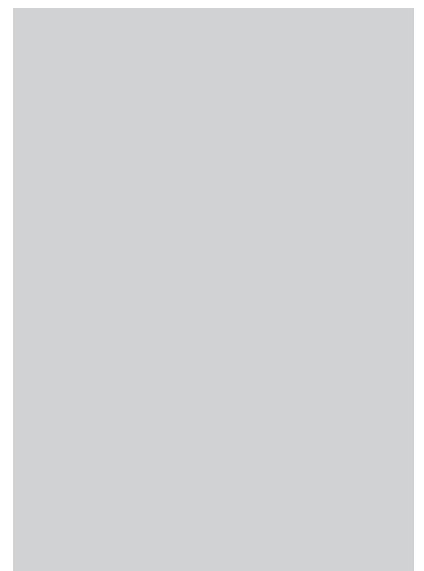
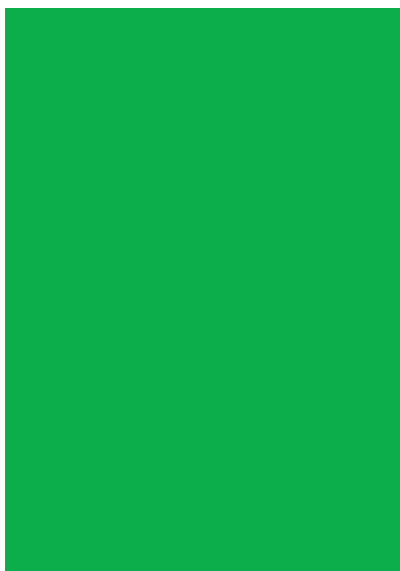
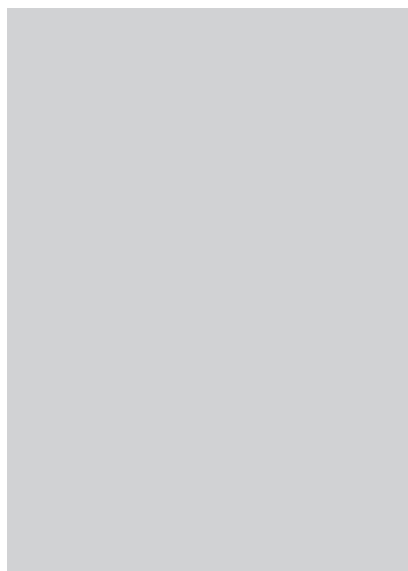




Boletín

de Malariología
y Salud Ambiental

Ministerio del Poder Popular para la Salud



Ciencias

Físicas

Biológicas

Sociales



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

Vol. XLVII, Nº 1, 2007

Maracay - Aragua - Venezuela

BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL

Vol. XLVII, N° 1, ENERO-JULIO, 2007

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

(antes Boletín de Malariología y Saneamiento Ambiental)

MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA SALUD

JESÚS M. MANTILLA O.
MINISTRO

**DIRECCIÓN GENERAL
DE SALUD AMBIENTAL**

GUILLERMO R. LUCES B.
DIRECTOR

**DIRECCIÓN GENERAL
DE CONTRALORÍA SANITARIA**

DIVIS DEL CARMEN ANTUNEZ
DIRECTOR

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

RICARDO MOLINA MARTÍ
DIRECTOR

Editores

José Vicente Scorza
M. Dora Feliciangeli

Secretaría Técnica

Wuilman Gómez

Diseño y Diagramación

Oswaldo Flores S.

Comité Editorial

Francisco Armada
Rafael Borges
Roberto Briceño León
Rafael Cásares
Oscar Feo
Oscar Noya
Yasmín Rubio-Palis
Omar Verde

Comité Honorario

Jacinto Convit (Venezuela)
José R. Coura (Brasil)
Philippe Desjeux (Francia)
Oswaldo Forattini (Brasil)
Felipe Guhl (Colombia)
Santiago Mas Coma (España)
Alberto Maeckelt (Venezuela)
Alejandro Mondolfi (Venezuela)
César Náquira (Perú)
Carlos Ponce (Honduras)
María A. Rojas de Arias (Paraguay)
Christopher Schofield (Reino Unido)
Rodrigo Zeledón (Costa Rica)

Para suscripciones: publpeiaesp@yahoo.com
Apartado de Correos N° 2171. Maracay 2101. Estado Aragua, Venezuela.

Revista indizada en **BIREME, GLOBAL HEALTH, LATINDEX y LILACS**,
y registrada en **ASEREME**.

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

Esta revista está editada on line en la dirección: www.iaesp.edu.ve

Boletín de Malariología y Salud Ambiental

Vol. XLVII, N° 1

Maracay, Aragua, Venezuela

Enero-Julio, 2007

CONTENIDO

REVISIONES

- El paludismo y las pruebas rápidas de diagnóstico
Rapid tests for malaria diagnosis
Hilda A Pérez, Carmen Bracho & Mercedes De La Rosa.....3
- La oncocercosis humana en el foco amazónico
Human onchocerciasis in the Amazonian focus
Sarai Vivas-Martínez, María-Eugenia Grillet, Carlos Botto & María-Gloria Basáñez.....15

ARTÍCULOS ORIGINALES

- Brote familiar de fascioliasis en Venezuela
Family outbreak of fascioliasis in Venezuela
Belkisyolé Alarcón de Noya, Elina Rojas, Cecilia Colmenares, Carmen Morales, Rosa Contreras, Sharon Kay Valero, Dalila Hernández, Sonia Briceño, Jose Vicente Scorza & Oscar Noya.....47
- Evaluation of conventional serological tests for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis
Evaluación de pruebas serológicas convencionales para el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea americana
Néstor Añez, Agustina Rojas & Gladys Crisante.....55
- Malaria inducida en el estado Aragua, Venezuela
Induced malaria in Aragua state, Venezuela
José Luis Cáceres G., Olga Serrano, Fredy Peña & Florencio Mendoza.....63
- Estudio preliminar sobre la distribución espacial del riesgo epidemiológico de la fiebre amarilla selvática, municipio Jesús María Semprún, estado Zulia, Venezuela
Preliminary study of the epidemiological spatial risk of sylvatic yellow fever in the municipality of Jesús María Semprún, Zulia State, Venezuela
Vidal Sáez-Sáez, Milady Seijas, Dayana Montezuma & Hernán Paublíni.....71

Uso de proteínas como alternativa diagnóstica para discriminar infecciones entre *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi*
Use of proteins as diagnostic tool to discriminate between Trypanosoma vivax and Trypanosoma evansi infections

Ana María Bolívar, Armando Reyna-Bello, Francisco García, Pablo García-Lugo, Gladys Crisante, Agustina Rojas & Nestor Añez83

Wyeomyia trujilloi Pulido y Sutil, 1981, nuevo sinónimo de *Wyeomyia bicornis* (Root, 1928) (Culicidae: Sabethini), con redescrpcion de la pupa y parte de la larva
Wyeomyia trujilloi Pulido & Sutil, 1981, new synonym of Wyeomyia bicornis (Root, 1928) (Culicidae: Sabethini), with redescription of the pupa and part of the larva

Juan-Carlos Navarro & Jonathan Liria.....89

Comparación de métodos de captura intradoméstica de triatominos vectores de la enfermedad de Chagas en Venezuela
Comparison of methods of intradomestic capture of Chagas disease vectors in Venezuela

M. Dora Feliciangeli, Mayeli Hernández, Benny Suarez, Cinda Martínez, Arturo Bravo, José Bracho, José Toyo, Annhymariet Torrellas & Rosalba Marrero103

Eficacia del Griselesf® (*Bacillus sphaericus* 2362) como controlador biológico de larvas de *Anopheles aquasalis* Curry
The effectiveness of Griselesf® (Bacillus sphaericus 2362) as a biological control of larvae of Anopheles aquasalis Curry

Frances Osborn, Melfran Herrera & Armando Salazar119

Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae)
Insecticidal activity of vegetal extracts on Rhodnius prolixus and Rhodnius pallescens (Hemiptera: Reduviidae)

Gabriel Parra-Henao, Carlos Mario Garcia Pajón & José Miguel Cotes Torres.....125

Evaluacion ambiental rápida como procedimiento de vigilancia ambiental en Sorocaima II, municipio Mariño, estado Aragua, Venezuela
Rapid environmental evaluation as a procedure of environmental surveillance at Sorocaima II, municipio Mariño, state Aragua, Venezuela

José Luis Cáceres G., Karys Khilzi, Indira Estanga, Yalexandra Cortez, Jaibeth Durán, Pedro Fuentes, Angela González, Said González, Greyla González, María Hernández & Andrés Larroverre139

NOTA CIENTÍFICA

DNA degradation of *Anopheles darlingi* collected at high relative humidity and preserved in isopropanol
Degradación de ADN de Anopheles darlingi colectados a una humedad relativa alta y preservados en isopropanol

José Rivero, Normig Zoghbi, Yasmin Rubio-Palis, Ludmel Urdaneta & Flor Herrera...149

REVISTA DE REVISTAS.....153

NOTICIAS.....157

Revisión

El paludismo y las pruebas rápidas de diagnóstico

Hilda A Pérez*, Carmen Bracho & Mercedes De La Rosa

Las pruebas rápidas para el diagnóstico de la malaria surgieron en los noventa con miras a proporcionarle a la microscopía un adjunto fiable en el escenario clínico y epidemiológico, utilizan principios de inmunocromatografía de flujo lateral y pretenden tipificar a la especie de *Plasmodium* según la pesquisa de productos antigénicos secretados por los estadios eritrocíticos. Resultan sencillas en su ejecución, expeditas, sensibles y no precisan microscopio; los primeros formatos identificaban únicamente a *Plasmodium falciparum*, posteriormente agregaron la posibilidad de distinguir infecciones por plasmodios otros que *falciparum*. Las dianas antigénicas más aprovechadas han sido la proteína 2 rica en histidina de *P. falciparum* y las enzimas deshidrogenasa láctica y aldolasa de *Plasmodium* sp. Los alegatos en contra señalan poca sensibilidad frente a las parasitemias bajas, falsos positivos, falsos negativos junto a la imposibilidad de diagnosticar a las infecciones mixtas, reconocer a *Plasmodium vivax* y cuantificar las parasitemias. Se discute el desempeño de las pruebas rápidas para el diagnóstico de la malaria durante su aplicación en zonas endémicas, evolución de sus prototipos, pertinencia a la mejora del diagnóstico, relación costo/beneficio y utilidad en el seguimiento de la respuesta terapéutica.

Palabras claves: malaria, diagnóstico, PfHRP-2, pLDH, p-aldolasa.

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la malaria o paludismo provoca anualmente entre 350 y 500 millones de casos clínicos y más de un millón de defunciones (WHO, 2005). Sin embargo, algunos especialistas consideran que estas cifras apenas si reflejan el inmenso agobio que a causa de esta enfermedad sufre la humanidad. La cuantificación del número global de casos clínicos resulta muy difícil porque la mayoría de los países endémicos enfrenta dificultades con sus estadísticas sanitarias, en muchas zonas endémicas la población no tiene acceso al diagnóstico parasitológico, los residentes en zonas de transmisión muestran parasitemia en cualquier momento y los párvulos suelen padecer anualmente hasta nueve o más episodios febriles

(Breman, 2001). Además y no menos importante, porque las cifras relativas a morbilidad y mortalidad atribuidas directamente a paludismo desconocen otras consecuencias de la enfermedad como son: la anemia crónica, la deficiencia de peso al nacer, la mayor vulnerabilidad a las enfermedades de la niñez, la mortalidad peri-natal, el retraso en el desarrollo, la sub-nutrición y las secuelas neurológicas y cognitivas provocadas por el paludismo (Breman *et al.*, 2004).

Actualmente, cerca de 3,2 billones de personas habitan territorios donde se arriesgan a contraer paludismo (Hay *et al.*, 2004). La enfermedad se relaciona con cuatro especies del género *Plasmodium*: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*. Las dos primeras tienen la mayor incidencia y entre todas, *falciparum* es la más peligrosa, por su relación con episodios severos y mortales, por la dispersión mundial de sus estirpes resistentes a las drogas antipalúdicas y por su predominio en África, el continente con mayor incidencia palúdica.

Laboratorio de Inmunoparasitología, Centro de Microbiología y Biología Celular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, IVIC, Apartado 21827, Caracas 1020 A, Venezuela.

*Autor de correspondencia: hperez@ivic.ve

Plasmodium falciparum predomina en los climas cálidos y lluviosos mientras que *P. vivax* despliega una extensa cobertura geográfica en regiones tropicales, subtropicales y hasta en algunas templadas. En cuanto a *P. malariae* y *P. ovale*, el primero se muestra irregular en el trópico y *ovale* esporádico en África, América del Sur y algunos países del Lejano Oriente (Bruce-Chwatt, 1986).

La estrategia global de control de paludismo auspiciada por la OMS (WHO, 1993) y acogida por la mayoría de los países endémicos, anticipa el diagnóstico oportuno a la instauración del tratamiento anti-palúdico. Desafortunadamente, en muchas zonas endémicas la infraestructura adecuada al diagnóstico microscópico no existe o es precaria y ante el riesgo de una malaria complicada, los pacientes son tratados conforme al diagnóstico clínico. Tan sólo en África se estima que ocurren 4,9 billones de eventos febriles o de tratamientos anti-palúdicos, cifras que por sí solas indican la necesidad de pruebas de diagnóstico fiables, rápidas, sencillas y económicas que permitan asistir a los pacientes, ayuden a conservar drogas valiosas y contribuyan a prevenir la irrupción y expansión de los parásitos resistentes (Breman *et al.*, 2004). Especialmente porque la expansión de los parásitos multi-resistentes ha motivado cambios en las políticas de tratamiento anti-palúdico, hacia esquemas más costosos basados en la terapia combinada con artemisinina (WHO, 2005).

Durante muchos años, el examen microscópico convencional de los frotis de sangre teñidos con colorante de Giemsa en sus modalidades de gota gruesa (GG) y extendido, ha sido la técnica más fiable y barata para diagnosticar al paludismo. Aunque la prueba es técnicamente sencilla y sus costos directos son relativamente bajos, requiere de microscopistas bien capacitados en la coloración y discriminación morfológica de los parásitos, una infraestructura adecuada de mantenimiento de insumos y equipos, además de control periódico de la calidad de los procesos y de la eficiencia de los microscopistas. Consecuentemente, en muchas regiones endémicas y por una variedad de razones operacionales, el diagnóstico microscópico efectuado en los servicios periféricos de salud no alcanza la fiabilidad y calidad apropiadas (Aron, 1982; Barat *et al.*, 1999; Gautam *et al.*, 1992; Kachur *et al.*, 1995; Cáceres *et al.*, 2006), problemas que en la práctica desfavorecen la diligencia de las acciones de control.

Las dificultades relacionadas con el diagnóstico del paludismo no son exclusivas de los países pobres y con transmisión de la enfermedad, hoy por hoy, dados los desplazamientos humanos entre regiones endémicas y no endémicas, los países desarrollados también confrontan equívocos con el diagnóstico y atención de los pacientes palúdicos, infectados allende los mares. Kain *et al.* (1998) refieren que en Canadá, más de 50% de los casos de malaria importada no suscitó sospecha de malaria durante la primera visita al centro de salud y 16% requirió de al menos tres visitas médicas, antes que se ordenara el examen de un frotis de sangre. Datos retrospectivos sobre los problemas relacionados con el diagnóstico de malaria en Canadá y Estados Unidos, señalaron que fuera de los laboratorios especializados, las pruebas son poco confiables y ante la referencia de casos sospechosos, los frotis no fueron examinados con la urgencia del caso y tampoco se informó rutinariamente de la especie y nivel de parasitemia (Kain *et al.*, 1998). Cuando la identificación de la especie fue profesional, hubo tendencia a sobrestimar a las infecciones por *P. falciparum*, acarreado el uso innecesario de anti-palúdicos de segunda y tercera línea aplicados al tratamiento de infecciones por *P. vivax*, además de no utilizar primaquina en prevención de las recaídas. En países con alto nivel de desarrollo, las demoras en el diagnóstico y tratamiento de la malaria importada se relacionaron con 0,6% a 3,8% de defunciones por *falciparum* (Greenberg & Lobel, 1990) y 20% de casos de malaria severa, incluso cuando fueron atendidos en una unidad moderna de terapia intensiva (Campbell, 1991). Por consiguiente, aun aquellos que disfrutaban de un sistema de salud adelantado y sofisticado, se han visto expuestos a complicaciones y hasta defunciones por paludismo, derivadas del reconocimiento tardío de la infección, inexactitudes del diagnóstico de laboratorio y fallas en la instauración de terapia oportuna (Greenberg & Lobel, 1990).

Los intentos por mejorar la cobertura y la eficacia del diagnóstico, han promovido el desarrollo de métodos alternativos con opciones que trajinan las tinciones con colorantes fluorescentes (Kawamoto, 1991; Rickman *et al.*, 1989), la detección inmunológica de antígenos específicos (Shiff *et al.*, 1993) y la pesquisa de la impronta genética por métodos de biología molecular (Snouno *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1999; Greenwood, 2002; Berry *et al.*, 2005). Entre las tinciones fluorescentes,

la mayor experiencia se tiene con la naranja de acridina (NA) (Kawamoto, 1991) y con el sistema de QBC (Quantitative Buffy Coat System™, Becton Dickinson) descrito por Rickman *et al.*, (1989). En este último, los eritrocitos parasitados y teñidos con NA, son concentrados y estratificados en un capilar, para ser luego examinados bajo microscopio de epifluorescencia. El ensayo es un procedimiento rápido y fácil de aprender, ha sido evaluado en varios estudios de campo (Lowe *et al.*, 1996; Bosch *et al.*, 1996) con resultados de sensibilidad y especificidad, satisfactorios a la pesquisa del paludismo por *falciparum*. Los eritrocitos infectados con los estadios jóvenes y gametocitos de este parásito se distinguen con facilidad, mayores problemas se tienen con *P. vivax*, cuyos trofozoitos maduros tienden a estratificar entre las células mononucleares donde pueden resultar difíciles de distinguir (Bosch *et al.*, 1996).

El rastreo de la huella genética del parásito, con ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ofrece alta especificidad y sensibilidad. Particularmente, un ensayo de PCR adecuado a la detección del ADN genómico de las cuatro especies parasitarias, muy sensible (<1 parásito/μL de sangre) y eficaz en la pesquisa de infecciones mixtas (Snouno *et al.*, 1993; Postigo *et al.*, 1998, Singh *et al.*, 1999). Sin embargo, por una variedad de razones técnicas y presupuestarias, los ensayos basados en la reacción de PCR no son fáciles de incorporar a la rutina de diagnóstico de los países endémicos.

Esta breve revisión dispensará atención especial a la pesquisa del paludismo, con las llamadas pruebas rápidas de diagnóstico de malaria (PRDM). A los aciertos y desaciertos señalados durante su aplicación en zonas endémicas y a las expectativas relevantes al mejoramiento del diagnóstico y a la evaluación de la respuesta al tratamiento anti-palúdico.

LAS PRUEBAS RÁPIDAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA (PRDM)

Las PRDM surgieron en los noventa con miras a proporcionarle a la microscopía un adjunto fiable en el escenario clínico y epidemiológico, utilizan principios de inmunocromatografía incorporados a formatos de cintas reactivas o de

tarjetas de prueba y pretenden tipificar a la especie de *Plasmodium* conforme a la detección de antígenos específicos producidos por el parásito. El diseño de las PRDM atiende con especial propósito, la sencillez de ejecución, el manejo a temperatura ambiente sin auxilio de instrumentos y la rapidez del diagnóstico en sólo 10 a 15 minutos. Las primeras, estuvieron destinadas a identificar únicamente a *P. falciparum*, posteriormente surgieron las que agregaron la posibilidad de distinguir infecciones por plasmodios otros que *falciparum*. Las dianas antigénicas más aprovechadas han sido la proteína 2 rica en histidina de *P. falciparum* (PfHRP-2) y las enzimas deshidrogenasa láctica (pDHL) y aldolasa de los parásitos *Plasmodium*. Generalmente, el antígeno presente en la sangre infectada y previamente tratada con un detergente no iónico, es capturado por un anticuerpo monoclonal (Ac. Mon) inmovilizado sobre un soporte sólido, normalmente una matriz de celulosa. Seguidamente esta reacción deviene revelada por otro Ac. Mon o un anticuerpo policlonal mono-específico conjugado a un marcador coloreado e insoluble en medio acuoso, lo que da lugar a una impronta coloreada sobre el sitio de reacción.

Las PRDM fundamentadas en la PfHRP-2 de Plasmodium falciparum

Entre las primeras encontramos a ParaSight-F (Shiff *et al.*, 1993; Beadle *et al.*, 1994), diseñada con la finalidad de revelar específicamente a PfHRP-2. Esta proteína, exclusiva de *P. falciparum* y relativamente bien conservada entre sus linajes, deviene secretada activamente por los estadios asexuales y los gametocitos inmaduros. PfHRP-2 posee un alto contenido de histidina (H) (34%), alanina (A) (37%) y ácido aspártico (D) (10%) y muchas subunidades repetidas ricas en histidina y alanina, tales AHH y AHHAAD (Panton *et al.*, 1989), sus funciones fisiológicas no están definidas, posiblemente participa en la formación de la hemozoina (Sullivan *et al.*, 1996; Schneider & Marletta, 2005). Transcurridos unos 13 años de la introducción de la primera PRDM basada en la PfHRP-2, se han comercializado más de una veintena de nuevas versiones basadas en el mismo principio. Las denominaciones ParaSight-F e ICT-malaria-P.f han sido bastante estudiadas en las zonas endémicas de malaria, con resultados que avalan desempeños de sensibilidad y especificidad útiles a la clínica (Banchongaksorn *et al.*, 1997;

Beadle *et al.*, 1994; Caraballo & Ache, 1996; Craig & Sharp, 1997; Cropley *et al.*, 2000; Forney *et al.*, 2001; Gaye *et al.*, 1998; Humar *et al.*, 1997; Lema *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 1997; Valecha *et al.*, 1998). Los problemas más importantes se han relacionado con: a) falsos negativos en individuos cuyas parasitemias eran inferiores a 500 parásitos/ μ L de sangre (Beadle *et al.*, 1994; Shiff *et al.*, 1993; Uguen *et al.*, 1995); b) falsos positivos causados por interferencias del factor reumatoide (Grobusch *et al.*, 1999; Iqbal *et al.*, 2003) y c) falsos positivos en individuos infectados y tratados exitosamente.

Los falsos positivos post-tratamiento y sin evidencia de falla terapéutica, posiblemente se deban a que PfHRP-2 puede hallarse en sangre periférica hasta dos semanas después de la extinción terapéutica de los parásitos asexuales (Karbwang *et al.*, 1996; Vakharia *et al.*, 1997). Adicionalmente PfHRP-2 también es sintetizada por los gametocitos inmaduros, los cuales sobreviven a la mayoría de esquizonticidas (Hayward *et al.*, 2000). Por estas razones, la pesquisa de PfHRP-2 puede introducir equívocos en la interpretación de la eficacia de los tratamientos anti-palúdicos (Mayxay *et al.*, 2001b; Tjitra *et al.*, 2001a; 2001b).

Bajo otras circunstancias, las PRDM basadas en PfHRP-2 tienen la ventaja potencial de discriminar a *falciparum* en los sujetos portadores de parasitemias sub-microscópicas en sangre periférica, pero secuestradas en el lecho vascular, tal el secuestro placentario del parásito (Leke *et al.*, 1999) o en las asociaciones crípticas de *falciparum* con *P. vivax* (Mayxay *et al.*, 2001a).

Los informes de falsos negativos en individuos con diagnóstico microscópico de *falciparum* resultan difíciles de conciliar, la mayoría alude a parasitemias bajas con umbral que sitúan entre 100 y 500 parásitos/ μ L, mientras una minoría apunta parasitemias altas con resultados negativos (Forney *et al.*, 2003; Wongsrichanalai *et al.*, 1999). A las variaciones en los lotes del producto, deterioro de los reactivos causado por las condiciones ambientales o manejo inapropiado de la prueba, se añaden, posiblemente, factores más complejos. Por ejemplo se ha informado que algunos linajes de *P. falciparum* carecen del gen *pfhrp-2* (Uguen *et al.*, 1995) y recientemente Baker *et al.*, (2005) hallaron diversidad genética del gen *pfhrp-2* en muestras silvestres de *P.*

falciparum provenientes de África, Asia y América del Sur. De 14 arreglos repetidos de aa identificados en PfHRP-2, cinco solamente fueron comunes a todos los aislados estudiados. A mayor número de arreglos repetidos, especialmente con las secuencias AHHAHHAAD Y AHHAAD, mayor la probabilidad de un resultado positivo a parasitemias de baja densidad (250 parásitos/ μ L). Los autores argumentaron que este polimorfismo posiblemente es relevante a la especificidad fina de los anticuerpos incorporados en las PRDM basadas en PfHRP-2 y en consecuencia a la sensibilidad de la prueba (Baker *et al.*, 2005). Un estudio reciente (Lee *et al.*, 2006a) ha explorado la reactividad de varios anticuerpos monoclonales (Ac. Mons) específicos de PfHRP2 frente a muestras de *P. falciparum* procedente de varias zonas geográficas y ha determinado los epitopos reconocidos por estos Ac. Mons y relación de su reactividad según el número de copias de los epitopos, comprobando que los Ac. Mons reaccionaban distintamente según se tratara de un mismo anticuerpo con varias muestras silvestres o viceversa. Las secuencias identificadas para los epitopos de tres de los Ac. Mons se encontraron con frecuencia variable entre linajes silvestres de *P. falciparum* (Lee *et al.*, 2006a).

