zamora.

DISCUSIÓN

Todos los insecticidas químicos ejercen en mayor o menor extensión, presión selectiva sobre las poblaciones de insectos que intentan controlar. El tiempo necesario para el desarrollo de resistencia depende de numerosos factores incluyendo la frecuencia y naturaleza de los genes de resistencia, las estrategias para su manejo, las dosis y frecuencias de

aplicación de los insecticidas y la eficacia biológica de las poblaciones resistentes en relación con las susceptibles. El malatión es uno de los principales insecticidas que se ha empleado en América desde los años 80. En Venezuela es el adulticida usado en aplicación espacial en el control vectorial del dengue. Las evaluaciones realizadas en el presente estudio con *Ae. albopictus*, mostraron que todas las cepas evaluadas expresaron mayor sobrevivencia al malatión y al fenitrotión, a excepción de la cepa SM que resultó más susceptible a los tiempos que tardaron para morir en ambos insecticidas, a pesar de que el fenitrotión ha sido de uso menos frecuente en control vectorial del dengue en el país.

Las esterasas elevadas han estado involucradas en la resistencia a los insecticidas organofosforados y en menor medida en la resistencia a los piretroides y carbamatos, diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) en las cepas evaluadas indican que este mecanismo pudiera estar asociado con los valores encontrados de sobrevivencia a los organofosforados. Aun cuando no se hicieron estudios genéticos, el principal mecanismo de resistencia metabólica ocurre debido a

Tabla I. Mecanismos de resistencia in vitro (media y desviación estándar) de *Aedes albopictus* de la región central de Venezuela.

Cepas	Mecanismos Enzimáticos Evaluados				
	Esterasas alfa	Esterasas beta	AChe	ACheI	Oxidasas
SM	1,050* +/- 0,127	0,981* +/- 0,075	0,140* +/- 0,040	0,092* +/- 0,013	0,423* ^a +/-0,163
Carabobo	1,082* +/- 0,066	1,100* +/- 0,062	0,126* +/- 0,014	0,138* ^a +/- 0,018	0,299* ^a +/- 0,152
DC	1,115* +/- 0,153	1,071* +/- 0,144	0,211* ^a +/- 0,069	0,131* ^a +/-0,018	0,260* +/- 0,090
MBI	1,282* ^a +/- 0,107	1,307* ^a +/- 0,088	0,095* +/- 0,012	0,094* +/- 9,77E-03	0,269* +/- 0,085
Zamora	2,051* ^a +/- 0,0983	1,422* ^a +/- 0,072	0,160* ^a +/- 0,016	0,136* ^a +/- 0,01	0,239* +/-0,060

*Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$); a: presentaron los valores más elevados.

un incremento en expresión o actividad de tres de las principales familias de enzimas dentro de las cuales están involucradas las esterasas (Hemingway & Ranson, 2000; Flores *et al.*, 2007). Bioquímicamente, las esterasas actúan uniéndose rápidamente al insecticida secuestrando a este, antes de que llegue a su sitio de acción, lo que requiere altas cantidades de estas enzimas, desencadenando la sobreproducción enzimática y por ende el desarrollo de resistencia (Karunaratne *et al.*, 1993). Los insecticidas organofosforados, al igual que los carbámicos ejercen su acción tóxica mediante la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (ACheI) (Saume, 1992). Esta pareciera estar involucrada además de las esterasas como la razón de los valores encontrados en relación a las otras cepas; Carabobo, DC y Zamora. Se desconoce si los individuos que presentaron sobrevivencia a los organofosforados llegaron al país con esa característica o son producto de la presión de selección ejercida por el uso de organofosforados para el control de *Ae. aegypti* en la región. El sinergista PB potenció la acción del insecticida malatión; mediante la inhibición de la actividad enzimática posiblemente involucrada en el comportamiento de sobrevivencia de los individuos.

Por otra parte, los valores de susceptibilidad encontrados al DDT y al piretroide lambdacialotrina, puede relacionarse con los bajos valores obtenidos de oxidasas, solo la cepa SM que presentó altos niveles de esta enzima, posiblemente relacionados con los valores de sobrevivencia encontrados para este insecticida. Esto en concordancia con lo reportado por González y Salazar (2015), quienes

realizaron estudios moleculares de la región ITS2II cromosómica y evidenciaron heterogeneidad en los tamaños de la región ITS2 de los individuos de la población de Santos Michelena (SM), de lo cual se puede inferir que: 1) Los individuos que se encuentran en SM provienen de una población invasora distinta al resto de las poblaciones estudiadas, o 2) Existe una alta tasa de variabilidad intraespecífica en la región ITS2 en esta especie de mosquitos.

Estudios sobre comportamiento frente a insecticidas en *Ae. albopictus* están pobremente documentados ya que los mismos se han enfocado principalmente en vectores de malaria y dengue, específicamente *Ae. aegypti*. Se encuentran reportados estudios principalmente en Asia y en menor frecuencia en Europa, África y América, empleando insecticidas biológicos, *Bacillus thuringiensis israelensis* (Duque & Navarro, 2005), y químicos tales como: temefos, malatión, fenitrotión, permeterina, lambdacialotrina, deltametrina, DDT, propoxur entre otros (Ponlawat *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2011; Kamgang *et al.*, 2011; Pocquet *et al.*, 2014).

Marcombe *et al.* (2014), encontraron en *Ae. albopictus* resistencia al malatión y susceptibilidad a piretroides; el mecanismo involucrado para la resistencia al organofosforado evaluado por sobreexpresión de esterasas (β) y Glutation-S-Transferasas (GST), reportaron resistencia al DDT, atribuyendo la resistencia a las (GST), asociadas principalmente con la resistencia a DDT (Clark *et al.*, 1984) organofosforados y piretroides (Kostaropoulos *et al.*, 2011; Vontas *et al.*, 2002).

Otro estudio realizado por Kamgang *et al.* (2011), hallaron susceptibilidad al fenitrotion y resistencia al DDT en *Ae. albopictus* de África Central, pero no encontraron resistencia cruzada entre DDT y el piretroide deltametrina sugiriendo la participación de la resistencia metabólica y no modificación del sitio diana (IRAC, 2006). Pethuan *et al.* (2007) encontraron susceptibilidad en *Ae. albopictus* a los insecticidas: deltametrina, permetrina, fenitrotion y propoxur, obteniendo niveles enzimáticos muy bajos, que se corresponde a su condición de susceptibilidad a los insecticidas evaluados.

Los resultados encontrados en el presente trabajo, constituyen una referencia para el inicio de estudios de resistencia a insecticidas de *Ae. albopictus* en Venezuela y la región, a fin de contribuir en la eficacia de las medidas de control químico vectorial de esta especie

Conflicto de intereses

Los autores del trabajo declaramos que no existen conflictos de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a: los árbitros por su importante contribución en la revisión de este artículo, a la Dirección de Investigación del IAE; al personal del Centro de Estudio de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA) adscrito al IAE, especialmente al personal Técnico del Laboratorio de Biología de Vectores y Reservorios por el excelente trabajo realizado en el desarrollo de las Cepas. Esta investigación fue financiado por el IAE, Ministerio del Poder Popular Para la Salud.

REFERENCIAS

- Abbott W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* **18**: 265-267.
- Alarcon-Elbal, P., Delacour, S., Pinal, R., Ruiz-Arredondo, I., Muñoz, A., *et al.* (2010). Establecimiento y mantenimiento de una colonia autóctona española de *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1894, (Diptera, Culicidae) en laboratorio. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.* **69**: 140-148.
- Benedict MQ., Levine RS., Hawley WA. & Lounibos P. (2007). Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vect Borne Zoo Dis.* **7**: 76-85.
- Brown A.W.A. (1986) Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J. Amer. Mosq. Control. Assoc.* **2**: 123-140.
- Brogdon W. & Baber A. (1990). Fenitrotion-deltametrina cross-resistance conferred by esterases in Guatemalan *Anopheles albimanus*. *Pestic Biochem Physiol.* **3**: 130-139.
- Brogdon W., McAllister J. & Valule J. (1997). Hemeperoxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *J Am Mosq Control Assoc.* **13**: 233-237.
- Brogdon W. & McAllister J. (1998). Simplification of adult mosquito bioassays through use of time mortality determinations in glass bottles. *J. Amer. Mosq. Control. Assoc.* **14**: 159-154.
- Chadwick P., Invest J. & Browron M. (1977) An example of cross-resistance to pyrethroids in DDT-resistance *Aedes aegypti*. *Pestic. Sc.* **8**: 618-624.
- Charrel R. N., de Lamballerie X. & Raoult D. (2007) Chikungunya outbreaks, the globalization of vectorborne diseases. *N. Engl. J. Med.* **356**: 769-771.
- Chuaycharoensuk T., Juntarajumnong W., Boonyuan W., Bangs M., Akranakul P., Thammapalo S., *et al.* (2011). Frequency of pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *J Vector Ecology.* **36**: 204-211.
- Clark A. & Shamaan N. (1984). Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the housefly is glutathione S-transferase. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **22**: 249-261.
- Duquet J. & Navarro M. (2005). Susceptibilidad de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) en de Sao Pablo Brasil al Bacillus Thuriensis Var israeliensis. *Rev Colomb de Entomol.* **31**: 99- 201.

- Figueroa Acosta L. E., Marín Álvarez M., Pérez Pinto E. & Molina de Fernández D. (2006). Mecanismos de resistencia a insecticidas organosintéticos en una población de *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae) del estado Aragua. *Bol. Mal. Salud Amb.* **46**: 39-47.
- Forattini O. P. (1986). Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. *Rev Saúde Pública.* **20**: 244-245.
- Flores A., Salomon J., Fernandez I., Ponce G., Loaiza M., Lozano S., et al. (2007). Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L) from Quintana Roo, southern Mexico. *J. Amer. Mosq. Control. Assoc.* **22**: 672-677.
- González M. F. & Salazar M. (2015). Diferencias moleculares intraespecíficas del mosquito *Aedes albopictus*. Memorias de las XXII Jornadas Científicas “Dr. Arnoldo Gabaldon”.
- 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.
- Gratz N. G. (2004). Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *J. Medi and Veterinary Entomol.* **18**: 215-227.
- Grieco J., Achee N., Chareonviriyaphap T., Suwonkerd W., Chauhan K., Sardelis M. & Roberts D. R. (2007). A new classification system for the actions of IRS chemicals traditionally used for malaria control. *Ploss one 2*:e716.
- Hawley W. A. (1988). The biology of *Aedes albopictus*. *J of the American Mosq Control Association.* **4**: 2-39.
- Hemingway J. (1998). *Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual)*. World Health Organization. Geneva.
- Hemingway J. & Ranson H. (2000). Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annu Rev. Entomol.* **45**: 371-391.
- Ibáñez-Bernal B. B. S., Mutebi J. P., Argot E. & Rodríguez G. (1997). First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. *Med. Vet. Entomol.* **11**: 305-309.
- IRAC (2006). *Prevention and management of insecticide resistance in vector and pests of public health importance*. Insecticide Resistance Action Committee. USA: Crop Life.
- Kamgang B., Marcombe S., Chandre F., Nchoutpouen E., Nwane P., Etang J., Corbel V & Paupy C. (2011). Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in África Central. *Parasites & Vector.* **4**: 79-86
- Karunaratne S., Jayawar-Dena K., Hemingway J. & Ketterman A. (1993). Characterization of a B-type esterase involved in insecticide resistance from the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochem J.* **339**: 575-579.
- Khan H. A. A., Akram W., Shehzad K & Shaalan E. (2011). First report of field devolved resistance to agrochemicals in dengue mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), from Pakistan. *Parasites & Vector.* **4**: 146-156
- Kostaropoulos I., Papadopoulos A., Metaxakis A., Boukouvala E. & Papadopoulo M. (2011). Glutathione S-transferase in defense against pyrethroid insecticides. *Biochemistry & Molecular Biology Insect.* **31**: 313-319.
- Kushwah R. B. S., Mallick P. K., Ravikumar H., Dev V., Kapoor N., Adak T & Singh O. P. (2015). Status of DDT and pyrethroid resistance in Indian *Aedes albopictus* and absence of Knockdown resistance (Kdr) mutation. *J Vector Borne.* **52**: 95-98.
- Marcombe S., Farajollahi A., Healy S., Clark G., & Fonseca D. (2014). Insecticide resistance status of United States populations of *Aedes albopictus* and Mechanisms involved. *Plos One* **9**: 1-10.
- Martiradona, G., Silva, G., Molina de Fernández, D., Salcedo, L., Sánchez, V., Amaya, W & Berti, J. (2013). *Aedes (Stegomyia) albopictus*: (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) en Maracay-Aragua, Venezuela, aumento en su distribución geográfica. *Bol Mal Salud Amb.* **53**: 196-197.

- Mitchell C. S. (1995) Geographic Spread of *Aedes albopictus* and potential for involvement in arbovirus cycles in the Mediterranean basin. *J Vect Ecol.* **20**: 44-58.
- Molina de Fernández D., & Figueroa Acosta L. E. (2009). Resistencia metabólica a insecticidas organofosforados en *Anopheles aquasalis* Curry 1932, municipio Libertador, estado Sucre, Venezuela. *Biomédica.* **29**: 604-615
- Momi D. & Prafulla D. (2014). Status of insecticide resistance and detoxifying enzyme activity of *Aedes albopictus* population in Sonitpur district of Assam, India. *International J of Mosquito Research.* **1**: 35-41
- Moore C. G. & Mitchell C. J. (1997). *Aedes albopictus* in the United States: ten-year presence and public health implications. *Emerg Infect Diseases.* **3**: 329- 334.
- Navarro J., Zorrilla A. & Nelson M. (2009). Primer registro de *Aedes albopictus* (Skuse) en Venezuela. Importancia como vector de dengue y acciones a desarrollar. *Bol Mal Salud Amb.* **49**: 161-166.
- OMS (1993). *Técnicas entomológicas de campo para la lucha antipalúdica, parte I.* Guía del alumno. Organización Mundial de la Salud. Ginebra. pp.:9-77.
- OMS (1998). *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticide on treated surfaces.* WHO/CDC/MAL/98.12 Geneva, Switzerland.
- OPS (2013). Epidemiological alert. Chikungunya, fever, 9. (Disponible en línea: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid_23806&Itemid_999999&lang_en). (Consultado: 2015, Marzo 26).
- OPS & OMS (2015). *Actualización Epidemiológica, Infección por virus Zika.* [Disponible en línea: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=32023&lang=es]. (Consultado: 2015, Octubre 16).
- Pethuan S., Jirakanjanakit N., Saengtharatip S., Chareonviriyaphap T., Kaewpa D & Rongnoparut P. (2007). Biochemical studies of insecticide resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Tropical Biomedicine.* **24**: 7-15.
- Ponlawat A., Scott J. & Harrington L. (2005). Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* across Thailand. *J med Entomology.* **42**: 822-825.
- Pocquet N., Darriett F., Zumbo B., Milesi P., Thiria J., Bernard V., Toty C., Labbe P. & Chandre F. (2014). Insecticide resistance in disease vectors from Mayotte: an opportunity for integrated vector management. *Parasites & Vectors.* **7**: 299-309.
- Quinto C., Frontado H., Ledezma M., Polanco G., Montenegro J. & Naranjo J. (2013) *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) en los estados Monagas y Guarico, Venezuela. *Bol. Malariol Salud Amb.* **53**: 65-67.
- Ramírez R., Estrada Y. & Guzman H. (2012) Primer registro para el estado Aragua de *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1894 (Diptera: Culicidae). *Bol. Malariol Salud Amb.* **52**: 307-309.
- Reiter P. (1998). *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988-1995: the shape of things to come?. *J of the Am Mosquito Control Association* **14**: 83-94.
- Rodríguez-Morales A. J. (2015). No era suficiente con el dengue y chikungunya: llegó también Zika. *Archivos de Medicina.* 11(2):e3. doi: 10.3823/1245
- Rodríguez M., Bisset J., Molina D., Soca A. (2000). Malathion resistance in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* after it is in *Aedes aegypti* control programs. *J. Amer. Mosq. Control. Assoc.* **16**: 324-330.
- Rodríguez M., Bisset J., Díaz C. Soca A. (2003). Cross resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* from Cuba induced by the selection with organophosphate malathion. *Rev Cubana Med Trop.* **55**: 105-111.
- Rodríguez M., Bisset J., Fernández D. Pérez O. (2004). Resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti*: prevalencia de la

- esterasa A4 asociada con la resistencia a temefos
Rev Cubana Med Trop. **56**: 54-60.
- Rubio-Palis, Y., Estrada, Y., Guzmán, H., Caura, S.,
Sánchez, V. & Arias, L. (2015). Primer reporte de
Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse) (Diptera:
Culicidae) en el estado Bolívar e implicaciones
epidemiológicas. *Bol. Malarial Salud Amb.* **55**:
110-112.
- Saume F. (1992). *Introducción a la química y
toxicología de insecticidas*. Ed. Industria Gráfica
Integral C.A. Maracay, Venezuela.
- Robert R. Sokal, Miguel Lahoz León & F. James
Rohlf (1979). *Biometría: Principios y métodos
estadísticos en la investigación biológica*. Primera
edición española. Ediciones H. Blumes Rosario,
17- Madrid -5., 832p
- Somboon, P., Prapanthadara, L. y Suwonkerd, W.
(2003). Insecticide susceptibility tests of *Anopheles
minimus* s.l., *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*,
and *Culex quinquefasciatus* in northern Thailand.
Southeast Asian J of Trop Med and Public Health
34: 87-93.
- Thanispong K., Sathantriphop S. & Chareonviriyaphap
T. (2008). Insecticide resistance of *Aedes aegypti*
and *Culex quinquefasciatus* in Thailand. *J. Pestic.
Sci.* **33**: 351-356
- Vassena C. & Picollo M. (2000). Insecticide resistance
in Brazilian Triatom infestans and Venezuelan
Rhodnius prolixus. *Med Vet Entomol.* **14**: 51-55.
- Vontas J., Hejazi M., Hawkes N., Cosmidis N.,
Loukas M. & Hemingway J. (2002). Resistance-
associated point mutations of organophosphate
insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit
fly *Bactrocera oleae*. *Insect Molecular Biology.*
11: 329-336.

Recibido el 11/06/2015
Aceptado el 18/06/2016

Mecanismos de resistencia a la permetrina en dos poblaciones de *Aedes aegypti* del occidente de Venezuela

Mechanisms of Permethrin resistance in two populations of Aedes aegypti in western Venezuela

Leslie Álvarez González^{1,2*}, Gustavo Ponce García² & Adriana Flores Suarez²

RESUMEN

Se determinó la resistencia a la permetrina en *Aedes aegypti* de los estados Trujillo y Zulia mediante bioensayos de botella. Los insectos derribados durante la hora de exposición fueron registrados y usados para calcular la Concentración Knock-down cincuenta (CK₅₀) y los muertos a las 24 horas para la Concentración Letal cincuenta (CL₅₀). La resistencia al derribo y post-recuperación fueron determinadas calculando del Factor de Resistencia FRCK₅₀ y FRCL₅₀, comparando los valores de CK₅₀ y CL₅₀ de las poblaciones de *Ae. aegypti* de campo con los de la cepa susceptible New Orleans obtenidos mediante análisis de regresión log-probit. Mecanismos metabólicos y no metabólicos asociados a la resistencia, fueron evaluados midiendo los niveles de las enzimas alfa-esterasas, beta-esterasas, oxidasas de función múltiple y glutatión-S-transferasas mediante la técnica de microplacas y determinando la frecuencia alélica I1016 por PCR alelo específico. Ambas poblaciones mostraron baja resistencia al derribo (FRCK₅₀ < 5) y moderada resistencia post-recuperación (FRCL₅₀ entre 5 y 10). Sobre-expresión de alfa-esterasas fue observada en la población Loma Linda la cual se correlacionó significativamente con la CL₅₀. En la población Pampanito la frecuencia del alelo I1016 fue de 0,1 y en Loma Linda de 0,17, observándose homocigotos mutantes solo en esta última población. Se evidencia la presencia de mecanismos metabólicos y no metabólicos asociados a la resistencia al derribo y post-recuperación a la permetrina en las poblaciones bajo estudio, lo cual debe ser considerado antes de la aplicación de piretroides para el control de *Ae. aegypti* en la zona de estudio.

Palabras clave: Culicidae, control químico, enzimas desintoxicantes, mutación *kdr*.

SUMMARY

Permethrin resistance was determined in *Aedes aegypti* populations from Trujillo and Zulia states using the bottle bioassay method. Insect knock-down rates during 1h of exposure were recorded and used to calculate the 50% knock-down concentration (KC₅₀) and the mortality after 24 h (LC₅₀). Knock-down and post-recovery resistance were determined by calculating the resistance factors, FRKC₅₀ and FRLC₅₀. This was done by comparing the KC₅₀ and LC₅₀ values (obtained by regression analysis log-probit) of the field populations with a susceptible New Orleans strain. Metabolic and non-metabolic mechanisms associated with resistance were assessed by measuring the levels of the following enzymes: alpha-esterases, beta-esterases, mixed function oxidases (MFOs) and glutathione-S-transferases (GSTs) using the microplate technique. We also determined the allelic frequency of I1016 by allele specific PCR. Both populations showed a low knock-down resistance (FRKC₅₀ < 5) and moderate post-recovery resistance (FRLC₅₀ between 5 and 10). Overexpression of alpha-esterases was observed in the Loma Linda population and was significantly correlated with the LC₅₀. The frequency of the I1016 allele was 0.1 for the Pampanito population and 0.17 for the Loma Linda population, and in the latter we also observed homozygous mutants. The existence of metabolic and non-metabolic mechanisms associated with knockdown resistance and post-recovery to permethrin in the populations studied was demonstrated. This should be taken into account before introducing these insecticides to control populations of *Ae. aegypti* in the region.

Key words: Culicidae, chemical control, detoxification enzymes, *kdr* mutation.

¹ Laboratorio de Bioquímica y Genética de Resistencia a Insecticidas. Instituto Experimental "J. W. Torrealba". Núcleo Universitario Rafael Rangel. Universidad de los Andes, Trujillo Venezuela. Sede Carmona. 3150.

² Laboratorio de Toxicología y Fisiología de Insectos. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. Facultad de Ciencias Biológicas. Av. Universidad s/n Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. México 66451.