Los hallazgos señalados anteriormente (Baker *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006a) demuestran que aun sutiles variaciones en la secuencia y frecuencia de los epitopos relacionados con la especificidad de los Ac. Mons empleados en las PRDM, pueden ser relevantes a la sensibilidad del ensayo.

Las PRDM que combinan PfHRP-2 y un antígeno genérico de Plasmodium sp.

A las PRDM basadas en PfHRP-2 únicamente, sucedieron las que agregaron la posibilidad de diagnosticar paludismo por otras especies de *Plasmodium* distintas de *falciparum*, aunque sin exclusión precisa de su identidad (Iqbal *et al.*, 2001; 1999; Singh *et al.*, 2000; 1997; Tjitra *et al.*, 1999). Se trata de identificar antígenos comunes a las cuatro especies que infectan al humano, cual la aldolasa de *Plasmodium* (p-aldolasa) (Cloonan *et al.*, 2001). Bajo la modalidad mencionada, la p-aldolasa actúa en calidad de antígeno genérico y señala infección por *Plasmodium sp.*, mientras PfHRP-2 revela específicamente a *falciparum*. Una de las versiones de esta aproximación es ICT malaria Pf/Pv, cuyo desempeño de sensibilidad se ha reportado

relativamente aceptable en las infecciones por *P. falciparum* y poco fiable en las mono-infecciones por *P. vivax* u otros plasmodios (Tjitra *et al.*, 1999; Coleman *et al.*, 2002; Richter *et al.*, 2004). Estas diferencias, al parecer, no se vinculan a que exista diversidad entre la aldolasa de *P. falciparum* y de *P. vivax*, pues la secuenciación de los genes codantes respectivos en linajes silvestres de diferentes orígenes indicó alto grado de conservación (Lee *et al.*, 2006b). La p-aldolasa comparte con PfHRP-2 la persistencia en sangre periférica aun después de la eliminación de la parasitemia asexual, especialmente por *falciparum*, un hecho a tener en consideración al utilizar PRDM basadas en el rastreo de p-aldolasa, durante el seguimiento post-tratamiento (Tjitra *et al.*, 2001a; 2001b; Iqbal *et al.*, 2004).

Un intento por lograr una PRDM cuya sensibilidad y especificidad resultaran aceptables a la pesquisa de las infecciones por *falciparum* y *vivax*, fue ParaSight F_V, modalidad del ParaSight-F que al anticuerpo anti-PfHRP-2 añadió otro específico de un antígeno de *P. vivax*, sirviendo a la causa de identificar ambas especies en una sola cinta. Evaluado en 1999 en zonas endémicas de Perú y Tailandia, se lo encontró muy sensible en las infecciones por *falciparum* con parasitemias superiores a 500 parásitos/ μ L, con un descenso de la sensibilidad en aquellas de menor densidad, y de desempeño menos satisfactorio en las infecciones por *P. vivax* (Forney *et al.*, 2003).

Las PRDM fundamentadas en la pLDH de Plasmodium

Se basan en la detección inmunológica de las isoformas de la pLDH, una enzima producida por los parásitos vivos y descrita a principios de los sesenta en *Plasmodium lophurae* (Sherman, 1961). Entre las primeras PRDM con este principio se encuentra OptiMAL®, que utilizó un Ac. Mon específico de la isoforma de pLDH (17E4) de *P. falciparum* y dos genéricos (6C9 y 19G7) reactivos con todas las isoformas de pLDH, el 6C9 conjugado a oro coloidal (Palmer *et al.*, 1998; Piper *et al.*, 1999). Sirviendo los anticuerpos 17E4 y 19G7 a las capturas del antígeno y el conjugado 6C9-oro coloidal a la detección dichas capturas. Dos improntas coloreadas señalan una infección por *P. falciparum*, correspondientes a los anticuerpos 17E4 y 19G7, específico y genérico, respectivamente. Si se trata de una infección con cualquier otro *Plasmodium*, será visible únicamente la

señal provista por el Ac. Mon 19G7. En la práctica, la incorporación de un anticuerpo anti-inmunoglobulinas murinas añade una tercera impronta indicadora de la presencia e idoneidad del anticuerpo detector. Criterio diagnóstico es la formación de tres bandas coloreadas en el caso de las infecciones por *P. falciparum* y sólo dos, con cualquier otro *Plasmodium*. Dado que la pLDH, diferente de PfHRP-2, es una enzima producida sólo por los parásitos vivos, su hallazgo presume una infección activa. Sin embargo, la PfLDH también es producida por los gametocitos y en el caso de parasitemias conformadas exclusivamente por gametocitos, por ejemplo tras la quimioterapia con drogas que sólo actúan sobre los estadios asexuales, tienen el potencial de producir reacciones positivas y con ello equívocos sobre la eficacia terapéutica (Oduola *et al.*, 1997).

En cuanto a la sensibilidad, el ensayo basado en la búsqueda de la PfLDH y comercializado con el nombre de OptiMAL® detecta infecciones con parasitemias hasta de 200 parásitos/ μ L de sangre, se lo ha evaluado en varios países con transmisión de malaria con resultados que atestiguan, buen desempeño frente a las infecciones con *P. falciparum* y menos exitoso en aquellas por *P. vivax*. Las referencias a la sensibilidad de OptiMAL® son controversiales y algunos autores basados en el hallazgo de indicadores razonables de sensibilidad y especificidad, la consideran útil cuando las facilidades laboratoriales son inexistentes, escasas o poco confiables (Moody *et al.*, 2000) mientras que otros, alegando baja sensibilidad se muestran cautelosos en recomendarla aunque reconocen sus ventajas bajo una serie de circunstancias (Fryauff *et al.*, 2000; Huong *et al.*, 2002; Mason *et al.*, 2002; Kolaczinski *et al.*, 2004). Las experiencias realizadas en Venezuela, son coincidentes en cuanto a la baja sensibilidad de OptiMAL® frente a las parasitemias de *P. vivax* menores de 500 parásitos/ μ L (De Abreu *et al.*, 2001).

OptiMAL® ha sido reconfigurada con otras generaciones de mayor estabilidad a las condiciones ambientales adversas (Moody & Chiodini, 2002; Penhalbel *et al.*, 2005). Aunque han persistido los cuestionamientos a la sensibilidad de modalidades recientes, tales OptiMAL 48 (Kolaczinski *et al.*, 2004) y OptiMAL IT (De Monbrison *et al.*, 2004).

Respecto al seguimiento de la respuesta terapéutica, las PRDM basadas en la pesquisa de la LDH del parásito, por su relación con parásitos viables, se

consideran más fiables que las trazadoras de PfHRP-2 o de p-aldolasa (Tarimo *et al.*, 2001; Tjitra *et al.*, 2001a; 2001b; Huong *et al.*, 2002; Grobusch *et al.*, 2003).

CONCLUSIONES

Las PRDM representan una visión novedosa del diagnóstico del paludismo mediante el testimonio de una impronta coloreada sobre una pieza de papel de nitrocelulosa. Los formatos comercializados proporcionan pruebas expeditas sin el auxilio de instrumentos, pero ninguna alcanza la sensibilidad de la GG. La mayoría cumple el propósito de diagnosticar específicamente a *P. falciparum* y por exclusión a otros parásitos maláricos. Aunque algunos formatos comerciales refieren las siglas Pf/Pv ninguno tiene el potencial de proporcionar diagnóstico específico de paludismo por *P. vivax* y menos por *P. malariae* o *P. ovale*.

El número creciente de estudios de campo publicados sobre las PRDM, reúne una diversidad de diseños y metodologías a la postre enmarañadora de las comparaciones. Notablemente, varían los objetivos abordados, las poblaciones enroladas difieren en sus características, escasea la información de la rigurosidad de la microscopia de la referencia, el tamaño de la muestra de estudio arroja dudas sobre la fortaleza estadística de los datos, en muchos casos no se proveen datos del desempeño de la prueba según la densidad de la parasitemia y a menudo falta información del prototipo utilizado y de los detalles de su fabricación.

La evolución incesante de las PRDM conlleva la disponibilidad de múltiples prototipos, a menudo indistinguibles en base a su empaquetamiento, etiquetamiento o fecha de producción, posiblemente las inconsistencias informadas sobre el desempeño de dispositivos que llevan el mismo nombre comercial bien pueden ser atribuidas a variaciones de fabricación y a modificaciones inherentes al desarrollo reiterativo del producto.

El costo de las pruebas rápidas según el producto y cantidad se ha estimado entre 0,60 y 2,50 US\$ que es aparentemente superior al costo del diagnóstico microscópico de rutina valorado entre 0,12 y 0,40 US\$ por frotis (WHO, 2000).

La facilidad de ejecución e interpretación de la mayoría de los formatos disponibles en el mercado, redundan en beneficio del diagnóstico confirmado de paludismo en la periferia del sistema de salud y más aun en las zonas de transmisión baja o moderada, donde los sujetos carecen de inmunidad y las demoras del diagnóstico conllevan el riesgo potencial de una malaria complicada o fatal. Considerando a las PRDM un valioso complemento a la microscopia, hay pocas dudas de su utilidad en provecho del tratamiento oportuno y consecuente disminución de la morbilidad y mortalidad. La introducción de nuevos esquemas terapéuticos basados en las combinaciones con artemisinina, costosos y por lo pronto única alternativa al tratamiento de la malaria multi-resistente a drogas, obliga a una mayor rigurosidad en el diagnóstico, asunto en el que seguramente hay amplio espacio para el aprovechamiento de las PRDM.

El campo de las PRDM es muy dinámico, es altamente probable que algunas de las dificultades técnicas actuales relacionadas con la estabilidad de los reactivos, disminución de los pasos de ejecución y discriminación jerárquica de las densidades parasitarias, resulten corregidas en el futuro próximo.

El aprovechamiento de las PRDM también estará sujeto a la validación previa de estos ensayos en las diferentes zonas endémicas donde se pretenda su aplicación. En una comunicación reciente un comité de la OMS ha alertado a los países endémicos sobre la importancia de la capacitación local en los conocimientos y prácticas necesarias al uso racional de las nuevas tecnologías de diagnóstico (Banoo *et al.*, 2006). Superadas estas dificultades, el costo continuará siendo, seguramente, el mayor obstáculo que enfrentarán los países en desarrollo si decidieran aprovechar estos y posiblemente otros adelantos tecnológicos, en beneficio del control de la malaria. El problema trasciende a la comunidad científica y reclama una decisión política global con el consenso de todos los involucrados.

Rapid tests for malaria diagnosis

SUMMARY

Rapid tests for malaria diagnosis use basic principles of lateral flow immuno-chromatography to identify specific molecules secreted by the blood

stages of malaria parasites. They are simple and rapid to execute without laboratory equipment, sensitive and friendly to use. The first generation identified *Plasmodium falciparum* only. Later on, those distinguishing between *falciparum* malaria and non-*falciparum* malaria were developed. Antigenic targets more commonly used have been the histidine rich protein 2 of *P. falciparum* and the aldolase and lactate dehydrogenase enzymes of *Plasmodium* sp. Those criticizing rapid tests for malaria diagnosis refer to poor sensitivity mainly with low-density parasitaemias, false positive, false negatives along with their inability to diagnose mixed infections, to recognize *Plasmodium vivax* and to quantify the parasitaemias. The performance of the above-mentioned tests in endemic areas, the evolution of their prototypes, their reliability in the improvement of diagnosis, cost/benefit relation and potential problems with the interpretation of the tests after anti-malarial treatment are discussed in this review. Successful application of malaria rapid diagnosis tests in endemic areas should focus on the evaluation of current and new devices in local settings and on the promotion and enhancement of training in technical skills for health workers in endemic countries.

Key words: malaria, diagnosis, PfHRP-2, pLDH, p-aldolase

REFERENCIAS

Aron J.L. (1982). Malaria epidemiology and detectability. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.* **76**: 595-601.

Baker J., McCarthy J., Gatton M., Kyle D.E, Belizario V., Luchavez J, Bell D. & Cheng Q. (2005). Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (PfHRP2) and its effect on the performance of PfHRP2-based rapid diagnostic tests. *J. Infect. Dis.* **192**: 870-877.

Banchongaksorn T., Prajakwong S., Rooney W. & Vickers P. (1997). Operational trial of ParaSight-F (dipstick) in the diagnosis of *falciparum* malaria at the primary health care level. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* **28**: 243-246.

Banoo S., Bell D., Bossuyt P., Herring A., Mabey D., Poole F. *et al.*, (2006). Evaluation of diagnostic

tests for infectious diseases: general principles. *Nature Reviews Microbiology.* **4**: S21-S31.

Barat L., Chipipa J., Kolczak M. & Sukwa T. (1999). Does the availability of blood slide microscopy for malaria at health centers improve the management of persons with fever in Zambia? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 1024-1030.

Beadle C., Long G.W., Weiss W., McElroy P., Maret S., Oloo A. & Hoffman S. (1994). Diagnosis of malaria by detection of *Plasmodium falciparum* HRP-2 antigen with a rapid dipstick antigen-capture assay. *Lancet.* **343**: 564-568.

Berry A., Fabre R., Benoit-Vical F., Cassaing S. & Magnaval J.F. (2005). Contribution of PCR-based methods to diagnosis and management of imported malaria. *Med. Trop.* **65**: 176-183.

Bosch I., Bracho C. & Pérez H.A. (1996). Diagnosis of malaria by acridine orange fluorescent microscopy in an endemic area of Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **91**: 83-86.

Breman J.G. (2001). The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants and estimates of the malaria burden. *Am. J. Trop. Med.* **64** (Suppl. 1-2): 1-11.

Breman J.G., Alilio M.S. & Mills A. (2004). Conquering the intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary. *Am. J. Trop. Med.* **7** (Suppl. 2): 1-15.

Bruce-Chwatt L.J. (1986). *Essential Malariology*. William Heinemann Medical Books Ltd. London.

Cáceres J.L., Vaccari E., Campos E., Terán E., Ramírez A., Ayala C. & Itriago M. (2006). Concordancia del diagnóstico malárico en Venezuela, año 2003. *Bol. Dir. Malarial. San. Amb.* **66**: 49-57.

Campbell C.C. (1991). Challenges facing antimalarial therapy in Africa. *J. Infect. Dis.* **163**: 1207-1211.

Caraballo A. & Aché A. (1996). The evaluation of a dipstick test for *Plasmodium falciparum* in mining areas of Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **55**: 482-484.

- Cloonan N., Fischer K., Cheng Q. & Saul A. (2001). Aldolase genes of *Plasmodium* species. *Mol. Biochem. Parasitol.* **113**: 327-330.
- Coleman R.E., Maneechai N., Rachapaew N., Kumpitak C., Soyseng V., Miller R.S., Thimasarn K. & Sattabongkot J. (2002). Field evaluation of the ICT Malaria Pf/Pv immunochromatographic test for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66**: 379-383.
- Craig M.H. & Sharp B.L. (1997). Comparative evaluation of four techniques for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**: 279-282.
- Cropley I.M., Lockwood D.N., Mack D., Pasvol G. & Davidson R.N. (2000). Rapid diagnosis of *falciparum* malaria by using the ParaSight F test in travellers returning to the United Kingdom: prospective study. *BMJ.* **321**: 484-485.
- De Abreu N., Zabala L. & Pérez H.A. (2001). El PCR versus la microscopia y la prueba de OPTIMAL en el diagnóstico de la malaria. *Rev. Talleres.* **7**: 151.
- De Monbrison F., Gerome P., Chaulet J.F., Wallon M., Picot S. & Peyron F. (2004). Comparative diagnostic performance of two commercial rapid tests for malaria in a non-endemic area. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**: 784-786.
- Forney J.R., Magill A.J., Wongsrichanalai C., Sirichaisinthop J., Bautista C.T., Heppner D.G. *et al.*, (2001). Malaria rapid diagnostic devices: performance characteristics of the ParaSight F device determined in a multisite field study. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 2884-2890.
- Forney J.R., Wongsrichanalai C., Magill A.J., Craig L.G., Sirichaisinthop J., Bautista C.T. *et al.*, (2003). Devices for rapid diagnosis of Malaria: evaluation of prototype assays that detect *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 and a *Plasmodium vivax*-specific antigen. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 2358-2366.
- Fryauff D.J., Purnomo., Sutamihardja M.A., Elyazar I.R.S., Susanti I., Krisin. *et al.*, (2000). Performance of the Optimal assay for detection and identification of malaria infections in asymptomatic residents of Irian Jaya, Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **63**: 139-145.
- Gautam A.S., Sharma R.C., Bhatt R.M. & Gupta D.K. (1992). Microscopic diagnosis of malaria in Kheda District of Gujarat. *Indian J. Malariol.* **29**: 83-87.
- Gaye O., Diouf M., Dansokho E. F., McLaughlin G. & Diallo S. (1998). Diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria using ParaSight F, ICT malaria PF and malaria IgG CELISA assays. *Parasite.* **5**: 189-192.
- Greenberg A. & Lobel H.O. (1990). Mortality from *Plasmodium falciparum* malaria in travelers from the United States. *Ann. Intern. Med.* **113**: 326-327.
- Greenwood B. (2002). The molecular epidemiology of malaria. *Trop. Med. Int. Health.* **7**: 1012-1021.
- Grobusch M.P., Alpermann U., Schwenke S., Jelinek T., Warhurst D.C. (1999). False-positive rapid tests for malaria in patients with rheumatoid factor. *Lancet.* **353**: 297.
- Grobusch M.P., Hanscheid T., Gobels K., Slevogt H., Zoller T., Rogler G. & Teichmann D. (2003). Comparison of three antigen detection tests for diagnosis and follow-up of *falciparum* malaria in travellers returning to Berlin, Germany. *Parasitol. Res.* **89**: 354-357.
- Hay S.I., Guerra C.A., Tótem A.J., Noor A.M. & Snow R.W. (2004). The global distribution and population at risk of malaria: past, present and future. *Lancet. Infect. Dis.* **4**: 327-336.
- Hayward R.E., Sullivan D.J. & Day K.P. (2000). *Plasmodium falciparum*: Histidine-rich protein II is expressed during gametocyte development. *Exp. Parasitol.* **96**: 139-146.
- Humar A., Ohrt C., Harrington M.A., Pillai D. & Kain K.C. (1997). Parasight F test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **56**: 44-48.
- Huong N.M., Davis T.M., Hewitt S., Huong N.V., Uyen T.T., Nhan D.H. *et al.*, (2002). Comparison

- of three antigen detection methods for diagnosis and therapeutic monitoring of malaria: a field study from southern Vietnam. *Trop. Med. Int. Health*. **7**: 304-308.
- Iqbal J., Hira P. R., Sher A. & Al-Enezi A. A. (2001). Diagnosis of imported malaria by *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH) and histidine-rich protein 2 (PfHRP-2)-based immunocapture assays. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **64**: 20-23.
- Iqbal J., Sher A., Hira P. R. & Al-Owaish R. (1999). Comparison of the OptiMAL test with PCR for diagnosis of malaria in immigrants. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 3644-3646.
- Iqbal J., Siddique A., Jameel M. & Hira P. R. (2004). Persistent histidine-rich protein 2, parasite lactate dehydrogenase, and panmalarial antigen reactivity after clearance of *Plasmodium falciparum* mono-infection. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 4237-4241.
- Iqbal J., Khalid N. & Hira P. R. (2003). Performance of rapid malaria Pf antigen test for the diagnosis of malaria and false- reactivity with autoantibodies. *Adv. Exp. Med. Biol.* **531**: 135-148.
- Kachur S. P., Nicolas E., Jean-Francois V., Benitez A., Bloland P.B., Saint Jean Y. *et al.*, (1995). Prevalence of malaria parasitemia and accuracy of microscopic diagnosis in Haiti. *Rev. Panam. Salud Publica.* **3**: 35-39.
- Kain K. C., Harrington M.A., Tennyson S. & Keystone J.S. (1998). Imported malaria: prospective analysis of problems in diagnosis and management. *Clin. Infect. Dis.* **27**: 142-149.
- Karbwang J., Tasanor O., Kanda T., Wattanagoon Y., Ibrahim M., Na-Bangchang K. *et al.*, (1996). ParaSight -F test for the detection of treatment failure in multidrug resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **90**: 513-515.
- Kawamoto F. (1991). Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy with light microscopy and interference filters. *Lancet*. **1**: 200-202.
- Kolaczinski J., Mohammed N., Ali I., Ali M., Khan N., Ezard N. *et al.*, (2004). Comparison of the OptiMAL® rapid antigen test with field microscopy for the detection of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*: considerations for the application of the rapid test in Afghanistan. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **98**: 15-20.
- Lee N., Baker J., Andrews K. T., Gatton M.L., Bell D., Cheng Q. *et al.*, (2006a). Effect of sequence variation in *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: Implications for rapid diagnostic tests for malaria. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 2773-2778.
- Lee N., Baker J., Bell D., McCarthy J. & Cheng Q (2006b). Assessing the genetic diversity of the aldolase genes of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* and its potential effect on the performance of Aldolase-detecting Rapid Diagnostic Tests (RDTs). *J. Clin. Microbiol.* Publicación virtual pre-impresión, octubre 4 2006, doi:10.1128/JCM.01611-06
- Leke R. F., Djokam R. R., Mbu R., Leke R. J., Fogako J., Megnekou R. *et al.*, (1999). Detection of the *Plasmodium falciparum* antigen histidine-rich protein 2 in blood of pregnant women: implications for diagnosing placental malaria. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2992-2996.
- Lema O. E., Carter J.Y., Nagelkerke N., Wangai M.W., Kitenge P., Gikunda S.M. *et al.*, (1999). Comparison of five methods of malaria detection in the outpatient setting. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 177-182.
- Lowe B. S., Jeffa N. K., New L., Pedersen C., Engbaek K. & Marsh K. (1996). Acridine orange fluorescence technique as alternative to traditional Giemsa staining for the diagnosis of malaria in developing countries. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **90**: 34-36.
- Mason D. P., Kawamoto F., Lin K., Laoboonchai A. & Wongsrichanalai C. (2002). A comparison of two rapid field immunochromatographic tests to expert microscopy in the diagnosis of malaria. *Acta Trop.* **82**: 51-59.
- Mayxay M., Pukritrakamee S., Chotivanich K., Imwong M., Looareesuwan S. & White N. J. (2001a). Identification of cryptic coinfection with *Plasmodium falciparum* in patients presenting with *vivax* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**: 588-592.

- Mayxay M., Pukrittayakamee S., Chotivanich K., Looareesuwan S. & White N.J. (2001b). Persistence of *Plasmodium falciparum* HRP-2 in successfully treated acute *falciparum* malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **95**: 179-182.
- Moody A. H. & Chiodini P. L. (2002). Non microscopic method for malaria diagnosis using OptiMAL IT, a second generation dipstick for malaria pLDH antigen detection. *Br. J. Biomed. Sci.* **59**: 228-231.
- Moody A., Hunt-Cooke A., Gabbett E. & Chiodini P. (2000). Performance of the OptiMal_ malaria antigen capture dipstick for malaria diagnosis and treatment monitoring at the Hospital for Tropical Diseases, London. *Br. J. Haematol.* **109**: 891-894.
- Oduola A. M., Omitowoju G. O., Sowunmi A., Makler M. T., Falade C. O., Kyle D. E. *et al.*, (1997). *Plasmodium falciparum*: evaluation of lactate dehydrogenase in monitoring therapeutic responses to standard antimalarial drugs in Nigeria. *Exp. Parasitol.* **87**: 283-289.
- Palmer C.J., Lindo J.F., Klaskala W.I., Quesada J.A., Kaminsky R., Baum M.K. *et al.*, (1998). Evaluation of the OptiMAL test for rapid diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 203-206.
- Panton L.J., McPhie P., Maloy W.L., Wellems T.E., Taylor D.W. & Howard R.J (1989). Purification and partial characterization of an unusual protein of *Plasmodium falciparum*: histidine-rich protein II. *Mol. Biochem. Parasitol.* **35**: 149-160.
- Penhalbel R de S., Fugikaha E., Lorenzetti A., Alves R.T., Cavasini C.E., Rossit A.R *et al.*, (2005). Evaluation of an immunochromatography test for malaria diagnosis under different storage conditions. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **38**: 194-195.
- Piper R., Lebrass J., Wentworth L., Hunt-Cooke A., Houze S., Chiodini P. *et al.*, (1999). Immunocapture diagnosis assays for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 109-118.
- Postigo M., Mendoza-León A. & Pérez H. A. (1998) Malaria diagnosis by the polymerase chain reaction: A field study in south-eastern Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92**: 509-511.
- Richter J., Gobels K., Muller-Stover I., Hoppenheit B. & Haussinger D. (2004). Co-reactivity of plasmodial histidine-rich protein 2 and aldolase on a combined immuno-chromographic-malaria dipstick (ICT) as a potential semi-quantitative marker of high *Plasmodium falciparum* parasitaemia. *Parasitol. Res.* **94**: 384-385.
- Rickman L., Oberst R., Sangalang R., Chulay J., Long G., Cabanban A. *et al.*, (1989). Rapid diagnosis of malaria by acridine orange staining of centrifuged parasites. *Lancet.* **1**: 68-71.
- Schneider E. L. & Marletta M. A. (2005). Heme binding to the histidine-rich protein II from *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry.* **44**: 979-986.
- Sherman I. W. (1961). Molecular heterogeneity of lactic dehydrogenase in avian malaria (*Plasmodium lophurae*). *J. Exp. Med.* **114**: 1049-1062.
- Shiff C., Premji Z. & Minjas J. (1993). The rapid manual Parasight-F test. A new diagnostic tool for *Plasmodium falciparum* infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**: 646-648.
- Singh B., Bobogare A., Cox-Singh J., Snounou G., Abdullah M.S. & Rahman H.A. (1999). A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 687-692.
- Singh N., Saxena, A. & Valecha, N. (2000). Field evaluation of the ICT malaria P.f/P.v immunochromatographic test for diagnosis of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infection in forest villages of Chhindwara, central India. *Trop. Med. Int. Hlth.* **5**: 765-770.
- Singh N., Valecha N. & Sharma V. P. (1997). Malaria diagnosis by field workers using an immunochromatographic test. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**: 396-397.
- Snounou G., Viriyakosol S., Jarra W., Thaithong S. & Brown N. (1993). High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**: 315-320.
- Sullivan D.J Jr., Gluzman I.Y. & Goldberg D.E. (1996). *Plasmodium* hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. *Science.* **271**: 219-222.