*Autor de correspondencia: hleslieag@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Aedes aegypti (L.), principal vector de los flavivirus de la fiebre amarilla, dengue, fiebre hemorrágica por dengue (VFA y DENV) y zika (ZIKV), así como del alfavirus de la fiebre chikungunya (VC) ha desarrollado resistencia a los insecticidas en numerosos lugares del mundo (Brown, 1986). El desarrollo de este fenómeno en los mosquitos constituye el principal problema que afecta a las estrategias de control y se debe a la selección de genes de resistencia en las poblaciones de esta especie (WHO, 1981). En las últimas décadas, los insecticidas piretroides han jugado un papel importante en el control de adultos de *Ae. aegypti* a nivel mundial, a menudo en combinación con el insecticida organofosforado temefos para el control de estadios inmaduros, sin embargo, la evolución de la resistencia a estos y otros insecticidas en este vector ha comprometido la eficacia de los programas de control (Flores *et al.*, 2006, Thanispong *et al.*, 2008). Los principales mecanismos implicados en la resistencia a piretroides son el incremento de enzimas desintoxicantes tales como: carboxilesterasas, oxidasas de función múltiple P-450 (MFO) y glutatión-s-transferasas (GST) (Vaughan & Hemingway 1995, Rodríguez *et al.*, 1999, 2001, Kasai *et al.*, 2000, Prapanthadhara *et al.*, 2002, Hemingway *et al.*, 2004, Flores *et al.*, 2006) y mutaciones presentes en el gen para el canal de sodio dependiente de voltaje (Brenques *et al.*, 2003, Saavedra *et al.*, 2007, Yanola *et al.*, 2011). En Venezuela, investigaciones señalan resistencia de *Ae. aegypti* a los piretroides permetrina, ciflutrina, lambdacialotrina y deltametrina (Mazzarri & Georghiou, 1995, Molina *et al.*, 1995, Pérez, 2010, Álvarez *et al.*, 2008, 2013) lo cual refleja la intensa presión de selección ejercida, bien por la aplicación de estos químicos para el control de *Ae. aegypti*, o para el control de plagas agrícolas. Sobre-expresión de estererasas y MFO determinadas mediante el uso de sinergistas han sido reportados por Pérez (2010) en poblaciones de *Ae. aegypti* del estado Aragua resistentes a lambdacialotrina y deltametrina, del mismo modo, Álvarez *et al.* (2013), encuentran sobre-expresión de GST y MFO en poblaciones de los estados Trujillo y Lara resistentes a deltametrina. Mutaciones en el gen para el canal de sodio dependiente de voltaje asociadas a resistencia a piretroides, han sido observadas en *Ae. aegypti* de Venezuela. Saavedra *et al.*, (2007) refieren frecuencias para I1016 comprendidas entre 0,01 y 0,132 en poblaciones de los estados Anzoátegui, Lara, Bolívar y Apure. Recientes

investigaciones realizadas por Álvarez *et al.*, (2015) en poblaciones silvestres de *Ae. aegypti* de los estados Trujillo, Lara, Táchira y Guárico colectadas entre los años 2008-2012 demuestran la diseminación de la mutación V1016I con frecuencias del alelo I1016 comprendidas entre 0,01 y 0,37, así como la presencia de la mutación F1534C con frecuencias entre 0,35 y 1,0. Estos hallazgos acerca de los mecanismos metabólicos y no metabólicos responsables de la resistencia a piretroides en *Ae. aegypti* del territorio venezolano, exhortan al monitoreo de estas y otras poblaciones del país donde se observa emergencia de chikungunya y zika así como re-emergencia del dengue, lo anterior con la finalidad de ampliar la información necesaria para el manejo de la resistencia de este vector a los insecticidas usados para su control. Este estudio evalúa el nivel de resistencia de dos poblaciones de *Ae. aegypti* procedentes de los estados Trujillo y Zulia al piretroide permetrina, así como niveles de enzimas desintoxicantes y la mutación *kdr* V1016I.

METODOLOGÍA

Material Biológico

El presente estudio comprende 2 poblaciones de campo de *Ae. aegypti* procedentes de las localidades Pampanito (9°24'42"LN, 70°29'39"LO) en el estado Trujillo y Loma Linda (10°43'26"LN, 71°37'24"LO) en el estado Zulia, al occidente de Venezuela. Estadios inmaduros fueron colectados en el 2014 y transportados al Instituto Experimental "J. W. Torrealba" de la Universidad de los Andes, Venezuela para el establecimiento de las colonias y obtención de las generaciones parentales, las cuales fueron trasladadas a la Universidad Autónoma de Nuevo León, México donde fueron obtenidas las generaciones filiales F1, tal como se describe en (Álvarez *et al.*, 2013). Hembras de 1 a 3 días de emergidas y sin alimentación sanguínea fueron utilizadas para los bioensayos, pruebas bioquímicas y moleculares. La cepa de *Ae. aegypti* New Orleans (NO) mantenida durante varios años en el laboratorio sin exposición a insecticidas, fue usada como cepa de referencia susceptible.

Bioensayos

El insecticida evaluado permetrina 99% de pureza calidad reactivo (ChemService, West Chester, PA), se resuspendió en 1 mL de acetona para obtener

una solución stock con una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, a partir de la cual fueron preparadas diferentes diluciones con concentraciones que ocasionaron entre 2% y 98% de mortalidad. Los bioensayos se llevaron a cabo siguiendo la metodología de botellas tratadas propuestas por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, 2002) en Atlanta, GA y (Brogdon&McAllister 1998), usando de 15 a 20 mosquitos por botella. Se evaluaron 5 a 6 concentraciones del insecticida mediante 4 réplicas (botella) por concentración y un grupo control o testigo cuya botella se trató solo con acetona. El tiempo de exposición fue de 1 h, tiempo durante el cual se hicieron observaciones cada 10 minutos para registrar los insectos derribados y evaluar el efecto Knock-down. Posteriormente, los insectos fueron trasladados a envases libres de insecticida y a las 24h se registró la mortalidad. Los bioensayos se realizaron en 3 oportunidades diferentes tanto en las poblaciones de campo y con la población de referencia NO. Las mortalidades fueron corregidas mediante la fórmula de Abbott (1925) cuando se registró mortalidad en el grupo control entre 5 y 20%. Los resultados obtenidos fueron sometidos al análisis de regresión log-Probit (Finney, 1971), empleando el programa Probit (Raymond, 1985), para determinar la CK_{50} y CL_{50} e intervalos de confianza ($\alpha = 0,05$). Los factores de resistencia (FR) fueron calculados dividiendo los valores de CK_{50} de cada población entre los valores de CK_{50} de la cepa NO, así como los valores de CL_{50} y utilizados para categorizar la resistencia como: baja ($FR < 5$), moderada (FR entre 5 y 10) y alta ($FR > 5$) según Mazzarri&Georghiou (1995).

Enzimas

Cada mosquito se homogenizó en 2 mL de buffer fosfato pH 7,2 y 100 μL fueron transferidos a pozos individuales por triplicado por enzima. Alfa y beta esterases, oxidasas de función múltiple y glutatión-S-transferasas (GST) fueron cuantificadas en 30 mosquitos de cada población de campo y de la cepa de referencia siguiendo la metodología descrita por Brogdon (1989) y CDC (1992). La absorbancia fue medida en un microlector de placas UVM-34 (ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Austria) y promediada. La concentración de proteínas fue determinada según Brogdon (1984) y en caso de observarse variación en el tamaño de los mosquitos se realizó la dilución necesaria del homogenado. Se evaluaron los datos para cada ensayo bioquímico por

análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey a un nivel de significancia de $P > 0,05$, para comparar los promedios de absorbancia para cada enzima de las poblaciones estudiadas con el de la cepa de referencia. El umbral de resistencia correspondiente al valor de absorbancia máximo en la cepa NO, se comparó con los obtenidos en las poblaciones estudiadas. Se calculó el porcentaje de individuos que excedían el umbral (CDC, 2002) y se clasificó la enzima como un mecanismo no alterado (NA), alterado incipientemente (IA), o alterado (A), si $< 15\%$, $15-50\%$, o $> 50\%$ de los individuos excedían el umbral, respectivamente (Montella *et al.*, 2007). Análisis de regresión lineal fue realizado entre los valores de las CL_{50} y los niveles enzimáticos (promedio de valores de absorbancia). La correlación (r) fue determinada para conocer el grado de asociación entre ambas variables. Tres criterios fueron considerados para asociar algún mecanismo enzimático con la resistencia encontrada; valores promedio de absorbancia significativamente superiores con respecto a los mostrados por la cepa NO, más del 50% de los individuos excediendo el umbral de resistencia y alta correlación significativa entre los valores de CL_{50} y promedios de absorbancia para cada enzima.

Determinación de la frecuencia de la mutación V1016I

Extracción de ADN

El ADN se aisló de cada mosquito mediante la técnica de extracción sales modificada por Coen *et al.*, (1982). El ADN se pelletizó y antes de usarse se resuspendió en 200 μL de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0). La cantidad y la calidad de cada ADN se determinó en un NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc).

Amplificación de los alelos específicos PCR

Para la amplificación de los alelos V1016 e I1016 se realizó una sola reacción de PCR en tubo (Saavedra *et al.*, 2007). Se preparó un Máster mix con buffer 10x, agua destilada ultrapurificada, cloruro de magnesio 1,5 mM, dNTP's 25nM, 2 primers "alelo específicos" a 500 pM/ μL : V1016 (5'-[GCGGGCAGGGCGGGGGGGCGGGGCCACAAATTGTTTCCCACCCGCACCG]3') y I1016 (5'-[GCGGGCACAAATTGTTTCCCACCCGCACTGA]-3') y un primer anti sentido Ile1016r

(5'-[TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC]-3') y Taq polimerasa 5U/μL. En cada tubo de PCR se mezclaron por pipeteo 1,5 μL de ADN y 23,5 μL del Master Mix y se colocaron en un termociclador Biocycler BIORAD® programado a 4 ciclos: 1er ciclo: 95°C x 5 min, 2do Ciclo: 95°C x 1min, 60°C x 1min, 72°C x 1,15 min x 29, 3er Ciclo: 72°C x 10 min, 4°C 24 horas. Tres controles fueron incluidos cada vez que se realizó la PCR: un control homocigoto susceptible (V1016/V1016 cepa NO), un homocigoto resistente cepa IMU5 (I1016/I1016 población resistente Isla Mujeres, México) donada por la Dra. Karla Saavedra Rodríguez de Colorado State University, USA y un control negativo que correspondía a agua destilada ultrapurificada. Los productos de PCR, un marcador de peso molecular de 12 bandas (de 25bp a 500 pb HyperLadderTMV, Bionline) y el control negativo se revisaron en geles de agarosa al 3% con gel red. La electroforesis se corrió por 20 minutos a 100 voltios y se visualizó el gel para la genotipificación según Saavedra *et al.* (2007) mediante fragmentación de productos de PCR de alelos específicos del sistema V1016I. La frecuencia de cada mutación (p), fue calculada como la suma de dos veces el número de homocigotos resistentes y el número de heterocigotos, todo dividido entre 2n, donde n es el tamaño de la muestra. El intervalo de confianza 95% alrededor de p, fue calculado como el intervalo Wald:

$$\tilde{p} \pm Z_{\alpha/2} \sqrt{\tilde{p}(1-\tilde{p}) / n}$$

el cual fue ajustado por adición de la mitad del cuadrado del valor crítico Z (1,96), para el numerador y el cuadrado entero del valor crítico en el denominador antes calculando el intervalo (Agresti & Coull, 1998).

RESULTADOS

Para la población de *Ae. aegypti* Pampanito, la CK₅₀ correspondió a 2,57 μg/botella y la CL₅₀ 2,60μg/botella, para Loma Linda la CK₅₀ fue 2,90μg/botella y 2,54 μg/botella la CL₅₀ y para NO la CK₅₀ fue de 0,67μg/botella y 0,46μg/botella la CL₅₀. Al determinar los FRCK₅₀ encontramos un valor de 3,8 para Pampanito y 4,3 para Loma Linda mostrando baja resistencia al derribo y valores de FRCL₅₀ en Pampanito de 5,7 y 5,5 en Loma Linda mostrando moderada resistencia post-recuperación (Tabla I). Con respecto a los mecanismos enzimáticos, sobre-expresión significativa de las alfa-esterasas y oxididasas fue observada en la población Pampanito con

porcentajes de individuos que excedían el umbral de resistencia inferiores a 15% quedando categorizadas como mecanismos enzimáticos NA según Montella *et al.*, (2007), al evaluar la correlación entre los valores de CL₅₀ y los niveles enzimáticos (promedio de absorbancia) solo se encontró correlación significativa con las alfa-esterasas. En ninguno de los casos se cumplieron los tres criterios propuestos en este estudio, razón por la cual no se asocian estos mecanismos enzimáticos con la resistencia post-recuperación. En la población Loma Linda se observó incremento significativo de las alfa-esterasas, oxididasas y GST con porcentajes de individuos que excedían el umbral de resistencia superiores al 25%, quedando categorizados como mecanismos IA. Alta correlación significativa (r= 0,998; p: α 0,05) entre la CL₅₀ y los niveles de alfa-esterasas fue encontrada, asociando la participación de estas enzimas en la resistencia post-recuperación mostrada por esta población (Tabla II y Fig. 1). En la Tabla III se muestra el número de mosquitos para cada genotipo, la frecuencia del alelo I1016 e intervalo de confianza 95% alrededor de la frecuencia de las poblaciones naturales de *Ae. aegypti* de los estados Trujillo y Zulia para el 2014. El genotipo homocigoto silvestre V1016/V1016 fue el genotipo predominante, seguido por el genotipo heterocigoto V1016/I1016 presentes en ambas poblaciones. En contraste, el genotipo homocigoto mutante I1016/I1016 solo estuvo presente en la población Loma Linda (2/26). La frecuencia alélica I1016 en la población Loma Linda fue superior a la encontrada en Pampanito con valores de 0,17 y 0,10 respectivamente, en concordancia con los resultados obtenidos mediante bioensayos, ya que el mayor valor de FRCK₅₀ se obtuvo en la población Loma Linda. Todos los genotipos estuvieron en equilibrio para el locus 1016 según la Ley de Hardy-Weinberg con base en la prueba de α2 de Pearson, con valores calculados inferiores al valor tabulado (3,84).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados evidencian resistencia knock-down y post-recuperación a la permetrina a pesar de ser una molécula que no ha sido incorporada en los programas de control de *Ae. aegypti* en Venezuela, no obstante, la aplicación de insecticidas piretroides a nivel doméstico para el control de insectos voladores y en los programas de control de otras plagas de interés en salud pública pudiera

Tabla I. CK₅₀, CL₅₀ y factores de resistencia a la permetrina en *Ae. aegypti*, cepa susceptible New Orleans y dos poblaciones silvestres del occidente de Venezuela.

Cepas de <i>Aedes aegypti</i>	CK ₅₀ µg/mL	IC	b (+/- DE)	FRCK ₅₀	CL ₅₀ µg/mL	IC	b (+/- DE)	FRCL ₅₀
New Orleans	0,67	0,45-1,50	2,10 (0,31)	-	0,46	0,29-0,97	1,84 (0,27)	-
Pampanito	2,57	1,14-5,53	3,08 (0,45)	3,8	2,60	2,24-3,01	2,27 (0,41)	5,7
Loma Linda	2,90	1,99-5,60	4,90 (0,49)	4,3	2,54	2,07-3,13	4,45 (0,40)	5,5

CK₅₀ = Concentración Knock-down cincuenta.CL₅₀ = Concentración Letal cincuenta

IC = Intervalos de Confianza 95%.

DE = Desviación Estandar

b = pendiente de la recta de regresión log-probit

FR = Factor de Resistencia.

Tabla II. Promedio de absorbancia (+/- DE) de cuatro mecanismos enzimáticos en *Ae. aegypti*, cepa susceptible New Orleans y dos poblaciones silvestres del occidente de Venezuela.

Cepas de <i>Aedes aegypti</i>	Alfa-esterasas	Beta-esterasas	Oxidasas	GST
New Orleans	0,423 (+/-0,073)	0,655 (+/-0,096)	0,122 (+/-0,028)	0,035 (+/-0,009)
Pampanito	0,483 (+/-0,083)*	0,655 (+/-0,108)	0,151 (+/-0,033)*	0,041 (+/-0,021)
Loma Linda	0,498 (+/-0,055)*	0,625 (+/-0,071)	0,191 (+/-0,035)*	0,062 (+/-0,019)*

DE = Desviación Estandar.

*promedio significativamente superior (p>0,05) al de la cepa NO.

Tabla III. Frecuencia alélica de I1016 en dos poblaciones silvestres de *Ae. aegypti* del occidente de Venezuela.

Cepas de <i>Aedes aegypti</i>	n	GG	GA	AA	Frecuencia de I1016	IC 95%	χ ² Hardy-Weinberg
Pampanito	26	21	5	0	0,10	(-0,02) - 0,13	0,294
Loma Linda	26	19	5	2	0,17	0,07 - 0,36	2,80

n = tamaño de la muestra.

GG = homocigoto silvestre V1016/V1016

GA = heterocigoto V1016/I1016

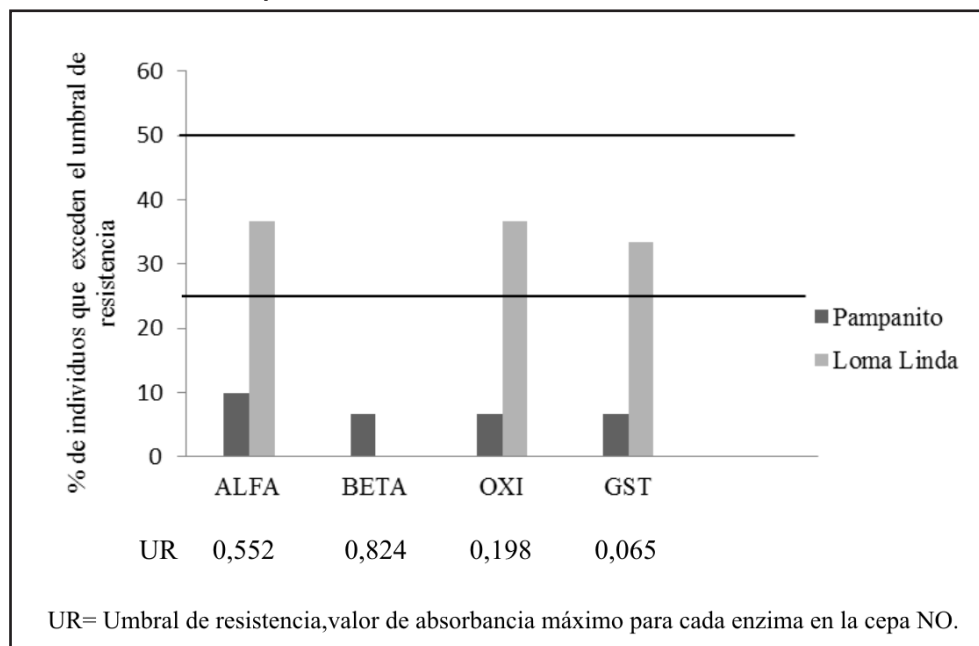
AA = homocigoto mutante I1016/I1016

IC = Intervalo de Confianza.

ser un factor determinante. Adicionalmente, existen reportes de *Ae. aegypti* resistentes a piretroides debido a resistencia cruzada con DDT (Hemingway *et al.* 1989, Brengues *et al.* 2003), ya que comparten el sitio blanco, el canal de sodio dependiente de voltaje, lo cual pudiera ser un factor adicional presente en nuestras poblaciones, debido a la presión de selección ejercida con la aplicación de DDT por varias décadas en Venezuela para el control de la malaria y otras enfermedades metaxénicas. El primer reporte de resistencia a la permetrina en Venezuela fue realizado por Mazzarri & Georghiou (1997) en poblaciones de *Ae. aegypti* procedentes de los estados Aragua y Falcón, no siendo afectada por los sinergistas DEF y butóxido de piperonilo (PBO), sugiriendo la

presencia de un mecanismo no enzimático asociado a la resistencia encontrada. *Ae. aegypti* de la población Pampanito (estado Trujillo), ha sido evaluado desde el 2006, particularmente en el 2008 mostró resistencia al piretroide deltametrina evolucionando en el 2010, con niveles sobre-expresados de GST en individuos supervivientes luego de ser expuestos a la CL₅₀ del piretroide y aumento de las frecuencias de los alelos mutantes I1016 y C1534 para el 2012 (Álvarez *et al.*, 2013; 2015). En el presente estudio encontramos resistencia knock-down y post-recuperación a la permetrina, por lo que esta población presenta resistencia cruzada a los piretroides permetrina y deltametrina, lo que limita el uso de estos químicos para el control de *Ae. aegypti* en la localidad. Similares

Fig. 1. Porcentaje de individuos de las Cepas de *Ae. aegypti* evaluadas que exceden el umbral de resistencia para cada enzima.



resultados han sido obtenidos por Molina *et al.*, (1995) en Venezuela, Harris *et al.*, (2010) en Islas Gran Caimán, Fonseca *et al.*, (2010) en Colombia y Flores *et al.*, (2013) en México. A pesar de mostrar niveles sobre-expresados de alfa-esterasas y oxidasas, estos mecanismos enzimáticos no fueron asociados con la resistencia encontrada, debido al bajo porcentaje de individuos que excedían el umbral de resistencia (< 15%) para ambas enzimas y ausencia de correlación entre los niveles de oxidasas y los valores de la CL_{50} , a diferencia de lo observado en la población Loma Linda resistente también a la permetrina, donde las alfa-esterasas se mostraron como un mecanismo incipientemente alterado (> entre 15% y 50%) correlacionándose significativamente con la CL_{50} , indicando la participación de estas enzimas en la resistencia desarrollada por esta población. El papel de las esterasas, oxidasas y GST en la resistencia a la permetrina es controversial, investigaciones realizadas por Mazzarri & Georghiou (1997), Prapanthadara *et al.* (2002) y Harris *et al.* (2010) afirman que no están involucradas en la resistencia a piretroides, en contraste, Flores *et al.* (2009), Azirun (2010), Fonseca *et al.* (2010), Somwang *et al.* (2011) y Kasai *et al.* (2014), demuestran el papel de enzimas como oxidasas P450 y esterasas en la resistencia a

permetrina. Con respecto al mecanismo de resistencia no metabólico mutación V1016I, este estudio evidenció el papel de esta mutación en la resistencia a la permetrina en *Ae. aegypti* de ambas poblaciones estudiadas, estando de acuerdo con diversos reportes que muestran que la resistencia a piretroides no se debe solo a la presencia de mutaciones en el gen del canal de sodio dependiente de voltaje sino también a mecanismos enzimáticos (Bregueset *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2005, 2006), tal como se presentó en la población Loma Linda. La mutación V1016I ha sido informada anteriormente en Venezuela en poblaciones silvestres de *Ae. aegypti* de varios estados, entre ellos el estado Trujillo, de donde es originaria la población Pampanito (Saavedra *et al.*, 2007; Álvarez *et al.*, 2015) y se ha diseminado a otros estados como el estado Zulia, sugiriendo ser el reflejo de la situación general del país. Cada año en Venezuela se continúan reportando casos de dengue, fiebre hemorrágica por dengue, chikungunya y la reciente arbovirosis zika. Particularmente para chikungunya, durante el año 2014 fueron reportados 37.274 casos probables con 2.486 confirmados para la semana epidemiológica 52 (OPS, 2014) los cuales descendieron progresivamente, reportándose para mayo de 2015 un total de 12.754 casos sospechosos

y confirmados, según la Sociedad Venezolana de Epidemiología; para zika, el gobierno anunció 5.221 casos sospechosos y 319 confirmados para febrero de 2016. El programa de control de *Ae. aegypti* durante los años 2014 y 2015 se basó en la eliminación de criaderos y la aplicación de los insecticidas químicos temefos granulado 1%, malatión 94%, fenitrotion CE 50% , pirimifosmetil 50% y deltametrina CE 2,5% en nebulizaciones de ultra bajo volumen, sin embargo, para la semana epidemiológica 41 del 2014, el Índice Aédico a Casas (IAC) a nivel nacional ascendió a 19,79, con respecto a la semana homóloga del 2013, resultando 2.136 casas positivas (MPPS, 2014) descendiendo en el 2015 a 17,54, lo cual se vio reflejado en el ascenso de casos de dengue, la ola epidémica de chikungunya registrada en el 2014 y la emergencia de zika en el país, a finales del año 2015. Debido a la necesidad de controlar *Ae. aegypti* en Venezuela, se han realizado investigaciones sobre la susceptibilidad y/o resistencia a los diferentes grupos de insecticidas químicos, así como los mecanismos de resistencia, las cuales se han limitado a poblaciones procedentes de pocos estados venezolanos (menos del 30%), trayendo como consecuencia la falta de información detallada acerca de la respuesta de este vector a los insecticidas usados en la actualidad. Lo anterior se traduce en un manejo general de la resistencia a nivel nacional que repercute en el éxito de los programas de control. Nuestro estudio comprendió poblaciones de *Ae. aegypti* de dos estados venezolanos, el primero Trujillo, el cual se ha monitoreado desde el año 2008 hasta la actualidad, reportándose resistencia a los insecticidas piretorides con participación de mecanismos metabólicos y no metabólicos, así como susceptibilidad a los organofosforados temefos y malatión usados para su control, el segundo Zulia, que a pesar de ser un estado referido durante los últimos cinco años como de alta casuística por dengue, no ha sido objeto de investigaciones acerca de la resistencia a insecticidas. La presente investigación viene a ser el primer reporte de resistencia a insecticidas piretroides en *Ae. aegypti* del estado Zulia, Venezuela, así como la determinación de enzimas desintoxicantes y mutaciones en el gen *para* del canal de sodio dependiente de voltaje. Recomendamos desarrollar investigaciones similares en otras localidades de este estado y otros estados del país con diferentes insecticidas con la finalidad de contar con información importante para el manejo de la resistencia. Adicionalmente, deben monitorearse continuamente las poblaciones de *Ae. aegypti* para

evitar la evolución de la resistencia y considerar los resultados obtenidos para garantizar el éxito del control del vector en las localidades estudiadas.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan que no hubo conflicto de intereses con persona o institución alguna en ninguna de las etapas de ejecución de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

La investigación fue financiada por la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), México a través del proyecto Fortalecimiento del laboratorio de referencia para el estudio de la resistencia a insecticidas en artrópodos vectores de enfermedades, CONACYT INFR 2015-01 No. 251675 y la Universidad de los Andes, Venezuela a través del proyecto NURR C-571-13-03-B del CDCHTA, e Intercambio Científico.

REFERENCIAS

- Abbott W. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* **8**: 265-267.
- Agresti A. & Coull B. A. (1998). Approximate is better than 'exact' for interval estimation of binomial proportions. *Am Stat.* **52**: 119-126.
- Álvarez L., Castillo C., Oviedo M. & Briceño F. (2008). Diferencias en la susceptibilidad a la deltametrina en poblaciones de *Aedes aegypti* de Trujillo, Venezuela. *Bol Mal Salud Amb.* **48**: 169-175.
- Álvarez L., Ponce G., Oviedo M., López B. & Flores A. (2013). Resistance to Malathion and Deltamethrin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Western Venezuela. *J Med Entomol.* **50**: 1031-1039.
- Álvarez L., Ponce G., Saavedra-Rodríguez K., López B. & Flores A. (2015). Frequency of V1016I and F1534C mutations in the voltage-gated sodium channel gene in *Aedes aegypti* in Venezuela. *Pest Management Science.* **71**: 863-869.
- AzirunMohdSofian. (2010). Permethrin resistance in *Aedes aegypti* (Linnaeus) collected from Kuala

- Lumpur, Malaysia. *J. Asia-Pacific Entomol.* **13**: 175-182.
- Bregues C., Hawkes N. J., Chandre F., Mc Carroll L., Duchon S., Guillet P., *et al.* (2003). Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med. Vet. Entomol.* **17**: 87-94
- Brogdon W. G. (1984). Mosquito protein microassay. I. Protein determinations from small portions of single- mosquito homogenates. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **79**: 457-459.
- Brogdon W. G. (1989). Biochemical resistance detection: an alternative to bioassay. *Parasitol. Today.* **5**: 56-60.
- Brogdon W.G. & Mc Allister J. C. (1998). Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *J Am Mosq Control Assoc.* **14**: 159-164.
- Brown A. W. A. (1986). Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **2**: 123-140.
- CDC (2002). *Evaluating awebbased instruction.* (www.cdc.gov/ncidod/wbt/resistance/assay/microplate/index.htm). (Consultado: 2015, Agosto 18).
- Coen E., Strachan T. & Dover G. (1982). Dynamics of concerted evolution of ribosomal DNA and histone gene families in the melanogaster species subgroup of *Drosophila*. Department of Genetics, University of Cambridge. *J. Mol. Biol.* **158**: 17-35.
- El Universal (2016). Gobierno confirma que hay 319 casos de zika en el país. <http://www.eluniversal.com/vida/160212/gobierno-confirma-que-hay-319-casos-de-zika-en-el-país> (Consultado: 2016, Febrero).
- Finney D. (1971). *Probit analysis*. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Flores A. E., Albeldaño W., Fernández S. I., Badii M. H., Loaiza H., Ponce G. G., *et al.* (2005). Elevated α -esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, México. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **82**: 66-78.
- Flores A. E., Grajales J., Fernandez S. I., Ponce G. G., Becerra M., Lozano F. S., *et al.* (2006). Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern México. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **22**: 672-677.
- Flores A. E., Ponce G. G., Silva B., Gutiérrez S., Bobadilla C., López M. B., *et al.* (2013). Wide spread cross resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* (L.) from Veracruz State México. *J. Econ. Entomol.* **106**: 959-969.
- Flores A. E., Reyes S. G., Fernandez S. I., Sanchez F. & Ponce G. (2009). Resistance to permethrin in *Aedes aegypti* (L.) in Northern México. *Southwestern Entomologist.* **34**: 167-177.
- Fonseca-González Y., Quiñones M., Lenhart A. & Brogdon W. (2010). Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. *Pest Management Science.* **67**: 430-437. DOI: 10.1002/ps.2081
- Harris A. F., Rajatileka S. & Ranson, H. (2010). Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am J Trop Med Hyg.* **83**: 277-284. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0623>
- Hemingway J., Boddington R. G. & Harris J. (1989). Mechanisms of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) from Puerto Rico. *Bull Ent Res.* **79**: 123-30.
- Hemingway J., Hawkes N., McCarroll L. & Ranson H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**: 653-665.
- Kasai S., Weerasinghe I., Shono T. & Yamagawa M. (2000). Molecular clonig, nucleotide sequence and gene expression of a cytochrome P450 (CYP6F1) from the pyrethroid resistant mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. *Insect Biochem Mol Biol.* **30**: 163-171.
- Kasai S., Komagata O., Itokawa K., Shono T., Ng L. C., Kobayashi M., & Tomita T. (2014). Mechanisms

- of Pyrethroid Resistance in the Dengue Mosquito Vector, *Aedes aegypti*: Target Site Insensitivity, Penetration, and Metabolism. *PLoS Negl Trop Dis* **8**: e2948. doi: 10.1371/journal.pntd.0002948
- Mazzarri M. B. & Georghiou G. P. (1995). Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* (L) from Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc.* **11**: 315-322.
- MPPS (2014). *Boletín Integral de Salud Ambiental. Semana Epidemiológica 41*. Dirección General de Salud Ambiental. www.iaes.edu.ve/descargas/boletin-dgsa/bidgsa2014.
- MPPS (2015). *Boletín Integral de Salud Ambiental. Semana epidemiológica 41*. Dirección General de Salud Ambiental. www.iaes.edu.ve/descargas/boletin-dgsa/bidgsa2015.
- Molina de Fernández D., Bisset J., Rodríguez M., González J., Salas O., Barazarte H., et al. (1995). Estudio de la susceptibilidad a insecticidas organofosforados y piretroides en cepas de *Aedes aegypti* (Linn.) de cinco estados de Venezuela. *Bol Dir Malarial San Amb.* **35**: 85-90.
- Montella I. R., Martins A. J., Fernández V. P., Pereira J. B., Braga I. A. & Valle D. (2007). Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg.* **77**: 467-477.
- OPS (2014). Número de casos reportados de fiebre chikungunya en las Américas. Oficina Sanitaria Panamericana. SE 41. www.paho.org.
- Pérez P. & Enrique E. (2010). *Resistencia cruzada a insecticidas piretroides en cepas de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) de municipios del estado Aragua*. www.bvs.gob.ve/jornadas.2010/03122010.
- Prapanthadara L., Promtet N., Koottathep S., Somboon P., Suwonkerd W., McCarroll L., et al. (2002). Mechanisms of DDT and permethrin resistance in *Aedes aegypti* from Chiang Mai, Thailand. *Dengue Bull.* **26**: 185-189.
- Raymond M. (1985). Presentation d' une programme d' analyse logprobit pour Microordinateur cahiers Orstrom. *Se' r Ent Me' d Parasitol.* **23**: 117-121.
- Rodríguez M., Bisset J., Mila L., Calvo E., Díaz C. & Soca L. (1999). Levels of insecticide resistance and its mechanisms in a strain of *Aedes aegypti* of Santiago de Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* **51**: 83-88.
- Rodríguez M., Bisset J., Fernández D., Lauzan L. & Soca A. (2001). Detection of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba and Venezuela. *J Med Entomol.* **38**: 623-628.
- Rodríguez M., McCall P. J., Donnelly M. J., Ranson H., Hemingway J. & Black W. C. (2007). A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol.* **16**: 785-798.
- Saavedra-Rodríguez K., Urdaneta-Marquez L., Rajatileka S., Moulton M., Flores A. E., Fernández-Salas I., et al. (2007). A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol.* **16**: 785-798.
- Somwang P., Yanola J., Suwan W., Walton C., Lumjuan M., Prapanthadara L., et al. (2011). Enzymes based resistant mechanism in pyrethroids resistant and susceptible *Aedes aegypti* strains from northern Thailand. *Parasitol Research.* **109**: 531-537.
- Thanispong K., Satfiantriphop S. & Chareonviriyaphap T. (2008). Insecticide resistance of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* in Thailand. *J Pest Sci.* **33**: 351-356.
- Vaughan A. & Hemingway J. (1995). Mosquito carboxylesterase Est alpha 2(1)(A2). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J Biol Chem.* **270**: 17044-17049.
- Yanola J., Somboon P., Walton C., Nachaiwieng W., Somwang W. & Prapanthadara L. (2011). High-

throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. *Trop Med Int Hlth.* **16**: 501-509.

insecticides. World Health Organization. Geneva (WHO/VBC/81.80).

Recibido el 01/11/2015
Aceptado el 11/03/2016

WHO (1981). Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to

Genetic structure of Latin American *Aedes aegypti* *Estructura genética de Aedes aegypti latinoamericano*

Marifel Carrozza¹, Yasmin Rubio-Palis^{1,2} & Flor Herrera^{1*}

SUMMARY

The mosquito *Aedes aegypti* is the main Dengue vector in Latin America. This study investigated the genetic structure of this vector using samples collected in Venezuela, Colombia, Peru, Mexico, Argentina, Puerto Rico, and French Guiana. We examined the distribution of a 246-basepair region of the NADH dehydrogenase subunit 4 mitochondrial gene among a total of 369 *Ae. aegypti* from all the populations. This gene was amplified by the polymerase chain reaction and tested for variation using single strand conformation polymorphism analysis. Twelve haplotypes were detected among all the countries sampled and grouped into two clades. Significant differentiation was detected among the populations studied and these were not genetically isolated by distance.

Keywords: Dengue, *Aedes aegypti*, ND4, haplotypes, differentiation, genetic.

RESUMEN

El mosquito *Aedes aegypti* es el principal vector del Dengue en los países latinoamericanos. En este estudio se investigó la estructura genética de este vector en muestras colectadas en Venezuela, Colombia, Perú, México, Argentina, Puerto Rico y Guyana Francesa. Nosotros examinamos la distribución de una región de 246 pares de bases del gen mitocondrial de la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa entre un total de 369 *Ae. aegypti* de todas las poblaciones. Este gen fue amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa y la variación se determinó usando el análisis de polimorfismos de conformación de cadena simple. Doce haplotipos se detectaron entre todos los países y se repartieron en dos clados. Una diferenciación significativa se detectó entre las poblaciones y estas no se encontraron genéticamente aisladas por distancia.

Palabras clave: Dengue, *Aedes aegypti*, ND4, haplotipos, diferenciación, genética.

INTRODUCCIÓN

Dengue is the most important viral disease transmitted to human by *Aedes aegypti* mosquitoes in Venezuela and other Latin American countries, and its incidence and prevalence are rising annually (San Martín *et al.*, 2010). *Aedes aegypti* is the principal vector for Dengue viruses and it is able to maintain the four serotypes in an urban transmission cycle. In addition, this mosquito is also a vector for other viruses like Chikungunya and Zika which were responsible for a serious outbreaks of those disease in the Americas recently (Vorou, 2016; WHO, 2014).

Aedes aegypti populations may differ in biting behaviour, vectorial capacity, and other

characteristics of epidemiological importance which may be detected through molecular markers (Tabachnick, 1991, Getis *et al.*, 2003, Harrington *et al.*, 2005). In addition, these markers could be used to determine the relatedness of geographic populations and associate this information with vector movements. This will help to analyze the risk of disease transmission (Getis *et al.*, 2003, Liotta *et al.*, 2005, Bracco *et al.*, 2007).

Single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis offers a simple, sensitive, and cheap method of detecting DNA polymorphisms, therefore, SSCP has become one of the most used means for determining genetic variation (Orita *et al.*, 1989). SSCP is based on the principle that changes

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco J. Triana Alonso”, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Sede Aragua, Maracay, Venezuela.

² Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA), S.A. Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldon” (IAE/MPPS), Maracay, Venezuela

*Author of correspondence: flormhq@gmail.com

in the nucleotide sequences of a singlestrand DNA molecule alter its three-dimensional conformation. Point mutations could thereby change strands migration through polyacrylamide gels. SSCP detected 99% of base changes in 100 to 300 bp DNA fragments and 89% of point mutations in 300-450 bp molecules (Sunnucks *et al.*, 2000).

The understanding of genetic variability, population structure, and migration dynamics of the mosquito *Ae. aegypti* is a major issue because of the risk associated with invasive new mosquito strains in a region that could cause the emergence and spread of Dengue (Manguin & Boete, 2011). The persistent increase in air and sea traffic between American countries increases the probability of introducing new *Ae. aegypti* strains into the region. These vector invasions are particularly accentuated in regions where vector surveillance is poor for lack of routine entomological surveys.

The aim of this study was to investigate the population genetic structure of *Ae. aegypti* from Colombia, Peru, Mexico, Argentina, Puerto Rico and French Guiana, using ND4 mitochondrial DNA markers and compared these sequences with the haplotype sequences obtained from Venezuela in a previous work (Herrera *et al.*, 2006).

MATERIALS AND METHODS

Mosquito collection and DNA extraction – Eggs from mosquitoes collected during the period 2008-2010 in six countries (Fig. 1) were sent to the insectary in Maracay, Aragua, Venezuela where they were reared to adults and then stored at -70°C awaiting DNA extraction. The DNA was extracted from individual specimens using a phenol/chloroform method, resuspended in 60 µl of sterilized water and stored at -80°C (Rivero *et al.*, 2004). From the eight localities of the collections in Venezuela, it was selected the locality of La Esperanza because its haplotype distribution resembles more the total population than the others populations. The list of country of origin, localites, geographic coordinates and sample sizes are indicated in Table I.

Mitochondrial gene amplification - A 246-bp region of the ND4 gene was amplified using the oligonucleotides and reaction conditions of Herrera *et al.* (2006) but with a high annealing temperature (55°C)

to limit the amplification of Nuclear Mitochondrial Elements (NUMTs) which are present in the *Ae. aegypti* genome (Black & Bernhardt, 2009). The PCR amplifications were carried out in 50 µL reaction volumes using 1 µL of template DNA in a PTC-100 thermal cycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA). Negative controls (all reagents except template) were run to detect possible contamination. The amplified products were visualized by electrophoresis in 2% agarose gels stained with ethidium bromide.

SSCP analysis - The PCR product (10 µL: 40-50 ng) was mixed with 8 µL of loading buffer (10 mM NaOH, 95% formamide, 0.05% bromophenol blue, and 0.05% xylene cyanol), centrifuged and heated to 95°C for 10 min on a thermal cycler, then transferred immediately into ice. Samples were loaded onto 27 × 20 cm, 1 mm thick, 7% polyacrylamide gels. Gels were run at 4°C for 20 h at a constant 8 milliamps and silver stained to visualize DNA fragments (Black & DuTeau, 1997). ND4 PCR products from 3-6 individuals of each haplotype were sequenced in both directions using the PCR primers. Sequencing reactions were performed with ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit on an Applied Biosystem Model ABI 3130XL.

Statistical analysis of mitochondrial haplotype frequencies- Analysis of molecular variance

Fig. 1. Map showing the geographic collection sites.



(AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) was conducted on the resulting haplotypes within and among regions using Arlequin versión 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). The significance of the variance components was computed using a non-parametric permutation test (Excoffier *et al.*, 1992). The DNA sequences were aligned using the Clustal W software package (Thompson *et al.*, 1994). The nucleotide sequence and the frequency of each haplotype for each population were analyzed using DnaSP version 5.10 (Librado & Rozas, 2009). The number of polymorphic sites, the average number of nucleotide differences (k) (Tajima, 1983), the nucleotide diversity (π_1) and the nucleotide diversity with the Jukes and Cantor correction (π_2) (Nei 1987) were estimated. Effective migration rates (Nm) were calculated from F_{ST} . Transformed $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ were regressed on the natural logarithm of pairwise geographic distances among populations to test for isolation by distance (Slatkin, 1993). The Mantel test was performed using FORTRAN program MANTEL (William C. Black IV, Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, Fort Collins, CO). Genetic distance matrices were used to construct a cladogram among all populations by means of unweighted pair-group method with arithmetic averaging analysis in the NEIGHBOR procedure of PHYLIP 3.63 (Felsenstein, 2004).

Phylogenetic relationships among haplotypes-MEGA (version 4.0) was used to perform phylogenetic analyses using maximum parsimony (Tamura *et al.*, 2007). A bootstrap analysis with 1000 replications was done to assess the consistency with which the dataset supported the resolved phylogenies. ND4 homologous regions of *Anopheles darlingi* and *Ae. albopictus* were used as outgroups.

RESULTS

Haplotypes frequencies

A total of six samples, representing 324 wild specimens of *Ae. aegypti* collected in Colombia, Peru, Mexico, Argentina, Puerto Rico and French Guiana (Table I) were analyzed. Twelve haplotypes were detected by SSCP analysis and sequencing. The haplotype sequences were aligned with ND4 sequences from Venezuela (Herrera *et al.*, 2006). All these haplotypes sequences, including haplotypes from Venezuela, were denoted from A-L and are already registered in the GenBank (KR349202-KR349213). The frequencies of these haplotypes in each country, including the previous reported in Venezuela, are shown in Table II.

The haplotype A was shared among Peru, Mexico, Puerto Rico, French Guiana and Venezuela populations. Except Mexican population, its frequency was > 40%. Haplotype H was the most frequent in the Colombia (96.22%) and Argentina (90.74%) populations. Haplotype J was present in the Mexico and French Guiana populations and its frequency varied from 98.14 to 32.07 % respectively. Haplotype L was found only in the population from Puerto Rico at a high frequency (57.89%). The rest of the haplotypes (I and K) occurred at low frequencies. The haplotype sequences were also aligned with other ND4 sequences registered in the GenBank. The haplotypes HH from Colombia and Argentina and HI from Colombia have identical sequences to the ones reported in Brazil for haplotypes H1 and H2, respectively (Sousa & Scaparssa, 2009). Several haplotypes from the coast of northeastern Mexico (Gorrochotegui-Escalante *et al.*, 2000) have

Table I. Countries, locations per region, geographic coordinates, and sample size of *Aedes aegypti* populations analyzed.

Country	Locality	Latitude	Longitude	N° individuals
Venezuela	La Esperanza	10°2'22"N	70°50'35"W	49
Colombia	Barranquilla	10°59'10"N	74°46'13"W	53
Peru	Lima	11°81' S	77°07' W	53
Mexico	Cuernavaca	18°56'68"N	99°13'33"W	54
Argentina	Córdoba	31°22'S	64 °12'W	54
Puerto Rico	San Juan	18°23'47"N	66°04'51"W	57
French Guiana	Baduel/Cayenne	04°55'53"N	52°18'17"W	53
Total	7			373

Table II. Present Haplotypes and their percentage per country.

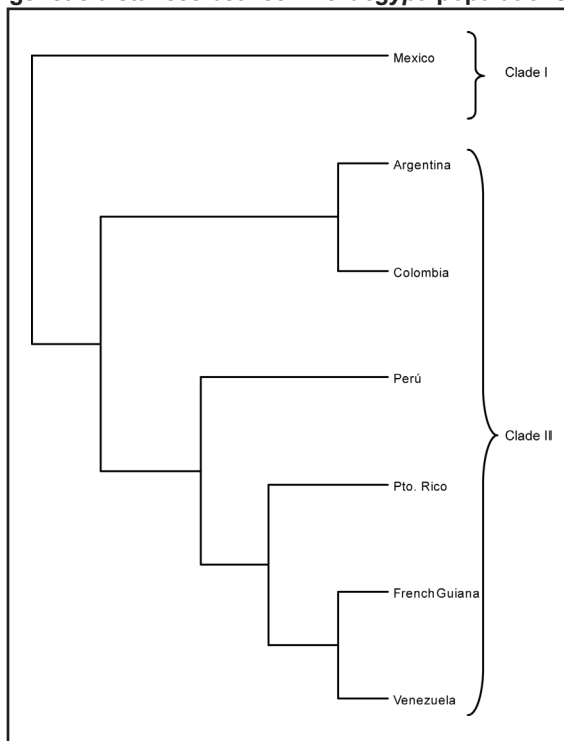
Country	Haplotypes	% of Haplotypes
Venezuela	A	58.68
	B	0.78
	C	24.29
	D	2.80
	E	11.89
	F	0.37
	G	1.19
Colombia	H	96.22
	I	3.78
Peru	A	100
Mexico	A	1.86
	J	98.14
Argentina	H	90.74
	K	9.26
Puerto Rico	A	42.11
	L	57.89
French Guiana	A	67.92
	J	32.07

similarities to the haplotypes reported in this work: haplotype-9b is 99% similar to the haplotype HJ from Mexico and French Guiana, haplotype 3a-3c is 98% analogous to HK from Argentina, haplotype-6b corresponds to 99% of HL from Puerto Rico and haplotype-10a is 99% similar to the haplotype HA found in Peru, Mexico, Puerto Rico, French Guiana and Venezuela. HA is also 97% analogous to one haplotype detected in Kenya (Burugu *et al.*, 2008).

Genetic heterogeneity

Geographical analysis of variation in ND4 haplotype frequencies was conducted by AMOVA (Table III). Most of the variation (70.6%) arose among populations while 29.5% arose among mosquitoes in populations. The average FST was 0.705 indicating a very high genetic structure among populations. In addition, the effect of the distance on levels of gene flow was estimated by regressing linearized FST values on geographic distance. This analysis indicated that significant correlation was not detected between genetic and geographic distances neither among all populations nor among

Fig. 2. Unweighted pair-group method with arithmetic averaging cluster analysis of pairwise FST/(1-FST) genetic distances between *Ae. aegypti* populations



populations in any particular subgroup of these countries (data not shown).

A distance matrix containing all the pairwise linearized FST among populations was collapsed using the UPGMA option in NEIGHBOR and the rectangular cladogram option on PHYLIP (Fig. 2). Two main clades were detected. Clade I contained only the Mexican population while clade II contained all of the other populations. This last clade was again divided into two subgroups: one with Argentina and Colombia populations and the other with Peru, Puerto Rico, French Guiana and Venezuela populations.

Haplotype diversity

The number of polymorphic sites and the diversity indices for each population and for all mosquitoes are listed in Table IV. The majority of populations had similar numbers of polymorphic sites (5-7) except for Peru (0), Argentina (1) and Venezuela (10). In relation to values for the mean number of nucleotide differences (k) and nucleotide diversity (π), populations from Venezuela, French

Table III. Analysis of molecular variance in the frequency of ND4 haplotypes among *Aedes aegypti* populations in seven Latin American countries.