- Tarimo D.S., Minjas J.N. & Bygbjerg I.C. (2001). Malaria diagnosis and treatment under the strategy of the integrated management of childhood illness (IMCI): relevance of laboratory support from the rapid immunochromatographic tests of ICT Malaria P.f/P.v and OptiMal. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **95**: 437-444.
- Tjitra E., Suprianto S., Dyer M., Currie B. J. & Anstey N.M. (1999). Field evaluation of the ICT malaria P.F/P.v immunochromatographic test for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in patients with a presumptive clinical diagnosis of malaria in eastern Indonesia. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2412-2417.
- Tjitra E., Suprianto S., Dyer M. E., Currie B. J. & Anstey N.M. (2001a). Detection of histidine rich protein 2 and panmalarial ICT Malaria Pf/ Pv test antigens after chloroquine treatment of uncomplicated *falciparum* malaria does not reliably predict treatment outcome in eastern Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**: 593-598.
- Tjitra E., Suprianto S., McBroom J., Currie B. J. & Anstey N. M. (2001b). Persistent ICT malaria P.f/P.v panmalarial and HRP2 antigen reactivity after treatment of *Plasmodium falciparum* malaria is associated with gametocytemia and results in false-positive diagnoses of *Plasmodium vivax* in convalescence. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1025-1031.
- Uguen C., Rabodonirina M., De Pina J. J., Vigier J. P., Martet G., Maret M. *et al.*, (1995). ParaSight-F rapid manual diagnostic test of *Plasmodium falciparum* infections. *Bull. World. Health. Org.* **73**: 643-649.
- Vakharia S., Gopinathan N. & Kshirsagar N. A. (1997). The ParaSight-F test for detecting treatment failure. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**: 490-491.
- Valecha N., Sharma V. P. & Devi C. U. (1998). A rapid immunochromatographic test (ICT) for diagnosis of *Plasmodium falciparum*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **30**: 257-260.
- Wongsrichanalai C., Chuanak N., Tulyayon S., Thanosingha N., Laboonchal A., Thimasarn T.G. *et al.*, (1999). Comparison of a rapid field immunochromatographic test to expert microscopy for the detection of *Plasmodium falciparum* asexual parasitemia in Thailand. *Acta Trop.* **73**: 263-273.
- WHO (1993). *Implementation of a Global Malaria Control Strategy*. WHO Technical report Series 839. Geneva.
- WHO (2000). *New perspectives: malaria diagnosis*. Report of a Joint WHO/USAID informal consultation, 25-27 October 1999. Document WHO/ CDS/ RBM/ 2000. 14. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO (2005). *World Malaria Report*. RBM/WHO/ UNICEF. Geneva.

Recibido el 27/10/2006
Aceptado el 16/12/2006

La oncocercosis humana en el foco amazónico

Sarai Vivas-Martínez^{1*}, María-Eugenia Grillet^{2*}, Carlos Botto^{3,4} & María-Gloria Basáñez^{5*}

En este artículo se describe la oncocercosis humana, la cual afecta al pueblo Yanomami en el foco amazónico del sur de Venezuela y se revisa el conocimiento actualizado de la enfermedad y su control. La epidemiología de esta infección parasitaria (causada por *Onchocerca volvulus*), y transmitida por insectos simúlidos, es altamente dependiente de las características ambientales y entomológicas prevalentes en la región, determinadas por gradientes altitudinales, vegetacionales, y geológicos que inciden en la distribución y severidad de la endemia. Asimismo, las características socioculturales y demográficas del pueblo Yanomami juegan un papel importante en la exposición al vector y en los niveles de transmisión del parásito. Las comunidades con mayor intensidad de infección y transmisión (hiperendémicas), son aquellas situadas a mayor altura, caracterizadas por elevadas cargas parasitarias, lesiones dermatológicas y oculares, además de una profunda supresión de la respuesta inmunológica frente a antígenos del parásito y otros. La proporción de comunidades hiperendémicas alcanza el 60% de las estratificadas hasta el momento, pero los mapas de riesgo generados usando sistemas de información geográfica sugieren que esta proporción puede ser aún más elevada. El programa de eliminación de la oncocercosis se basa en la distribución masiva bianual de ivermectina al 85% de la población elegible, y a pesar de las dificultades en el logro de esta meta, principalmente debido a la ubicación remota de las comunidades, el impacto de varias rondas de tratamiento permite aseverar que ha habido una mejoría de los indicadores parasitológicos y clínicos en la población Yanomami incorporada al programa. Finalmente, se discuten algunos lineamientos actuales dentro de la vigilancia epidemiológica y se reseñan nuevas opciones terapéuticas para el control de la oncocercosis.

Palabras clave: oncocercosis, Venezuela, Amazonas, Yanomami, epidemiología, programa de control.

LA ONCOCERCOSIS Y SU TRANSMISIÓN

Breve descripción de la enfermedad

La oncocercosis es la infección parasitaria causada por nemátodos (gusanos redondos) filáricos pertenecientes a la especie *Onchocerca volvulus*, y transmitida entre los humanos mediante la picada de pequeñas moscas del género *Simulium*

(conocidos como jejenes). La enfermedad, llamada “ceguera de los ríos” y “erisipela de la costa”, está ampliamente distribuida en África y más focalmente en Latinoamérica. La Fig. 1 indica los países a nivel mundial que poseen áreas endémicas de oncocercosis humana. En Latinoamérica, seis países poseen áreas endémicas de oncocercosis de mayor o menor extensión y severidad. Estos países son México, Guatemala, Colombia, Ecuador, Brasil, y Venezuela. El foco de oncocercosis del sur de Venezuela se caracteriza por ser uno de los que exhibe una mayor proporción de comunidades de elevada endemicidad y número de parásitos por persona. Este capítulo se enfocará principalmente en el foco sur de Venezuela, también conocido como foco amazónico, por ser dicho foco el que afecta en nuestro país a una elevada proporción de población indígena, en particular al pueblo Yanomami.

Ciclo de vida de Onchocerca volvulus

La filaria *O. volvulus* pasa a través de varios estadios durante su ciclo de vida, ciclo que se desarrolla

¹ Departamento de Medicina Preventiva y Social, Facultad de Medicina (Escuela Luis Razetti), Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

² Laboratorio de Biología de Vectores, Instituto de Zoología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela

³ Centro Amazónico para la Investigación y Control de Enfermedades Tropicales ‘Simón Bolívar’ (CAICET), Puerto Ayacucho, Estado Amazonas, Venezuela

⁴ Instituto de Medicina Tropical ‘Dr Felix Pifano’, Facultad de Medicina (Escuela Luis Razetti), Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

⁵ Department of Infectious Disease Epidemiology, Faculty of Medicine (St Mary’s School), Imperial College London, Inglaterra

* Investigadora asociada del CAICET

** Autor de correspondencia: svivasm@gmail.com

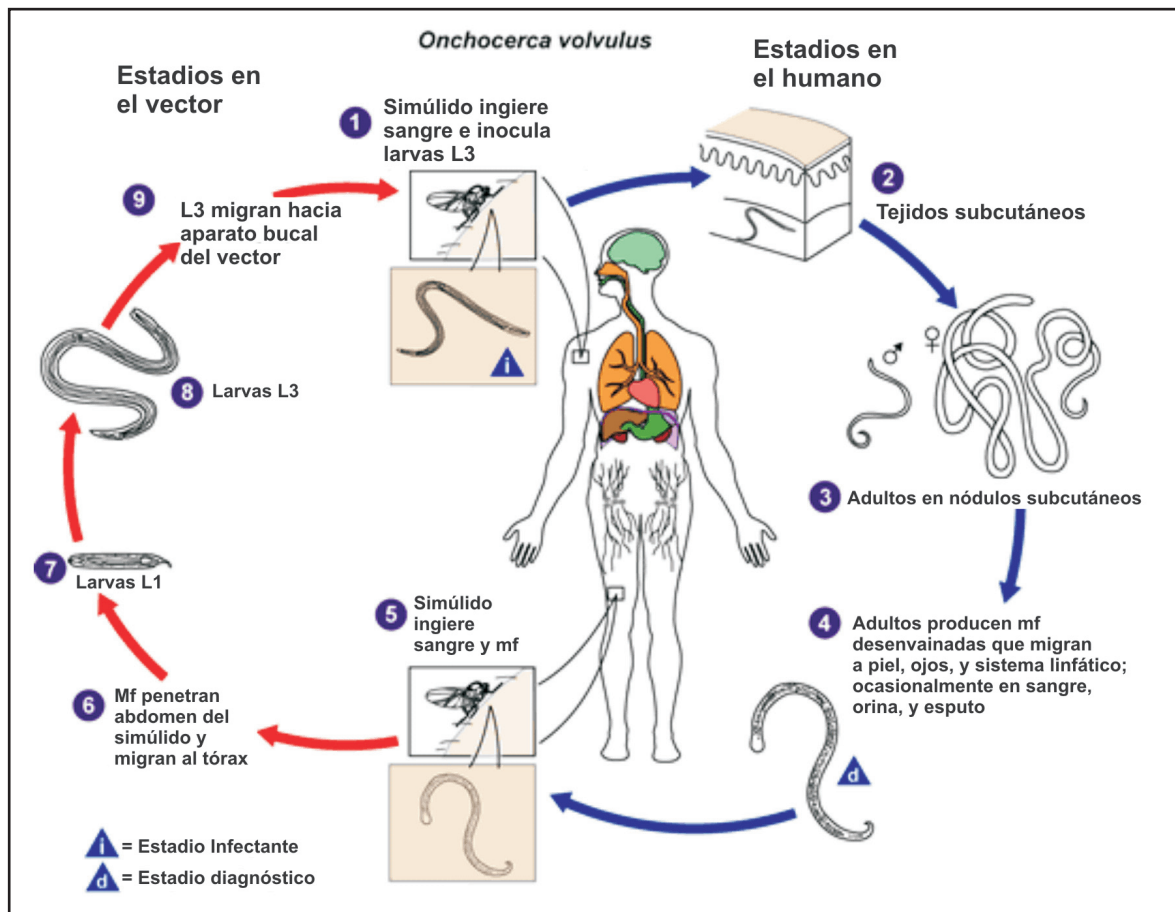


Fig. 2. Ciclo vital de *Onchocerca volvulus* en el humano y en el vector (Centers for Disease Control, <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/> accesada 2006).

norte y uno en la región sur del país, cada uno con características epidemiológicas distintas. En el foco sur de Venezuela, la oncocercosis está presente en la Sierra de Parima, en la zona del Alto Orinoco, y en el Alto Caura (Rassi *et al.*, 1977; Godoy *et al.*, 1989; Yarzabal *et al.*, 1985a). Más recientemente una extensión al sur de este foco ha sido reportada por Botto *et al.*, (1997) en la Sierra de Unturán. Esta área, junto con la contigua de Brasil, conforma el llamado foco amazónico de oncocercosis que afecta principalmente al pueblo Yanomami, cuya población en Venezuela se ha estimado en unas 13.600 personas (OCEI 1993).

Recuento histórico en Venezuela

La oncocercosis fue reportada por primera vez en Venezuela en 1948 en la región nor-oriental del país. Poco tiempo después, fue descubierto un nuevo foco en la región nor-central. Posteriormente,

Rassi *et al.*, (1977) describieron una nueva área de transmisión en la región sur de Venezuela, limítrofe con el foco de Brasil descrito en parte por el mismo Rassi.

En 1982 Godoy reportó la presencia del parásito entre los Sanemá del Alto Caura, al sur del Estado Bolívar, para posteriormente describir el foco del Alto Caura (Godoy *et al.*, 1989), que forma parte del foco amazónico. Los estudios epidemiológicos, parasitológicos, y entomológicos de la oncocercosis humana en el Estado Amazonas de Venezuela, iniciados por Rassi, prosiguieron en detalle a partir de 1981 por parte del equipo multidisciplinario del CAICET (Centro Amazónico para la Investigación y Control de Enfermedades Tropicales “Simón Bolívar”). Este equipo comenzó sus investigaciones en la Sierra de Parima y el Alto Orinoco (Yarzabal *et al.*, 1985a; Botto *et al.*, 1985; Basáñez *et al.*, 1988), para más recientemente explorar y describir

las características y transmisión de la enfermedad a lo largo de los ríos Ocamo-Putaco, Orinoco-Orinoquito (Vivas-Martínez *et al.*, 1998, 2000a, 2000b; Grillet *et al.*, 2001a, 2005), Padamo y Mavaca (Carabin *et al.*, 2003), y cuenca del río Siapa (Botto *et al.*, 1997, 1999). La distribución, extensión, y epidemiología de paisaje del foco sur han sido descritas recientemente por Botto *et al.*, (2005a).

Descripción del foco amazónico

Esta zona comprende la región sur del Amazonas venezolano (estados Amazonas y Bolívar) (Fig. 3), caracterizada por un marcado gradiente de niveles de endemidad; desde áreas de baja transmisión y mayor tamaño poblacional (bosques húmedos de tierras bajas a lo largo de los ríos Orinoco, Mavaca, Padamo y curso bajo del Ocamo), hasta zonas hiperendémicas con comunidades más pequeñas en áreas montañosas

o en altiplanicies situadas por encima de los 800 msnm en las serranías de Parima, Unturán, y del Alto Caura. La contigüidad de esta zona endémica con la correspondiente zona en Brasil, sumada a las características seminómicas de la población Yanomami han determinado que a este foco se le considere como una misma zona de transmisión. Si bien esto tiene sentido en cuanto a un abordaje integral de la endemia y su control, dentro del foco amazónico existe una marcada heterogeneidad ecológica, de especies de vectores involucrados, y de severidad de la infección.

Variables epidemiológicas, endemidad por grupos de edad y sexo, vectores

En el foco sur de Venezuela, los niveles de endemidad y severidad varían ampliamente, reportándose en comunidades hiperendémicas una intensidad de infección promedio de 54 microfilarias (mf) por miligramo (mg) de piel en

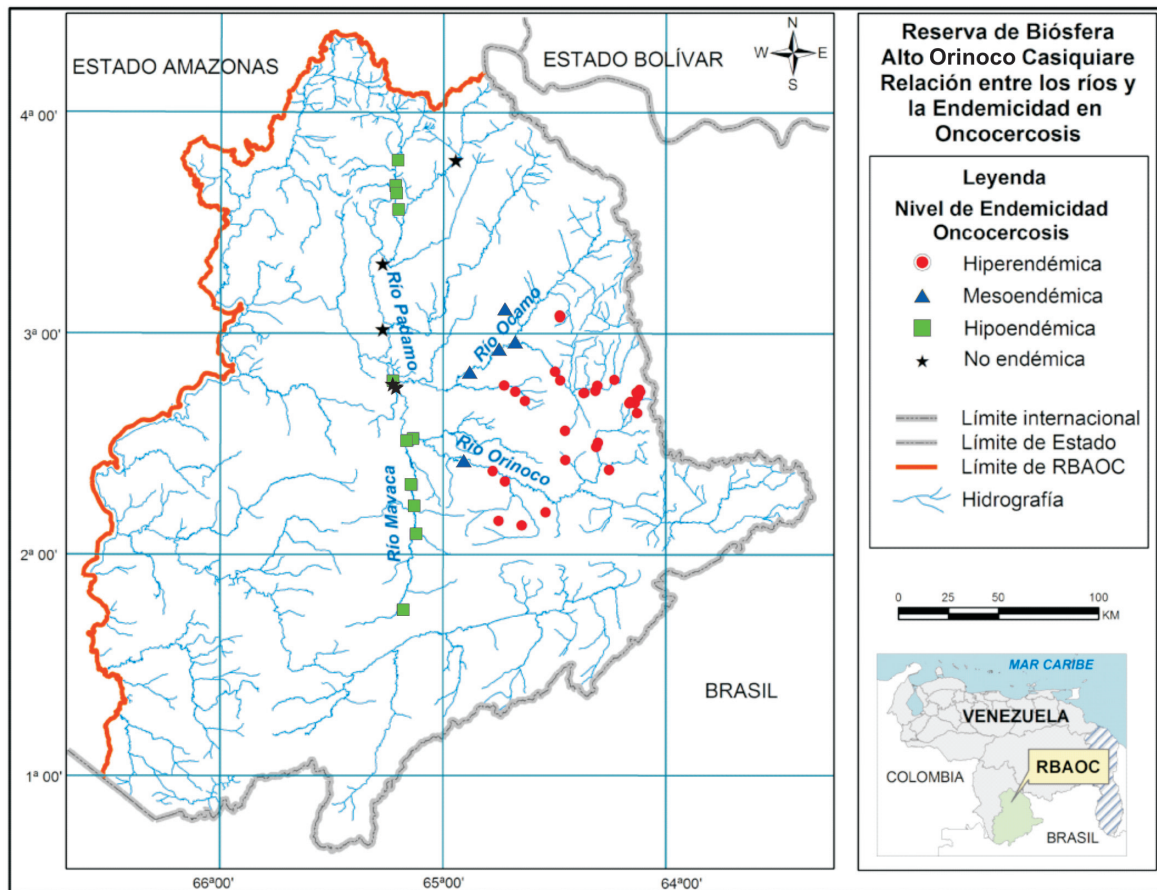


Fig. 3. Distribución de las (56) comunidades Yanomami georeferenciadas que han sido estratificadas en niveles de endemidad (por biopsia de piel) en el Estado Amazonas (Botto *et al.*, 2005a)

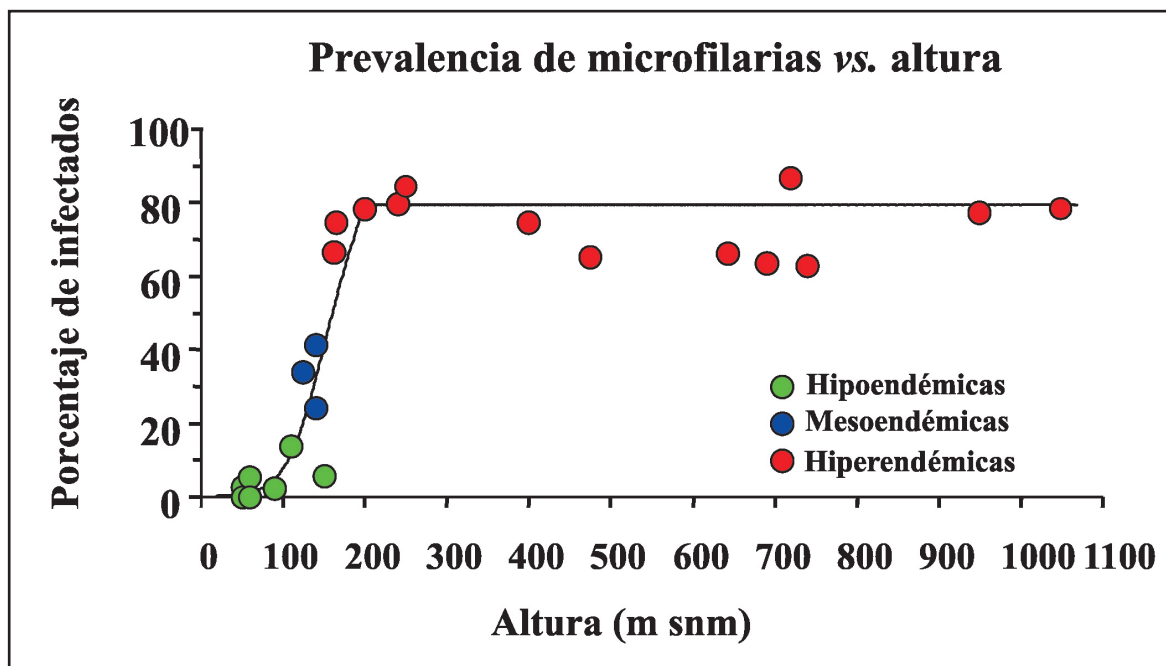


Fig. 4. Relación entre el porcentaje de personas infectadas por comunidad y la altura en el foco amazónico (Vivas-Martínez *et al.*, 1998)

Parima B (950 m snm), y de 51 mf/mg en la Serranía de Unturán, con lesiones oculares y cutáneas graves (Yarzabal *et al.*, 1985a; Botto *et al.*, 1997, 1999). Esto contrasta con promedios de 0.1 mf/mg en zonas más bajas del Alto Orinoco, tales como Ocamo (90 msnm) (Vivas-Martínez *et al.*, 1998).

Las comunidades hiperendémicas son aquellas que presentan una prevalencia microfilariana (porcentaje de personas infectadas con mf) igual o mayor al 60%. En contraste, las comunidades hipoendémicas son aquellas que exhiben una prevalencia menor al 20%. Entre estos dos extremos se sitúan las comunidades mesoendémicas, cuya prevalencia de infección puede ser mayor al 20% pero menor del 60% (OEPA 1996).

Los estudios de epidemiología del paisaje han permitido describir áreas geográficas con diferente riesgo de infección e identificar variables ambientales relevantes para la transmisión. Un total de 64 comunidades Yanomami han sido georeferenciadas hasta el momento, estimándose el nivel de endemidad por biopsia cutánea (ver sección de Diagnóstico) en una población de 2.530 personas distribuidas en un área geográfica de 83.830 km² en la región del Alto Orinoco. La información cartográfica y de sensores remotos obtenida ha sido

analizada utilizando un sistema de información geográfica (SIG). El SIG ha permitido precisar que las comunidades hipoendémicas se localizan en planicies fluviales con bosques ribereños y siempreverdes, generalmente sobre rocas sedimentarias recientes. Las comunidades hiperendémicas se sitúan en lomeríos y montañas, con bosques basimontanos a montanos, o en altiplanicies con sabanas de altura, generalmente sobre sustratos graníticos (Botto *et al.*, 2005b). En general, el 51,5% de las 2.530 personas examinadas presentaron microfilarias de *O. volvulus* en biopsias de piel, determinándose que de las 64 comunidades, 37 (58%) son hiperendémicas, 8 (13%) mesoendémicas, 13 (20%) hipoendémicas, y 6 (9%) no endémicas (Botto *et al.*, 2005b). La Fig. 4 ilustra, en una muestra de estas comunidades, la relación entre la altura a la cual está situada la comunidad y su prevalencia de microfilarias.

Las variaciones en los niveles de endemidad de la oncocercosis en el foco sur de Venezuela se corresponden principalmente con la presencia de distintas especies de jejenes involucrados en la transmisión de *O. volvulus*. En las zonas altas, la especie *Simulium guianense* (conocida entre los Yanomami como *pēti*¹) ha sido incriminada como un vector eficiente, mientras en las zonas bajas, *S. oyapockense* (conocida por los Yanomami como

*pareto*²) actúa como un vector menos eficiente (Basáñez *et al.*, 1988). Además de *S. guianense* (= *S. pintoï*), y *S. oyapockense* (= *S. sanchezi*; *S. amazonicum*; *S. cuasisanguineum*), hay otras especies de simúlidos que pican al humano tales como *S. incrustatum*² (= *S. limbatum*²; *S. yarzabali*), y *S. bipunctatum*³ (= *S. antillarum*³; *S. pseudoantillarum*), conocido este último como *iro shi*³ entre los Yanomami (Ramírez-Pérez *et al.*, 1982; Shelley *et al.*, 1997).

En el área también se ha reportado la presencia de *Mansonella ozzardi* en piel; esta filaria podría ser transmitida por los mismos vectores que *O. volvulus* (Yarzabal *et al.*, 1985b). La Fig. 5 demuestra como el gradiente altitudinal de prevalencia de la oncocercosis se relaciona con la composición porcentual de especies de vectores presentes a lo largo de dicho gradiente. Adicionalmente, las variaciones en la abundancia espacial y estacional de estas especies, así como la capacidad de cada una de estas especies para actuar como vector (lo que se conoce como competencia y capacidad vectoriales) juegan un papel muy importante en la transmisión de *O. volvulus*. Estos aspectos se discutirán en la sección dedicada a describir la transmisión de la oncocercosis en general, y en particular en el foco amazónico.

Los perfiles de infección por edad también dependen del nivel de endemidad, revelando que en áreas hiperendémicas la carga microfilariana aumenta con la edad del hospedador. Estos patrones se muestran en la Fig. 6. Entre los Yanomami no hay diferencias significativas en la prevalencia e intensidad de infección por microfilarias en relación al sexo, pero en los grupos de edad más avanzados, los hombres muestran microfilarodermias ligeramente superiores a la de las mujeres (Vivas-Martínez *et al.*, 2000a). Esto se debe a que ambos sexos practican actividades que los exponen de modo semejante a las picadas de los vectores. Carabin *et al.*, (2003), investigaron además, la influencia de la altura de la comunidad, el sistema fluvial a lo largo del cual éstas se ubican, y la importancia de factores socioculturales y demográficos (tales como el uso del vestido, el tipo de *shapono*, el grado de contacto con

misiones y la distancia a los centros de atención de salud). Las variables antropológicas resultaron estar estrechamente correlacionadas con la altitud, que explicó la mayor parte de la variabilidad en niveles de endemidad. Sin embargo, se observó un efecto importante del tipo de río, pues en los sistemas fluviales del Mavaca y el Ocamo, la prevalencia de microfilarias no aumenta del mismo modo con la altura.

Métodos de evaluación epidemiológica rápida

Los métodos de evaluación epidemiológica rápida (EER) fueron concebidos con el propósito de proveer información en salud de forma confiable, rápida, simple y a un costo menor que los procedimientos tradicionales. Tienen especial importancia en los programas de control de enfermedades tropicales al permitir por ejemplo la estimación de la prevalencia de infección o enfermedad, a nivel individual y comunitario, con niveles de precisión confiables y aceptables para propósitos de planificación dentro de los programas de control (Vlassoff & Tanner 1992). La aplicación de los métodos de EER en oncocercosis surgen de la necesidad de usar métodos apropiados para la distribución de ivermectina en áreas endémicas donde la epidemiología de la enfermedad no ha sido completamente documentada.

Los métodos de EER se aplican por lo general en los llamados grupos indicadores, que constituyen muestras poblacionales representativas de la variable a estimar y que obvian la necesidad de examinar a todos los habitantes de una comunidad. En África fue sugerido que el grupo indicador, en el cual las EER deberían ser realizadas, consistía en una muestra de 30 hombres cuya edad fuera ≥ 20 años. Inicialmente uno de los parámetros incluidos fue la carga comunitaria de microfilarias (CMFL), la cual es el promedio geométrico del número de microfilarias/biopsia de piel o microfilarias/mg de piel en adultos ≥ 20 años, incluyendo los negativos para la infección (Remme *et al.*, 1986). Esta medida es un índice de la intensidad de la infección y del riesgo de ceguera en una comunidad (Remme *et al.*, 1989b). Sin embargo,

pëti¹: Zool., jején, simúlido hematófago grande; *Simulium guianense* (Diptera: Simuliidae). Se lo encuentra sobre todo río arriba en los cursos de agua y en las regiones montañosas; es el principal vector de oncocercosis en la región [NB: de las tierras altas del Alto Orinoco] (Lizot 2004).

pareto²: Zool., simúlido, mosquito, jején; designa a tres especies de simúlidos hematófagos muy difundidos en el Alto Orinoco: *Simulium incrustatum*, *S. oyapockense* y *S. limbatum*. Todos son vectores de oncocercosis. *pareto kano*: pequeño punto rojo dejado por la picada de los jejenes (Lizot 2004).

iro shi³: Zool., pequeña mosca hematófaga; [*Simulium*] *antillarum*, *bipunctatum*. (Lit.: emanación de araguato). Tiene la cabeza roja y vive en las regiones montañosas (Lizot 2004).

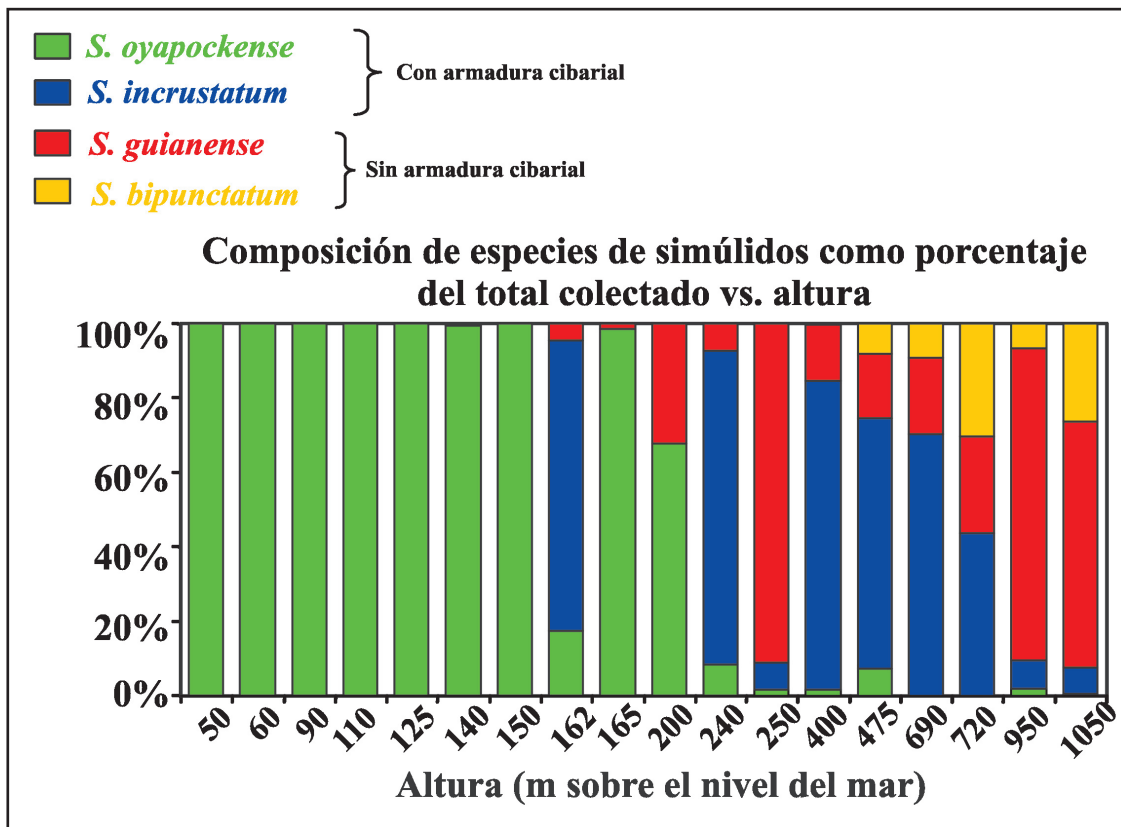


Fig. 5. Variación en la composición porcentual de especies de simúlidos vectores con la altura en el foco amazónico (Vivas-Martínez et al., 1998)

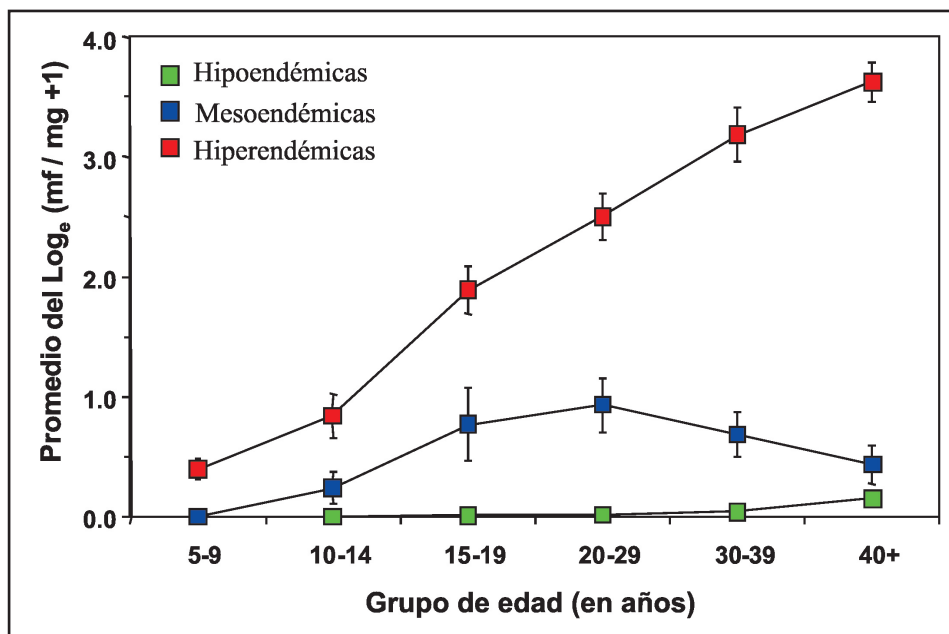


Figura 6. Promedio de la intensidad microfilariana en piel (expresada como el logaritmo natural del número de mf/mg + 1) en las áreas hipoendémicas, mesoendémicas, e hiperendémicas del foco amazónico de oncocercosis (Vivas-Martínez et al., 2000a)

debido a lo laborioso de realizar el conteo de microfilarias, este método no fue recomendado para EER, pero sí como indicador para el seguimiento de las medidas de control.

Entre los métodos propuestos para EER en oncocercosis se encuentran: a) la prevalencia de ceguera de una comunidad, pero aunque esta medida puede subestimar la prevalencia de la enfermedad (Taylor *et al.*, 1992); b) la prevalencia de despigmentación crónica de la piel (piel de leopardo), la cual en Latinoamérica parece no tener especificidad para oncocercosis (Guderian *et al.*, 1991); c) la presencia de nódulos palpables, que se relaciona con el riesgo de ceguera y la prevalencia comunitaria de microfilarias (Whitworth & Gemade 1999), y d) la biopsia de piel, cuando se toma una sola muestra de una región corporal específica (escapular o cresta ilíaca) y se reporta como positiva o negativa a microfilarias de *O. volvulus*.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Lesiones cutáneas

En el foco amazónico, estudios realizados tanto en Venezuela como en Brasil, incluían el reporte de varias lesiones de piel debidas a oncocercosis en las comunidades altamente infectadas con *O. volvulus*; las lesiones observadas eran dermatitis grave, atrofia dérmica, linfadenopatías e ingre colgante (Rassi *et al.*, 1977; Botto *et al.*, 1997). Con el fin de determinar la importancia de las lesiones de piel por oncocercosis, se realizó un estudio sistemático de la prevalencia y gravedad de las mismas a lo largo del foco, de acuerdo a la clasificación propuesta por Murdoch *et al.*, (1993). Los resultados, por nivel de endemidad, se resumen en la Tabla I. A pesar de que se registró despigmentación, no se observó la forma crónica descrita como piel de leopardo. Tampoco se registraron lesiones de oncodermatitis asimétrica tipo sowda. La Fig. 7 muestra un caso severo de atrofia dérmica en población Yanomami.

Lesiones oculares

La oncocercosis es conocida como “ceguera de los ríos” por su impacto sobre la agudeza visual, siendo responsable de la existencia en el mundo de un millón de personas con la visión severamente afectada (Etya'ale, 2001). Es bien conocida la participación de *O. volvulus* como el agente etiológico de lesiones

tanto del segmento anterior del ojo (queratitis punteada, queratitis esclerosante, iridociclitis), como del segmento posterior (lesiones del nervio óptico, corioretinopatía), estando todas ellas vinculadas a la reacción inflamatoria en torno a microfilarias muertas. Más recientemente, se ha postulado que la liberación de endosimbiontes del parásito, del género *Wolbachia*, es la causa de las reacciones inflamatorias que conducen a la patología ocular (Saint André *et al.*, 2002). La respuesta inmune local y sistémica está orientada a la modulación y regulación, a través de citoquinas, para reducir el daño tisular que sigue a la liberación de antígenos de microfilarias (de origen parasitario o de *Wolbachia*). Sin embargo, existe también evidencia de la existencia de antígenos compartidos por el verme adulto y células de la retina, el iris y el nervio óptico, de manera que algunos pacientes producen anticuerpos contra el parásito que contribuyen al daño ocular (Ottesen, 1995). Yarzabal *et al.*, (1985a) describieron tres casos de ceguera entre 219 personas estudiadas oftalmológicamente en la población Yanomami de Parima B, de los cuales uno era atribuible a oncocercosis (1,4%), comunicándose asimismo la presencia de lesiones oculares oncocercósicas (especialmente queratitis punteada, queratitis esclerosante, iritis, corioretinitis y atrofia óptica) en el 51,6% de la población general, con 10% de prevalencia de microfilarias en la cámara anterior del ojo. La prevalencia de lesiones oculares por oncocercosis se incrementó con la edad, alcanzando el 70% en el grupo ≥ 40 años. Estudios posteriores realizados con lámpara de hendidura, criterios estandarizados, y observadores entrenados en el marco del Programa para la Eliminación de la Oncocercosis en las Américas (OEPA) confirman estas cifras, hallándose elevadas prevalencias de lesiones oculares oncocercósicas (52%) con 40% de



Fig. 7. Lesión de atrofia de piel en la región glútea; Sierra de Parima, foco amazónico

Tabla I. Prevalencia estandarizada por edad y sexo de lesiones cutáneas debidas y asociadas a la oncocercosis en las comunidades estudiadas en el foco amazónico del sur de Venezuela (Vivas-Martínez et al., 2004)

	Comunidades hipoendémicas N = 227	Comunidades mesoendémicas N = 149	Comunidades hiperendémicas ¹ N = 346
Nódulos palpables: - % con oncocercomas	7,0	10,1	29,2
Prurito:			
- % con prurito	13,47	10,32	20,11
- % con prurito grave	3,31	1,71	8,98
Cambios cutáneos por oncocercosis			
Oncodermatitis:			
- % OPA ²	2,65	2,75	1,75
- % OPC ³	3,66	5,62	9,63
- % OL ⁴	14,03	17,53	23,63
Atrofia de piel:			
- % ATR ⁵	6,54	7,59	10,00
Despigmentación:			
- % DEP ⁶	14,69	8,19	7,38
Cambios asociados con lesiones cutáneas por oncocercosis			
Compromiso linfático:			
- % LA ⁷	0,00	0,00	0,23
- % LE ⁸	0,00	0,00	0,00
Ingle colgante:			
- % IC ⁹	0,42	0,76	0,46
Hernia (inguinal / femoral)	0,42	0,82	0,46

¹No se incluyen las comunidades de Niyayowë-theri, Coyowë-theri, o Parima-A; ²Oncodermatitis papular aguda; ³Oncodermatitis papular crónica; ⁴Oncodermatitis liquenificada; ⁵Atrofia cutánea; ⁶Despigmentación; ⁷Linfadenopatía; ⁸Linfoedema; ⁹Ingle colgante.

prevalencia de queratitis punteada, y hasta 28% de prevalencia de microfilarias en cámara anterior en algunas comunidades del piedemonte de la Sierra de Parima (Botto *et al.*, 2000). Estas cifras contrastan con las halladas en comunidades hipoendémicas donde la prevalencia de lesiones oculares es del 6,5%.

Muy recientemente se realizó una evaluación de la especificidad de la queratitis punteada como indicador de morbilidad ocular (Richards 2004), para cuya valoración se solicitó a los pacientes que colocaran la cabeza sobre sus rodillas durante 5 minutos. Esto facilita el descenso de las microfilarias a la cámara anterior del ojo, la cual fue examinada con una lámpara de hendidura con magnificación de 25x o 32x por un observador bien entrenado. El estudio encontró que hay diferencias apreciables entre los observadores, e indicó que el hallazgo de microfilarias vivas “enrolladas” y/o de microfilarias muertas extendidas, es absolutamente característico

de la oncocercosis y no se observa en áreas no endémicas, en tanto que el infiltrado inflamatorio en torno a una microfilaria muerta, que se aprecia como una lesión en “copo de nieve”, de carácter fugaz y reversible, puede confundirse con lesiones de otra etiología y encontrarse en áreas no oncocercósicas. En consecuencia, la presencia de un número ≥ 20 de microfilarias vivas en la cámara anterior (MFCA) del ojo, o de microfilarias muertas reconocibles, constituye un indicador muy específico asociado al riesgo de desarrollo de lesiones oculares severas y ceguera (Cooper *et al.*, 1995).

Quizás el rasgo más distintivo de la oncocercosis en el foco sur es la elevada prevalencia de queratitis esclerosante. Ésta es una lesión inflamatoria crónica de la córnea, que se acompaña de penetración de vasos sanguíneos y pigmento en el estroma corneano, comenzando frecuentemente como una lesión semilunar inferior que luego se

hace confluyente, opacificando la córnea y pudiendo conducir a la ceguera. La queratitis esclerosante puede alcanzar entre los Yanomami de la Sierra de Parima y su piedemonte prevalencias del 18% en la población general, incrementándose su frecuencia con la edad y la intensidad de la infección.

DIAGNÓSTICO

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

Detección de microfilarias en biopsia de piel

El diagnóstico de la oncocercosis se realiza principalmente por métodos parasitológicos, y en particular a través de la detección de estadios de transmisión como lo son las microfilarias (d) en la Fig. 2). Ya que las microfilarias de *O. volvulus* se alojan principalmente en la piel del hospedador humano, la biopsia cutánea exsangüe, incubada en un medio apropiado (solución salina fisiológica, usualmente con antibióticos para evitar la contaminación microbiana durante la incubación) constituye el método de elección (Yarzabal *et al.*, 1985a). Ya que la sensibilidad de este método diagnóstico aumenta con el número de biopsias tomadas y con el período de incubación de las mismas (Collins *et al.*, 1980) se recomienda incubar los trocitos de piel durante un mínimo de 8 horas y un máximo de 24 horas en placas de microtitulación debidamente rotuladas y protegidas de la evaporación.

A fin de obtener biopsias de un tamaño y peso relativamente homogéneos, se ha recomendado el uso de pinzas esclerocorneales (tipo Holth o tipo Walser) (Prost & Prod'hon 1978) adecuadamente esterilizadas antes de su uso en cada paciente durante estudios clínicos o epidemiológicos. En este último caso, la esterilización consiste en la inmersión de la mitad inferior del instrumento, a través de una secuencia de cinco pasos, en diferentes soluciones: glutaraldehído al 2%, alcohol al 70% y agua destilada. Las biopsias deben obtenerse de localizaciones corporales que aseguren una máxima probabilidad de diagnosticar como positiva una persona infectada (sensibilidad) y de diagnosticar correctamente la especie de filaria (especificidad). En el foco Amazónico, se ha demostrado una mayor concentración de microfilarias en la mitad inferior del cuerpo, particularmente cuando la intensidad de infección es relativamente baja, y por tanto se recomienda que las biopsias se tomen de las crestas ilíacas derecha e izquierda, para un número mínimo de dos biopsias por paciente (Yarzabal *et al.*,

1985a, Vivas-Martínez *et al.*, 2000b). En cuanto a la especificidad del método, la extracción de biopsia exsangüe debería reducir la probabilidad de encontrar microfilarias de *Mansonella ozzardi*, circulantes en sangre periférica. Sin embargo, sólo la adecuada caracterización morfológica de las microfilarias que se encuentren en la biopsia permitirá la correcta identificación del parásito. En algunas ocasiones, y particularmente cuando la carga microfilariana es elevada, pueden encontrarse microfilarias de *O. volvulus* en sangre y orina (Botto *et al.*, 1985).

El contenido de los pozos de las placas de microtitulación puede leerse con microscopio invertido, contando las microfilarias emergidas (Fig. 8) con un contador de células, o fijarse con solución de formaldehído para una concentración final del 2%. El contenido así fijado puede extenderse en láminas de microscopio, dejarse secar en posición horizontal, y teñirse con hematoxilina ácida de Mayer. Esto permitirá la coloración de la columna nuclear de las microfilarias, las cuales se identifican observando las láminas al microscopio.

Microfilarias en cámara anterior

Como se dijo anteriormente, la detección de microfilarias (vivas o muertas) en cámara anterior del ojo se emplea en evaluaciones oftalmológicas (ver sección *Lesiones oculares*). Se utiliza la lámpara de hendidura en recámara de observación oscurecida y para aumentar la sensibilidad del método el paciente ha debido colocar su cabeza entre las piernas durante 5 minutos previamente al examen oftalmológico.

Presencia de nódulos subcutáneos u oncocercomas

La palpación del cuerpo durante el examen clínico permite detectar la presencia de nódulos característicos, que son generalmente indolores

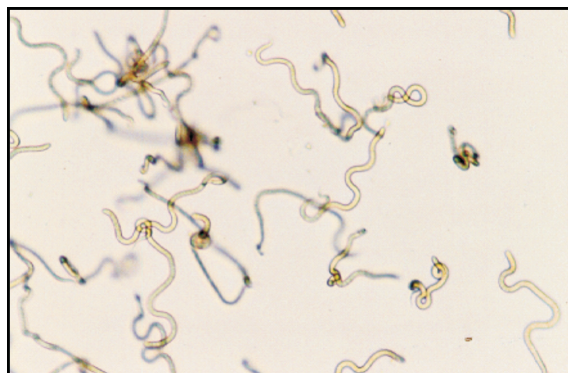


Fig. 8. Microfilarias de *O. volvulus*, Sierra de Parima.

y están situados cerca de prominencias óseas, así como registrar su número y ubicación. Estos nódulos albergan los vermes adultos. En el foco amazónico, la proporción de nódulos ubicados en la cabeza tiende a ser más alta que en los focos del norte del país, pero a su vez, la intensidad y localización anatómica de los oncocercomas varía con el nivel de endemidad. Las Tablas II y III presentan la información sobre localización de nódulos subcutáneos recabada para comunidades Yanomami situadas a lo largo de los ríos Ocamo y Orinoco.

El porcentaje de personas con nódulos palpables en las comunidades se ha utilizado en el África occidental para estimar el porcentaje de personas con microfilarias y por consiguiente la endemidad inicial de las comunidades. Ya que la palpación de nódulos es un método de evaluación parasitológica menos invasivo que la toma de biopsias de piel, la estimación de la prevalencia de infección por este método y su extrapolación a la prevalencia de microfilarias constituye un método de evaluación epidemiológica rápida (EER). En el foco amazónico, el grupo indicador para EER está constituido por personas de ambos sexos y mayores de 15 años de edad. La Fig. 9 muestra la relación entre la prevalencia de nódulos y la prevalencia de microfilarias. La prevalencia de nódulos en el grupo indicador debe ser multiplicada por un factor de 1,85 para obtener la prevalencia comunitaria de microfilarias.

MÉTODOS INDIRECTOS

Prueba de Mazzotti

La aplicación de la llamada prueba de Mazzotti está basada en la administración de

Tabla II. Ubicación anatómica de oncocercomas subcutáneos en el foco amazónico de oncocercosis humana (Vivas-Martínez et al., 2004)

Localización corporal	Nódulos	
	No.	Porcentaje
Cabeza	58	39,7
Torso superior	2	1,4
Brazos	1	0,7
Cresta ilíaca y región sacra	81	55,4
Glúteos	1	0,7
Piernas	2	1,4
Trocánter	1	0,7
Total	146	100,0

diethylcarbamazina (DEC), la cual produce un prurito característico debido a la muerte súbita de las microfilarias de *O. volvulus*. Dadas las elevadas intensidades de infección en algunas comunidades Yanomami no es recomendable utilizar la prueba de Mazzotti. Actualmente, se han diseñado pruebas tópicas tipo parche que aplican una pomada que contiene DEC para producir una reacción local. Este método tiene como objetivo el de reducir la toma de biopsias, y el de proporcionar métodos alternativos para detectar presencia de infección ya que la sensibilidad de la biopsia cutánea disminuye a medida que la intensidad de la infección decrece como resultado del control (Boatin et al., 2002).

Métodos de diagnóstico serológico

En principio, el diagnóstico serológico de una enfermedad parasitaria puede ser efectuado bien sea mediante la detección de antígenos circulantes, o la detección de anticuerpos específicos producidos por el hospedador contra el parásito. La detección de antígenos circulantes tiene la ventaja de permitir establecer la situación de infección presente en un individuo (en contraste con infección pasada o memoria inmunológica de infección, típica de las pruebas basadas en la detección de anticuerpos). Sin embargo, y a pesar de muchos intentos por parte de numerosos grupos de investigación, no ha sido posible desarrollar una prueba confiable para la detección de antígenos en oncocercosis. Esta situación contrasta con la de las filarisis linfáticas, para las cuales (y en particular para aquella causada por *Wuchereria bancrofti*), es posible cuantificar la presencia de antígeno filariano circulante. Es posible que la localización cutánea y subcutánea, respectivamente, de las microfilarias y adultos de *O. volvulus*, dificulte de alguna manera la liberación regular de antígenos (de excreción-secreción) en circulación periférica (Bradley et al., 2005). Ello no obstante, Arango et al., (1983) detectaron antigenemia en 17 de 24 (71%) sueros obtenidos de población Yanomami con

Tabla III. Ubicación anatómica de nódulos oncocercosis por nivel de endemidad (Vivas-Martínez et al., 2004)

Localización de los nódulos	Comunidades hipo- y mesoendémicas (%)	Comunidades hiperendémicas (%)	Subtotal
Cabeza	1 (1,7)	57 (98,3)	58
Resto del cuerpo	30 (37,0)	51 (63,0)	81
Subtotal	31	108	139

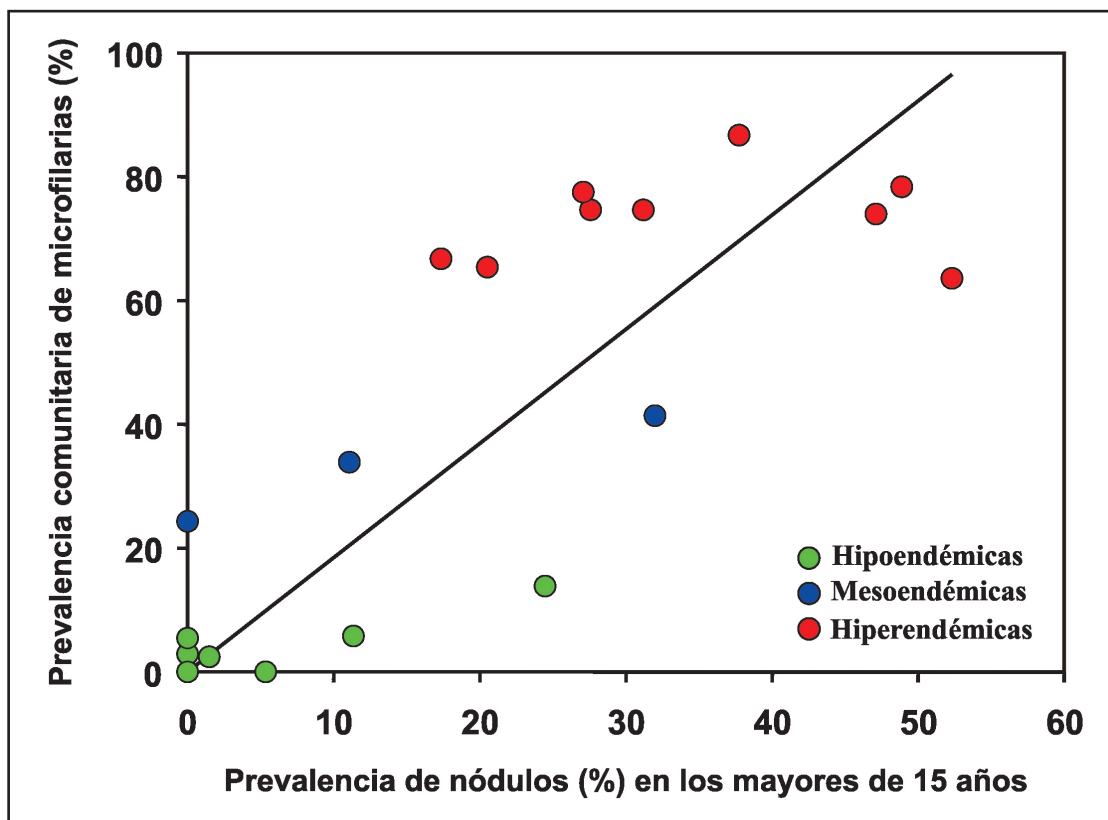


Fig. 9. La relación entre la prevalencia de nódulos palpables registrada en el grupo indicador y la prevalencia comunitaria de microfilarias en el foco amazónico

microfilarias en piel, y concluyeron que la presencia de antígenos circulantes, libres o en combinación con anticuerpos, participan en la patogenia de inmunosupresión de la inmunidad celular observada en oncocercosis severa generalizada.