Source of Variation	Degrees of freedom	Variance Components	Variation (%)	Fixation index	P
Among populations	6	0.28099	70.54		
Within populations	413	0.11738	29.46	FST = 0.705	< 10 ⁻⁴
Total	419	0.39837			

Fixation index: FST, correlation among haplotypes within collections relative to the correlation of random pairs drawn from the whole sample.

Table IV. Variability estimates in the mitochondrial genome among *Aedes aegypti* populations in seven Latin America countries.

Country	N	S	k	π_1	π_2	Tajima's D
Venezuela	49	10	3.11300	0.01526	0.01555	1.09860
Colombia	53	5	0.37010	0.00182	0.00185	-1.59002
Peru	53	0	0	0	0	0
Mexico	54	7	0.25926	0.00127	0.00130	-2.16671
Argentina	54	1	0.17100	0.00084	0.00084	-0.28956
Puerto Rico	57	6	2.97740	0.01460	0.01489	3.19629
French Guiana	53	7	3.10900	0.01524	0.01560	2.65638
Total samples	373	15	4.68816	0.02309	0.02365	2.38142

N: number of samples; S: polymorphic sites; k: average number of nucleotide differences; π_1 : nucleotide diversity; π_2 : nucleotide diversity with Jukes and Cantor correction.

Guiana and Puerto Rico had higher values of k and π , in which values were at least 8-18 times higher than the k and π from Argentina, Mexican and Colombian populations. The values of k and π from the Peruvian population were 0. Tajima's D test gave a statistically significant positive result for the total sample (Table IV).

Phylogenetic analysis

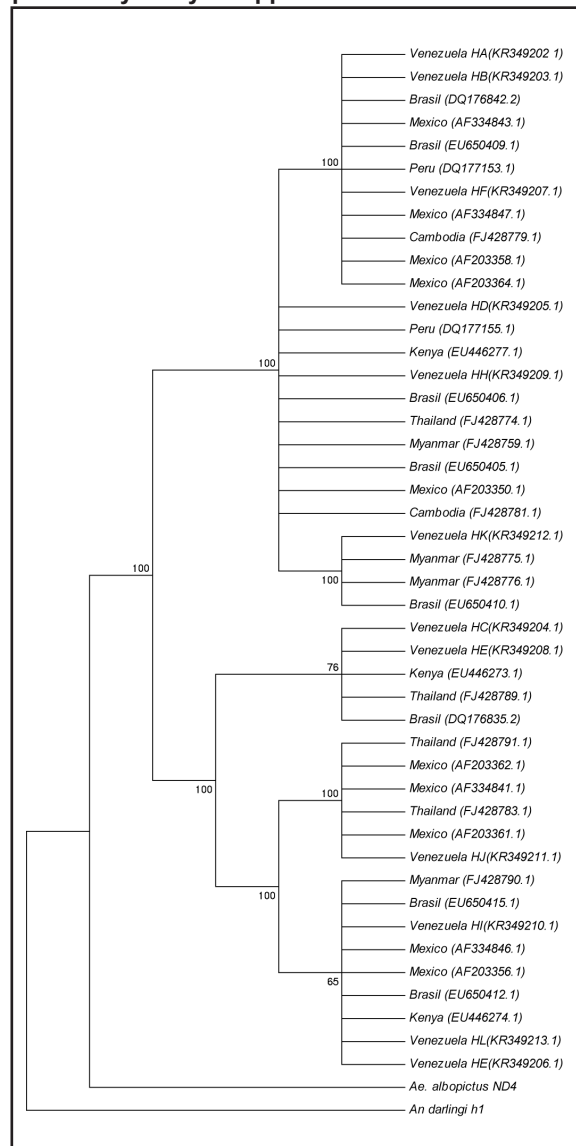
Phylogenetic analysis, based upon use as outgroups of one related subgenus *Stegomyia* species (*Aedes albopictus*) and other species of the genus *Anopheles* (*An. darlingi*), provided a well-supported phylogeny with two maternal lineages (Fig 3). The Clade I contained all the haplotypes found in the total population while the Clade II missed haplotypes from Argentina and Peruvian populations. The Clade I divided into clearly three sub-branches with 100% bootstrap support while Clade II divided into two branches with $\geq 76\%$ support. In addition, both clades contained haplotypes that have been found independently in several studies from America (Brazil, Mexico, and Peru), Asia (Thailand, Myanmar, Cambodia) and Africa (Kenya).

DISCUSSION

Aedes aegypti populations from different countries were genetically differentiated. This suggests a restricted level of interchange of genes among populations. This genetic differentiation did not arise by geographic distance. Similar results were reported in Mexico (Gorrochotegui-Escalante *et al.*, 2000), Thailand (Bosio *et al.*, 2005), Peru (Costa da Silva *et al.*, 2005) and Brazil (Da Costa-Ribeiro *et al.*, 2007, Twerdochlib *et al.*, 2012). The existence of geographic barriers (Caribbean Sea and the Andean Mountain Range) among populations might account for our findings.

Another possibility that could explain the results may be genetic drift arising from a strong reduction in the effective population size in collections caused by insecticide applications (Sharma *et al.*, 2009). The presence of only few major haplotypes, unique haplotypes or haplotypes with very small frequencies in some countries could arise due to major population bottlenecks caused by insecticide treatment. A similar hypothesis has been proposed by Gonçalves da Silva *et al.* (2012).

Fig. 3. Maximum parsimony tree showing phylogenetic relationships among individual haplotypes. Bootstrap support using maximum parsimony analysis appears above each branch.



They argued that recent bottlenecks have occurred in Peru, Venezuela, Mexico-North America, and Brazil probably due to vector control practices through the use of insecticides.

Contrary to these results, some authors have found isolation by distance among samples from Brazil and other countries (Monteiro *et al.*, 2014). They have suggested that in Brazil first occurred a complete eradication of *Ae. aegypti* (late 50's)

followed by re-colonization (in the 1970's), probably from mosquitoes from neighboring countries like Venezuela. It could be argued that in this time span the lineages that may have initially re-invaded Brazil are now exchanging genes and perhaps merging.

The genetic diversity found in this work is high and comparable to another similar study (Bracco *et al.*, 2007). This caused a very high genetic structure with large F_{ST} (~ 1.0) values among populations. Similarly, Ayres *et al.* (2004) have reported that Brazilian populations of *Ae. aegypti* showed high levels of genetic differentiation in areas most frequently treated with chemical insecticides. Other investigators suggested that insecticide pressure is probably the major cause of genetic diversity in *Ae. aegypti* from highly populated urban areas (Paupy *et al.*, 2003, Ocampo & Wesson, 2004, Twerdochlib *et al.*, 2012). The use of insecticides has also facilitated the appearance of insecticide resistance in *Ae. aegypti* (Bisset *et al.*, 2001, Rodríguez *et al.*, 2001, Álvarez *et al.*, 2008, Mourya *et al.*, 2015). This phenomenon appears to be happening in these populations as the statistically significant Tajima's D values were positive for all populations, indicating that there are haplotypes under positive selection (Tajima, 1983).

The populations were divided into two major clades, according to their genetic distance. The populations of Argentina, Mexico and Colombia, grouped in the first clade, were more genetically close than those of Venezuela, French Guiana, Puerto Rico and Peru, grouped in the second.

Phylogenetic analysis of haplotype sequences demonstrated two lineages. These did not contain haplotypes from a particular region since Asian, African and American haplotypes were found in both lineages. The haplotypes with greater frequencies (HA and HH) in the total population were located only in the lineage I. At least one of them was present in all subpopulations and together they constituted over 50% of the total haplotypes. Thus, HA was found in 5 of 7 populations and, except for Mexico, its frequency varied from 42.1 to 100%. It can be argued, therefore, that this lineage is the oldest. Probably HA and HH have spread to all subpopulations through migration of individuals that are best adapted to environmental changes (insecticide pressure) which has allowed their high frequencies (Sousa & Scarpassa, 2009). The presence of two phylogenetic lineages that

subdivide the *Ae. aegypti* populations is consistent with earlier research (Gorochotegui-Escalante *et al.*, 2002, Bosio *et al.*, 2005, Herrera *et al.*, 2006, Bracco *et al.*, 2007, Paduan & Ribolla, 2008, Sousa & Scarpassa, 2009, Fraga *et al.*, 2013, Moore *et al.*, 2013).

Populations from Puerto Rico, French Guiana and Venezuela had at least two haplotypes with frequencies $\geq 25\%$, therefore their nucleotide diversity (π) and the mean number of nucleotide differences (k) were higher than the corresponding ones to the others populations with only one dominant haplotype $\geq 90,7\%$. In addition, all the populations with the highest level of genetic diversity contained HA in a major frequency which strengthen the idea that HA is an ancient haplotype with a nucleotide differentiation already fixed.

The genetic variability found in these american countries (AC) was higher than those from Thailand (T) ($k \sim 1,6$ and $\pi \sim 2,9$ times) and the island of São Luís in the Brazilian state of Maranhão (BM) ($k \sim 2$ and $\pi \sim 3$ times) with an equal number of polymorphic sites ($S = 15$) (Bosio *et al.*, 2005, Fraga *et al.*, 2013). It could be explained because AC have more haplotypes than T (12 vs 7) and than BM (12 vs 10). On the contrary, other comparison with populations from Brazilian Amazon (BA) resulted in $\pi_{AC} > \pi_{BA}$ (2 times) while k value and haplotype number were in a similar range. This could mean that the more frequent BA haplotypes are more similar to each other than those of AC (Sousa & Scarpassa, 2009). The amount of polymorphic sites varied among the populations: 7-10 for Venezuela, México and French Guiana, 5-6 for Colombia and Puerto Rico, 1 for Argentina and 0 for Perú. This last result arose because Peru had only one haplotype. At the same time, it can also be noted that even though existed a striking difference between the populations of Colombia and Argentina (the first had 5 times more polymorphic sites than the second), both populations had a common dominant haplotype (Colombia 96.22%, Argentina 90.74%). This result agrees with the observed distribution of Colombia (HH and HI) and Argentina (HH and HK) haplotypes in different and same lineages respectively. This means that the nucleotide divergence of Argentina haplotypes that share a common ancestor, is smaller than those of Colombia.

In addition, the data presented here could have important implications for Dengue, Zika or Chikungunya transmission since the genetic variability in *Ae. aegypti* from these countries may cause differences in their susceptibility to these viruses. A correlation between population differentiation and heterogenous patterns of vector competence in *Ae. aegypti* has been suggested for other authors (Tran *et al.*, 1999, Vazeille-Falcoz *et al.*, 1999, 2001, Paupy *et al.*, 2003, Black WC *et al.*, 2002, García-Franco *et al.*, 2002, Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 2004, Ocampo & Wesson, 2004). A population genetic analysis and an evaluation of susceptibility to Dengue 2 virus were conducted among *Ae. aegypti* samples from different states of Brazil (Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 2004). It was demonstrated that Brazilian *Ae. aegypti* were genetically differentiated within most of the regions, and that their infection rates towards DENV2 were heterogenous. Other study has found a correlation between genetic distances of *Ae. aegypti* populations and their infections rates (García-Franco *et al.*, 2002). Recently, it was observed considerable variation in vector competence within and between Brazilian populations analyzed from short spatial and temporal collections (Gonçalves *et al.*, 2014).

This study suggests that the vector control programme from these countries may induce recurrent emergence of insecticide resistant populations. Moreover, the rapid fixation of haplotypes conferring insecticide resistance could take place; the resistant populations may be spread at a larger scale as the migration of resistant mosquitoes could be facilitated over the one of susceptible insects. *Ae. aegypti* resistant to insecticides represent a great problem in Dengue, Chikungunya or Zika control. The next step could be to look for insecticide resistance in the studied populations to confirm the involvement of selection effects in the actual genetic structure of their *Ae. aegypti* populations.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Walter Almirón (Argentina), Mario Henry Rodríguez (Mexico), Isabelle Dusfour (French Guiana), Manuel Amador (Puerto Rico), Palmira Ventosilla (Peru), Claudia Romero and Carlos Andrés Morales (Colombia) for kindly giving us the mosquito samples; to the staff of the Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental, Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldon”

for mosquito rearings; to Johanny Ruiz for helping in preliminary experiments and to José Rivero for technical assistance on sequencing the samples.

Financial support: Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación, Venezuela. Project N° 2008000911-1.

REFERENCIAS

- Álvarez G., Oviedo A. & Briceño A. (2008). Evaluación de Temephos 50% CE sobre poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en Trujillo, Venezuela. *Rev. Colomb. Entomo.* **34**: 188-191.
- Ayres C., Melo-Santos M., Prota J., Solé-Cava A., Regis L. & Furtado A. (2004). Genetic structure of natural populations of *Aedes aegypti* at the micro- and macrogeographic levels in Brazil. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **20**: 350-356.
- Bisset J., Rodriguez M., Molina D., Díaz C. & Soca L. (2001). High esterases as mechanism of resistance to organophosphate insecticides in *Aedes aegypti* strains. *Rev. Cubana Med. Trop.* **53**: 37-43.
- Black W., Bennett K., Gorrochotegui-Escalante N., Barillas-Mury C., Fernandez-Salas I., Muñoz M., et al. (2002). Flavivirus Susceptibility in *Aedes aegypti*. *Arch. Med. Res.* **33**: 379-388.
- Black W. & Bernhardt S. (2009). Abundant nuclear copies of mitochondrial origin (NUMTs) in the *Aedes aegypti* genome. *Insect Mol. Biol.* **18**: 705-713.
- Black W. & Du Teau N. (1997). *RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies*. pp. 361-373. In: *The Molecular Biology of Insect Disease Vectors: A Methods Manual*. Eds. Crampton J., Beard C.B., Louis C. Chapman and Hall. New York, U.S.A.
- Bosio C., Harrington L., Jones J., Sithiprasasna R. & Norris D. (2005). Genetic Structure of *Aedes aegypti* populations in Thailand using Mitochondrial DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **72**: 434-442.
- Bracco J., Capurro M., Lourenco-de-Oliveira R. & Mureb Sallum M. (2007). Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **102**: 573-580.
- Burugu M., Sang R., Kamau L. & Kenya E. (2008). *Genetic structure of Aedes aegypti populations in coastal and inland Kenya using mitochondrial DNA*. Submitted Centre for Virus Research, Kenya Medical Research Institute, Nairobi, Kenya. EMBL/GenBank/ databases.
- Costa da Silva A., Capurro M. & Bracco J. (2005). Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Perú. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **100**: 539-544.
- Da Costa-Ribeiro M., Lourenco-de-Oliveira R. & Failloux A. (2007). Low Gen Flow of *Aedes aegypti* between Dengue-Endemic and Dengue-Free areas in Southeastern and Southern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**: 3003-309.
- Excoffier L., Laval G. & Schneider S. (2005). Arlequin ver 3.0: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. *Evol. Bioinform. online* **1**: 47-50.
- Excoffier L., Smouse P. & Quattro J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics.* **131**: 479-491.
- Felsenstein J. (2004). *PHYLIP, Phylogeny Inference Package*. Version 3.6C. Seattle, WA, University of Washington.
- Fraga E., Oliveira D., Aragão D., Schneider H., Sampaio I. & Barros M. (2013). Genetic variability and evidence of two distinct lineages of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) on São Luís Island in Maranhão, Brazil. *The Open Trop. Med. J.* **6**: 11-18. doi: 10.2174/1874315301306010011.
- García-Franco F., Muñoz L., Lozano-Fuentes S., Fernández-Salas I., García-Rejon J., Beaty B., et al. (2002). Large genetic distances among *Aedes aegypti* populations along the South Pacific coast of Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66**: 594-598.
- Getis A., Morrison A., Kenneth G. & Scott T. (2003). Characteristics of the Spatial Pattern of the Dengue

- Vector, *Aedes aegypti*, in Iquitos, Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **69**: 494–505.
- Gonçalves da Silva A., Cunha I., Santos W., Ribolla L. & Fernando Abad-Franch F. (2012). Gene flow networks among American *Aedes aegypti* populations. *Evol. Appl.* **5**: 664–676. doi:10.1111/j.1752-4571.2012.00244.x
- Gonçalves C., Melo F., Bezerra J., Chaves B., Silva B., Silva L., et al. (2014). Distinct variation in vector competence among nine field populations of *Aedes aegypti* from a Brazilian Dengue-endemic risk city. *Parasites & Vectors.* **7**: 320-327.
- Gorrochotegui-Escalante N., Gómez-Machorro C., Lozano-Fuentes S., Fernández-Salas I., Muñoz M., Farfan-Ale J., et al. (2002). Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66**: 213-222.
- Gorrochotegui-Escalante N., Munoz M., Fernandez-Salas I., Beaty B. & Black W. (2000). Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **62**: 200–209.
- Harrington C., Scott T., Lerdthusnee K., Coleman R., Costero A., Clark G., et al. (2005). Dispersal of the Dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **72**: 209-220.
- Herrera F., Urdaneta L., Rivero J., Zoghbi N., Ruiz J. & Carrasquel G. (2006). Population genetic structure of Dengue mosquito *Aedes aegypti* in Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **101**: 625-633.
- Librado P. & Rozas J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* **25**: 1451-1452.
- Liotta D., Cabanne G., Campos R. & Tonón S. (2005). Molecular detection of Dengue viruses in field caught *Aedes aegypti* mosquitoes from northeastern Argentina. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **47**: 82-87.
- Lourenço-de-Oliveira R., Vazeille M., de Filippis A. & Failloux A. (2004). *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to Dengue and yellow fever viruses. *Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **98**: 43-54.
- Manguin S. & Boëte Ch. (2011). *Global Impact of Mosquito Biodiversity, Human Vector-Borne Diseases and Environmental Change.* pp. 27-50. In: The Importance of Biological Interactions in the Study of Biodiversity. Ed. López-Pujol J. Tech. Rijeka, Croatia.
- Monteiro F., Shama R., Martins A., Gloria-Soria A., Brown J. & Pow J. (2014). Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**: e3460.
- Moore M., Sylla M., Goss L., Burugu M., Sang R., Kamau L., et al. (2013). Dual African Origins of Global *Aedes aegypti* s.l. Populations Revealed by Mitochondrial DNA. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**: e2175.
- Mourya D., Kumar R., Barde P., Gokhale M. & Yadav P. (2015). Genetic Variation in *Aedes aegypti* mosquito populations along the West Cost of India and their susceptibility to insecticides and Dengue Virus. *Med. Sci.* **5**: 378-382.
- Nei M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics.* Ed. Columbia University Press. New York, U.S.A.
- Ocampo C. & Wesson D. (2004). Population dynamics of *Aedes aegypti* from a Dengue hyperendemic urban setting in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **71**: 506-513.
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K. & Sekiya T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 2766–2770.
- Paduan K. & Ribolla P. (2008). Mitochondrial DNA polymorphism and heteroplasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil. *J. Med. Entomol.* **45**: 59-67.
- Paupy C., Chantha N., Vazeille M., Reynes J., Rodhain F. & Failloux A. (2003). Variation over space and time of *Aedes aegypti* in Phnom Penh (Cambodia):

- genetic structure and oral susceptibility to a Dengue virus. *Genet. Res.* **82**: 171-82.
- Rivero J., Urdaneta L., Zoghbi N., Pernalette M., Rubio-Palis Y. & Herrera F. (2004). Optimization of extraction procedure for mosquito DNA suitable for PCR-based techniques. *Intern. J. Trop. Insect Sci.* **24**: 266-269.
- Rodríguez M., Bisset J., de Fernández D., Lauzan L. & Soca A. (2001). Detection of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba and Venezuela. *J. Med. Entomol.* **38**: 623-628.
- San Martín J., Brathwaite O., Zambrano B., Solórzano J., Bouckennooghe A., Dayan G., et al. (2010). The epidemiology of Dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **82**: 128-35.
- Sharma A., Mendki M., Tikar S., Chandel K., Sukumaran D. & Parashar B. (2009). Genetic variability in geographical populations of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) from India based on random amplified polymorphic DNA analysis. *Acta Trop.* **112**: 71-76.
- Slatkin M. (1993). Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution.* **47**: 264-279.
- Sousa L. & Scaparssa V. (2009). Evidence of two lineages of the Dengue vector *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA ND4 gene sequences. *Genet. Mol. Biol.* **32**: 414-422.
- Sunnucks P., Wilson A., Beheregaray L., Zenger K., French J. & Taylor A. (2000). SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol. Eco.* **9**: 1699-1710.
- Tabachnick W. (1991). The yellow fever mosquito: evolutionary genetics and arthropod-borne disease. *Am. Entomol.* **37**: 14-24.
- Tajima F. (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics.* **105**: 437-460.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 1596-1599.
- Thompson J., Higgins D. & Gibson T. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Tran K., Vazeille-Falcoz M., Mousson L., Tran H., Rodhain F., Ngugen T., et al. (1999). *Aedes aegypti* in Ho Minh City (Viet Nam): susceptibility to Dengue 2 virus and genetic differentiation. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **93**: 581-586.
- Twerdochlib A., Bona A., Leite S., Chitolina R., Westphal B. & Navarro-Silva M. (2012). Genetic variability of a population of *Aedes aegypti* from Paraná, Brazil, using the mitochondrial ND4 gene. *Rev. Bras. Entomol.* **56**: 249-256.
- Vazeille-Falcoz M., Mousson L., Rodhain F., Chungue E. & Failloux A. (1999). Variation in oral susceptibility to Dengue type 2 virus of populations of *Aedes aegypti* from the islands of Tahiti and Moorea, French Polynesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 292-299.
- Vazeille-Falcoz M., Mousson L., Rakatoarivony I., Villeret R., Rodhain F., Duchemin J. & Failloux A. (2001). Population genetic structure and competence as a vector for Dengue type 2 virus of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Madagascar. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**: 491-497.
- Vorou R. (2016). Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread world wide: what we know and what we should investigate today. *International Journal of Infectious Diseases.* **48**: 85-90.
- WHO (2014). Epidemiological alert Chikungunya and Dengue fever in the Americas. Available at: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=27049+&Itemid=999999&.

Recibido el 01/11/2015
Aceptado el 11/03/2016

Revisión de la colección del género *Chagasia* (Diptera: Culicidae) del Museo Entomológico “Dr. Pablo Cova García”, Maracay, Venezuela

Revision of the collection of the genus Chagasia (Diptera: Culicidae) of the Entomological Museum “Dr. Pablo Cova García”, Maracay, Venezuela

Yasmin Rubio-Palis*^{1,2}, Hernán Guzmán², Enrique Pérez² & Yarys Estrada²

RESUMEN

Se revisaron un total de 506 montajes permanentes de diferentes estadios de mosquitos del género *Chagasia* Cruz de la colección del Museo “Dr. Pablo Cova García”, S.A. Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldon”, Maracay. Especímenes previamente identificados como *Ch. bathana* (Dyar) fueron confirmados como *Ch. bonnae* Root. Se concluye que hasta el presente, al menos en el estado Bolívar, solo están presentes *Ch. bonnae* y *Ch. ablusa* Harbach, estando en discusión la presencia de *Ch. bathana* en Venezuela.

Palabras clave: mosquito, taxonomía, *Chagasia ablusa*, *Chagasia bathana*, *Chagasia bonnae*.

SUMMARY

A total of 506 specimens of mosquitoes from the genus *Chagasia* Cruz housed in the “Dr. Pablo Cova García” Museum at the Instituto de Altos Estudios, Maracay, were examined. Specimens previously identified as *Ch. bathana* (Dyar) were confirmed as *Ch. bonnae* Root. We can conclude that, at least in Bolívar State, only *Ch. bonnae* and *Ch. ablusa* Harbach are present. The presence of *Ch. bathana* in Venezuela remains under discussion.

Key words: mosquito, taxonomy, *Chagasia ablusa*, *Chagasia bathana*, *Chagasia bonnae*.

INTRODUCCIÓN

La subfamilia Anophelinae (Diptera: Culicidae) incluye tres géneros: *Anopheles* Meigen, de amplia distribución mundial; *Bironella* Theobald se encuentra en la región Australasia y *Chagasia* Cruz, confinado a la región Neotropical. Hasta el presente, se han descrito cinco especies dentro del género *Chagasia*: *Ch. ablusa* Harbach, *Ch. bathana* (Dyar), *Ch. bonnae* Root, *Ch. fajardi* (Lutz) y *Ch. rozeboomi* Causey, Deane & Deane (Harbach & Howard, 2009).

En Venezuela, diversos autores han reportado la presencia de este género en diversas entidades del país representado por una sola especie, *Ch. bathana* (= *bathanus*) (Dyar) (Berti *et al.*, 1998; Cova

García, 1961; Cova García & Sutil, 1977; Gabaldon *et al.*, 1940; Gabaldon & Cova García, 1946, 1952; Sutil, 1980; Mora *et al.*, 1993; Moreno *et al.*, 2000; Navarro, 1996; Rubio-Palis, 2005; Rubio-Palis *et al.*, 2010). Luego de la revisión del género *Chagasia* realizada por Harbach & Howard (2009) surgió la inquietud de verificar si realmente *Ch. bathana* era la única especie presente en Venezuela, puesto que las características observadas en ejemplares capturados en el estado Bolívar en los últimos 10 años no coincidían con las claves de Cova García (1961), Cova García & Sutil (1977) y Navarro (1996). Es por ello que nos planteamos como objetivo revisar la colección de *Chagasia* spp. del Museo Entomológico “Dr. Pablo Cava García”. Cabe resaltar que existen muy pocos estudios taxonómicos sobre el género

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela.

² Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA), S.A. Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldon” (IAE), Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS). Maracay, Venezuela

*Autor de correspondencia: rubiopalis@gmail.com

Chagasia, posiblemente debido a que carecen de importancia en salud pública.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente revisión se basa en ejemplares depositados en la colección del Museo Entomológico "Dr. Pablo Cova García", Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon" (IAE), MPPS, Maracay. La colección del Museo se encuentra repartida en tres laboratorios: la sede del Museo en el IAE y Laboratorio de Entomología [Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA)] en Maracay y en el Centro de Investigaciones "Dr. Francesco Vitanza" (CICFV) en Tumeremo, estado Bolívar.

La terminología y abreviaciones empleadas siguen la propuesta por Harbach & Knight (1980). Para indicar el material examinado se utilizan los símbolos ♀, ♂, g♂, eL, eP, L y P para referirnos a hembras, machos, exuvia larva, exuvia pupa, larva y pupa, respectivamente. Para el estudio del material se emplearon un microscopio estereoscópico marca Optika SZR-10 con fuente de luz Optika con iluminación LED y un microscopio compuesto marca Olympus BX40, oculares 10X y 20X. La revisión se realizó utilizando como referencia principal la clave ilustrada de Harbach & Howard (2009), así como las descripciones originales de *Ch. bathanus* (Dyar, 1928), *Ch. fajardoi* y *Ch. bonnae* (Root, 1927), *Ch. ablusa* (Harbach & Howard, 2009) y *Ch. rozeboomi* (Causey *et al.*, 1944), y las claves de Gast Galvis (1943) y Lane (1953).

Material Examinado

Museo IAE: *Chagasia bathana* (= *bathanus*) 20 montajes permanentes en Bálsamo de Canadá. 3L San Felipe, estado Yaracuy; 4♂, 8♀, San Carlos, estado Cojedes, diciembre 1944; 2L, 3L Acarigua, estado Portuguesa, 1942.

Laboratorio de Entomología (CEEESA): Estado Bolívar: municipio Sucre: 19 L Boca de Nichare (BOL-NIN-1, BOL-NIN-2, BOL-NIN-7) (06°34.44'N/064°49.39'W) y 68 L de El Playón (BOL-PLY-4) (02°59.65'N/061°12.37'W), Octubre 2005. Cuatro ejemplares (4L, 3eL, 3eP, 3♀, 1♂) de Surapire (BOL-SUR-35, BOL-SUR-2406, BOL-SUR-3508, BOL-SUR-3507) (06°28.04'N/064°45.68'W), Junio

2009. Municipio Cedeño: 9L de Iikutú (BOL-IKU-4) (05°59.65'N/061°12.37'W), Octubre 2005. Siete ejemplares (7L, 7P, 3♀, 4♂), El Palmar (BOL-PAL-3201, BOL-PAL-3202, BOL-PAL-1207, BOL-PAL-1307, BOL-PAL-2101, BOL-PAL-2102, BOL-PAL-1101) (06°28'N/064°45'W), Junio 2009. Municipio Gran Sabana: 1♀ Santa Elena de Uairen (04°36'07"N/061°06'34"W); 2♀ San Antonio del Morichal (04°31'14"N/061°07'14"W); 103 ejemplares (94L, 86eL, 86eP, 22♀, 3♂), Chiricayen (04°39'39"N/061°20'30"W); 34 ejemplares (34L, 4eL, 4eP, 3♂) Waramasen (04°33'26"N/061°16'59"W); 1♀ Maurak (04°33'46"N/061°10'46"W) y 1♀ Kinok-Pon (04°33'31"N/061°12'47"W).

Laboratorio de Entomología (CICFV): Estado Bolívar: municipio Sifontes: *Chagasia bathana* 15 ejemplares provenientes de cinco crías asociadas (5eL, 5eP, 5♀), Parroquia San Isidro, El Granzón (GRA-2318, GRA-2303, GRA-2332, GRA-2322, GRA-2360) (06°12'N/061°21'W), Junio 1998.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El material examinado del Museo en el IAE, constituido por ejemplares capturados y montados en Bálsamo de Canadá en la década de los años 1940s, se encuentra en términos generales, en muy malas condiciones. Sólo fue posible la determinación a nivel de especie de tres larvas previamente identificadas como *Chagasia bathanus* (Acarigua 701-2-VII) que resultaron ser *Ch. bonnae*, la cual se puede diferenciar de *Ch. bathana* por presentar la seta 11-C tan larga como la seta 13-C y casi del mismo tamaño que la antena y la seta 15-C es corta y ramificada. En cuanto al material proveniente de San Carlos, 4g♂ están en buenas condiciones pero no hay certeza que hayan sido identificadas correctamente como *Ch. bathana*, al no ser posible diferenciarla de *Ch. bonnae*, puesto que ambas especies se caracterizan por presentar en la claspeta espículas y carecer de setas, lo que las diferencia de las otras tres especies del género. Los adultos de *Ch. bathana* se pueden diferenciar de las demás especies del género por presentar en los tarsómeros posteriores 2-5 (Ta-III2-5) bandas oscuras postbasales. *Chagasia bathana* (= *bathanus*) fue reportada por primera vez en Venezuela por Gabaldon *et al.* (1940) quienes capturaron larvas en arroyos de Pampán, estado Trujillo y de Marín y Farriar, estado Yaracuy. Para la identificación de

la especie estos autores se basaron en los trabajos de Dyar (1928), Root (1927) y Sevenet (1934), quienes proporcionaron claves parciales para identificar *Ch. bathana* (=bathanus), *Ch. fajardi* (=fajardoi) y *Ch. bonnae*. Para entonces no existían descripciones de todos los estadios de estas tres especies y posiblemente la confusión radicó en este hecho. A partir de este trabajo inicial de Gabaldon *et al.* (1940) todos los registros de *Chagasia* en Venezuela se refieren a *Ch. bathana*, a falta de disponer de material de referencia. Gabaldon & Cova García (1952) realizan una amplia revisión de material y publicaciones existentes para la época sobre la distribución de los Anophelini neotropicales; sobre el género *Chagasia* indican que *Ch. bathana* (=bathanus) está presente en Venezuela en los estados Cojedes, Lara, Portuguesa, Trujillo, Yaracuy y Zulia, y en varias provincias de Ecuador. Mientras que *Ch. bonnae* solo se reportaba de Bolivia, Brasil, Colombia y Suriname (=Guayana Holandesa); *Ch. fajardi* (=fajardoi) estaba presente en Argentina, Bolivia, Colombia y Brasil; *Ch. rozeboomi* confinada a Bolivia y Brasil (Gabaldon & Cova García, 1952). Sutil (1980) amplía la distribución de *Ch. bathana* en Venezuela a los estados Barinas, Carabobo, Mérida y Táchira.

Hasta el presente lo que podemos afirmar es que *Ch. bathana* no está presente en el estado Bolívar. En efecto, todos los ejemplares identificados previamente como *Ch. bathana* (Moreno *et al.*, 2000) de la colección del CICFV de El Granzón (GRA-2318, GRA-2303, GRA-2332, GRA-2322, GRA-2360), municipio Sifontes fueron confirmados como *Ch. bonnae*. Cabe señalar que inventarios realizados en la zona minera por Berti *et al.* (1998) donde se reporta la presencia de *Ch. bathana*, posiblemente hayan sido identificadas incorrectamente. Así mismo, especímenes previamente identificados como *Ch. bathana* (Rubio-Palis *et al.*, 2010) de los municipios Sucre y Cedeño del estado Bolívar, fueron confirmados como *Ch. bonnae*, al igual que demás especímenes examinados y provenientes de la misma región del bajo río Caura. En cuanto a los ejemplares examinados provenientes de diversas localidades del municipio Gran Sabana se reportaron *Ch. bonnae* y *Ch. ablusa* en las localidades de Santa Elena de Uairen, Waramasen y Chirikayen (Berti *et al.*, 2011); *Ch. bonnae* además fue identificada en las localidades de San Antonio del Morichal, Maurak y Kinok-Pon (Berti *et al.*, 2011).

Podemos confirmar con certeza que, al menos en el estado Bolívar solo están presentes *Ch. ablusa* y *Ch. bonnae*. De acuerdo al material revisado por Harbach & Howard (2009), *Ch. ablusa* esta presente en Peru (localidad tipo: Satipo, Junin) y en Colombia, pero indican que posiblemente tambien se encuentra en Ecuador y Bolivia. *Chagasia bonnae* tiene una amplia distribucion geografica en America del Sur, existiendo material de referencia de Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guyana, Guyana Francesa, Peru, Suriname (localidad tipo: Dam) y Venezuela (Harbach & Howard, 2009). Mientras que *Ch. bathana* (localidad tipo: Gatún, Panamá) se extiende desde Mexico hasta Ecuador, Guyana Francesa y Venezuela, estando ausente de Brasil (Harbach & Howard, 2009). Cabe señalar que en la reciente revisión realizada por Talega *et al.* (2015) sobre los mosquitos de Guyana Francesa, manifiestan serias dudas sobre la presencia de *Ch. bathana* en este país, puesto que el reporte de esta especie se basa en un único registro realizado por Fauran & Pajot (1974) al sur del país y que no se cuenta con el respectivo material de referencia. Aún mas, Harbach & Howard (2009) señalan la presencia de *Ch. bathan* en Guyana Francesa pero sin haber revisado ejemplares de este país. Mientras que las otras dos especies del género, *Ch. fajardi* y *Ch. rozeboomi*, parecen estar confinadas a Brasil (Harbach & Howard, 2009). *Chagasia fajardi* solo ha sido reportada en Argentina y el sur de Brasil, si bien no se conocen los estadios de larva y pupa.

Es importante señalar que Harbach & Howard (2009) revisaron dos larvas de Venezuela (sin código), localidad desconocida, confirmando su identificación como *Ch. bathana*. Sin embargo, hay un silencio de mas de 60 años en cuanto a registros de *Ch. bathana* en Venezuela, siendo necesario realizar capturas de larvas y desarrollar todos los estadios asociados a lo largo de la distribución geográfica referida previamente en el país, a fin de confirmar la presencia de *Ch. bathana* y actualizar la distribución geográfica de *Chagasia* spp. en Venezuela.

Conflicto de Intereses

Los autores declaramos que no existe conflicto de intereses en la realización de este trabajo y resultados presentados.

REFERENCIAS

- 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.
- Berti J., Vanegas C., Amarista J., González J., Montañez H., Castillo M., et al. (1998). Inventario preliminar y observaciones biológicas sobre los anofelinos (Diptera: Culicidae) de una región minera del estado Bolívar, Venezuela. *Bol. Entomol. Venez.* **13**: 17-26.
- Causey O. R., Deane L. M. & Deane M. P. (1945). Description of *Chagasia rozeboomi*, an anopheline from Ceará, Brazil. *J. Nat. Mal. Survey.* **4**: 341-350.
- Cova-García P. (1961). *Notas sobre los Anofelinos de Venezuela y su identificación*. 2ª Ed. Editora Gráfica C.A, Caracas, Venezuela.
- Cova-García P. & Sutil E. (1977). *Claves gráficas para la identificación de Anofelinos de Venezuela*. Publicaciones de la División de Endemias Rurales. Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental. Maracay, Venezuela.
- Dyar H. G. (1928). *The mosquitoes of the Americas*. Publication N° 387. Carnegie Institution of Washington, D.C.
- Fauran P. & Pajot F. X. (1974). Complement to the catalog of the Culicidae recorded from French Guiana (South America). *Mosq. Syst.* **6**: 99-110.
- Gabaldon A., Herrera J., Pérez-Vivas M. A. & Rausseo J. A. (1940). Estudio sobre anofelinos, serie I. 6. *Chagasia bathanus* Dyar, 1928: su hallazgo en Venezuela y nota sobre variaciones morfológicas de las pupas. *Publicaciones de la División de Malariología.* **5**: 57-62.
- Gabaldon A. & Cova García P. (1946). Zoogeografía de los abofelinos en Venezuela. II. Los vectores secundarios y los no vectores. *Tijeretazos sobre Malaria,* **10**: 78-127.
- Gabaldon A. & Cova García P. (1952). Zoogeografía de los abofelinos en Venezuela. IV. Su posición en la región neotropical y observaciones sobre las especies de esta región. *Revista de Sanidad y Asistencia Social,* **27**: 171-209.
- Gast Galvis A. (1943). *Biología y distribución geográfica de los anophelinos de Colombia*. Editorial Cromos, Bogotá.
- Harbach R.E. & Howard T. M. (2009). Review of the genus *Chagasia* (Diptera: Culicidae: Anophelinae). *Zootaxa.* **2210**: 1-25.
- Harbach R. E. & Knight K. L. (1980). *Taxonomists' glossary of mosquito anatomy*. Plexus Publishing, Inc., Marlton, New Jersey.
- Lane L. (1953). *Neotropical Culicidae*. Volume I. University of São Paulo.
- Mora J., Berti J. & Gutiérrez J. (1993). Nuevo registro sobre la distribución geográfica de *Chagasia bathanus* Dyar (Diptera: Culicidae) en Venezuela. *Bol. Entomol. Venez.* **8**: 159.
- Moreno J., Rubio-Palis Y. & Acevedo P. (2000). Identificación de criaderos de anofelinos en un área endémica a malaria del estado Bolívar, Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **40**: 21-30.
- Navarro J. C. (1996). Actualización taxonómica de la tribu Anophelini de Venezuela, con nueva clave para la identificación de larvas de 4to estadio. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **36**: 25-43.
- Root F. M. (1927). Studies on Brazilian mosquitoes. II. *Chagasia fajardoii*. *Amer. J. Hyg.* **7**: 470-480.
- Rubio-Palis Y. (2005). Situación actual de la taxonomía de la subfamilia Anophelinae (Diptera: Culicidae) de Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **45**: 1-10.
- Rubio-Palis Y., Moreno J. E., Bevilacqua M., Medina D., Martínez A., Cárdenas L., et al. (2010). Caracterización ecológica de los anofelinos y otros culicidos en territorio indígena del Bajo Caura, estado Bolívar, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **50**: 93-105.
- Sevenet G. (1934). Contribution a l'étude des nymphes d'Anophelínés (4e Mémoire). *Arch. Inst. Parteur Algérie,* **12**: 29-76.

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.

Talega S., Dejean A., Carinci R., Gaborit P., Dusfour I. & Girod R. (2015). Updated list of the mosquitoes (Diptera: Culicidae) from French Guiana. *J. Med. Entomol.* **52**: 770-782. DOI: 10.1093/jme/tjv109.

Recibido el 15/02/2016
Aceptado el 20/06/2016

Notas Científicas

Description of the genital atrium of three *Lutzomyia* species in the subgenus *Psathyromyia* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from the Central Brazilian Amazon

Descripción del atrio genital de tres especies de Lutzomyia del subgénero Psathyromyia (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) de la Amazonía Central Brasileña

Arley Faria José de Oliveira^{1,2,*}, Eric Fabrício Marialva², Jeane Cristine de Oliveira Barbosa², Nair Otaviano Aguiar¹ & Felipe Arley Costa Pessoa²

SUMMARY

Phlebotomine sand flies are responsible for the transmission of the etiological agents of several diseases, including protozoan parasites that cause leishmaniasis. In the *Lutzomyia* França genus, the females of some species are morphologically similar, and the morphological characters normally used to identify them are unreliable. The aim of this study was to distinguish between females of cryptic *Lutzomyia* França species from the subgenus *Psathyromyia* Barretto by analyzing the armature in the genital atrium (AGA). The species studied were *Lutzomyia dendrophyla* Mangabeira, *L. scaffi* Damasceno & Arouck and *L. shannoni sensulato* Dyar. Lab-reared females were dissected to isolate the genital atrium and spermathecae. The AGA of each species was then photographed, and the arrangement of spines described. We conclude that the AGA can be a useful tool for distinguishing between female cryptic species of the subgenus *Psathyromyia*.

Key words: morphology; taxonomy; phlebotomine.

RESUMEN

Los flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) son responsables por la transmisión de agentes etiológicos de varias enfermedades, incluyendo protozoarios parásitos que causan las leishmaniasis. En el género *Lutzomyia* França, las hembras de algunas especies tienen morfologías semejantes y los caracteres morfológicos utilizados para identificarlas no son confiables. El objetivo de este estudio fue distinguir las hembras de especies crípticas del subgénero *Psathyromyia* Barretto analizando la armadura del área genital (AGA). Las especies estudiadas fueron *Lutzomyia dendrophyla* Mangabeira-Filho, *Lutzomyia scaffi* Damasceno & Arouck y *Lutzomyia shannoni sensulato* Dyar. Las hembras criadas en laboratorio fueron diseccionadas para aislar la genitalia y la espermateca, las armaduras fueron fotografiadas y la distribución de las espinas fue descrita. Concluimos que la AGA puede ser una herramienta útil para distinguir las hembras crípticas del subgénero *Psathyromyia*.

Palabras clave: morfología, taxonomía, flebotomo.

Phlebotomine sand flies are insects of medical and veterinary importance, because they can transmit etiological agents that cause leishmaniasis, bartonellosis, and arboviruses (e.g. Guerra *et al.*,

2006. *Cad.SaúdePública* 22: 2319-2327; Cohnstaedt *et al.*, 2011. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **84**: 913-922; Comer *et al.*, 1994. *J. Med. Entomol.* **31**: 850-854). In the Amazon region, these insects exhibit high species

¹ Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica – ICB, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brazil.

¹ Instituto de Biologia – ICB, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brazil.

² Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia – Centro de Pesquisas Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, AM, Brazil.

*Autor de correspondencia: afariajosedoliveira@gmail.com

richness and high indices of local diversity (Alves *et al.*, 2012. *Rev. Bras. Entomol.* **56**: 220-227; Oliveira *et al.*, 2013. *Uakari.* **9**: 55-59). Several species of sandflies, are considered cryptic (e.g. Arrivillaga & Feliciangeli 2001. *J. Med. Entomol.* **38**: 783-790; De La Riva *et al.*, 2001. *Mem Inst. Oswaldo Cruz.* **96**: 1089-1094; Dujardin *et al.*, 2005. *Infect. Genet. Evol.* **5**: 362-365; Pinto *et al.*, 2010. *J. Med. Entomol.* **47**: 16-21; Freitas *et al.*, 2015. *Paras. Vectors.* **8**: 448).

In the subgenus *Psathyromyia*, of the genus *Lutzomyia*, females of some species have morphologically similar external structures, and similar spermathecal characters e.g., *Lutzomyia dendrophyla*, *L. scaffi* and *L. shannoni sensulato*. Among these species, similar females are distinguished only by discrete chromatic characters of the pleura of the thorax, and these characters usually disappear when specimens are clarified for slide mounting (Young & Duncan 1994. *Mem. Am. Entomol. Inst.* **54**: 1-881). In the Amazon, these groups of species are also difficult to identify because they share the same resting place: tree trunks (Pessoa *et al.*, 2007. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **102**: 593-599).

According Valenta *et al.*, 1999 (*Ann. Trop. Med. Parasitol.* **93**: 389-399), the genital atrium is a structure with a thinchitinous membrane bearing an armature of small spines. The armature in the genital atrium (AGA) is located between the arms of the furca (Fig. 1). Armature morphology is consistent for individuals of the same species, but different species exhibit variations in the size, shape, number, and arrangement of spines and spine comb-sets. The size and width of each AGA is showed in the Table I.

Madulo-Leblond *et al.*, 1991 (*Parasitol.* **33**: 387-391) noted that the AGA of the female *Phlebotomus papatasi* Scopoli exhibited spines of a different length than those found in the female *P.*

dubosqi Neveu-Lemaire. Spine length was used as a diagnosis character to distinguish between the two species. Sandfly AGA was used subsequently as a taxonomic tool to assess African and Asian species of the genus *Phlebotomus* Rondani, and was applied successfully to the identification of subgenera *Phlebotomus* Rondani & Brete, *Larroussious* Nitzulescu, and *Paraphlebotomus* Theodor (Killick-Kendrick *et al.*, 1994. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **88**: 433-437; Killick-Kendrick *et al.*, 1997. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **91**: 417-428; Pessonnet *et al.*, 1994. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **88**: 539-542; Depaquitet *et al.*, 1998. *Bull. Soc. Path. Exot.* **91**: 346-352; Kakarsulemankhel 2003. *Parassitol.* **45**: 103-118).

In South America, Valenta *et al.*, 1999 (*Ann. Trop. Med. Parasitol.* **93**: 389-399) used the AGA to assess the genus *Lutzomyia*, and identified useful taxonomic characters for distinguishing females of the verrucarum group from other species of sandfly in Venezuela. In Brazil, Farias *et al.*, 2014 (*Acta Amaz.* **45**: 81-88) described the AGA of 16 species of sand fly from the North and Northeast regions, and found significant differences between sibling species, such as *L. longipalpis* Lutz & Neiva, *L. cruzi* Mangabeira, and *L. umbratilis* Ward & Fraiha.

The aim of this study was to describe the AGA of the species *L. dendrophyla*, *L. scaffi*, and *L. shannoni* s.l. These species have very similar females and share the same ecotypes in the Central Brazilian Amazon.

Sand fly collections carried out in solid ground forest located at the Experimental Farm of the Federal University of Amazonas, on BR - 174 high way, Km 38 (2° 38'59.46 "S, 60° 3'16:47" W). Live sand flies were taken to the entomological facility at the Leônidas & Maria Deane Institute. The samples taken, the females who were with

Table I. Length and width, in μm of the females of armature of genital atria, of *Lutzomyia scaffi*, *L. shannoni* and *L. dendrophyla*.