Comúnmente, el diagnóstico serológico de la oncocercosis se ha circunscrito a pruebas de detección de anticuerpos. Los primeros intentos, basados en extractos crudos del parásito tuvieron el inconveniente de caracterizarse por una baja especificidad, debida a la extensa reactividad cruzada con anticuerpos producidos contra otros nemátodos. Posteriormente, se utilizaron fracciones antigénicas de bajo peso molecular enriquecidas con antígenos localizados en la superficie del parásito (Cabrera & Parkhouse 1987), que son reconocidas principalmente por inmunoglobulinas de los tipos IgG e IgE. Un diagnóstico más específico se logró mediante el desarrollo de pruebas directas e indirectas del ensayo inmunoenzimático (ELISA), al restringir los ensayos a la detección de IgG4. El ensayo directo de ELISA se basó en el aislamiento de una preparación antigénica de bajo peso molecular conteniendo dos antígenos en

particular (de 16,2 y 12,8 kDA), que resultó poseer una especificidad del 91% y una sensibilidad del 96% al probarse con sueros provenientes de áreas endémicas del foco sur de Venezuela como controles positivos y sueros de pacientes con *Mansonella ozzardi* como controles negativos (Cabrera *et al.*, 1989). La preparación de estas fracciones antigénicas, sin embargo, requiere de disponibilidad continua de material parasitario, y de técnicas e instrumentos para la extracción y purificación de los antígenos.

El desarrollo de pruebas basadas en antígenos recombinantes, obtenidos por las técnicas de hibridoma, permitió superar algunas de estas dificultades y detectar exposición a *O. volvulus* (Lobos *et al.*, 1991). Aunque el uso individual de estos antígenos resultó inicialmente en una baja sensibilidad, este obstáculo se subsanó al combinar varios de ellos en un así llamado cóctel de antígenos recombinantes (Bradley *et al.*, 1998). En particular, el cóctel que contiene tres antígenos de bajo peso molecular (OvMBP/10, OvMBP/11 y OvMBP/29) demostró tener una especificidad del 88% y una sensibilidad del 96% en poblaciones Yanomami de Unturán (Botto *et al.*, 1999).

La dificultad de detectar infección presente ha sido parcialmente superada al concentrarse en la detección de IgG4, ya que este tipo de inmunoglobulina está altamente relacionado con infección activa (Cabrera *et al.*, 1989). Para propósitos de monitoreo de programas de control es importante desarrollar una prueba rápida de campo que equilibre adecuadamente la sensibilidad y la especificidad. Una de las pruebas desarrolladas utiliza uno de los antígenos del cóctel anteriormente descrito, y detecta específicamente anticuerpos IgG4 en suero de pacientes infectados (Weil *et al.*, 2000). Su incorporación a ensayos inmunocromatográficos fue exitosa, pero la producción comercial de estas pruebas no ha continuado. Los nuevos fabricantes no han podido superar dificultades inherentes al tiempo de lectura de las pruebas, y aunque los prototipos iniciales se probaron con éxito en el Ecuador, no se dispone al presente, de una prueba inmunodiagnóstica rápida y eficiente para la vigilancia epidemiológica en áreas bajo control.

Métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos

Métodos basados en la detección de ADN (Harnett, 2002), permiten distinguir entre especies del género *Onchocerca* (Meredith *et al.*, 1989). También se han desarrollado sondas de ADN que permiten diferenciar entre cepas de *O. volvulus* de sabana y de selva, las cuales se consideran diferencialmente asociadas con características epidemiológicas y de patología ocular (Zimmerman *et al.*, 1992).

a) Diagnóstico en humanos. Pruebas basadas en la amplificación de ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y empleadas para la detección parasitaria en biopsias de piel (Zimmerman *et al.*, 1994a), o en muestras obtenidas por raspado de piel (Toé *et al.*, 1998) pueden proporcionar alternativas a los procedimientos de incubación de las biopsias y subsiguiente examen microscópico, o a la misma toma de biopsias, y han demostrado ser altamente sensibles, si bien la positividad por PCR no puede comprobar la existencia de microfilarias vivas (Hoerauf & Brattig 2002). El análisis de ADN de muestras de *O. volvulus* obtenidas en Guatemala y Brasil ha sugerido que las poblaciones parasitarias americanas están más estrechamente relacionadas con las de sabana del África occidental, que con las de selva (Zimmerman *et al.*, 1994b).

b) Diagnóstico en vectores. Como señalamos anteriormente, las sondas de ADN que se han venido

desarrollando, permiten distinguir *O. volvulus* de otras especies del mismo género que infectan al vector (Meredith *et al.*, 1989; Toé *et al.*, 1994). Todas estas sondas se han derivado de una secuencia repetida de 150 pares de bases que constituyen aproximadamente el 1% del genoma de *O. volvulus*. El uso de PCR permite amplificar esta secuencia, cuya presencia en muestras puede, a su vez, ser detectada mediante métodos que permiten su manifestación o visualización. Esto se logra al combinar las técnicas de PCR con el ensayo inmunoenzimático. A fin de agilizar el procesamiento de cientos o miles de moscas, tal como se obtienen durante la realización de evaluaciones entomológicas rápidas, el procedimiento ha evolucionado desde la detección de infección en moscas individuales hacia la detección en un número dado de grupos de moscas (pooles) que se analizan simultáneamente. El tamaño óptimo del pool puede variar entre especies vectoras, y para *S. guianense* en el foco amazónico es de 50 moscas (Gowtage-Sequeira *et al.*, 2002). La metodología estadística que permite estimar la prevalencia de infección en la muestra de moscas a partir de los resultados obtenidos en grupos de moscas ha sido presentada por Katholi *et al.*, (1995). En el foco sur de Venezuela se ha demostrado, en *S. guianense*, que el procesamiento de moscas por PCR proporciona resultados estadísticamente indistinguibles de aquellos obtenidos por disección manual (Gowtage-Sequeira *et al.*, 2002).

ASPECTOS BÁSICOS DE LA TRANSMISIÓN DE *O. volvulus*

Los únicos vectores que participan en la transmisión de *O. volvulus* son las llamadas moscas negras, o más comúnmente jejenes, pertenecientes al género *Simulium*. La primera vez que se incriminó a una especie de *Simulium* en la transmisión de esta infección fue en 1926, cuando Blacklock identificó a *Simulium damnosum* como el principal vector de oncocercosis en África. Sin embargo, ya Robles en 1916 sospechaba del papel de estas moscas en la transmisión de *O. volvulus* en Guatemala.

CONSIDERACIONES GENERALES EN LA INCRIMINACIÓN DE ESPECIES DE SIMULIDOS COMO VECTORES DE ONCOCERCOSIS

El hábito hematofágico exclusivo de las hembras (los machos no se alimentan de sangre) y la presencia en este grupo de insectos de un aparato bucal especializado en lacerar la piel y romper los vasos capilares a la hora de obtener una comida sanguínea, los hace particularmente adaptados a la ingestión de

las microfilarias de *O. volvulus* presentes en la piel o dermis. La sangre de animales vertebrados de sangre caliente (mamíferos y aves) es un recurso necesario en estos insectos para el desarrollo de sus huevos. Aunque ningún simúlido se alimenta exclusivamente de sangre humana (antropofagia), existen especies más zoofágicas (en las que predomina la ingesta de sangre animal) que otras. El alto grado de antropofagia es uno de los tres principales criterios a tomar en cuenta a la hora de incriminar a una especie de simúlido como vector de *O. volvulus*. El segundo criterio a considerar es que la especie, bajo condiciones naturales, presente niveles importantes de infección con los estadios infectantes (larvas L3) del parásito. Para ello, se realizan capturas entomológicas en campo y se llevan a cabo disecciones en el laboratorio para la detección de las larvas del parásito dentro del simúlido. Finalmente, la especie de jején debe presentar una alta susceptibilidad a la infección experimental con el parásito o alta competencia vectorial. Esto es, se debe comprobar experimentalmente que la especie de simúlido: i) tiene la habilidad fisiológica para adquirir las microfilarias de *O. volvulus*, a partir de una comida sanguínea proveniente de una persona portadora de microfilarias, ii) puede permitir el desarrollo de estas microfilarias hasta el estadio infectante (L3), y iii) es capaz de sobrevivir el período de incubación requerido y puede transmitir las larvas infectantes al humano en una subsiguiente comida sanguínea. Como un corolario de todo lo anterior, una especie de simúlido será un vector más eficiente, mientras sea comparativamente más antropofágico, presente una mayor competencia vectorial, y se halle en densidades por encima del umbral necesario para el establecimiento endémico de la enfermedad (Basáñez *et al.*, 2002).

Competencia vectorial

Uno de los aspectos claves de la competencia vectorial es la relación entre el número de microfilarias ingeridas y el número de larvas infectantes producidas por simúlido. La forma de esta relación va a estar determinada principalmente por todos aquellos mecanismos presentes en el insecto tendientes a regular la ingesta y desarrollo del parásito. Uno de estos mecanismos es la presencia de una estructura bucal en el simúlido compuesta de protuberancias quitinosas y afiladas, conocida como armadura cibarial (Fig. 10). Las especies de simúlidos vectores que poseen armadura dañan una proporción importante de microfilarias durante la ingesta lo cual reduce por una parte la mortalidad

del insecto inducida por el parásito pero también su competencia vectorial, particularmente cuando la oferta de microfilarias en la piel de los infectados es baja (Basáñez *et al.*, 1995). Estas especies requieren de un umbral de densidad de picada relativamente alto a fin de introducir la infección y lograr su persistencia en el tiempo (Basáñez & Ricádez-Esquinca 2001). Por el contrario, las especies de simúlidos vectores que carecen de esta estructura tenderán en promedio a desarrollar una mayor proporción de larvas infectantes de *O. volvulus* en relación a la ingesta de microfilarias, lo cual les confiere una relativa mayor eficiencia vectorial a densidades microfilarianas bajas (Basáñez *et al.*, 1995). La relevancia de las cargas microfilarianas estriba en que, en el contexto de programas de control con ivermectina, dichas densidades disminuirán notablemente en piel, favoreciendo a aquellas especies de vectores que exhiban una mayor infectividad, por microfilaria, a cargas bajas (como por ejemplo, *S. guianense* en el foco amazónico).

La presencia o ausencia de un cibario armado no es el único determinante de la competencia vectorial de una especie de simúlido. Otros factores incluyen la matriz peritrófica (que rodea la comida sanguínea y precede a la digestión de la sangre) (Reid & Lehane 1984), y la capacidad innata o adquirida por parte del

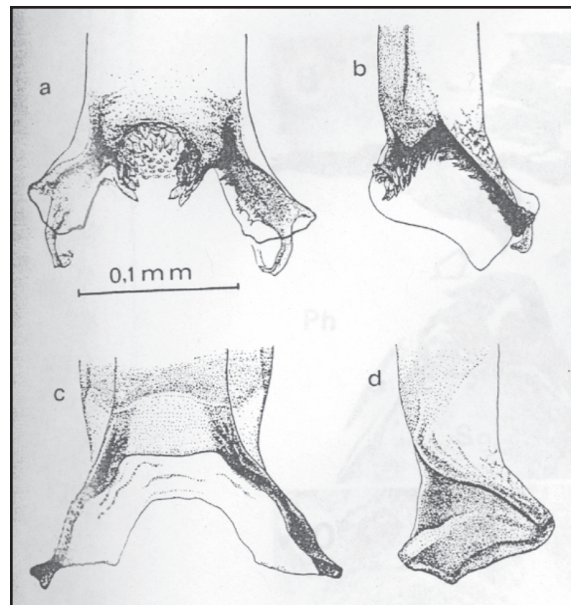


Fig. 10. Dibujo representando el cibario de especies de simúlidos con armadura cibarial presente (a y b), y ausente (c y d); vistas frontales (a y c) y laterales (b y d) (Omar & Garms, 1975)

insecto de defenderse inmunológicamente frente a la agresión representada por el parásito (Ham, 1992).

Además de la adquisición de cierta inmunidad por parte de los simúlidos (en la cual posiblemente intervienen lectinas, hemocitos, y componentes humorales de la hemolinfa, entre otros), los simúlidos pueden ser naturalmente refractarios al desarrollo larvario de *O. volvulus*. Como ejemplo, citamos las poblaciones de *Simulium exiguum* que habitan en los raudales de Culebra, cercanos a Puerto Ayacucho, en el Estado Amazonas. Si bien esta especie pica al hombre con voracidad, y es capaz de ingerir microfilarias de *O. volvulus* y de permitir su paso hacia el tórax del simúlido, estas larvas no prosiguen su desarrollo. Esta población es, pues, naturalmente refractaria al desarrollo de *O. volvulus* (Basáñez *et al.*, 2000).

En mosquitos vectores de filiaris linfática, se ha comprobado que la susceptibilidad está genéticamente determinada (Townson & Chaithong, 1991). Debido a la dificultad de obtener colonias permanentes de simúlidos en el laboratorio, la genética de estos insectos no ha sido investigada en profundidad. Los estudios citogenéticos (cromosómicos), sin embargo, han permitido demostrar que las especies que podemos diferenciar morfológicamente (morfoespecies), están compuestas por grupos de especies morfológicamente indistinguibles pero citogenéticamente diferenciables, llamadas citoespecies. Las especies de simúlidos son por tanto, en su mayoría, complejos de especies. La competencia vectorial estará influenciada por la citoespecie a la cual pertenece una población dada.

Densidad de vectores y tasas de picada

a) Tasa de picada. La transmisión de la oncocercosis es el producto de la continua exposición de los humanos a las picadas de los vectores. De allí que la determinación del grado de exposición del hospedador, medida a través de la cuantificación de la densidad de picada del vector sobre el humano, sea uno de los parámetros de transmisión más importantes utilizados en los programas de control de oncocercosis. El indicador más común de este grado de contacto hombre-vector es la tasa de picada anual, la cual describe el número potencial de picadas de jején que recibe una persona durante un año en un área endémica, a máximos niveles de exposición (Duke, 1968).

b) Tasa anual de picadas infectantes. Ya que las únicas picadas que pueden resultar en una infección exitosa del hospedador humano son aquellas efectuadas por

hembras infectantes, se estima la tasa de picadas infectantes al multiplicar la tasa anual de picada por la proporción de hembras infectantes (portadoras de larvas L3) obtenida por disección o por PCR (ver sección *Diagnóstico de vectores*).

c) Potencial anual de transmisión. Cuando la tasa anual de picadas infectantes se multiplica por el promedio de larvas L3 por mosca infectante, se obtiene el potencial anual de transmisión, que cuantifica el número de L3 potencialmente inoculadas por persona por año.

d) Tasa de picadas por hembras paras. Otra medida comúnmente usada es la de estandarizar la tasa de picada en función de la proporción de hembras paras (hembras que han experimentado al menos un ciclo gonadotrófico, ver definición más abajo, y que por tanto han adquirido una comida sanguínea previamente, lo cual ha incrementado la probabilidad de que hayan adquirido el parásito).

Ya que la transmisión de la oncocercosis es raramente perenne (a lo largo de todo el año) con la misma intensidad, una manera más apta de cuantificar la transmisión es la de discriminar las tasas de picada, de picadas infectantes, o de picadas por hembras paras, por mes, día y hora. Las así llamadas tasas de picada mensuales u horarias permiten, en consecuencia, identificar aquellas estaciones, períodos, u horas del día, durante los cuales la transmisión de *O. volvulus* es más elevada.

Resumiendo, la intensidad de la transmisión de la oncocercosis se relaciona de manera directa con: i) la proporción de insectos hembra que sobreviven y son capaces de desarrollar el estadio infectante para los humanos (larvas L3) después de haber ingerido microfilarias, ii) el número de larvas L3 producidas por mosca infectante, y iii) la densidad de picada sobre humanos de la especie de simúlido considerada. Todos estos factores en conjunto, además de la distribución espacial de la especie, determinan en gran parte el nivel de endemidad y la severidad de esta infección en un área endémica dada.

CICLO DE VIDA Y BIOLOGÍA DE LOS SIMÚLIDOS

El ciclo de vida de un simúlido pasa por cuatro fases o estadios de metamorfosis conocidos como huevo, larva, pupa y adulto; es decir los simúlidos son holometábolos (Fig. 11). Las fases inmaduras son acuáticas. La asociación de estos insectos y de las poblaciones humanas afectadas con

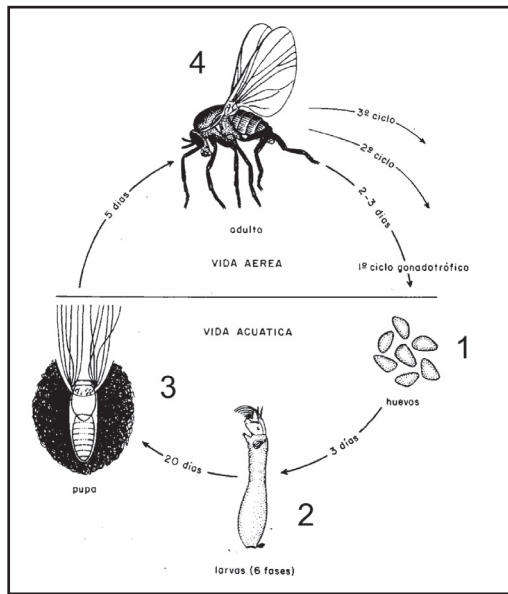


Fig. 11. Ciclo de vida de los simúlidos, vectores de oncocercosis (Ramírez-Pérez, 1977)

el ecosistema acuático de río es lo que le ha dado el nombre a la oncocercosis de “ceguera de los ríos”.

El ciclo de vida de estos insectos se cumple, en la zona tropical, en aproximadamente 20 días (Ramírez-Pérez, 1977). Las hembras maduran sus huevos (entre 200–500 por mosca) a partir de una comida sanguínea y los depositan (oviposición) en masas compactas sobre sustratos tales como rocas o piedras, plantas acuáticas y diversos tipos de vegetación sumergida o colgante presente en la corriente de quebradas y ríos (numeral 1 en Fig. 11). Los huevos eclosionan a los 2–4 días posterior a la oviposición, dando origen a las larvas (numeral 2), las cuales a su vez pasan por 6–9 estadios larvales. Estas permanecen adheridas a los sustratos y se alimentan mediante filtración de microorganismos y materia orgánica en suspensión en la columna de agua. A las 2–3 semanas, se transforman en pupas (3), y a los pocos días, emergen los adultos (4). Las especies tropicales se caracterizan por presentar varias generaciones por año. Posteriormente a la emergencia del adulto a partir de la pupa, la hembra busca un hospedador a fin de procurar una comida sanguínea. La actividad de los simúlidos es diurna (desde el amanecer hasta el atardecer), existiendo picos de actividad a determinadas horas del día dependientes de la especie, estación, condición climática, edad fisiológica, la disponibilidad y localización de los hospedadores, y la distancia de los asentamientos humanos en relación con los criaderos del vector.

El período gonadotrófico constituye el intervalo de tiempo, usualmente entre 2–4 días en especies tropicales, entre dos comidas sanguíneas consecutivas, lo cual incluye la búsqueda e ingesta de sangre, la oviposición, y la búsqueda de la próxima comida sanguínea. Una hembra puede sobrevivir varios ciclos gonadotróficos durante su vida. En promedio, la expectativa de vida del vector es de aproximadamente 1–2 semanas, lo cual no debe confundirse con la longevidad máxima que puede ser hasta de 1–2 meses. Ya que el desarrollo del parásito en el vector requiere de aproximadamente una semana, una hembra que haya adquirido microfilarias durante su primera comida sanguínea, podrá transmitir larvas infectantes durante su segunda, o más probablemente, su tercera comida sanguínea. De allí que mientras más longeva sea una hembra, mayor probabilidad tiene de transmitir al parásito *O. volvulus* en caso de que lo haya adquirido previamente.

ESPECIES VECTORAS DE ONCOCERCOSIS EN EL FOCO AMAZÓNICO

Tres especies de simúlidos están involucradas en la transmisión de oncocercosis en el foco amazónico: *Simulium guianense*, *S. incrustatum* y *S. oyapockense*. Estudios recientes han demostrado que las variaciones en la distribución espacial (altitud, localidad, tipo de río) y temporal (estación) en las actividades de picada de estas especies, así como sus contrastantes eficiencias vectoriales contribuyen de manera diferencial a la exposición y transmisión de *O. volvulus* en este foco (Basáñez *et al.*, 1988; Shelley *et al.*, 1997; Vivas-Martínez *et al.*, 1998; Grillet *et al.*, 2001a).

Simulium guianense (Fig. 12) es más abundante durante las transiciones estacionales (sequía-lluvia, lluvia-sequía) en las zonas de sabana de altura de las áreas hiperendémicas donde es el principal vector de *O. volvulus*. Esta especie carece de armadura cibarial, presenta un máximo de actividad de picada hacia el final del día, una relativa baja densidad de picada (media = 40 picadas de hembras para / persona / día; intervalo = 4–350 moscas), pero una alta competencia vectorial (Basáñez *et al.*, 1995; Grillet *et al.*, 2001a).

S. incrustatum, con una competencia vectorial intermedia debido a la presencia de armadura cibarial, juega un papel importante en la transmisión

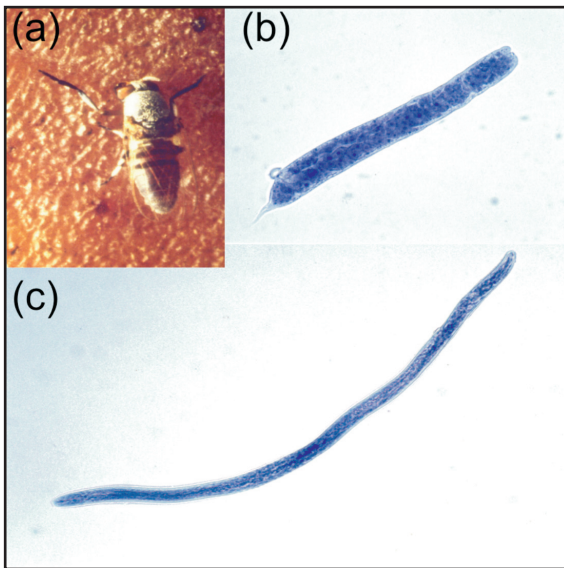


Fig. 12. *Simulium guianense* (a); larva L1 (b) y larva L3 (c) de *O. volvulus* obtenidas por disección en Sierra de Parima

de oncocercosis en niveles medios de altitud (zonas hiperendémicas y mesoendémicas), principalmente en el eje fluvial Ocamo-Putaco. En este eje fluvial, la especie predomina durante la época de lluvia y principios de la estación seca, cuando la población adulta está compuesta principalmente por hembras paras (densidad de picada media = 180 hembras / persona / día; intervalo = 60–390 moscas) que pican principalmente en la mañana (Grillet *et al.*, 2005).

Finalmente, *S. oyapockense* es la especie dominante en los bosques y valles fluviales hipoendémicos de tierras bajas de la región del Alto Orinoco, donde esta especie es altamente antropofágica, picando casi todo el día (densidad de picada media = 1920 picadas / persona / día; intervalo = 1500–3300), comportamiento que compensa su baja competencia vectorial, producto, en parte, de poseer una armadura cibarial bien desarrollada (Basáñez *et al.*, 1988; Shelley *et al.*, 1997; Vivas-Martínez *et al.*, 1998; Grillet *et al.*, 2001a).

En la Tabla IV se observan algunos resultados correspondientes a evaluaciones entomológicas llevadas a cabo en localidades centinelas seleccionadas en el marco del programa de control de oncocercosis en el foco amazónico, con el objetivo de determinar diversos índices o parámetros de transmisión, a saber, tasas de paridad, tasas de picada (TP), índices de infección (TIP) e infectividad (TI), de las tres especies de simúlidos. *Simulium*

incrustatum prevalece en las localidades centinela de Awei-theri y Pashopeka, mientras *S. guianense* es la especie predominante en las de Coyowë-theri y Niyayowë-theri. El porcentaje de moscas infectadas con larvas de *O. volvulus* de cualquier estadio (tasa de infección parasitaria) tiende a ser más elevado en *S. guianense* que en *S. incrustatum* y *S. oyapockense*. Con excepción de la pequeña muestra de ejemplares de *S. oyapockense* disecados para Pashopeka, el porcentaje de moscas infectantes (tasa de infectividad, con larvas L3), es más elevado en *S. guianense* en Coyowë-theri y Niyayowë-theri, que en el resto de las especies. Las tasas de picada de *S. oyapockense* son sumamente elevadas en las localidades de tierras bajas (aproximadamente 2000 por persona por día), pero el número de L3 por mosca es bajo (0.0008). En Coyowë-theri y Niyayowë-theri, el potencial anual de transmisión es de unas 2000 larvas L3 por persona por año. Entre estos dos extremos, se situarían las localidades de Maweti, Pashopeka y Awei-theri, con potenciales anuales de transmisión oscilando entre 90 y 500. Las variaciones espaciales, estacionales, y diarias en las tasas de picada de las hembras paras de simúlidos en el foco sur apuntan a que las tasas de paridad, y presumiblemente de infectividad, son más elevadas en los meses de menor precipitación y de transición entre las épocas de mayor y menor pluviosidad (Grillet *et al.*, 2001a).

INMUNOLOGÍA

Los estudios sobre la respuesta del sistema inmunológico de los individuos con oncocercosis han aumentado la comprensión de los mecanismos involucrados tanto en la infección como en la inmunopatología de esta parasitosis (Pearlman 2003). La presencia de individuos aparentemente no infectados pero sí expuestos en áreas de transmisión activa, ha sido citada como evidencia de la existencia de putativos inmunes. Sin embargo, puede decirse que no hay evidencia directa en favor de la existencia de inmunidad protectora adquirida en la oncocercosis (Bradley *et al.*, 2005). Aquellos casos donde la microfilarodermia continúa aumentando con la edad, tal como se observa en comunidades hiperendémicas Yanomami (Fig. 6), podrían explicarse por niveles de exposición a los vectores que cambian con la edad (Filipe *et al.*, 2005), o por fenómenos de inmunosupresión o inmunotolerancia.

a) Respuesta inmune humoral. La respuesta inmune humoral (mediada por anticuerpos) no está afectada, y en aquellos individuos infectados con elevadas

Tabla IV. Índices entomológicos pre-ivermectina en comunidades centinela del foco amazónico

Localidad y altura	Año	Especie Simulium	Totaldisecado	Paridad (%)	TIP(%)	TI(%)	TPdiaria	TPanual	No. L3 / mosca
Maweti‡ (140 m)	1995	<i>S. oyapockense</i>	8.878	76%	0,16	0,01	1.776	648.240	0,0008
Awei-theri (162 m)	1995-1997	<i>S. incrustatum</i>	1.598	68%	1,50	0,00	521	190.341	-
Pashopeka (240 m)	1995-1997	<i>S. incrustatum</i>	1.414	50%	1,70	0,14	270	98.438	0,0014
Awei-theri (162 m)	1995-1997	<i>S. oyapockense</i>	573	61%	0,52	0,00	130	47.506	-
Pashopeka (240 m)	1995	<i>S. oyapockense</i>	71	61%	1,41	1,41	25	9.052	0,0100
Coyowé (250 m)	1982-1993	<i>S. guianense</i>	29.490	61%	6,07	0,37	669	244.325	0,0073
Niyayowé (950 m)	1982-1987	<i>S. guianense</i>	4.742	71%	3,30	0,65	352	128.480	0,0141

‡ Maweti-theri no es comunidad centinela del programa de control del foco sur pero se muestran datos por ser una localidad típica de *S. oyapockense*, TIP = tasa de infección parasitaria (con larvas de cualquier estadio); TI = tasa de infectividad (con larvas L3).

cargas microfilarianas, que sin embargo, aparentan ser asintomáticos (condición referida como oncocercosis generalizada), la respuesta de anticuerpos específicos muestra ser vigorosa (Ottesen 1995). En particular, la clase de citoquinas y anticuerpos producidos por dichos individuos frente a antígenos del parásito, sugieren que la respuesta inmunológica está polarizada hacia lo que se conoce como el tipo TH2, caracterizada por altos niveles de interleukinas IL-4, IL-5 e IL-10, y de inmunoglobulinas IgG4 e IgE. También se incrementan los niveles de complejos inmunológicos circulantes, cuyo papel es aún poco conocido (Yarzabal *et al.*, 1983; Bradley *et al.*, 2005). Estudios sobre el papel que juegan las diferentes subclases de inmunoglobulinas (Ig) han identificado la IgG4 como un indicador de infección activa en oncocercosis (Ogunrinade *et al.*, 1992), tal como ha sido demostrado en filiarisis linfáticas. Sin embargo, la IgG1 puede estar más relacionada con un estado de transmisión actual en la comunidad; es decir, con la exposición de miembros de dicha comunidad a las larvas infectantes del parásito (Bradley *et al.*, 1993).

b) Respuesta inmune celular. En contraste a la respuesta humoral, en los individuos con infección patente, es decir, con microfilarias en piel, existe una disminución marcada de la respuesta inmune celular (linfocitos) frente a los antígenos de *O. volvulus*, que no se observa en individuos no infectados o con infección pre-patente (expuestos pero donde el parásito no ha alcanzado su madurez reproductiva). Las características de la intradermoreacción (luego de la inyección subcutánea de antígenos parasitarios)

sugieren que la respuesta de hipersensibilidad retardada (mediada por células), está asimismo suprimida (Arango *et al.*, 1983). La observación de que después de una dosis de tratamiento microfilaricida con ivermectina la proliferación celular se recupera (Soboslay *et al.*, 1992), sugiere que los antígenos liberados por las microfilarias son los responsables por la mayor parte de la depresión de la inmunidad celular. El mecanismo mediante el cual la respuesta inmune celular se encuentra afectada probablemente involucra la interleukina-10 (Cooper *et al.*, 1998). Los individuos calificados como putativos inmunes, no presentan depresión de la reacción de hipersensibilidad retardada, y demuestran una vigorosa proliferación celular frente a antígenos del parásito en comparación con aquellos con microfilarodermia. Asimismo, exhiben bajos niveles de IgG1, IgG4, e IgE (Elson *et al.*, 1995), y por tanto se ha considerado que la respuesta inmunológica de los putativos inmunes está, de alguna manera, polarizada hacia el tipo TH1. Está por demostrarse que esta respuesta protectora sea innata o adquirida.

c) La dicotomía TH1/TH2. La opinión prevaleciente ha sido que existen dos poblaciones separadas de linfocitos T-ayudadores, TH1 y TH2, las cuales se regulan mutuamente de manera inhibitoria. Una población de células ganará a expensas de la otra, con el resultado de que hay un desbalance en la razón de TH1/TH2 en la mayoría de las infecciones helmínticas hacia el tipo TH2 de respuesta. Las células TH1 son responsables principalmente de la respuesta inmune mediada por células, mientras que las células

TH2 elevan la producción de IgE, IgG4, y el nivel de eosinófilos (Maizels & Yazdanbakhs, 2003). Sin embargo, la descripción de la anergia en oncocercosis generalizada como un fenómeno meramente debido a una polarización hacia TH2 es actualmente considerada como una simplificación. Por una parte, investigaciones recientes han revelado la existencia de respuestas de hipersensibilidad retardada de tipo II, inducidas por reacciones dependientes de células del tipo TH2, pero con presentación clínica semejante a la hipersensibilidad retardada clásica. Hasta ahora, una respuesta normal de intradermoreacción frente a antígenos de *O. volvulus* había sido interpretada como una respuesta saludable del tipo TH1. Falta por determinar si la hipersensibilidad retardada en oncocercosis es mediada por TH1 o por TH2 (Hoerauf & Brattig, 2002). Por otra parte, la respuesta de los putativos inmunes es en realidad una respuesta mixta TH1/TH2, siendo interferón gamma (IFN- γ) e IL-5 las citoquinas predominantes entre los putativos inmunes. Los niveles de IgG3 también están elevados en los putativos inmunes en comparación con los individuos que padecen oncocercosis generalizada. Sin embargo, la relación entre IgG3 y TH1 no ha sido documentada. No está claro como una respuesta del tipo TH1 puede explicar inmunidad contra las larvas L3, el estadio contra el cual los putativos inmunes estarían reaccionando más vigorosamente. Modelos animales sugieren la mediación de TH2 frente a antígenos de larvas infectantes (Hoerauf & Brattig, 2002).

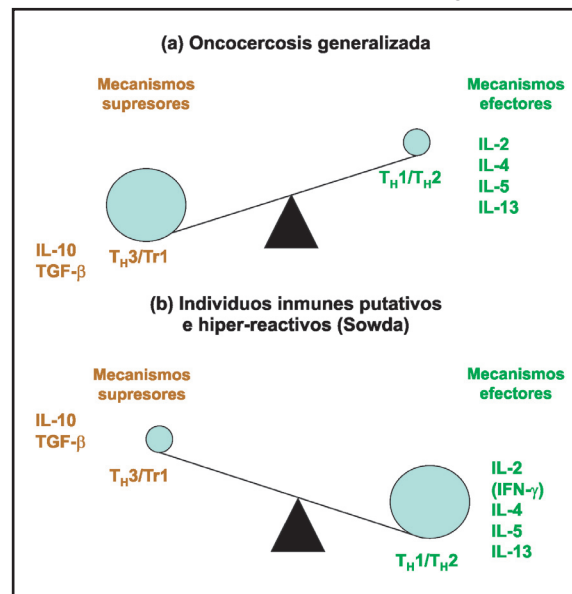
d) El papel de las células T-reguladoras. Otra línea de evidencia contra la mera dicotomía TH1/TH2 es el hecho de que luego de terapia microfilaricida con ivermectina, la recuperación de la proliferación celular mencionada anteriormente incrementa tanto la respuesta TH1 como la TH2, en lugar de inducir una simple cambio hacia TH1. En individuos con oncocercosis generalizada, el tratamiento con ivermectina también conduce a una reducción significativa de los niveles de IL-10. Se requiere además, de la neutralización de otra citoquina inmunosupresora, como el factor transformador de crecimiento celular beta (TGF- β).

La explicación de estas observaciones yacería en que en realidad, existe una tercera rama de células T-ayudadoras, la cual está asociada con la hipoproliferación celular ante antígenos parasitarios y que a su vez puede suprimir tanto la respuesta de tipo TH1 como TH2. Tanto la interleukina IL-10 como el TGF- β son producidas por células T-reguladoras (Doetze *et al.*, 2000). Se ha sugerido, en consecuencia, que la

respuesta inmunosupresora en oncocercosis crónica sea definida en términos de TH3/Tr1 (linfocitos T-ayudadores de tipo 3 o linfocitos reguladores de tipo 1), a fin de subrayar que la inmunodepresión observada en infecciones por helmintos requiere de un tercer tipo de respuesta, no-TH1 / no-TH2. La Fig. 13 resume el nuevo modelo de balance entre los mecanismos inmunológicos supresores y efectores en la oncocercosis. Como apuntamos anteriormente, la presencia de microfilarias es esencial para el mantenimiento de la inmunosupresión, ya que el tratamiento con ivermectina restablece la habilidad de montar una respuesta efectora que vuelve a suprimirse a medida que las microfilarias recolonizan la piel.

De una importancia aún mayor para la comprensión de la interacción entre la infección por *O. volvulus* y otros parásitos y patógenos, es la pregunta de si la respuesta celular, alterada por la oncocercosis, también está suprimida frente a otros antígenos. Esto conduciría a un estado de inmunodepresión generalizada que dejaría a los individuos con oncocercosis más susceptibles a otras infecciones,

Fig. 13. Modelo del balance entre mecanismos efectores y supresores en la respuesta inmunológica frente a la oncocercosis (Hoerauf & Brattig 2002)



En la oncocercosis generalizada (a), los mecanismos efectores dependientes de TH1 y TH2 están deprimidos por IL-10 y TGF-beta; se encuentran células T-reguladoras (Tr) específicas para *O. volvulus*. En los individuos putativamente inmunes (y en pacientes con la forma hiper-reactiva de Sowda) (b), prevalecen los mecanismos efectores dependientes de TH1 y TH2, conduciendo al ataque inmunológico dirigido hacia larvas L3 (en los inmunes putativos) o microfilarias (pacientes con Sowda). IL: interleukina; IFN- γ : interferón gamma; TH: células T-ayudadoras; Tr1: células T-reguladoras; TGF- β : factor de transformación de crecimiento celular beta.

o incapaces de seroconvertir exitosamente luego de ser vacunados. Una respuesta disminuida tanto en lo celular como en lo humoral frente a la vacunación con el toxoide tetánico se ha observado en pacientes con oncocercosis (Cooper *et al.*, 1998), pero la respuesta humoral permanece inalterada frente a la vacunación contra la rubéola, o con el bacilo de Calmette-Guérin (BCG) contra la tuberculosis (Kilian & Nielsen 1989).

TRATAMIENTO Y CONTROL

PERCEPCIÓN DEL PROBLEMA POR LOS YANOMAMI

La percepción de la enfermedad es un aspecto complejo, en particular cuando se trata de un pueblo indígena como el Yanomami, que permaneció relativamente aislado hasta hace poco tiempo. Son diversas las investigaciones antropológicas realizadas en el ámbito de salud de las comunidades Yanomami, tanto en Brasil como en Venezuela. Se expondrá aquí el análisis realizado por Lizot (2001), por referirse en su ensayo de manera particular a la oncocercosis y a los pueblos indígenas Yanomami que habitan la región del Alto Orinoco. De acuerdo con este autor, las interpretaciones Yanomami asociadas con los síntomas de la oncocercosis, están ubicadas en la teoría general de las enfermedades elaborada por ellos. Según dicha teoría, las enfermedades tienen causas sobrenaturales o mágicas y sólo los shamanes son capaces de tratarlas en un contexto tradicional (Lizot, 2001). Sin embargo, de acuerdo a la teoría Yanomami sobre el origen de las enfermedades, la acción del médico occidental y la del shaman Yanomami no entran en conflicto, son complementarias. Este elemento es de gran importancia para la concepción e implementación de acciones encaminadas a mejorar la salud del pueblo Yanomami.

Para Lizot, los síntomas asociados con la oncocercosis no se ubican, sino de manera aislada, en el sistema de representaciones del sistema salud-enfermedad de los Yanomami. Este autor señala, que a pesar de que los Yanomami no tienen un vocablo para designar la oncocercosis, poseen una interpretación parcial para cada uno de los síntomas correspondientes, que no están asociados entre sí. También poseen vocablos específicos para designar no sólo a los jevenes vectores en general, sino a las distintas especies en particular (como se describió anteriormente), aunque estas descripciones no se

asocian, obviamente, a la presencia de la enfermedad. En el caso de los nódulos, éstos se designan con un término genérico no específico. En la parte del foco amazónico que corresponde a Venezuela, se utiliza la palabra *shimokore*, que designa tumoraciones de tamaño pequeño. En Brasil y en Parima, se ha referido el uso del término *ōrã*, que designa “chichones” o quistes de mayor tamaño que el de los nódulos oncocercósicos. A pesar de que los nódulos son considerados manifestaciones benignas y los Yanomami no tienen explicación alguna acerca de sus causas, son motivo de vergüenza para los sujetos portadores de los mismos (Lizot, 2001).

Con respecto a ciertos efectos visibles de la oncocercosis, como el aspecto apergaminado de la piel y las lesiones que aparecen en estadios más avanzados de la enfermedad, estas son interpretadas como consecuencia del uso de *hëri*, el cual es un término genérico que agrupa la utilización de una gran variedad de sustancias mágicas que afectan la salud de la persona que es víctima del ataque shamánico. Lizot afirma que sólo dos sustancias se pueden relacionar con la oncocercosis: el uso del *kramosi* y el uso del *nashi kosiki*. El *kramosi* se refiere a las escamas de una mariposa nocturna (polilla), y el *nashi kosiki* es una planta no identificada. En relación con el prurito o picazón característicos de la oncocercosis, los Yanomami usan el nombre genérico de *shihiti*, usado para todas las irritaciones cutáneas que provocan picazón, pero que nunca se atribuyen al uso del *hëri* (Lizot, 2001).

MÉTODOS PARA EL CONTROL Y ELIMINACIÓN DE LA ONCOCERCOSIS

Control por nodulectomía

Entre las medidas usadas contra el parásito, se encuentra la nodulectomía, que consiste en remover los nódulos, particularmente de la cabeza. Se considera una estrategia para el tratamiento de los individuos infectados, ya que los gusanos contenidos en ellos pueden producir altas concentraciones de microfilarias cerca de los ojos, incrementando el riesgo de lesiones oculares (Fuglsang & Anderson, 1977). Esta observación, originó la creación de las brigadas de nodulectomías desde el año 1928 en Guatemala y México, las cuales siguen siendo un componente importante de las campañas de control en estos países. Sin embargo, la nodulectomía aislada, se considera insuficiente como estrategia efectiva porque sólo una proporción de los gusanos adultos vive en

nódulos palpables. El impacto de estas campañas en la transmisión ha sido controversial y se ha planteado la necesidad de su evaluación a través de estudios epidemiológicos. El uso de modelos matemáticos ha permitido analizar su beneficio cuando se aplica en conjunto con la distribución de ivermectina (Basáñez & Ricardez-Esquinca, 2001).

Control de vectores

Las medidas de control vectorial están dirigidas básicamente a las larvas de *Simulium*. En África occidental el programa de control, iniciado en 1975 y concluido en el 2002, se basó principalmente en la aplicación aérea semanal de insecticidas sobre los criaderos de *Simulium damnosum*. Este programa logró reducir la transmisión a casi cero en 90% de área endémica de sabana (unos 600.000 km²). En las áreas selváticas el impacto fue más limitado (Davies 1994). En América Latina, el control vectorial ha sido intentado en Guatemala; este fue llevado a cabo en un área de 93.1 km² durante un período de seis años y las tasas de picada de *S. ochraceum* fueron reducidas a menos de 2/persona/hora (Ochoa *et al.*, 1997). A pesar de esto, se han señalado los altos costos de las operaciones y su impracticabilidad en áreas donde las comunidades se encuentran dispersas en pendientes empinadas. En las áreas de selva de América del Sur, los métodos larvicidas no son prácticos por el costo que implica su uso tanto en los grandes ríos, como en los más pequeños, numerosos e inaccesibles ríos cerca de comunidades que se encuentran dispersas en la selva.

Control por quimioterapia

a) Dietilcarbamazina y suramina: limitaciones para su uso. Los agentes quimio-terapéuticos disponibles hasta finales de la década de los ochenta fueron la dietilcarbamazina (DEC) y la suramina sódica, siendo la primera una droga microfilaricida y la segunda de acción macrofilaricida. Las limitaciones asociadas con el régimen de tratamiento, y los efectos secundarios severos que su administración provoca, impidieron continuar con el uso de estas drogas en campañas masivas de control de la oncocercosis. En la actualidad la droga de elección para el tratamiento comunitario es la ivermectina.

b) Ivermectina: efecto sobre la morbilidad y la transmisión. La ivermectina es una lactona macrocíclica que causa parálisis en muchos nemátodos y artrópodos. Fue usada en el área de salud veterinaria por muchos años hasta que en 1982, se demostró que era efectiva en la oncocercosis humana (Aziz *et al.*,

1982), y finalmente fue incluida en programas de control a gran escala a partir de 1988. La ivermectina mata las microfilarias en piel y evita su liberación del útero de la hembra adulta. A dosis orales de 150 µg/kg de peso la droga es segura y reduce el número de microfilarias a niveles muy bajos por al menos un año con reacciones oftalmológicas mínimas (Dadzie *et al.*, 1987). Los criterios de exclusión para la administración de ivermectina (recomendados por los fabricantes) incluyen: mujeres embarazadas, mujeres amamantando en la primera semana después del parto, niños menores de cinco años o con menos de 15 kg de peso y personas en malas condiciones de salud o con enfermedades del sistema nervioso central (Goa, 1991). Los efectos adversos reportados con mayor frecuencia después de las primeras administraciones de ivermectina son reacciones cutáneas, incluyendo prurito, dolores músculo-esqueléticos, fiebre, edema de cara, articulaciones y miembros, dolores de cabeza y vértigo, linfadenopatía, y reacciones oculares, así como, en raras ocasiones, hipotensión postural. Estos efectos son normalmente leves y autolimitados (Zea-Flores *et al.*, 1992).

La distribución masiva de ivermectina es la estrategia de intervención fundamental dentro de los programas de control actuales, por lo que es importante discutir la evidencia de su efecto sobre la morbilidad y la transmisión de la oncocercosis para el logro de los objetivos de la iniciativa regional.

Con respecto a la morbilidad ocular, el tratamiento con ivermectina ha resultado en la regresión de lesiones tempranas y avanzadas del segmento anterior del ojo, mientras su impacto sobre las lesiones del segmento posterior es menos marcado (Ejere *et al.*, 2005). A pesar de que se ha reportado mejoría de la agudeza visual en estudios longitudinales (Emukah *et al.*, 2004), no existe todavía evidencia sobre cambios significativos en la misma en ensayos clínicos controlados (Ejere *et al.*, 2005). En relación con su efecto sobre las lesiones de piel y el prurito asociado, la evidencia no es concluyente. No obstante, hay estudios que demuestran una reducción en la prevalencia y severidad de los signos agudos, principalmente erupciones papulares (Brieger *et al.*, 1998). También se ha reportado disminución de la severidad de signos crónicos como liquenificación, atrofia e incluso inglete colgante (Burnham, 1995). Actualmente, se reconoce que la estrategia de control con ivermectina ha tenido un impacto beneficioso en las comunidades en términos de la morbilidad

asociada a oncocercosis (Tielsh & Beeche, 2004). Ya que la ivermectina es principalmente microfilaricida, se espera, después de tratamientos regulares, un impacto importante sobre la capacidad del reservorio humano de microfilarias de infectar al vector.

La evidencia más convincente acerca del impacto de la ivermectina sobre la transmisión procede de los estudios hechos en Guatemala, donde se demostró la reducción en el potencial de transmisión en ciertas localidades, y en Ecuador donde se demostró interrupción de la transmisión. Estos estudios indican que si la cobertura de la población es alta; el tratamiento se distribuye dos veces por año; el área tratada es grande, y el vector es relativamente poco eficiente (ej. *S. ochraceum* en Guatemala y *S. quadrivittatum* en Ecuador), entonces la ivermectina puede reducir la transmisión efectivamente (Collins *et al.*, 1992; Cupp *et al.*, 1992; Guderian *et al.*, 1997). Aún cuando las coberturas sean bajas (ej. 30%), la reducción en el reservorio de microfilarias ha resultado en una reducción proporcional en la intensidad de transmisión por *S. damnosum* (Chavasse *et al.*, 1995), si bien no en su interrupción. La disminución de la población de microfilarias de *O. volvulus* en áreas tratadas repetidamente con ivermectina, puede explicarse por el efecto microfilaricida de la droga, reforzado por el efecto acumulativo que dosis repetidas tienen sobre la fecundidad de las hembras adultas (Duke *et al.*, 1991). También se ha demostrado, que se logra una reducción notable en la prevalencia e intensidad de microfilarias en niños no tratados, a pesar de coberturas promedio por debajo de 60% y alta competencia de vectores locales (Boussinesq *et al.*, 1997).

La revisión y análisis de datos después de 10-12 años de tratamiento masivo con ivermectina en África occidental, demuestra que si bien esta intervención ha sido exitosa para eliminar la oncocercosis como problema de salud pública, no conducirá a la eliminación de la transmisión (Borsboom *et al.*, 2003). En América Latina, la efectividad de la ivermectina en la interrupción de la transmisión dependerá del nivel de endemidad inicial en el foco y de la competencia y capacidad vectorial de los simúlidos responsables por la transmisión, entre otros factores. Por ejemplo, en el foco amazónico se prevé que la distribución bianual de ivermectina tenga un mayor impacto sobre la transmisión en aquellas áreas donde predomina *S. oyapockense* que en aquellas donde prevalezca *S. guianense*. Estos argumentos entomológicos, sin embargo, no consideran la posibilidad de un efecto pronunciado del tratamiento

sobre la biología reproductiva del parásito que redunde en una alta proporción de vermes hembra no fecundadas o incapaces de producir microfilarias (Cupp *et al.*, 2004).

Aparte de su uso para controlar la oncocercosis, la ivermectina tiene otros beneficios como el efecto sobre los helmintos intestinales, en particular *Ascaris lumbricoides* y *Strongyloides*. Este efecto es de importancia en los programas de control ya que la expulsión de gusanos es uno de los beneficios percibidos con mayor frecuencia por las comunidades. La ivermectina también tiene efecto sobre ciertas ectoparasitosis como la escabiosis y pediculosis (Tielsh & Beeche, 2004).

IMPLEMENTACIÓN DEL CONTROL DE LA ONCOCERCOSIS EN EL FOCO AMAZÓNICO

El programa de Eliminación de la Oncocercosis en las Américas (OEPA)

Sobre la base de la disponibilidad de ivermectina en forma gratuita (donada bajo la marca de Mectizan® por Merck & Co.), la posibilidad de eliminación de la oncocercosis en algunos focos, y el apoyo financiero internacional, la Conferencia Interamericana de Oncocercosis (IACO) urgió, en 1991, a la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y a los ministros de salud de los países endémicos de la región a proveer la droga a las poblaciones a riesgo de infección. A partir de ese momento, se crea la OEPA y bajo sus auspicios se desarrollan y/o fortalecen los programas de control en los seis países endémicos. El objetivo primordial de la OEPA es el de la eliminación de la enfermedad como problema de salud pública, y la extinción local del parásito en focos específicos (Blanks *et al.*, 1998).