	<i>L. scaffi</i>		<i>L. shannoni</i>		<i>L. dendrophyla</i>	
	Lenght	width	leght	width	lenght	width
Maximum	202,6	61,3	192	34,6	186,6	42,6
Minimum	186,6	26,6	176	8	173,3	10,6
Median	200	37	184	12	176	32
Standard deviation	4,1	7,1	6,0	5,6	1,7	4,6

Fig. 1. Photomicrograph of the genital furca *Lutzomyia (Psathyromyia) scaffi* – f: furca; e: spermathecae; AGA: armature in the genital atrium.



eggs or engorged were separated into individual tubes oviposition. For all three species, the first generation of laboratory reared females was obtained according to the methodology described by Killick-Kendrick & Killick-Kendrick 1991 (*Parasitol.* **33**: 315-320) and Pessoa *et al.*, 2008 (*Zootaxa.* **1740**: 1-14). The identification of cryptic species females was confirmed by identification of the reared males

morphological characters. The identification key and nomenclature used were Young & Duncan 1994 (*Amer. Entomol. Inst.* **54**: 1-881) proposals.

To obtain the furca of each species studied, we separated the last three abdominal segments and placed them overnight in 10% KOH. The samples were then washed in 10% acetic acid and water, and placed in glycerin for dissection under a stereoscopic microscope. The segments were separated using fine needles to open them ventrally and expose the furca within the atrium (Killick-Kendrick *et al.*, 1994. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **88**: 433-437). The atria were then mounted in Berlese's fluid. The images were obtained using a Leica DM 1000 optical microscope with a 100x objective. Images were recorded with a JVC - 3 CCD digital camera and a computer, using Auto Montage 4.0 (Syncroscopy).

In this study, we slide mounted nine furcae from each of the species studied. We did not find any intraspecific differences in the AGA of all individuals examined. In *L. scaffi*, there were three to six spines in each comb, the combs formed horizontal strips, and spine-sets were abundant across the membrane (Fig. 2A, 3A). In *L. shannoni* s.l., spine clusters in the middle of the membrane formed combs of three to six short spines, while spines on the lateral edges of the membrane were large and ungrouped (Fig. 2B, 3B). In *L. dendrophyla*, spines were large and clustered in sets of one to three; grouped and ungrouped spines were present across the membrane (Fig. 2C, 3C).

In this study, the species examined showed specific differences in AGA distinguished at specific levels. Valenta *et al.*, 1999 (*Ann. Trop. Med. Parasitol.* **93**: 389-399) distinguished between important species of the verrucarum group that are involved in the

Fig. 2. The armature in the genital atria of A) *Lutzomyia scaffi*, B) *L. shannoni sensu lato*, C) *L. dendrophyla*.

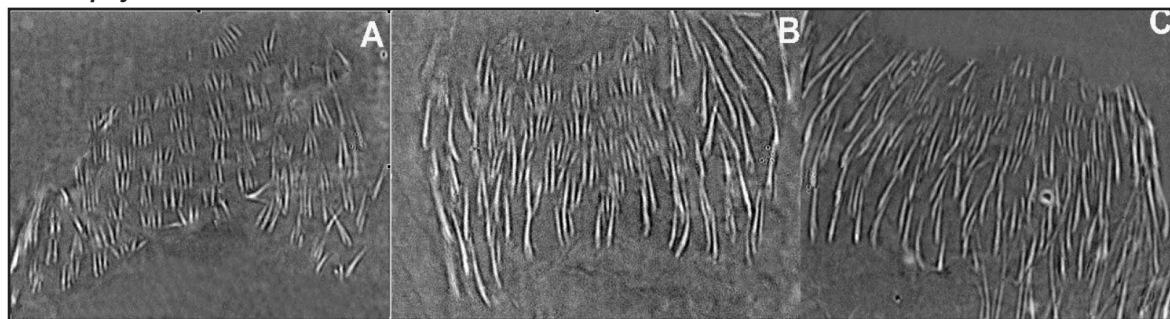
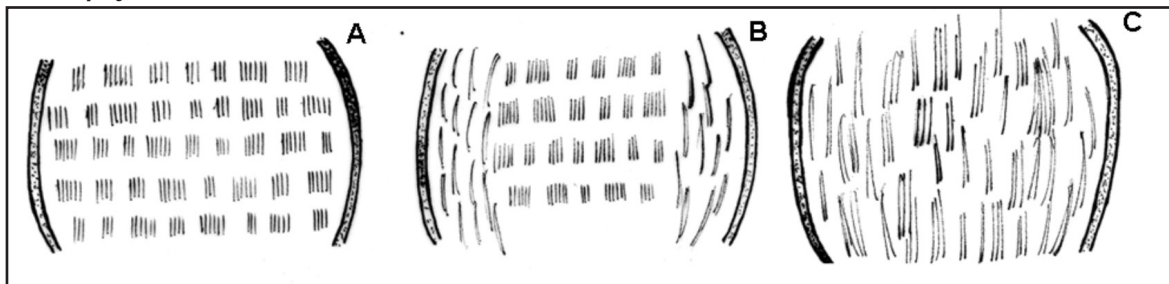


Fig. 3. The schematic graphs of the genital atria of A) *L. scaffi*, B) *L. shannoni sensu lato*, C) *L. dendrophyla*.



transmission of leishmaniasis. Farias *et al.*, 2014 (*Acta Amaz.* **45**: 81-88) distinguished *L. lenti* (Mangabeira) from *L. carmelinoi* Ryan, Fraiha, Lainson & Shaw, and also distinguished *L. longipalpis* (Lutz & Neiva) from *L. cruzi* (Mangabeira) species that are vectors of *Leishmania infantum*, and have very similar females. This study has shown that there are morphological differences in the atria of *L. dendrophyla*, *L. shannoni* s.l., and *L. scaffi*. Two of these species are important in vector competence studies: *L. dendrophyla* may be infected by *Leishmania amazonensis* (Ryan *et al.*, 1986. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **80**: 164-165); *L. shannoni* s.l. has been incriminated as a vector of vesicular stomatitis virus (Comer *et al.*, 1990. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **42**: 483-490; 1991. *Parassitol.* **33**: 151-158; 1994. *J. Med. Entomol.* **31**: 850-854; Corn *et al.*, 1990. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **42**: 476-482). This study concludes that morphological differences in the AGA can be adopted as important taxonomic

characters for differentiating between cryptic species of the subgenus *Psathyromyia* in the Central Brazilian Amazon.

ACKNOWLEDGMENTS

Arley Faria José de Oliveira received an MSc. Scholar ship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes. Eric Fabrício Marialva received a Scientific initiation scholar ship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM, and Jeane Cristine de Oliveira Barbosa received a Scientific initiation scholar ship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq and Raúl Bismark Pinedo Garcia for translating the abstract in Spanish.

Recibido el 28/11/2015
Aceptado el 08/04/2016

A probable hybrid female *Psychodopygus* sp. (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) specimen from Amazonas State, Brazil

Un híbrido probable en una hembra Psychodopygus sp. (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) en el estado de Amazonas, Brasil

Arley Faria José de Oliveira^{1,2*}, Nair Otaviano Aguiar¹ & Felipe Arley Costa Pessoa²

SUMMARY

Phlebotomine sand flies are vectors of several important etiological agents. Sand fly cibaria and genitalia exhibit morphological characters that are essential for species identification. A morphologically anomalous female sand fly of the subgenus *Psychodopygus* Mangabeira was found in a faunistic survey of a forested area near Manaus, Amazonas State, Brazil. This specimen possesses two pairs of spermathecae and a cibarium with supernumerary rows of teeth. Most morphological anomalies in sand flies occur in the number and arrangement of spines in structures associated with the male genitalia. In females, the number of cibarial teeth is the most common form of anomaly. The specimen described here constitutes a rare anomalous record.

Key words: leishmaniasis, morphological abnormalities, sandflies, taxonomy

Phlebotomine sand flies are hematophagous insects which transmit pathogens that cause disease in vertebrates. These insects are identified primarily via characters of the genitalia and characters of the mouth, such as the cibarium. Morphological anomalies are often found in structures of the external genitalia in males, and in the number of cibarial teeth in females; abnormalities are also common in wing-nervures, palpi and antennae (e.g. Sherlock *et al.*, 1958. *Rev. Bras. Biol.* **18**: 433-437; Feliciangeli *et al.*, 1985. *Acta Amazon.* **15**: 157-166; Marcondes, 1999. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **94**: 365-366; Ximenes *et al.*, 2002. *Brazil. Entomotrópica.* **17**: 183-184; Andrade Filho *et al.*, 2004. *Rev. Bras. Entomol.* **48**: 583-585;

RESUMEN

Los flebotomos son importantes vectores de varios agentes etiológicos. En flebotomos, los caracteres morfológicos del cibario y la genitália, son esenciales para la correcta identificación de las especies. Una hembra morfológicamente anómala del subgénero *Psychodopygus* Mangabeira, fue encontrada en un levantamiento faunístico en un área de bosque cerca de Manaus, estado de Amazonas, Brasil. Este espécime tiene dos pares de espermatecas y un cibario como hileras de dientes supranumerarios. La mayoría de las anomalías morfológicas en los flebotomos ocurre en el número y disposición de las espinas en las estructuras de la genitália masculina. En las hembras, el número de dientes del cibario es la forma más común de anomalía. El espécimen aquí descrito constituye un raro registro de anomalía.

Palabras clave: leishmaniosis, anomalías morfológicas, flebotomos, taxonomía

Pinto *et al.*, 2010. *Neotrop. Entomol.* **39**: 732-735). Abnormalities may cause insects to be misidentified, and correct identification is important because some species are vectors of leishmaniasis.

An abnormal female sand fly was found during an entomological survey conducted in an Amazonian forest reserve that is part of the UFAM Experimental Farm, Federal University of Amazonas, on Km 38 of BR – 174, between Manaus, Amazonas and Boa Vista, Roraima, Brazil (2° 38' 59.46" S, 60° 3' 16.47" W). The specimen was slide-mounted, photographed and drawn.

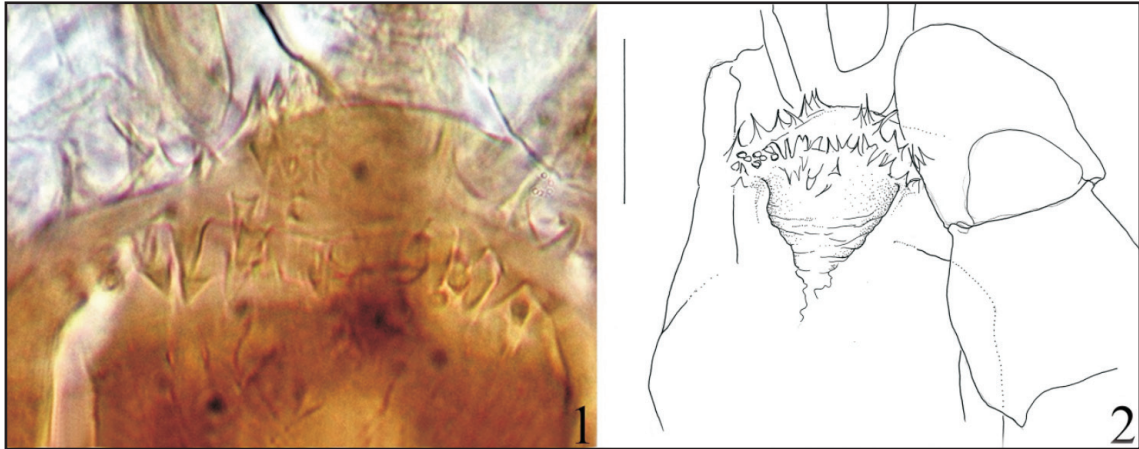
¹ Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica – ICB, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brazil.

¹ Instituto de Biologia – ICB, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brazil.

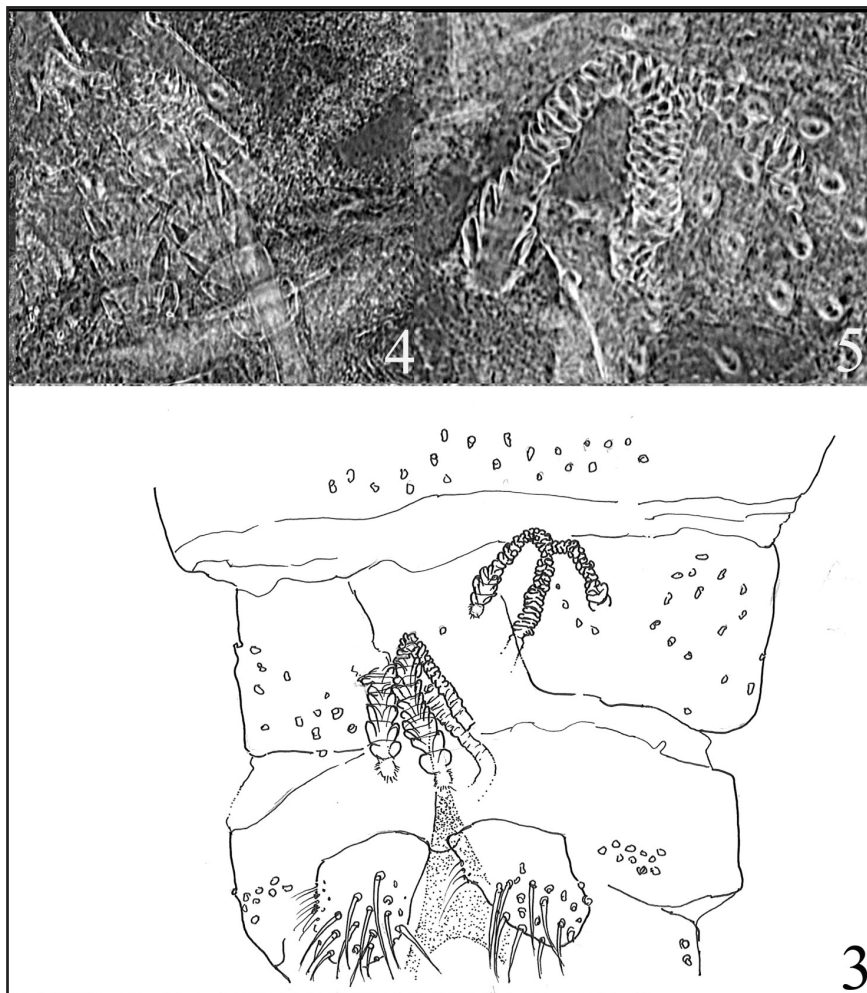
² Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia – Centro de Pesquisas Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, AM, Brazil.

*Autor de correspondencia: afariajosedoliveira@gmail.com

Figures 1-2. Photomicrographs and drawing of cibarium showing three rows of irregular horizontal teeth.



Figures 3-5. Photomicrographs and drawing showing two pairs of spermathecae. One pair of spermathecae possesses two complete bodies other pair of spermathecae possesses one complete body and one body without the head.



The specimen exhibits a cibarium with three rows of irregular horizontal teeth (Figs. 1 and 2), and two pairs of spermathecae. One pair of spermatheca possesses two complete bodies, with individual ducts and a visible common duct ending in the genital furca. The other pair of spermathecae possesses one complete body and one body without the head, and only the distal third of the common and individual ducts is visible (Figs. 3-5).

Normally, female sandflies possess a single pair of spermathecae (McAlpine, 1981. Canada: *Res. Branch Agric.* **1**: 9-63). Ogusuku & Pérez, 1994 (*Acta Amazon.* **24**: 317-320) found a supernumerary spermathecae in a specimen of *Psychodopygus carrerai* Barretto, and the absence of spermathecae in a specimen of *P. amazonensis* Root. The abnormal female described here exhibits anomalies in both the cibarium and the spermathecae. According to the keys proposed by Young & Duncan, 1994 (*Mem. Am. Entomol. Inst.* **54**: 1-881), the arrangement of cibarial teeth is similar to that of *P. arthuri* Fonseca, 1936; additionally, the strong pigmentation of the thorax and pleura, and the characteristics of one pair

of spermathecae could cause this specimen to be misidentified as *P. ayrozai* Barretto & Coutinho. This may be the first record of combined cibarium and spermathecae teratologies present in a single female sand fly. Due to these abnormalities, the specimen could not be identified at species level.

ACKNOWLEDGEMENTS

To my technical illustrator Mr. Artêmio Coelho da Silva and Raúl Bismarck Pinedo Garcia Graduate in Biological Sciences the translation of the abstract in Spanish.

Conflict of interest

The authors report no conflicts of interest with this study.

Recibido el 20/01/2016
Aceptado el 10/04/2016

Study of the prevalence of *Plasmodium* infections by the polymerase chain reaction (PCR) among patients with severe anaemia treated at a rural hospital in southern Ethiopia

Prevalencia de infección por Plasmodium mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en pacientes con anemia grave atendidos en un hospital rural de sudeste de Etiopía

José M. Ramos^{1,2*}, Gabre Tissiano¹, Ashenafi Gosa¹, Iñaki Alegria¹ & Pedro Berzosa³

SUMMARY

This study was conducted to determine the current burden of *Plasmodium* infections among patients with severe anaemia attending a rural hospital in southern Ethiopia. A total of 111 patients with severe anaemia (hemoglobin < 7 mg/dL) were included. The *Plasmodium* species causing the infection were identified using a Semi-nested Multiplex PCR. The mean age of the study population was 15 years and 26 (23.4%) individuals tested positive for malaria. Of these, 18 (16.2%) were infected by *P. falciparum*, 4 (3.6%) by *P. vivax*, and 4 by *P. ovale*. No significant associations between the species of *Plasmodium* and the sex of the patient or the haemoglobin values were found. This study showed that *Plasmodium* infections cause severe anaemia in one in four cases.

Key words: Anaemia, *Plasmodium*, Malaria, PCR.

Anaemia remains a major public health problem affecting about a quarter of the world's population (Haidar, 2010. *J Health Popul Nutr.* **28**: 359-368). Anaemia can result from non-nutritional factors, such as haemorrhage, infection, chronic disease states, or drug toxicity, and from nutritional ones, including deficiencies of iron, certain vitamins, copper, and protein (Zhang *et al.*, 2003. *J Natl Cancer Inst.* **95**: 373-380). Moreover, parasitic diseases, including helminthic infections and *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*, have long been recognized as important contributors to anaemia

RESUMEN

El estudio se ha llevado a cabo para conocer el impacto de la infección por especies de spp *Plasmodium* entre los pacientes con anemia grave atendidos en un hospital rural del sudeste de Etiopía. Se incluyeron en el estudio 111 pacientes con anemia grave (hemoglobina < 7 mg/dL). La infección por *Plasmodium* spp. se llevó a cabo mediante una PCR Semi-nested Multiplex. La media de edad de la población de estudio fue de 15 años; 26 pacientes presentaban infección por *Plasmodium* spp. (23.4%): 18 (16.2%) fueron para *P. falciparum*, 4 (3.6%) para *P. vivax*, and 4 (3.6%) para *P. ovale*. No encontramos asociación entre el tipo de *Plasmodium* con el sexo y el los valores de hemoglobina. Este estudio reveló la importancia que la infección por *Plasmodium* es responsable de la anemia grave en uno de cada cuatro pacientes evaluados.

Palabras clave: Anemia, *Plasmodium*, Malaria, PCR.

in endemic countries (McDevitt *et al.*, 2014. *Curr Hematol Rep.* **3**: 97-106).

The light microscopy examination of blood smears is still considered the gold standard for laboratory diagnosis of malaria (WHO: *World Malaria Report*, 2008). It is relatively cheap and allows for the quantification of parasitaemia. Polymerase chain reaction (PCR) is a technique that is more sensitive and specific than light microscopy, particularly in situations of low-level parasitaemia (0.7-0.02 parasites/ μ L) (Hermsen *et al.*, 2011. *Mol Biochem Parasitol.* **118**: 247-251).

¹ Gambo General Rural Hospital, POB 121, Shashemane, Ethiopia

² Department of Internal Medicine, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, and Universidad Miguel Hernández de Elche, Pintor Baeza, 12, 03010 Alicante, Spain,

³ National Centre of Tropical Medicine, Institute of Health Carlos III, Carretera Majadahonda- Pozuelo km. 2. Majadahonda, 28220 Madrid Spain

*Autor de correspondencia: jramosrincon@yahoo.es

This research was conducted to determine the current burden of *Plasmodium* infections among patients with severe anaemia attending a rural hospital in southern Ethiopia.

A prospective cross-sectional study was performed at Gambo General Rural Hospital from September 2013 to May 2014. Patients with severe anaemia < 7 mg/dL were included. The hospital is a 150-bed rural general hospital located in the West-Arsi zone, 250 km south of Addis Ababa. Most of the population lives in a rural setting and works in agriculture and farming. It is situated at an altitude of 2,200 meters. However, patients can come from endemic areas situated at lower altitudes. The patients with severe anaemia gave informed verbal consent. Pregnant women were excluded. A sample of blood was taken from each patient on filter paper (Whatman® 3MM) for diagnostic confirmation by Semi-nested Multiplex PCR (sPCR) at the National Centre of Tropical Medicine, Institute of Health Carlos III, Spain. Blood samples were stored at 4°C and transported at room temperature in double zip-lock plastic bags. DNA extraction was performed on the filter paper samples using commercial kits (Speedtools tissue DNA Extraction Kit, Biotools). Haemoglobin levels were determined by laboratory technicians using a portable digital haemoglobin meter (Hemo Control, EKF-diagnostic GmbH, Barleben/Magdeburg, Germany). This study was carried out under anonymous conditions and ethics committee approvals were obtained from the local Research and Publication Committee of the GRH.

A total of 111 patients with anaemia were included. The median age of this investigation

population was 15 years (range: 6 months - 65 years; interquartile range: 3-28); 47 (43.3%) were male and 64 (57.7%) were female. The median haemoglobin was 4.7 (range 1.6-6.9; interquartile range: 3.9-5.7). Of 111 cases studied, 26 were positive for malaria (23.4%; 95% confidence interval [CI]: 16.1-32.1%), 18 (16.2%; 95% CI: 10.5-24.1%) were so for *P. falciparum*, 4 (3.6%; 95% CI: 1.4-8.9%) for *P. vivax*, and 4 for *P. ovale*. Patients with *P. falciparum* infection and severe anaemia are younger than those with other *Plasmodium* infections and those with no *Plasmodium* infections (p=0.08, Kruskal-Wallis Test). There was no significant association of malaria and with sex, and the haemoglobin value (Table I).

Plasmodium falciparum and *P. vivax*, have long been recognized as important contributors to anaemia in endemic countries (McDevitt *et al.*, 2014. *Curr Hematol Rep.* **3**: 97–106). So, Molineaux suggested that ‘total’ falciparum malaria mortality due to anaemia for malaria in Africa is likely to be twice as high as ‘direct’ malaria mortality (Molineaux, 1997. *Ann Trop Med Parasitol.* **91**: 811-825). Moreover, malaria with anaemia are significant risk factors for poor early childhood neurodevelopment in malaria-endemic areas in rural Africa (Boivin *et al.*, 2016. *Malar J.* **15**: 210). It is a important relevance of association.

This study is relevant because it showed that malaria infections diagnosed by PCR methods cause severe anaemia (< 7 mg/dL) in one of four cases. The PCR technique allows diagnosing more cases of malaria than the conventional light microscopy technique and it could be implemented (Orm *et al.*, 2014. *Bol Mal Salud Amb.* **54**: 95-99). However, other

Table I. Age, gender, and haemoglobin according to *Plasmodium* infection.

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i> and <i>P. ovale</i>	No <i>Plasmodium</i> infection	Total
Median age (IQR)*	6.5 (0.95-20)	17.5 (1.5-33.75)	20 (3-30)	15 (3-28)
Age group				
<5 years (%)	7 (38.9)	3 (37.5)	22 (25.9)	32 (28.8)
5-18 years (%)	6 (33.3)	1 (12.5)	19 (22.1)	26 (23.4)
>18 years (%)	5 (9.4)	4 (50)	44 (51.8)	53 (47.7)
Sex				
Male (%)	8 (44.4)	4 (50)	35 (41.2)	47 (42.3)
Female (%)	10 (55.6)	4 (50)	50 (58.5)	64 (57.7)
Median haemoglobin (IQR)	4.9 (4-5.8)	3.85 (3.45-4.5)	4.8 (4-5.8)	4.7 (3.9-5.7)

IQR: interquartile range

*Patients with *P. falciparum* are younger than those with other *Plasmodium* infections and without *Plasmodium* infections (p=0.08, Kruskal-Wallis Test).

causes can influence in severe anaemia as nutritional ones including deficiencies of iron, certain vitamins, copper, and protein or parasitic infections. This research has a limitation that it did not evaluate other causes of anaemia, such as helminthic infections, vitamin deficiency, and so on.

In our area one of four cause of severe anaemia is due to *Plasmodium* infection by molecular methods, the introduction of rapid diagnostic tests for initial screening reduce the number of false negative of the conventional light microscopy technique. The strategy of the control of malaria based on better prevention, diagnosis and treatment for this disease implemented by government of Ethiopia set in 2011

(Alemu *et al.*, 2012. *Parasit Vectors*. **5**: 173) will confirm a progressive reduction in incident malaria and after that the episodes of severe anaemia.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the National Centre of Tropical Medicine (NCTM) and the Institute of Health Carlos III, Spain, for funding this study.

Conflict of interest

The authors report no conflicts of interest with this study.

Recibido el 28/11/2015
Aceptado el 10/04/2016

Registros de altitud de mosquitos anofelinos (Diptera: Culicidae: Anophelinae) del Municipio Gran Sabana, estado Bolívar, Venezuela, y nuevos datos altitudinales de importancia

Altitude records for anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae: Anophelinae) from the Gran Sabana municipality, Bolivar State, Venezuela, and new relevant altitudinal data

Jesús Berti*, Rodrigo Ramírez, Yarys Estrada, Hernán Guzmán & Lourdes Arias

RESUMEN

En el presente trabajo se reportan las respectivas altitudes para mosquitos de la tribu Anophelini (Diptera: Culicidae: Anophelinae) del Municipio Gran Sabana, estado Bolívar, Venezuela. Se señalan nuevos registros de altitudes en el país para *Chagasia ablusa* Harbach, *Chagasia bonnea* Root y doce especies del género *Anopheles*. La Gran Sabana cubre una superficie de cerca de 18.000 km², con altitudes que varían de 750 m a 1.450 m. La mayor parte de las tierras altas de la misma, presenta un clima característico de bosques húmedos sub-montanos siempre verdes, con temperaturas promedio anual que oscilan entre 18°C y 24°C, con un promedio de precipitación anual entre 2.000 y 3.500 mm, y un corto periodo seco que ocurre entre los meses de Diciembre y Marzo.

Palabras clave: Altitudes, *Anopheles*, *Chagasia*, Escudo Guayanés, estado Bolívar, Gran Sabana, malaria, vectores, Venezuela.

La familia Culicidae (Diptera: Nematocera) incluye cerca de 3.546 especies (Harbach & Kitching 2016. *Royal Swedish Academy of Sciences, Zoologica Scripta*, **45**: 34-47); Navarro *et al.*, 2007. *Zootaxa*, 1547: 1-19; Navarro *et al.*, 2010. *Rev. Biol. Trop.* **58**: 245-254). De estas, una parte importante actúan como vectores potenciales de patógenos al ser humano (arbovirus, protozoos y nemátodos), transmitiendo enfermedades de mucha importancia en salud pública como: malaria, dengue, fiebre amarilla, fiebre mayaro, fiebre chikungunya, zika, virus del Oeste del Nilo y otras enfermedades tropicales emergentes (Berti *et al.*, 2015. *Frontiers in Public Health*. **2**: 1-10).

SUMMARY

Altitude records for mosquitoes in the tribe Anophelini (Diptera: Culicidae: Anophelinae) from the Gran Sabana municipality, Bolívar State, Venezuela are reported. New altitude registers include Chagasia ablusa Harbach, Chagasia bonnea Root and 12 species of Anopheles. The Gran Sabana is an undulating grass-dominated upland savanna covering an area close to 18,000 km², with altitudes ranging from 750 m to 1,450 m. Most of the Gran Sabana highlands have a humid submontane climate, with average annual temperatures ranging between 18°C and 24°C, and average annual rainfall between 2,000 and 3,500 mm. It has a very short dry season occurring from December to March.

Key words: Altitudes, *Anopheles*, Bolívar State, *Chagasia*, Gran Sabana, Guayana Shield, malaria, vectors, Venezuela.

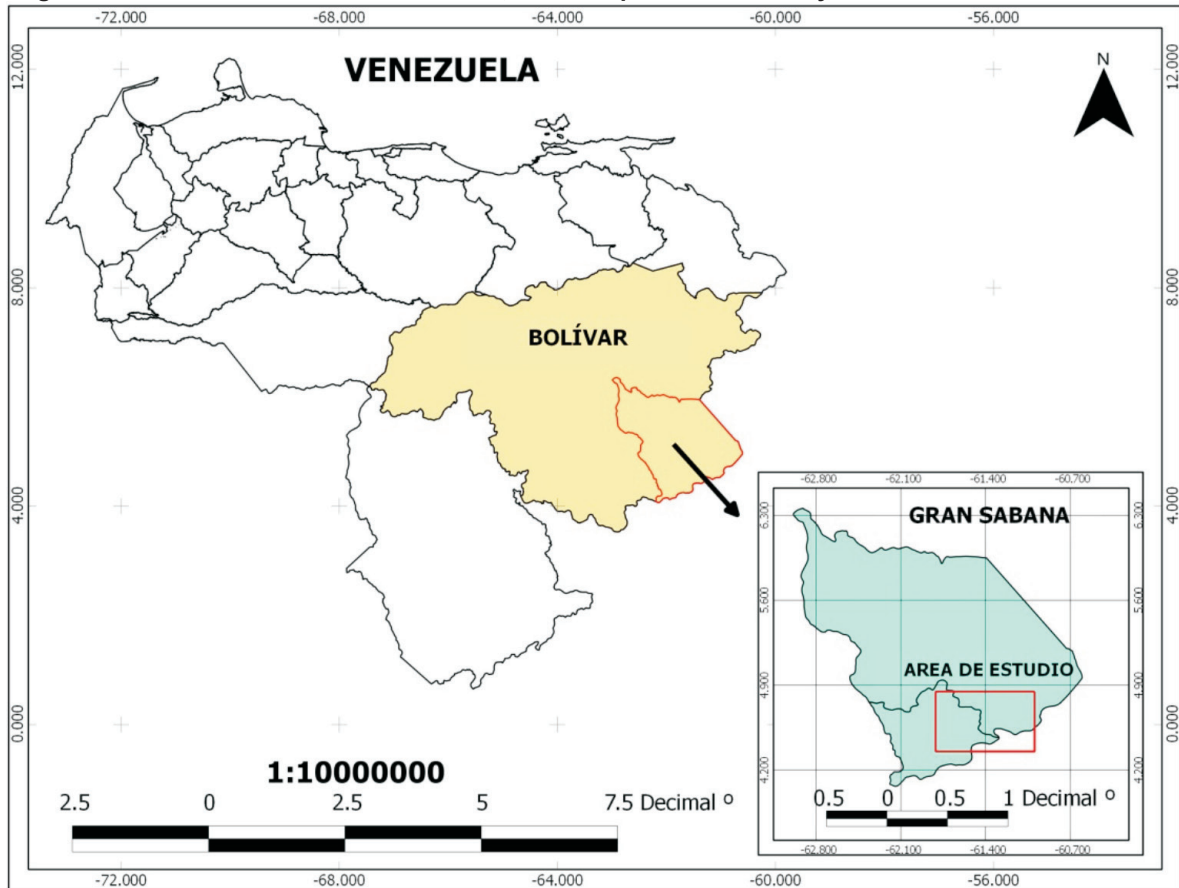
Protozoarios parásitos del género *Plasmodium* (Apicomplexa: Plasmodidae) causantes del paludismo o malaria, se transmiten al ser humano exclusivamente a través de la picada de mosquitos hembras del género *Anopheles* Meigen. Las hembras de *Anopheles* son hematófagas y las únicas que transmiten la malaria al humano; aunque hay especies de *Anopheles* del subgénero *Kerteszia* Theobald, que transmiten la malaria de los simios (Deane *et al.*, 1970. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* **64**: 647-648; Wilkerson & Peyton 1991. *Mosq. Systematics*. **23**: 110-122).

En la actualidad, según Harbach & Kitching (2016. *Royal Swedish Academy of Sciences, Zoologica Scripta*, **45**: 34-47) dentro de la subfamilia Anophelinae (Diptera: Culicidae), están registrados tres géneros, que son: *Anopheles* Meigen (472 especies), *Bironella* Theobald (8 especies) y *Chagasia* Cruz (5 especies). En las Américas, solamente se encuentran presentes los géneros *Anopheles* y *Chagasia* (exclusivamente Neotropical); la mayoría de las especies de Anophelinae, están incluidas dentro del género *Anopheles* (472 especies), el cual ha sido subdividido en siete subgéneros que son: *Anopheles* s.s. Meigen (185 especies), *Cellia* Theobald (224 especies), *Nyssorhynchus* Blanchard (39 especies), *Kerteszia* Theobald (12 especies), *Lophopodomyia* Antunes (6 especies), *Stethomyia* Theobald (5 especies) y *Baimaia* (1 especie). En Venezuela, Navarro (1996. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **36**: 25-43) señaló la presencia de 37 especies de la tribu *Anophelini* (Culicidae: Anophelinae); posteriormente se reportaron 42 especies de la tribu en el país (Rubio-

Palis. 2005. *Bol. Malariol. Salud Amb.* **45**: 1-10). En el presente, con la inclusión de nuevos registros para el país (*An. malefactor*, *Chagasia bonnae* y *Chagasia ablusa*), están registradas 45 especies de *Anophelini*, incluidas en los géneros: *Chagasia* (3 especies) y *Anopheles* (42 especies) (Berti et al., 2015. *Op. Cit.*).

Según Grillet et al., (2009. *Bol. Malariol. Salud Amb.* **49**: 193-208; Grillet et al., 2010. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **82**: 194-201), un foco caliente de malaria es un área geográfica con transmisión activa y una alta agregación de casos, producto de las condiciones epidemiológicas locales que promueven una continua transmisión del *Plasmodium*. En ese sentido, la parroquia de Icabarú (municipio Gran Sabana), se corresponde totalmente con el concepto del foco caliente de transmisión; dicha parroquia está ubicada al sur del municipio Gran Sabana, en el límite de la frontera de Brasil y Venezuela (Fig. 1). Esta parroquia, representa el área de mayor incidencia de la

Fig. 1. Situación relativa del estado Bolívar, el municipio Gran Sabana y del área de estudio.



enfermedad en la zona fronteriza entre ambos países. Es un área de intensa actividad de explotación de oro; puede ser considerada el principal foco caliente de malaria del municipio Gran Sabana de los últimos 25 años. La razón principal de esta problemática, la constituye la minería artesanal de explotación del oro, una actividad ilegal y estrechamente relacionada con la malaria. El cambio climático por un lado, junto a la deforestación y alteración del suelo, producidas por estas actividades mineras, propicia la aparición de hábitats o criaderos adecuados para la reproducción de mosquitos vectores de la malaria. La malaria en esta región, ha sido definida como una enfermedad ocupacional de prevalencia casi exclusivamente en las personas vinculadas a actividades de explotación del oro. La especie *Anopheles braziliensis* (Chagas) ha sido señalada como el principal vector de malaria en la Eco-región de la Gran Sabana (Osborn *et al.*, 2004. *Bol. Malar. Salud Amb.* 44: 77-92) y probablemente *Anopheles (Anopheles) peryassui* Dyar & Knab, también esté involucrado en la transmisión de la malaria en la región, debido a su elevada antropofagia y endofagia (Berti *et al.*, 2015, *Op. Cit.*).

El conocimiento de la distribución geográfica de estas especies es importante para el estudio de su bionomía, ecología, genética poblacional y evolución, así como también, para obtener información ecológica necesaria para entender la dinámica de las enfermedades reemergentes transmitidas por vectores, como es el caso del paludismo; o también para desarrollar estrategias eficientes de manejo vectorial integrado y control de estas enfermedades (Berti *et al.*, 2015, *Op. Cit.*); las cuales están asociadas a cambios ambientales y/o climáticos locales que ocurren en una determinada región geográfica. Una de las variables más importantes de estudio, es la distribución altitudinal de especies, la cual está determinada por factores intrínsecos a su biología, y asociada entre otras, a los límites verticales de los hábitats y sitios de cría (Navarro *et al.*, 2010. *Op. Cit.*). La altitud, la pendiente, la temperatura promedio, los suelos y la climatología general, determinan la vegetación predominante, y éstos a su vez, los hábitats o criaderos disponibles para las hembras (Navarro *et al.*, 2010. *Op. Cit.*).

METODOLOGÍA

El estudio fue realizado mediante la revisión sistemática de la base de datos de una colección de

referencia de mosquitos anofelinos del Municipio Gran Sabana, perteneciente al Laboratorio de Entomología del Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental del IAE en Maracay. Este municipio está localizado en el estado Bolívar (Fig. 1) entre las coordenadas -63.000 y -60.500 O, y 4.000 y 6.500 N. La mayoría de los mosquitos fueron recolectados entre los años 2009 y 2015 en ese municipio, principalmente en el área situada al sur del límite del Parque Nacional Canaima, es decir, al sur del río Kukenán-Caroní, entre Icabarú y Santa Elena de Uairén (Fig. 1). El poblado más importante de esta región es Santa Elena de Uairén, capital del Municipio Gran Sabana. Según información recogida en campo, Santa Elena tiene cerca de 39.000 habitantes de población estrictamente local. El área ha sido descrita con detalle en otra publicación (Berti *et al.*, 2015. *Op. Cit.*). Esta región, está emplazada enteramente sobre el sector nororiental del Escudo de Guayana, la misma tiene una superficie de 18.000 km², con altitudes entre 750 m y 1.450 m; con temperaturas que oscilan entre 18°C y 24°C (Huber, 1995. *Flora of Venez. Guayana*. Vol. 1. pp. 1-61); presenta un corto periodo de sequía entre los meses de Diciembre y Marzo y un promedio de precipitación anual entre 2.000 y 3.500 mm (Huber, 1995. *Op. Cit.*). El área tiene influencia de importantes factores eco-epidemiológicos como son: cambios ambientales hechos por el hombre (deforestación, explotación de minerales), movilización de muchas personas en la frontera Brasil-Venezuela y factores socio-económicos producto de las actividades de explotación del oro. Por tal motivo, ha sido objeto de estudios epidemiológicos ecológicos y recolección sistemática de especies de mosquitos durante más de siete años, resultados que han sido publicados en revistas nacionales e internacionales (Berti *et al.*, 2015. *Op. Cit.*). La metodología consistió en una revisión sistemática de los datos de altitud registrados en la base de datos de la colección antes mencionada, tanto para muestras de larvas como de adultos presentes en la misma, con la finalidad de detectar nuevos registros altitudinales para anofelinos de Venezuela; considerando la premisa de que el municipio Gran Sabana, presenta altitudes con rangos que oscilan entre 750 m y 1.450 m. Lo que pudiera garantizar la detección de nuevos registros de altitud. Las comunidades y/o lugares de muestreo incluidos en el estudio fueron: Santa Elena de Uairén (capital), Manak-Krú, Maurak, Waramasén, San Antonio del Morichal, Colinas de la Laguna, Kinok Pon Parú, Chiricayén, Chiririka, Uaiparú, Betania de

Wariwantey, El Paují y El Paraíso; también fueron incluidas zonas boscosas cercanas a los ríos Kukenán, Chiririka y Uairén y a Santa Elena (Capital) (Figs. 2a, b y 3a, b); en los cuales se presenta un clima característico de bosques húmedos sub-montanos siempre verdes (Huber, 1995. *Op. Cit.*). Es importante resaltar que la selección de sitios de capturas dentro del bosque, es una garantía para obtener una mayor biodiversidad de especies de mosquitos, sobre todo en una región muy poco estudiada y conocida como la Gran Sabana.

RESULTADOS

Estas actividades, permitieron señalar los registros de mayor altitud en Venezuela para *Chagasia bonnae* Root, 1927 y *Chagasia ablusa* Harbach, 2009; Asimismo, para las siguientes especies del género *Anopheles*:

1. *Anopheles (Nyssorhynchus) triannulatus* s. l. (Neiva & Pinto, 1922)
2. *Anopheles (Nyssorhynchus) braziliensis* (Chagas, 1907)
3. *Anopheles (Nyssorhynchus) marajoara* Galvao & Damasceno, 1942
4. *Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi* s. l. (Peryassú, 1922)
5. *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* s. l. Root, 1926
6. *Anopheles (Kertezsia) cruzii* Dyar & Knab, 1908
7. *Anopheles (Anopheles) mattogrosensis* Lutz & Neiva, 1911
8. *Anopheles (Anopheles) peryassui* Dyar & Knab, 1908
9. *Anopheles (Anopheles) punctimacula* Dyar & Knab, 1906
10. *Anopheles (Anopheles) malefactor* Dyar & Knab, 1907
11. *Anopheles (Stethomyia) nimbus* (Theobald, 1902)
12. *Anopheles (Lophopodomyia) squamifemur* Antunes, 1937

Las especies con los mayores registros altitudinales de la Gran Sabana, fueron aquellas localizadas en Waramasén a 975 m (Fig. 3), las cuales son las siguientes: *Chagasia ablusa*, *Chagasia bonnae*, *An. malefactor*, *An. mattogrosensis*, *An. peryassui*, *An. punctimacula*, *An. squamifemur*; *An. braziliensis*, *An. oswaldoi* s. l., *An. rangeli* Gabaldon, Cova-García & López, *An. strodei* s. l., *An. triannulatus* s. l. y *An. nuneztovari* s. l. Gabaldon (Tablas I y II).

DISCUSION

Las especies *Ch. ablusa* y *Ch. bonnae*, recientemente fueron señaladas por primera vez en Venezuela (Berti *et al.*, 2015. *Op. Cit.*). Las especies del género *Chagasia*, no han sido involucradas en la transmisión de enfermedades al hombre, ya que éstas tienen hábitos preferiblemente zoofílicos (Berti *et al.*, 2015 *Op. Cit.*). *Ch. ablusa* y *Ch. bonnae*, han sido capturadas picando al ser humano, tanto durante el día como en la noche (Berti *et al.*, 2015 *Op. Cit.*), pero el contacto es poco frecuente; éstas especies fueron recolectadas en la fase de larva en Waramasén (975 m); éstos hallazgos representan para ambas especies sus mayores registros de altitud en Venezuela (Fig. 3; Tablas I y II).

El vector *Anopheles darlingi* Root, fue encontrado en fase adulta a la altitud de 898 m en Colinas de la Laguna (Tablas I y II), altitud muy similar a la referida anteriormente en Santa Elena de Uairén de 900 m (Tabla II). Esta especie también fue recolectada en fase de larva a 888 m en el río Uairén II (Fig. 2) y también a una menor altitud (628 m) en fase adulta en la localidad de Uaiparú (Tablas I y II).

Por otro lado, también en Waramasén (975 m) fueron capturadas posándose sobre cebo humano, cuatro especies del subgénero *Nyssorhynchus* (Tabla II). Estas son: *Anopheles (Nys.) triannulatus* s. l., *Anopheles (Nys.) braziliensis*, *Anopheles (Nys.) oswaldoi* s. l. y *Anopheles (Nys.) strodei* s. l. Estos registros, también representan las mayores altitudes de dichas especies en Venezuela (Tabla II); ya que en sus registros anteriores, ninguna de ellas había sido encontrada en zonas con altitudes mayores de 900 m (Tabla II; Osborn *et al.*, 2004. *Op. Cit.*). Por su parte, *Anopheles (Nys.) marajoara* presentó su mayor registro de altitud en el país, en la localidad de Kinok Pon Parú (945 m); su anterior registro fue de 900 m en Santa Elena de Uairén (Tabla II). Lo contrario ocurrió con *Anopheles (Nys.) rangeli* Gabaldon, Cova-García & López, que fue capturada en Waramasén (975 m), pero su registro de mayor altitud en el país corresponde a Sanare, estado Lara, con una altitud de 1.352 m (Tabla II).

En relación a *Anopheles cruzii*, la especie se capturó posándose sobre cebo humano en el sector El Paraíso/El Paují a la altitud de 880 m (Tablas I y II). Recientemente *Anopheles cruzii* fue detectada

Fig. 2. Imágenes satelitales señalando la ubicación de lugares de captura de especies de anofelinos en Santa Elena de Uairén (A) y en el Río Uairén II (B).

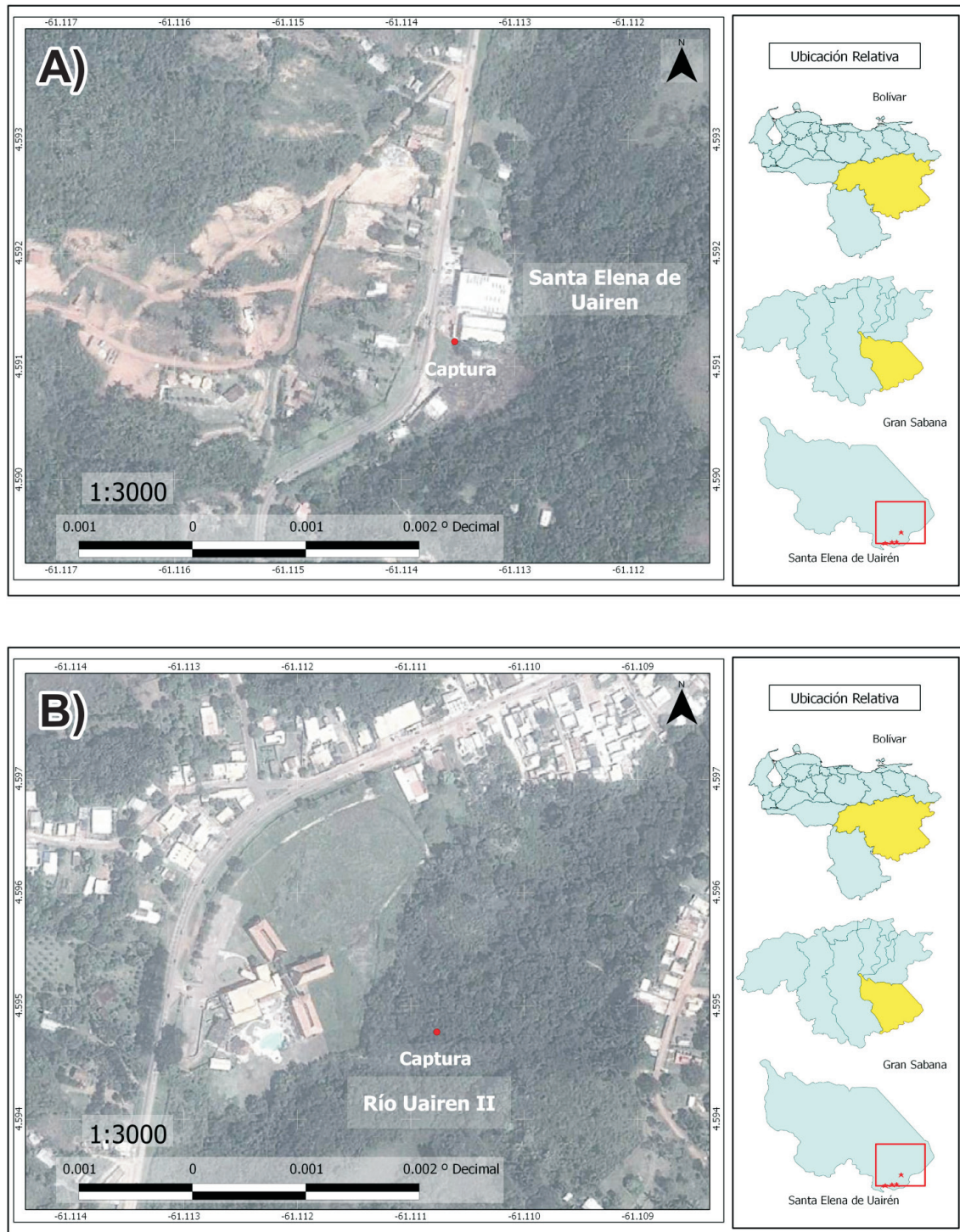


Tabla I. Ubicación geográfica (coordenadas) y altitudes (mayor a menor) de las localidades del municipio Gran Sabana, incluidas en el estudio.