Para alcanzar estos objetivos, la estrategia actual es la distribución comunitaria de ivermectina dos veces por año con una cobertura no inferior al 85% de población elegible y por un período estimado en 14 años, el cual corresponde a la suma de la duración promedio de la vida reproductiva de la hembra adulta de *O. volvulus* más la longevidad de las microfilarias. Algunos autores han señalado que este período podría acortarse si aplicaciones repetidas del fármaco tienen una acción macrofilaricida y embriostática irreversible (Cupp *et al.*, 2004).

Control de la oncocercosis en el foco amazónico

En Venezuela, el Programa Nacional de

Eliminación de Oncocercosis, dirigido tanto a los focos del norte como al foco sur, sigue los lineamientos estratégicos de la OEPA y los componentes programáticos son desarrollados de acuerdo a las características epidemiológicas propias de cada uno de los focos.

Durante comienzos de la década de los noventa, y específicamente durante 1992 el CAICET comenzó la coordinación de la administración de ivermectina en las comunidades hiperendémicas de Niyayowë-theri (área de Parima B), y Coyowë-theri (área de Orinoquito), y sus alrededores. Desde 1995, y con el fin de conocer la verdadera extensión del foco sur y estratificar el área en zonas de distintos niveles de endemidad, se realizaron evaluaciones epidemiológicas cubriendo gradientes altitudinales y ecológicos a lo largo de los ríos de las cuencas del Siapa, Ocamo-Putaco, Orinoco-Orinoquito, Padamo y Mavaca. A partir del año 2000 se inició la distribución de ivermectina en un mayor número de comunidades. Sin embargo, no es sino hasta el 2004 que la distribución de ivermectina se realiza a una mayor escala. Desde entonces y hasta la fecha, OEPA ha apoyado financieramente la implementación del Programa Nacional de Eliminación de la Oncocercosis en el foco Sur de Venezuela.

El organigrama funcional actual del programa, establece la existencia de una Comisión Nacional de Control de la Oncocercosis (integrada por representantes del Ministerio de Salud (MS), OPS, Instituto de Biomedicina y CAICET) dependiente del MS. El programa del foco sur es coordinado por el CAICET, en estrecha relación con la Dirección Regional de Salud del Estado Amazonas, el Plan de Salud Yanomami y el Distrito Sanitario del Alto Orinoco, que se responsabilizan de la distribución de ivermectina a través de la red ambulatoria. Los componentes programáticos implementados en el foco sur se reseñan a continuación.

a) Evaluaciones epidemiológicas rápidas. Tienen como propósito la estratificación del área endémica, realizadas en comunidades sospechosas con la finalidad de conocer su nivel de endemidad. En el foco sur están dirigidas al grupo indicador, compuesto por las personas mayores de 15 años de edad presentes en la comunidad (Vivas Martínez *et al.*, 2000b). El diagnóstico se realiza mediante biopsias de piel. Al término de la evaluación la comunidad se clasifica, de acuerdo a su prevalencia, en un determinado nivel de endemidad siguiendo los criterios de la

OEPA (OEPA 1996). La población total Yanomami comprende más de 200 comunidades en el foco sur de Venezuela. La población blanco a ser tratada se estima en unas 6.700 personas, con unas 5.300 personas adicionales que habitan en áreas lejanas de difícil acceso y que por ahora no están incorporadas al programa. La estratificación epidemiológica realizada hasta el momento, arroja 115 comunidades endémicas para una población total censada de 5.542 personas y una población elegible de 5.125. De las 115 comunidades clasificadas como endémicas 64 habían sido consideradas sospechosas, confirmando su condición de endémicas por biopsia cutánea. El resto fueron evaluadas por mapeo epidemiológico rápido usando inicialmente como indicador la altitud y más recientemente un Sistema de Información Geográfica. Como se describió en la sección 2.3 un 60% de las comunidades son hiperendémicas. La estratificación del foco aún requiere ser completada, pero la delimitación de áreas de riesgo hace suponer que la mayoría de las comunidades en esa área serán hiperendémicas.

b) Distribución masiva de ivermectina. Constituye la estrategia de intervención del programa de eliminación. Se trata con ivermectina, cada 6 meses, a todas aquellas personas elegibles que viven en áreas endémicas. Durante la distribución deben seguirse los criterios de exclusión del medicamento (sección 7.2.3b). El uso de ivermectina está asociado a una moderada reacción secundaria (reacción de Mazzotti) en aproximadamente 10% a 30% de las personas tratadas por primera vez. Esta ocurre entre los dos o tres primeros días después del tratamiento y se resuelve espontáneamente en el mayor número de los casos (Zea-Flores *et al.*, 1992). Los efectos pueden tratarse con la administración simultánea de medicamentos esteroideos o antihistamínicos. Los datos del programa del foco sur muestran que desde el año 1992 se han distribuido 29.301 tratamientos, alcanzándose las cifras de cobertura más altas en el año 2004 con 57,8% de cobertura sobre la población elegible para tratamiento, abarcando al 61,74% de las comunidades endémicas, pero sólo a 27,8% de ellas con coberturas superiores al 85%.

c) Evaluaciones epidemiológicas en profundidad (EEP). Se realizan en un número determinado de comunidades generalmente hiperendémicas, llamadas centinelas, que van a ser objeto de seguimiento longitudinal durante el programa y en las cuales se recolecta regularmente información sobre indicadores oftalmológicos (tasas de prevalencia de morbilidad ocular, ver sección 3.2), parasitológicos (tasas de

prevalencia e intensidad de infección) y entomológicos (tasas de picada, de infección, y de infectividad de los simúlidos con larvas de *O. volvulus* para medir el potencial de transmisión) que serán usados como indicadores para medir el impacto del tratamiento con ivermectina. Las EEP deben realizarse antes del tratamiento, a los dos años y posteriormente a intervalos de cuatro años y están dirigidas a todos los grupos de edad.

En el foco sur fueron seleccionadas 8 comunidades centinelas: Hasupiwei-theri, Pashopeka-theri, Awei-theri, Coyowë-theri, Niyayowë-theri, Matoa-theri, Fubalema-theri (hoy denominada Waharafita) y Shiauca-theri. Se han realizado EEP en dos ocasiones, en 1998 y en 2001. También se cuenta con información basal de las comunidades de Sierra Parima del año 1981 (Yarzabal *et al.*, 1985a). Las comunidades centinela en el foco sur, muestran prevalencias de infección por microfilarias entre 63% y 84%, y cargas microfilarias comunitarias (CMFL) ente 7 y 45 mf/biopsia. A pesar que la mayoría de

las coberturas comunitarias no han alcanzado aún la meta fijada de 85% de la población elegible, se ha observado un impacto importante sobre la prevalencia e intensidad de la oncocercosis. En Niyayowë-theri por ejemplo, la prevalencia de microfilarias disminuyó desde un 74% en 1981, hasta un 60% en 1998, y hasta un 20% en 2001 para una reducción porcentual total del 73% luego de 8 rondas de tratamiento; el promedio aritmético de microfilarias por biopsia de piel (en todas las edades) se redujo en un 94% (Fig. 14). d) Componentes de información y educación para la salud. El sistema de información resulta clave para el seguimiento de las actividades desarrolladas por el programa. Este incluye la creación del SIG. El segundo componente es el de educación para la salud, el cual se ha desarrollado a partir de las necesidades locales. En el foco sur las actividades están dirigidas a la formación de personal profesional, técnico, y a capacitación de agentes de salud, que incluye un componente específico de entrenamiento de auxiliares de medicina simplificada Yanomami. Además se han producidos sobre la oncocercosis y las actividades del

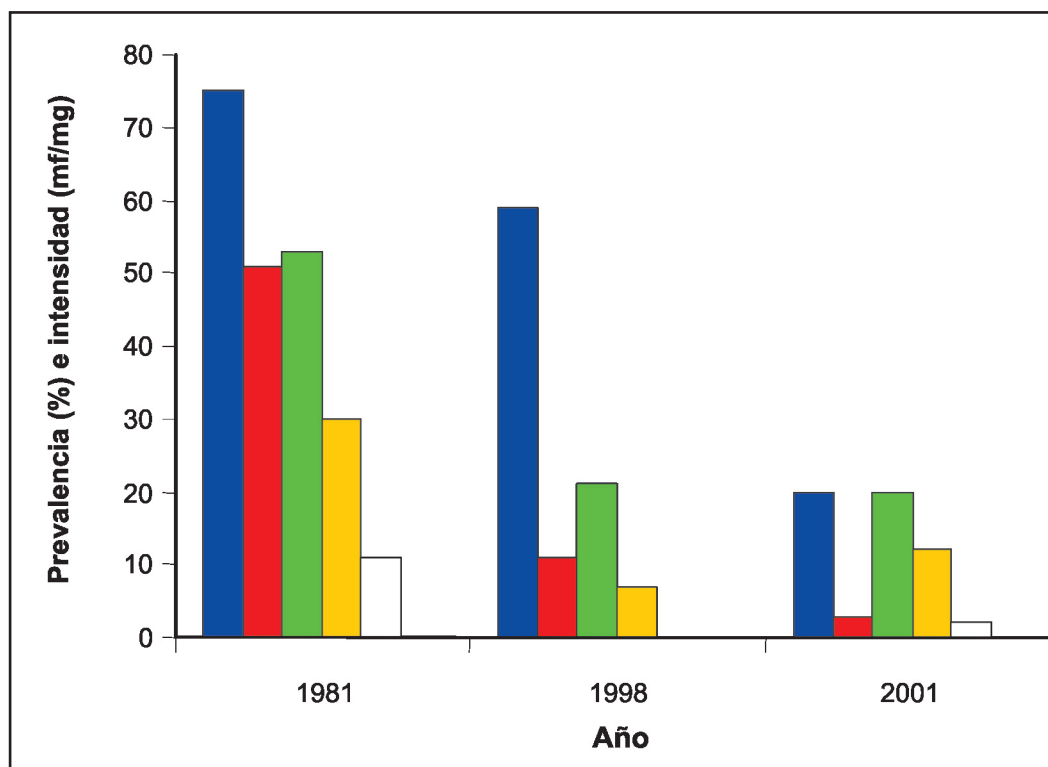


Fig. 14. El impacto de tratamiento con ivermectina sobre la prevalencia de microfilarias en piel (barras azules), el promedio aritmético microfilariano en todas las edades (barras rojas), la prevalencia de lesiones oculares (barras verdes), la prevalencia de queratitis punteada (barras amarillas), y la prevalencia de microfilarias en cámara anterior del ojo (barras blancas) en la comunidad centinela de Niyayowë-theri, foco sur de Venezuela.

programa como material educativo para el personal de salud.

DIRECCIONES FUTURAS

Epidemiología

En la implementación del programa del foco sur, el SIG deberá jugar un papel de importancia creciente, no sólo para completar la estratificación de comunidades y producir mapas de riesgo, sino también para monitorear los cambios de endemicidad en el tiempo y en el espacio que resulten de la estrategia de intervención, y de la movilidad propia de los Yanomami. En la identificación de las áreas de riesgo será crucial localizar los criaderos de las principales especies de simúlidos vectores, y en particular los de *S. guianense*, así como el rango de vuelo y los patrones de dispersión y migración de esta especie. La movilidad tanto de humanos como de vectores es un componente fundamental asociado a la transmisión y su control. La cuantificación de estos componentes constituyen insumos para el modelaje matemático de la biología poblacional del parásito y para predecir la duración de los programas (Winnen *et al.*, 2002).

Los sistemas de vigilancia epidemiológica requerirán del monitoreo de población no tratada (a fin de estimar el beneficio comunitario indirecto de las medidas de control, o la contribución a la transmisión de estas personas), y en particular de la medición de la incidencia (aparición de nuevos casos) en niños ≤ 5 años. Para esto se requiere de métodos que permitan detectar infecciones tempranas y pre-patentes, por lo que el desarrollo de pruebas basadas en la detección de antígenos parasitarios es una de las metas de la iniciativa regional. Idealmente, estas pruebas deberán ser poco invasivas y de lectura directa en el campo, tal como las tarjetas inmunocromatográficas (Weil *et al.*, 2000). Se ha postulado que la utilización de moscas (núlparas) en pruebas de xenodiagnóstico (donde se alimenta a los vectores sobre personas que se sospecha estén infectadas) podría facilitar la identificación de personas que continúan contribuyendo a la transmisión en áreas tratadas, en las cuales la biopsia cutánea ha perdido sensibilidad o no es bien recibida (Davies *et al.*, 1997).

Como parte del sistema de vigilancia epidemiológica es recomendable establecer un

banco de muestras parasitológicas en las que puedan detectarse cambios genéticos en la población del parásito como producto de presiones selectivas por el tratamiento con ivermectina, cuando haya marcadores confiables de dicha selección.

Control

En relación a las nuevas terapias que se piensa puedan usarse en conjunción o en reemplazo de la ivermectina, y a falta de una droga macrofilaricida eficaz y segura para tratamiento masivo, están la moxidectina, y la terapia antibiótica contra las rickettsias (*Wolbachia*) endosimbióticas del parásito. La moxidectina ejerce un efecto microfilaricida más pronunciado y prolongado que el de la ivermectina, y podría usarse en áreas sin tratamiento previo a fin de lograr interrumpir la transmisión en un plazo más corto. Sin embargo, se prevé, que debido a la semejanza de su estructura química con la de la ivermectina, no constituirá una alternativa de tratamiento en caso de detectarse resistencia. La terapia antibiótica se basa en el hecho, recientemente investigado, de que las bacterias endosimbióticas participan en la actividad reproductiva y longevidad del parásito, las cuales se ven seriamente afectadas al eliminar dichas rickettsias. Sin embargo, los regímenes de tratamiento son prolongados (6 semanas con 100 mg diarios de doxiciclina), y se estima que su mayor utilidad será en las etapas finales de los programas, a fines de eliminar los últimos vestigios de infección en individuos que puedan identificarse y tratarse selectivamente (Hoerauf *et al.*, 2003).

AGRADECIMIENTOS

Los estudios en el foco amazónico de oncocercosis fueron realizado por los autores con ayuda financiera del FONACIT (previamente CONICIT), la OPS, el Consejo Británico, el Wellcome Trust, y el Medical Research Council. Agradecemos el apoyo brindado por la OEPA, el Distrito Sanitario del Alto Orinoco, la Dirección Regional de Salud del Estado Amazonas, y las Misiones del Alto Orinoco.

Human onchocerciasis in the Amazonian focus

SUMMARY

In this article we describe human onchocerciasis affecting Yanomami people in the

Amazonian focus of southern Venezuela and review recent knowledge about the disease and its control. The epidemiology of this parasitic infection (caused by *Onchocerca volvulus* and transmitted by *Simulium* vectors), is highly dependent on the environmental and entomological characteristics prevalent in the region, which are in turn determined by altitudinal, vegetational and geological gradients. Similarly, sociocultural and demographic characteristics of the Yanomami people play an important role in the exposure to the vector and the transmission levels of the parasite. Communities with higher infection intensity and transmission (hyperendemic) are located at higher altitudes, characterized by high parasite burden, ocular and dermatological lesions, and additionally a deep suppression of the immunological response to parasite antigens. The proportion of hyperendemic communities reaches 60% of communities stratified so far; however, risk maps using geographical information systems suggest that this proportion may be higher. The onchocerciasis elimination programme is based on mass ivermectin distribution twice a year to at least 85% of the eligible population. Despite difficulties in achieving this goal, mainly caused by the remoteness of the communities, the impact of several rounds of treatment is an improvement on the parasitological and clinical indicators in the Yanomami population included in the programme. Finally, we discuss recent guidelines of epidemiological surveillances of the disease and describe new therapeutical approaches for onchocerciasis control.

Key Words: onchocerciasis, Venezuela, Amazon, yanomami, epidemiology, control programme.

REFERENCIAS

Arango M., Lugo E., Ouaisi A., Des Moutis I., Capron A. & Yarzabal L. (1983). Asociación de antigenemia con depresión de la hipersensibilidad cutánea retardada en la oncocercosis. pp. 101–108. En: *Las Filarias Humanas en el Territorio Federal Amazonas, Venezuela*. Eds. Yarzabal L., Holmes R., Basáñez M. G., Petralanda I., Botto C., Arango M. & Schkolnik S. Publ. Cient. No. 2, PROICET Amazonas, Caracas, Venezuela.

Aziz M. A., Diallo S., Diop I. M., Lariviere M. & Porta M. (1982). Efficacy and tolerance of ivermectin in human onchocerciasis. *Lancet*. **2(8291)**:171–173.

Basáñez M. G. & Ricárdez-Esquinca J. (2001). Models for the population biology and control of human onchocerciasis. *Trends Parasitol.* **17**: 430–438.

Basáñez M. G., Yarzabal L., Takaoka H., Suzuki H., Noda S. & Tada I. (1988). The vectorial role of several blackfly species (Diptera: Simuliidae) in relation to human onchocerciasis in the Sierra Parima and Upper Orinoco regions of Venezuela. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **82**: 597–611.

Basáñez M. G., Remme J. H. F., Alley E. S., Bain O., Shelley A. J., Medley G. F. & Anderson R. M. (1995). Density-dependent processes in the transmission of human onchocerciasis: relationship between the numbers of microfilariae ingested and successful larval development in the simuliid vector. *Parasitology*. **110**: 409–427.

Basáñez M. G., Yarzabal L., Frontado H. L. & Villamizar N. J. (2000). *Onchocerca-Simulium* complexes in Venezuela: can human onchocerciasis spread outside its present endemic areas? *Parasitology*. **120**: 143–160.

Basáñez M. G., Collins R. C., Porter C. H., Little M. P. & Brandling-Bennett D. (2002). Transmission intensity and the patterns of *Onchocerca volvulus* infection in human communities. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **67**: 669–679.

Blanks J., Richards F., Beltrán F., Collins R., Álvarez E., Zea-Flores G. *et al.* (1998). The Onchocerciasis Elimination Program for the Americas: a history of partnership. *Pan Am. J. Public Health*. **3**: 367–374.

Boatin B. A., Toé L., Alley E. S., Nagelkerke N. J., Borsboom G. & Habbema J. D. (2002). Detection of *Onchocerca volvulus* infection in low prevalence areas: a comparison of three diagnostic methods. *Parasitology*. **125**: 545–552.

Borsboom G. J. J., Boatin B. A., Nagelkerke N. J. D., Agoua H., Akpoboua K. L. B., Soumbe Alley E. *et al.* (2003). Impact of ivermectin on onchocerciasis transmission: assessing the empirical evidence that repeated ivermectin mass treatments may lead to elimination/eradication in West-Africa. *Filaria J.* **2**: 8.

Botto C., Arango M., Sampson L., Belmonte P., Ayesta C. & Yarzabal L. (1985). Influencia de

- los métodos de fijación en el diagnóstico de la microfilaremia en la oncocercosis. pp. 113–124. En: *La Oncocercosis en América*. Eds. Yarzabal L., Allan R. & Botto C. Publ. Cient. No. 3. PROICET Amazonas, Caracas, Venezuela.
- Botto C., Planchart S., Martínez N., Castro, L., Gelrud A., Vivas L. & Grillet M. E. (1997). Onchocerciasis hyperendemic in the Unturán mountains: an extension of the endemic region in southern Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**: 150–152.
- Botto C., Gillespie A. J., Vivas-Martínez S., Martínez N., Planchart S., Basáñez M. G. & Bradley J. E. (1999). Onchocerciasis hyperendemic in the Unturán mountains: the value of recombinant antigens in describing a new transmission area in southern Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **93**: 25–30.
- Botto C., Basáñez M. G., Vivas-Martínez S., Escalona M., Villamizar N., Frontado H. *et al.* (2000). *Onchocerciasis in the southern focus of Venezuela: intensity of transmission and ocular morbidity*. XVth Int. Congress for Trop. Med. and Malaria, Cartagena de Indias, 20-25 August 2000.
- Botto C., Escalona E., Vivas-Martínez S., Behm V., Delgado L. & Coronel P. (2005a). Geographical patterns of onchocerciasis in southern Venezuela: relationship between environment and infection prevalence. *Parassitologia*. **47**: 145–150.
- Botto C., Barrera R., Suárez L., Grillet M. E., Behm V., Delgado L. *et al.* (2005b). *Epidemiología del paisaje y transmisión de la oncocercosis en el foco sur de Venezuela*. XVII Congreso de la Federación Latinoamericana de Parasitología, Mar del Plata, Argentina, 23–26 de Noviembre 2005.
- Boussinesq M., Prod'hon J. & Chippaux J. P. (1997). *Onchocerca volvulus*: striking decrease in transmission in the Vina valley (Cameroon) after eight annual large scale ivermectin treatments. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**: 82–86.
- Bradley J. E., Whitworth J. & Basáñez M. G. (2005). Onchocerciasis. En: *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. vol. Parasitology. Eds. Wakelin D., Cox F. E. G., Despommier D. & Gillespie S., 10^a ed., Edward Arnold Publishers, Ltd. London, UK.
- Bradley J. E., Trenholme K., Gillespie A., Guderian R., Titanji V., Karam M. & McReynolds L. (1993). A cocktail of recombinant antigens provide a sensitive serodiagnostic test for onchocerciasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **48**: 198–204.
- Bradley J. E., Athogo B. M., Elson L., Stewart G. R. & Boussinesq M. (1998). A cocktail of recombinant *Onchocerca volvulus* antigens for serologic diagnosis with the potential to predict the endemicity of onchocerciasis infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **59**: 877–882.
- Brieger W. R., Awedoba A. K., Eneanya C. I., Hagan M., Ogbuagu K. F., Okello D. O. *et al.* (1998). The effects of ivermectin on *Onchocercal* skin disease and severe itching: results of a multicentre trial. *Trop. Med. Int. Health*. **3**: 951–961.
- Burnham G. (1995). Ivermectin treatment of *Onchocercal* skin lesions: observations from a placebo-controlled, double-blind trial in Malawi. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **52**: 270–276.
- Cabrera Z. & Parkhouse R. M. E. (1987). Isolation of an antigenic fraction for diagnosis of onchocerciasis. *Parasite Immunol.* **9**: 39–48.
- Cabrera Z., Parkhouse R. M. E., Forsyth K., Gómez-Priego A., Pabón R. & Yarzabal L. (1989). Specific detection of human antibodies to *Onchocerca volvulus*. *Trop. Med. Parasitol.* **40**: 454–459.
- Carabin H., Escalona M., Marshall C., Vivas-Martínez S., Botto C., Joseph L. & Basáñez M. G. (2003). Prediction of community prevalence of human onchocerciasis in the Amazonian focus: Bayesian approach. *Bull. World Health Organ.* **81**: 482–490.
- Chavasse D. C., Whitworth J. A., Lemoh P. A., Bennett S. & Davies J. B. (1995). Low level ivermectin coverage and the transmission of onchocerciasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **89**: 534–537.
- Collins R. C., Brandling-Bennett A. D., Hollman R. B., Campbell C. C. & Darsie R. F. (1980). Parasitological diagnosis of onchocerciasis: comparison of incubation media and incubation times for skin snips. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **29**: 35–41.