Localidades	Latitudes (N)	Longitudes (O)	Altitudes (m)
Waramasén	4.55777	-61.28028	975
Kinok Pon Parú	4.55753	-61.21327	945
Maurak	4.58641	-61.18052	933
San Antonio del Morichal	4.52103	-61.11529	915
Chiricayén	4.71945	-61.32097	914
Betania de Wariwantey	4.67584	-61.37386	903
Colinas Laguna	4.59560	-61.10559	898
Río Uairén II	4.59577	-61.11077	888
El Paraíso/El Paují	4.44225	-61.69409	880
Río Chiririka	4.57677	-61.11432	871
Manak-Krú	4.60252	-61.12029	862
Santa Elena (Capital)	4.61165	-61.11098	819
Uaiparú	4.65614	-61.27899	628

por primera vez en el estado Bolívar, específicamente en la Parroquia Icabarú del municipio Gran Sabana (Berti *et al.*, 2015. *Op. Cit.*). Esta es una especie muy poco conocida en Venezuela; no existen registros previos de altitud para la especie en el país; de tal manera que el presente, representa el único registro de altitud existente y su registro de mayor altitud en Venezuela. Por el contrario, otras especies del subgénero *Kerteszia*, tienen antecedentes previos de altitud, ya que han sido reportadas en altitudes comprendidas entre 900 y 1.600 m (Osborn *et al.*, 2004. *Op. Cit.*), y también han sido encontradas en Los Andes venezolanos a altitudes que oscilaron entre 2.025 m y 2.680 m (Navarro *et al.*, 2010. *Op. Cit.*). La cordillera andina posee las localidades de mayor altitud en la Geografía venezolana y por ende, los registros más altos del país, están en los estados andinos de Táchira, Mérida y Trujillo. Al respecto, todos ellos corresponden a mosquitos del subgénero *Kerteszia*; éste subgénero es un grupo estrictamente Neotropical (12 especies), con 11 especies presentes en Venezuela. Las especies del subgénero, utilizan como hábitat larval principalmente a las plantas bromeliáceas (Deane *et al.*, 1970. *Op. Cit.*; Wilkerson & Peyton 1991. *Op. Cit.*). En ese sentido, la máxima altitud para una especie de *Anopheles* registrada en Venezuela, resultó ser para *Anopheles* (*Kerteszia*) *pholidotus* Zavortink, encontrada a 2.680 m en Páramos de Zumbador, estado Táchira (Navarro *et al.*, 2010. *Op. Cit.*). Otras especies del subgénero *Kerteszia* con registros de gran altitud, fueron

encontradas en los Andes en el Parque Nacional Dinira a 2.232 m (Navarro *et al.*, 2010. *Op. Cit.*) y éstas son las siguientes: *Anopheles* (*Kerteszia*) *gonzalezrinconesi* Cova-García, Pulido & Escalante; *Anopheles* (*Kerteszia*) *rollai* Cova-García, Pulido & Escalante y *Anopheles* (*Kerteszia*) *boliviensis* (Theobald). Asimismo, la altitud máxima registrada en Venezuela para *An. boliviensis*, ha sido referida en La Carbonera, estado Mérida, donde fue encontrada a 2.295 m (Navarro *et al.*, 2010. *Op. Cit.*).

El papel vectorial de especies del subgénero *Kerteszia*, no ha sido bien documentado en el país; hay varias especies que figuran como vectores de malaria en Colombia, Ecuador, Brasil y Trinidad y Tobago; las cuales también se encuentran en el país; pero que aún no han sido incriminadas en la transmisión de malaria en Venezuela; excepto *Anopheles neivai* Dyar & Knab, señalado como el responsable de la transmisión en un brote de malaria ocurrido en 1988 en San Josecito, estado Táchira (Osborn *et al.*, 2004. *Op. Cit.*). Asimismo, hubo otro brote ocurrido entre Noviembre de 1999 y Enero del 2000 en la Parroquia Vega de Guaramacal, en el estado Trujillo (Benítez *et al.*, 2004. *Bol. Malariol. San. Amb.* **44**: 93-99; Osborn *et al.*, 2004. *Op. Cit.*). En este brote de Trujillo, se recolectaron exclusivamente las siguientes especies: *Anopheles lepidotus*, *Anopheles neivai*, *Anopheles pholidotus* y *Anopheles homunculus* Komp; todas ellas en altitudes comprendidas entre 900 m y 1.600 m. En ninguno de estos hallazgos, se sugiere la

Fig. 3. Imágenes satelitales señalando la ubicación geográfica de sitios de captura en las localidades de Chiririka (A) y Waramasén (B), municipio Gran Sabana, estado Bolívar.

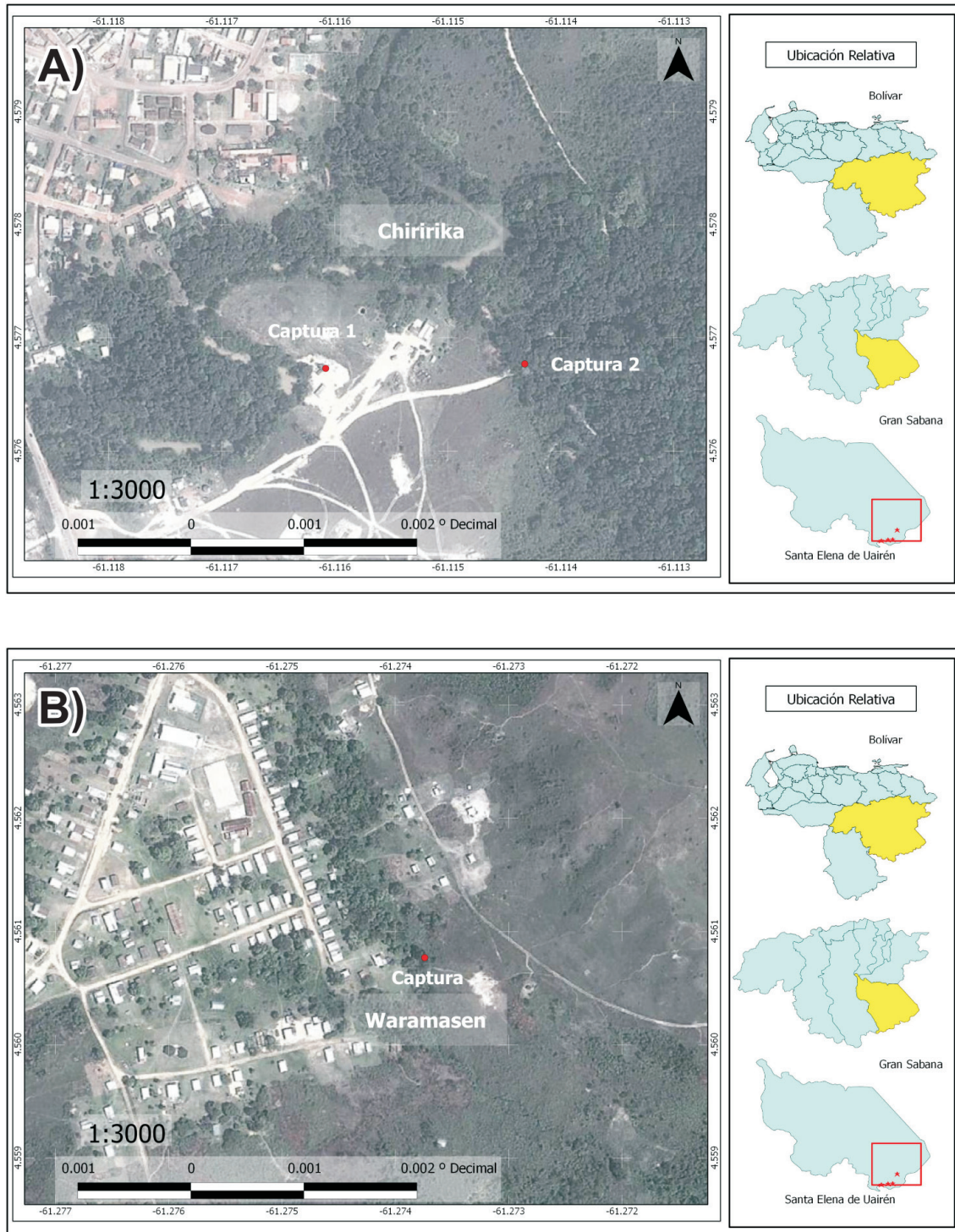


Tabla II. Especies de Anofelinos del municipio Gran Sabana, ordenadas según tipos de captura, localidades donde fueron capturadas y localidades de mayores altitudes de captura.

Especies de Anofelinos	Localidades de Captura	Tipos de Captura	Observación en relación a mayor altitud/localidad en la Gran Sabana	Registros anteriores de Referencias de altitud/localidad
<i>An. triannulatus</i>	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10	Cebo humano Captura larvas Trampa luz negra	Machos y hembras Waramasén. 975 m	Osborn et al, 2004. Bol. Malariol. Salud Amb. 44: 77-92) 900 m
<i>An. brasiliensis</i>	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17	Cebo humano Captura larvas Trampa luz negra	Machos y hembras Waramasén. 975 m	Osborn et al, 2004. Bol. Malariol. Salud Amb. 44: 77-92) 900 m
<i>An. marajoara</i>	1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10	Cebo humano Captura larvas	Machos y hembras Kinok-Pon Parú. 945 m	(Cova-García, 1951. Publicación Malariol 900 m
<i>An. nuneztovari</i>	1, 2, 3, 4, 6, 9, 10	Cebo humano Trampa luz negra	Adultos hembras Waramasén. 975 m	Osborn et al, 2004. Bol. Malariol. Salud Amb. 44: 77-92. 1.352 m
<i>Anopheles darlingi</i>	1, 8, 13, 17	Cebo humano Captura de larvas	Larvas y hembras. Colinas de la Laguna. 898 m	Cova-García, 1951. Publicación Malariol. 900 m
<i>Anopheles rangeli</i>	1, 2, 3, 4, 6, 9, 10	Cebo humano Trampa luz negra	Machos y hembras Waramasén. 975 m	Cova-García, 1951. Publicación Malariol. 1.352 m
<i>Anopheles oswaldoi</i>	1, 3, 4, 6, 9, 10	Cebo humano Trampa luz negra	Machos y hembras Waramasén. 975 m	Osborn et al, 2004. Bol. Malariol. Salud Amb. 44: 77-92. 900 m
<i>Anopheles strodei</i>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 13	Cebo humano Trampa luz negra	Machos y hembras Waramasén. 975 m	Osborn et al, 2004. Bol. Malariol. Salud Amb. 44: 77-92. 900 m
<i>An. matogrosensis</i>	2, 3, 5	Cebo humano Trampa luz negra	Adultos hembras Waramasén. 975 m	Cova-García, 1951. Publicación Malariol. 255 m
<i>An. peryassui</i>	3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 14, 15	Cebo humano Trampa luz negra	Machos y hembras Waramasén. 975 m	(Cova-García, 1951. Publicación Malariol. 135-250 m
<i>Anopheles eiseni</i>	5, 14, 15, 16, 17	Captura de larvas	Larvas Río Chiririka. 871 m	(Cova-García, 1951. Publicación Malariol.) 1.350 m
<i>Anopheles cruzii</i>	5, 11	Cebo humano Trampa luz negra	Adultos hembras El Paraíso. 880 m	Sin registro anterior en el país
<i>An. squamifemur</i>	3, 6, 14, 15, 16, 17	Captura de larvas	Machos y hembras Waramasén. 975 m	Berti et al, 1998. Bol. Entomol. Venez. 13: 17-26. 500 m
<i>An. nimbus</i>	15	Captura de larvas	Larvas Río Chiririka. 871 m	Cova-García, 1951. Publicación Malariol. 150 m
<i>An. puntimacula</i>	3	Captura de larvas	Larvas y hembras Waramasén. 975 m	Cova-García, 1951. Publicación Malariol. 850 m
<i>An. malefactor</i>	3	Captura de larvas	Larvas y hembras Waramasén. 975 m	Sin registro anterior en el país
<i>Ch. bonneae</i>	1, 3, 4, 6, 12, 14, 15, 16	Cebo humano Captura larvas	Machos y hembras. Waramasén. 975 m	Sin registro anterior en el país
<i>Ch. ablusa</i>	1, 3, 6, 12, 14, 15, 16, 17	Cebo humano Captura larvas	Machos y hembras, Waramasén. 975 m	Sin registro anterior en el país

Localidades del municipio Gran Sabana: Santa Elena Capital =1. Maurak = 2. Waramasén = 3. San Antonio del Morichal = 4. Campamento El Paraíso = 5. Chiricayén = 6. Manak-Krú = 7. Uaiparú = 8. Betania = 9. Kinok-Pon Parú = 10. El Paují = 11. Chiririka = 12. Colinas de la Laguna =13. Río Kukenán =14. Río Chiririka = 15. Río Uairén I=16. Río Uairén II=17.

presencia de *An. cruzii* y tampoco ha sido señalado su papel como vector potencial de malaria en el país. Por el contrario, en Brasil se le señala como un importante vector de malaria humana, asociado a áreas de transmisión selvática (Deane *et al.*, 1970. *Op. Cit.*; Wilkerson & Peyton 1991. *Op. Cit.*). Así como también, en ese país se le señala como un vector de malaria de simios (Deane *et al.*, 1970. *Op. Cit.*). Las hembras del subgénero *Kerteszia*, pican al humano durante todo el día y son muy activas en horas de la tarde dentro del bosque (Wilkerson & Peyton 1991. *Op. Cit.*).

Por otro lado, en Waramasén también tenemos los registros de mayor altitud para las especies: *An. mattogrosensis*, *An. peryassui*, *An. punctimacula*, *An. malefactor* y *An. squamifemur* (Tabla II). Para *An. punctimacula*, se había señalado la altitud de 850 m en Petare, estado Miranda (Tabla II); sin embargo en la actualidad, su registro de mayor altitud en el país pasa a ser de 975 m en Waramasén (Fig. 3; Tabla II). En el caso de *An. malefactor*, recientemente la especie fue registrada por primera vez en el país (Berti *et al.*, 2015. *Op. Cit.*), señalándose su registro de mayor altitud en Waramasén (Fig. 3; Tabla II); éste corresponde al registro de mayor altitud para la especie en Latinoamérica; ya que su anterior registro fue de 303 m en Panamá (Wilkerson 1990. *J. Med. Entomol.* **27**: 225-247). Por otro lado, *An. peryassui* tenía hasta la fecha, registros de altitud que oscilaban entre 135 m y 250 m y en la actualidad, su mayor registro pasa a ser de 975 m en Waramasén (Fig. 3; Tabla II). Igualmente ocurre con *An. mattogrosensis*, cuyo mayor registro de altitud en el país había sido de 255 m en San Felipe, estado Yaracuy y ahora pasa a ser de 975 m en Waramasén (Fig. 3; Tabla II). Por otro lado, *Anopheles (Stethomyia) nimbus*, tenía hasta la fecha su mayor registro de altitud en San Carlos, estado Cojedes con 150 m y ahora pasa a ser de 871 m

en el río Chiririka (Fig. 3; Tabla II). *Anopheles eiseni* Coquillett, fue encontrada también en el río Chiririka (Fig. 3; Tabla II), este corresponde al mayor registro de altitud de la especie para el estado Bolívar; sin embargo, su registro de mayor altitud en Venezuela corresponde a la ciudad de Boconó, estado Trujillo, con una altitud de 1.350 m (Tabla II). Por último, en relación a *Anopheles squamifemur*, cabe señalar que no se encontraron registros de ningún tipo para el país, por un periodo mayor de 45 años, hasta los trabajos publicados por Berti y Amarista (1992. *Bol. Entomol. Venez.* **7**: 157-158) y Berti *et al.* (1998. *Bol. Entomol. Venez.* **13**: 17-26) en la década de los 90; quienes encontraron a la especie en una quebrada sombreada a la altitud de 500 m, en San Miguel de Betania, municipio Sifontes del estado Bolívar. En la actualidad, su registro de mayor altitud pasa a ser de 975 m en Waramasén (Fig. 3; Tabla II). Sus larvas habitan en las márgenes de caños, quebradas y ríos, asociadas a la vegetación flotante y la hojarasca (Berti & Amarista 1992. *Op. Cit.*; Berti *et al.*, 1998. *Op. Cit.*; Berti *et al.*, 2015. *Op. Cit.*). Las especies *Ch. ablusa* y *Ch. bonnae* generalmente tienen el mismo hábitat larvario que *An. squamifemur*, pero a diferencia de ésta, sus hembras pueden picar al ser humano, aunque el contacto es poco frecuente y ninguna ha sido involucrada en la transmisión de enfermedades al hombre, ya que éstas son preferiblemente de hábitos zoofílicos (Berti *et al.*, 2015. *Op. Cit.*).

Conflicto de Intereses

Informamos que durante el desarrollo de la presente investigación, ni los autores ni la institución que representamos incurrimos en ningún tipo de conflicto de intereses.

Recibido el 22/02/2016
Aceptado el 19/06/2016

El Hombre y la Ciencia //

Lcda. MSc. Elina Rojas Moreno

por **Erick Barrymoore Brown***

La investigadora Elina Rojas Moreno de profesión Lcda. en Biología, con una Maestría en Protozoología del Instituto Experimental “José Witremundo Torrealba” Núcleo Universitario Rafael Rangel (NURR) adscrito a la Universidad de Los Andes, donde protagonizó, una lucha sin fin e hizo de esos espacios su morada, con el propósito de dar cuerpo a lo que hoy es, una Institución única en su género. Desarrolló la línea de Investigación en biología de parásitos y de sus vectores, en el contexto del control integrado de enfermedades metaxénicas, ciencias biomédicas, con mayor énfasis en el estudio de la leishmaniasis cutánea. Llegándose a preguntar ¿Qué hacer? Detección de casos o lucha antivectorial?. Ejecutó numerosos proyectos nacionales e internacionales en distintas áreas de la investigación de enfermedades parasitarias, las llamadas enfermedades olvidadas y también con arbovirus con enfoque multidisciplinario de la participación comunitaria, en estudios piloto a nivel local, utilizando estrategias educativas, logrando resultados exitosos. En el campo de la investigación crea la Revista Talleres, la misma del Centro JWT la cual publica artículos relacionados con Medicina Tropical en todas sus disciplinas, siendo Editora ejecutiva hasta el final de sus días. Mucho de destacar de la Profa. Elina como ser humano, por ello Eric Brown Biólogo Entomólogo y amigo, al referirse a



Elina Rojas

su mentora nos dice: “Hay personas que pasan por la vida y dejan una huella en cada recodo del camino, Elina Rojas Moreno es una de ellas, sus huellas yacen en el alma de quienes de alguna manera compartimos espacios de su vida, ya sea porque en nuestro andar tropezamos con su existencia, o porque de manera particular tocó nuestro quehacer dejando su sello en nuestro existir. Yo conocí a la Doctora Elina por allá a finales de 1985, cuando regresaba del curso Internacional de Malaria y Saneamiento Ambiental que se dictaba en la Escuela de Malariología en Maracay, el cual cursé gracias a una beca que el Doctor José Vicente Scorza, a petición del Doctor Gustavo Morales, consiguió tramitar para José Cabrita y mi persona. Al finalizar dicho curso, fui invitado a participar de

* Doctor en Ciencias Mención Entomología, Vicerrector del Instituto Experimental “José Witremundo Torrealba”, Núcleo Universitario Rafael Rangel (NURR), Trujillo - Edo. Trujillo. Venezuela.

*Autor de correspondencia: ebrown@ula.ve

manera informal en la Maestría en Protozoología, por lo que fui compañero de estudio de Elina. Por razones académicas no concluí con esa cohorte de manera formal, y a la postre cuando estuve listo para finalizar, ella fue mi tutora en el trabajo de grado. Durante todo ese trayecto entre 1985 y 1994, solo una palabra puede caracterizar a Elina y esa es, Solidaridad. Era una mujer solidaria que asumía la causas de los más necesitados aun al costo de su bienestar personal. Luego entre 2008-2016 tuve también la suerte de contar con su solidaridad y apoyo irrestricto en las diversas labores que ayudo a consolidar en el ahora Instituto Experimental José Witremundo Torrealba y el NUUR, La Universidad de Los Andes en Trujillo. Sus aportes fueron muchos, todos producto de un trabajo afanoso y desinteresado que condujo a mejorar las condiciones de vida y de trabajo del personal de la biblioteca Aquilez Naoza del (NURR) y a un sinnúmero de estudiantes que hacia vida allí, tanto del pre-grado como de post-grado.

Estoy seguro, pues tengo constancia de ello, que son muchas las personas que coinciden conmigo en los adjetivos que califican la calidez humana de este ser excepcional que nos acompañó y que se llamó Elina Rojas.

Su amplio Currículo Académico puede ser revisado actualmente gracias a la maravilla de la globalización de la información, pero quería enfatizar a la persona que hizo tanto y la vida a mi modo de ver, plena que llevó. Fue Elina Rojas, una persona integral que supo dirigir su vida para obtener reconocimiento académico, pero aún más para serle útil a todos aquellos a su alrededor; por eso cito a Bertolt Brecht *“Hay quienes luchan un día y son buenos, hay otros que luchan un año y son mejores, hay quienes luchan muchos años, y son muy buenos, pero hay quienes luchan toda la vida, esos son los imprescindibles”*, y Elina luchó toda su vida.

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 presencia 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 presencia 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 presencial 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. Esto es un producto de la gestión de la Dra. Tulia Hernández y se continúa la investigación.

La Junta Administradora está conformada por:

Dr. Joel Caraballo

Director Ejecutivo (E) 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

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:

Solís 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: bolmal2015@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 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. Excerta 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:

Solís 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: bolmal2015@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 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. Malariol. 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. Malariol. 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 C.A. 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. Excerta 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:

Solís 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 Campo*. 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.
Teléfonos: (58-0243) 2325633 / 2320833 / 2322645.
Fax: (58-0243) 2325633
E-mail: bolmal2015@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

(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. Arnaldo Gabaldon



Gobierno
Bolivariano
de Venezuela

Ministerio del Poder Popular
para la **Salud**