- Collins R. C., Gonzalez-Peralta C., Castro J., Zea-Flores G., Cupp M. S., Richards F. O. & Cupp E. W. (1992). Ivermectin: reduction in prevalence and infection intensity of *Onchocerca volvulus* following biannual treatments in five Guatemalan communities. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **47**: 156–169.
- Cooper P. J., Proaño R., Beltrán C., Anselmi M. & Guderian R. H. (1995). Onchocerciasis in Ecuador: ocular findings in *Onchocerca volvulus* infected individuals. *Br. J. Ophthalmol.* **79**: 157–162.
- Cooper P. J., Espinel I., Paredes W., Guderian R. H. & Nutman T. B. (1998). Impaired tetanus-specific cellular and humoral responses following tetanus vaccination in human onchocerciasis: a possible role for interleukin-10. *J. Infect. Dis.* **178**: 1133–1138.
- Cupp E. W., Ochoa J. O., Collins R. C., Cupp M. S., Gonzalez-Peralta C., Castro J. & Zea-Flores G. (1992). The effects of repetitive community-wide ivermectin treatment on transmission of *Onchocerca volvulus* in Guatemala. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **47**: 170–180.
- Cupp E. W., Duke B. O. L., Mackenzie C. D., Guzmán J. R., Vieira J. C., Méndez-Galván J. *et al.* (2004). The effects of long-term community level treatment with ivermectin (Mectizan) on adult *Onchocerca volvulus* in Latin America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **7**: 602–607.
- Dadzie K., Bird A. C., Awadzi K., Schulz-Key H., Gilles H. M. & Aziz M. A. (1987). “Ocular findings in a double-blind study of ivermectin versus diethylcarbamazine versus placebo in the treatment of onchocerciasis”. *Br. J. Ophthalmol.* **71**: 78–85.
- Davies J. B. (1994). Sixty years of onchocerciasis vector control: a chronological summary with comments on eradication, reinvasion, and insecticide resistance. *Ann. Rev. Entomol.* **39**: 23–45.
- Davies J. B., Luján R., López-Martínez L. A., Paniagua-Alvarez A. J., Morales-Hernández B. E. & Sherlock K. (1997). Assessment of vector microfilarial uptake as a comparatively non-invasive technique for monitoring onchocerciasis treatment campaigns in the Americas. *Trop. Med. Int. Health.* **2**: 348–355.
- Doetze A., Satoguina J., Burchard G., Rau T., Loliger C., Fleischer B. & Hoerauf A. (2000). Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by Th3/Tr1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a Th1 to Th2 shift. *Int. Immunol.* **12**: 623–630.
- Duke B. O. L. (1968). Studies on factors influencing the transmission of onchocerciasis. IV. The biting cycles, infective biting density and transmission potential of ‘forest’ *Simulium damnosum*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **62**: 95–106.
- Duke B. O. L. (1993). The population dynamics of *Onchocerca volvulus* in the human host. *Trop. Med. Parasitol.* **44**: 61–68.
- Duke B. O. L., Zea-Flores G., Castro J., Cupp E. W. & Muñoz B. (1991). Comparison of the effects of a single dose and of four six monthly doses of ivermectin on adult *Onchocerca volvulus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **45**: 132–137.
- Ejere H., Schwartz E. & Wormald R. (2005). *Ivermectin for onchocercal eye disease (river blindness) (Cochrane Review)*, En: The Cochrane Library, Issue 2. Update Software, Oxford, UK.
- Elson L. H., Calvopiña M., Paredes W., Araujo E., Bradley J. E., Guderian R. H. & Nutman T. B. (1995). Immunity to onchocerciasis: putative immune persons produce a Th1-like response to *Onchocerca volvulus*. *J. Infect. Dis.* **171**: 652–658.
- Emukah E. C., Osuoha E., Miri E. S., Onyenama J., Amazigo U., Obijuru C. *et al.* (2004). A longitudinal study of impact of repeated mass ivermectin treatment on clinical manifestations of onchocerciasis in Imo State, Nigeria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **70**: 556–561.
- Etya’ale D. (2001). Vision 2020: Update on onchocerciasis. *Comm. Eye Health J.* **14**: 19–21.
- Filipe J. A. N., Boussinesq M., Renz A., Collins R. C., Vivas-Martínez S., Grillet M. E. *et al.* (2005). Human infection patterns and heterogeneous

- exposure in river blindness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**: 15265–15270.
- Fuglsang H. & Anderson J. (1977). The concentration of microfilariae in the skin near the eye as a simple measure of the severity of onchocerciasis in a community and as an indicator of danger to the eye. *Tropenmed. Parasitol.* **28**: 63–67.
- Goa K. (1991). Ivermectin: a review of its antifilarial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy on onchocerciasis. *Drugs*. **42**: 640–658.
- Godoy G. A., Volcán G. S., Medrano C. & Guevara R. (1989). Onchocerciasis endemic in the State of Bolívar, Venezuela. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **83**: 405–410.
- Gowtage-Sequeira S., Higazi T., Unnasch T.R. & Basáñez M.-G. (2002). Estimating the prevalence and intensity of *Onchocerca volvulus* infection in *Simulium guianense* s.l. using the O-150 polymerase chain reaction assay. *Br. Simuliid Group Bull.* **18**: 13–15.
- Grillet M. E., Basáñez M. G., Vivas-Martínez S., Villamizar N., Frontado H., Cortez J. et al. (2001a). Human onchocerciasis in the Amazonian area of southern Venezuela: spatial and temporal variations in biting and parity rates of black fly (Diptera: Simuliidae) vectors. *J. Med. Entomol.* **38**: 520–530.
- Grillet M. E., Basáñez M. G., Villamizar N.J., Frontado H., Cortez J., Coronel P. et al. (2001b). Aspects of the vectorial competence of onchocerciasis vectors in the Amazonian focus of southern Venezuela before and during ivermectin distribution. *Br. Simuliid Group Bull.* **15**: 8–10.
- Grillet M. E., Villamizar N. J., Cortez J., Frontado H. L., Escalona M., Vivas-Martínez S. & Basáñez M. G. (2005). Diurnal biting periodicity of parous *Simulium* (Diptera: Simuliidae) vectors in the onchocerciasis Amazonian focus. *Acta Tropica*. **94**: 139–158.
- Guderian R. H., Anselmi M., Chico M. H. & Cooper J. P. (1991). Onchocerciasis in Ecuador: dermal depigmentation, “leopard skin” and comparison with treponemal infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**: 639.
- Guderian R. H., Anselmi M., Espinel M., Mancero T., Rivadeneira G., Proaño R. et al. (1997). Successful control of onchocerciasis with community-based ivermectin distribution in the Rio Santiago focus in Ecuador. *Trop. Med. Int. Health.* **2**: 982–928.
- Ham P. J. (1992). Immunity in haematophagous insect vectors of parasitic infection. *Adv. Dis. Vector Res.* **9**: 101–149.
- Harnett W. (2002). DNA-based detection of *Onchocerca volvulus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **96** (Suppl. 1): S231–S234.
- Hoerauf A. & Brattig N. (2002). Resistance and susceptibility in human onchocerciasis – beyond Th1 vs. Th2. *Trends Parasitol.* **18**: 25–31.
- Hoerauf A., Mand S., Volkmann L., Büttner M., Marfo-Debrekyei Y., Taylor M. et al. (2003). Doxycycline in the treatment of human onchocerciasis: kinetics of *Wolbachia* endobacteria reduction and of inhibition of embryogenesis in female *Onchocerca* worms. *Microbes Infect.* **5**: 261–273.
- Katholi C. R., Toé L., Merriweather A. & Unnasch T. R. (1995). Determining the prevalence of *Onchocerca volvulus* infection in vector populations by polymerase chain reaction screening of pools of black flies. *J. Infect. Dis.* **172**: 1414–1417.
- Kilian H. D. & Nielsen G. (1989). Cell-mediated and humoral immune responses to BCG and rubella vaccinations and to recall antigens in onchocerciasis patients. *Trop. Med. Parasitol.* **40**: 445–453.
- Lizot J. (2001). Situación cultural y acción sanitaria. El caso Yanomami. En: *Reporte de Consultoría en Antropología para el Programa de Eliminación de la Oncocercosis en las Américas*. CAICET. Puerto Ayacucho, Venezuela.
- Lizot J. (2004). *Diccionario enciclopédico de la lengua Yānomāmi*. Vicariato Apostólico. Puerto Ayacucho, Venezuela.
- Lobos E., Weiss N., Karam M., Taylor H. R., Ottesen E. A. & Nutman T. B. (1991). An immunogenic *Onchocerca volvulus* antigen: a specific and early marker of infection. *Science*. **25**: 1603–1605.
- Maizels R. M. & Yazdanbakhsh M. (2003). Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature Rev. Immunol.* **3**: 733–744.

- Meredith S. E. O., Unnasch T. R., Karam M., Piessens W. F. & Wirth D. F. (1989). Cloning and characterization of an *Onchocerca volvulus* specific DNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* **36**: 1–10.
- Murdoch M. E., Hay R. J., Mackenzie C. D., Williams J. F., Ghalib H. W., Cousens S. *et al.* (1993). A clinical classification and grading system of the cutaneous changes in onchocerciasis. *Br. J. Dermatol.* **129**: 260–269.
- OCEI (1993). *Censo Indígena de Venezuela 1992*. Oficina Central de Estadística e Informática, Tomo I. Caracas, Venezuela.
- Ochoa J. O., Castro J. C., Barrios V. M., Jaurez E. L. & Tada I. (1997). Successful control of onchocerciasis vectors in San Vicente Pacaya, Guatemala, 1984–1989. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **91**: 471–479.
- OEPA (1996). *Evaluaciones Epidemiológicas de la Oncocercosis en América*. Ecuador: Taller Operativo de Epidemiología, documento mimeografiado.
- Ogunrinade A. F., Kale O. O., Chandrashekar R. & Weil G. J. (1992). Field evaluation of IgG4 serology for the diagnosis of onchocerciasis in children. *Trop. Med. Parasitol.* **43**: 59–61.
- Omar M. S. & Garms R. (1975). The fate and migration of microfilariae of a Guatemalan strain of *Onchocerca volvulus* in *Simulium ochraceum* and *S. metallicum*, and the role of the buccopharyngeal armature in the destruction of microfilariae. *Tropenmed. Parasitol.* **26**: 183–190.
- Ottesen E. A. (1995). Immune responsiveness and the pathogenesis of human onchocerciasis. *J. Infect. Dis.* **171**: 659–671.
- Pearlman E. (2003). Immunopathogenesis of *Onchocerca volvulus* keratitis (river blindness): a novel role for endosymbiotic *Wolbachia* bacteria. *Med. Microbiol. Immunol.* **192**: 57–60.
- Prost A. & Prod'hon J. (1978). Le diagnostic de l'onchocercose. Revue critique des méthodes en usage. *Méd. Trop. (Mars.)* **38**: 519–532.
- Ramírez-Pérez J. (1977). *Estudio sobre la morfología de Simulium metallicum, vector de la oncocercosis humana en Venezuela*. OPS. Pub. Cient. No. 338.
- Ramírez-Pérez J., Yarzabal L. & Peterson B. (1982). *La Simuliofauna del Territorio Federal Amazonas, Venezuela*. Pub. Cient. No. 1. PROICET, Amazonas. Caracas, Venezuela.
- Rassi E., Monzón H., Castillo M., Hernández I., Ramírez-Pérez J. & Convit J. (1977). Discovery of a new onchocerciasis focus in Venezuela. *Bull. Pan Am. Health Organ.* **11**: 41–64.
- Reid G. D. F. & Lehane M. J. (1984). Peritrophic membrane formation in three temperate simuliids, *Simulium ornatum*, *S. equinum* and *S. lineatum*, with respect to the migration of *Onchocerca* microfilariae. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **78**: 527–539.
- Remme J., Ba O., Dadzie K. Y. & Karam M. (1986). A force-of-infection model for onchocerciasis and its applications in the epidemiological evaluation of the Onchocerciasis Control Programme in the Volta river basin area. *Bull. World Health Organ.* **64**: 667–681.
- Remme J., Dadzie K. Y., Rolland A. & Thylefors B. (1989). Ocular onchocerciasis and intensity of infection in the community. I. West African savanna. *Trop. Med. Parasitol.* **40**: 340–347.
- Shelley A. J., Lowry C. A., Maia-Herzog M., Luna Dias A. P. A. & Moraes M. A. P. (1997). Biosystematic studies on the Simuliidae (Diptera) of the Amazonia onchocerciasis focus. *Bull. Nat. Hist. Mus. Lond. (Entomol.)* **66**: 1–121.
- Soboslay P. T., Dreweck C. M., Hoffmann W. H., Lüder C. G. K., Heuschkel C., Görden H. *et al.* (1992). Ivermectin facilitated immunity in onchocerciasis. Reversal of lymphocytopenia, cellular anergy and deficient cytokine production after single treatment. *Clin. Exp. Immunol.* **89**: 407–413.
- Saint André A., Blackwell N. M., Hall L. R., Hoerauf A., Brattig N. W., Volkmann L. *et al.* (2002). “The role of endosymbiotic *Wolbachia* bacteria in the pathogenesis of river blindness”. *Science*. **295**: 1892–1895.
- Taylor H. R., Duke B. O. L. & Muñoz B. (1992). The selection of communities for treatment of onchocerciasis with ivermectin. *Trop. Med. Parasitol.* **43**: 267–270.

- Tielsch J. M. & Beeche A. (2004). Impact of ivermectin on illness and disability associated with onchocerciasis. *Trop. Med. Int. Health.* **9** (Suppl.): 45–56.
- Toé L., Merriweather A. & Unnasch T. R. (1994). DNA probe-based classification of *Simulium damnosum* s.l.-borne and human-derived filarial parasites in the Onchocerciasis Control Program area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**: 676–683.
- Toé L., Boatín B. A., Adjami A., Back C., Merriweather A. & Unnasch T. R. (1998). Detection of *Onchocerca volvulus* infection by 0-150 polymerase chain reaction analysis of skin scratches. *J. Infect. Dis.* **178**: 282–285.
- Townson H. & Chaithong U. (1991). Mosquito host influences on development of filariae. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **85**: 149–163.
- Vivas-Martínez S., Basáñez M.-G., Grillet M.-E., Weiss H., Botto C., García M. *et al.* (1998). Onchocerciasis in the Amazonian focus of southern Venezuela: altitude and blackfly species composition as predictors of endemicity to select communities for ivermectin control programmes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92**: 613–620.
- Vivas-Martínez S., Basáñez M.-G., Botto C., Rojas S., García M., Pacheco M. & Curtis C. F. (2000a). Amazonian onchocerciasis: parasitological profiles by host-age, sex, and endemicity in southern Venezuela. *Parasitology.* **121**: 513–525.
- Vivas-Martínez S., Basáñez M. G., Botto C., Villegas L., García M. & Curtis C. F. (2000b). Parasitological indicators of onchocerciasis relevant to ivermectin control programmes in the Amazonian focus of southern Venezuela. *Parasitology.* **121**: 527–534.
- Vivas S., Basáñez M. G., Domínguez G., Magris M., Botto C. & Curtis C. F. (2004). Onchocercal skin disease in the Amazonian focus of southern Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **71** (Suppl.): 59.
- Vlassoff C. & Tanner M. (1992). The relevance of rapid assessment to health research and interventions. *Health Policy Plan.* **7**: 1–9.
- Weil G. J., Steel C., Liftis F., Li B. W., Mearns G., Lobos, E. & Nutman T. B. (2000). A rapid format antibody card test for diagnosis of onchocerciasis. *J. Infect. Dis.* **182**: 1796–1799.
- Whitworth J. A. & Gemade E. (1999). Independent evaluation of onchocerciasis rapid assessment methods in Benue State, Nigeria. *Trop. Med. Int. Health.* **4**: 26–30.
- Winnen M., Plaisier A. P., Alley E. S., Nagelkerke N. J. D., Van Oortmarssen G., Boatín B. A. & Habbema J. D. F. (2002). Can ivermectin mass treatments eliminate onchocerciasis in Africa?. *Bull. World Health Organ.* **80**: 384–390.
- Yarzabal L., Ramírez R., Pérez R., Contreras C. E., Arango M. & Bianco N. (1983). Alteraciones de la inmunidad humoral en la oncocercosis. pp. 85–92. En: *Las Filariasis Humanas en el Territorio Federal Amazonas, Venezuela*. Eds. Yarzabal L., Holmes R., Basáñez M. G., Petralanda I., Botto C., Arango M. & Schkolnik S. Publ. Cient. No. 2, PROICET Amazonas, Caracas, Venezuela.
- Yarzabal L., Botto C., Arango M., Raga L. M., Wong F., Allan R. *et al.* (1985a). Epidemiological aspects of onchocerciasis in the Sierra Parima, Federal Territory of Amazonas, Venezuela. pp. 43–63. En: *La Oncocercosis en América*. Eds. Yarzabal L., Botto C., & Allan R. Publ. Cient. No. 3. PROICET Amazonas, Caracas, Venezuela.
- Yarzabal L., Basáñez M. G., Ramírez-Pérez J., Ramírez A., Botto C. & Yarzabal A. (1985b). Experimental and natural infection of *Simulium sanchezi* by *Mansonella ozzardi* in the Middle Orinoco region of Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **79**: 29–33.
- Zea-Flores R., Richards F. O. Jr., Gonzalez-Peralta C., Castro Ramirez J., Zea-Flores G., Collins R. C. & Cupp E. (1992). Adverse reactions after community treatment of onchocerciasis with ivermectin in Guatemala. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**: 663–666.
- Zimmerman P. A., Dadzie K. Y., De Sole G., Remme J., Soumbeiy Alley E. & Unnasch T. R. (1992). *Onchocerca volvulus* DNA classification correlates with epidemiological patterns of blindness. *J. Infect. Dis.* **165**: 964–968.

Zimmerman P. A., Guderian R. H., Araujo E., Elson L., Phadke P., Kubofcick J. & Nutman T. B. (1994a). Polymerase chain reaction based diagnosis of *Onchocerca volvulus* infection: improved detection of patients with onchocerciasis. *J. Infect. Dis.* **169**: 686–689.

Zimmerman P. A., Katholi C. R., Wooten M. C., Lang-Unnasch N. & Unnasch T. R. (1994b). Recent evolutionary history of American *Onchocerca volvulus*, based on analysis of a tandemly repeated DNA sequence family. *Mol. Biol. Evol.* **11**: 384–392.

Recibido el 08/02/2007

Aceptado el 13/03/2007

Artículos Originales

Brote familiar de fascioliasis en Venezuela

Belkisyolé Alarcón de Noya¹, Elina Rojas², Cecilia Colmenares¹, Carmen Morales², Rosa Contreras¹, Sharon Kay Valero³, Dalila Hernández², Sonia Briceño², Jose Vicente Scorza² & Oscar Noya¹

De los 9 casos de fascioliasis humana registrados en Venezuela, 4 han sido publicados en los últimos 10 años, siendo 2 de éstos procedentes de la región andina. El riesgo de endemicidad frecuente en bovinos y la condición clínica de una niña de 14 años, con malestar abdominal, vómitos, eosinofilia y antecedentes de ingestión abundante de berros, motivó realizar un estudio en su lugar de procedencia (Timotes, Edo. Mérida), para conocer la exposición de la comunidad al riesgo de infección. Se evaluaron 65 personas, a quienes se les realizó historia clínica, con consentimiento previa información, toma de muestras de sangre, exámenes de heces (n=37) y ecografía abdominal (n=33). Se practicó ELISA con extracto soluble de adultos de *Fasciola hepatica* (ELISA-AFhES), resultando 9 personas positivas. Se practicó "Western blot" (WB) a todos los sueros positivos en ELISA, de los cuales 5 reconocieron moléculas específicas de 9, 14, 27 y 65 kDa, lo que constituye un patrón de positividad al WB. Los cuatro sueros restantes, con débil reactividad al ELISA, no reconocieron estas moléculas. Por estudios coprológicos se encontraron *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica/dispar*, *Blastocystis hominis*, *Giardia lamblia*, *Endolimax nana* y *Ascaris lumbricoides*. Tres de las 5 personas positivas por ELISA-AFhES y WB-AFhES resultaron con huevos de *Fasciola hepatica* en las heces. Los 5 casos positivos corresponden a niñas de una familia, todas hermanas, cuyos padres resultaron sin infección, a pesar de que todos ingieren berros y ensaladas con productos de la región. El presente estudio constituye el primer reporte de transmisión a humanos en una población de un área bien delimitada en la región andina venezolana.

Palabras claves: fascioliasis, Venezuela., ELISA, "Western blot".

INTRODUCCIÓN

La fascioliasis es una enfermedad parasitaria causada principalmente por *Fasciola hepatica*, la cual afecta humanos y animales herbívoros, distribuida en Europa, África, América y Oceanía y por *Fasciola gigantica* en África y Asia. Actualmente esta parasitosis presenta un alto grado de expansión constituyéndose en una patología emergente y re-emergente en muchos países y presentando un

incremento en prevalencia e intensidad, por la gran capacidad de colonización de su agente causal y especies de vectores (Mas-Coma, 2004; 2005). Por otra parte, cuando la fascioliasis afecta bovinos, ocasiona pérdidas considerables en la industria pecuaria y alimenticia (Fredes, 2004). En algunos países constituye un verdadero problema de salud pública en humanos, reportándose casos en los 5 continentes en áreas endémicas con rangos que van desde hipo a hiperendémicas (Mas-Coma *et al.*, 1999a; Mas-Coma, 2005). Una de las características epidemiológicas singulares de la fascioliasis es su presencia en regiones de elevada altitud (Mas-Coma *et al.*, 2005), como es el caso del Altiplano Boliviano, descrito como un área de hiperendemicidad en humanos (Mas-Coma *et al.*, 1999b; Esteban *et al.*, 1999; Mas-Coma, 2005).

¹ Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela, Ciudad Universitaria, Los Chaguaramos, Zona Postal 1041-A, Apdo. 47623, Caracas, Venezuela.

² Instituto Experimental "José Witremundo Torrealba" NURR-Universidad de Los Andes; Edo. Trujillo, Venezuela.

³ Hospital Sor Juana Inés de Mérida, Edo. Mérida, Venezuela.

*Autor de correspondencia: belkisyole@yahoo.com.mx

El diagnóstico de la fascioliasis usualmente se basa en el hallazgo fortuito de los huevos del parásito en las heces. El diagnóstico coprológico es de baja sensibilidad, debido a que en la fase prepatente de infección, el helminto se encuentra en forma inmadura y en fase crónica la excreción de huevos es escasa e intermitente (Espino *et al.*, 2000). Las dificultades para lograr el diagnóstico parasitológico justifican la utilización de métodos inmunológicos para evidenciar la enfermedad en el hombre y los animales (Colmenares *et al.*, 2003).

Los métodos indirectos de diagnóstico como son las imágenes obtenidas por radiografía, ultrasonido convencional y endoscópico, tomografía computarizada ó resonancia magnética nuclear, permiten encontrar hepatomegalias y otras imágenes útiles para mantener el diagnóstico y darle soporte al seguimiento de la enfermedad (Fredes, 2004; Zali *et al.*, 2004). Sin embargo, estos exámenes resultan costosos y algunas veces inaccesibles a las poblaciones de bajos recursos.

El primer reporte en Venezuela data de 1910 (Risqueuz 1929), luego del cual se han detectado sólo 8 más (Risqueuz, 1929; Barroeta, 1911; Rodríguez & González, 1975; Abdul-Hadi *et al.*, 1996; Scorza *et al.*, 1999; Incani *et al.*, 2002; Alarcón de Noya *et al.*, 2006), perteneciendo dos de ellos a la región andina.

Los casos de fascioliasis en Venezuela, se han presentado de manera esporádica como consecuencia del hallazgo de adultos del parásito en procedimientos imagenológicos o quirúrgicos, como también de huevos en hígado o heces por análisis histopatológicos o coproparasitológicos. Al disponer del diagnóstico inmunológico (Colmenares *et al.*, 2003), para la búsqueda activa de casos, las posibilidades de detectar esta infección parasitaria aumentan considerablemente.

En este trabajo se identifica un brote familiar de *F. hepatica*, en la población de Timotes, ubicada en los andes venezolanos, al norte del Estado Mérida, siendo una zona de clima frío, un poco más húmeda, pero con características ecológicas similares a las encontradas en el Altiplano Boliviano. La detección de infección en una niña hospitalizada por presentar dolor abdominal, fiebre y alta eosinofilia, nos incentivó a investigar la presencia de esta parasitosis en su comunidad de procedencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población en estudio

Se trabajó en una comunidad situada en los alrededores de la ciudad de Timotes, a 2.050 m sobre el nivel del mar, en el municipio Miranda del Estado Mérida, al occidente de Venezuela. Se comunicó a la población por intermedio de sus líderes naturales la existencia de esta parasitosis y la importancia de su participación en el presente estudio. Se implementó un consentimiento informado el cual cumplió con los requisitos de informar a la población sobre el propósito del muestreo, su importancia y el compromiso de las partes involucradas. Todos los niños estaban acompañados de sus representantes y se hizo hincapié en el acto voluntario de permitir la obtención y evaluación de muestras biológicas. El presente trabajo contó con la aprobación de la Comisión de Bioética del Centro de Investigaciones “José Witremundo Torrealba” del Núcleo Universitario “Rafael Rangel” de la Universidad de Los Andes. La evaluación clínica consistió en la recopilación de datos epidemiológicos, antecedentes de importancia médica, interrogatorio funcional, síntomas actuales, examen físico y ecografía. Por razones logísticas, estos dos últimos se practicaron sólo a aquellas personas quienes manifestaron síntomas de malestar abdominal (dolor, llenura post-pandrial, vómitos frecuentes, diarreas). La ecografía abdominal se practicó con un transductor curvo de 3,75 MHz de un equipo portátil marca Toshiba. Se exploró hígado, vías biliares, páncreas, riñones y abdomen en general, también útero y anexos en las mujeres.

Muestras

Se colectaron muestras de sangre por punción venosa en tubos sin anticoagulante y sin agregar preservativos post-centrifugación, para la obtención de sueros. Con una gota de sangre lograda inmediatamente después de la punción se realizaron extendidos sanguíneos. Se recogieron muestras de heces, las cuales fueron preservadas en solución de Raillet-Henry a razón de 2 gr de heces aproximadamente en 2 cm³ (Pessôa & Martins, 1982). Los sedimentos se examinaron exhaustivamente post-centrifugación. Los extendidos sanguíneos obtenidos fueron fijados con metanol por 5 minutos y posteriormente coloreados con Giemsa, para determinar la fórmula sanguínea.

Obtención del antígeno de excreción-secreción de Fasciola hepatica (AFhES)

Se extrajeron parásitos adultos de *F. hepatica* de los conductos biliares de bovinos infectados. Luego de lavarlos en solución salina estéril, se procedió según está señalado en los trabajos de Cesari & Alarcón de Noya (1987), Espino *et al.* (2000) y Colmenares *et al.* (2003).

Inmunoensayo enzimático con AFhES (ELISA-AFhES)

Para su realización se siguió la técnica de Voller *et al.* (1976) con algunas modificaciones, las placas Nunc-Immuno Maxi Sorp fueron sensibilizadas con 50 µL/pozo de AFhES a una concentración de 10 µg/µL, luego de 18 h a 4°C, las placas se lavaron dos veces con buffer salino fosfato (PBS) con 0,05% de Tween 20. Para el bloqueo se colocaron 150 µL/pozo de solución de leche descremada al 5% en PBS-Tween 20 al 0,05% por 1 h. Luego se secaron y guardaron a 4°C hasta su uso.

Los sueros se diluyeron en la misma solución de bloqueo (1/200), colocando 50 µL/pozo por 1h a 37°C. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,05% y se expusieron a 50 µL/pozo de solución de anti IgG-humana conjugada a fosfatasa alcalina (1/2000) en la misma solución de bloqueo. Las placas se revelaron usando 50 µL/pozo de para-nitrofenilfosfato (PNPP) a una concentración de 1µg/µL como sustrato de la enzima. Luego se detuvo la reacción, con 50 µL/pozo de una solución de NaOH 3M. El punto de corte se estableció en base al promedio más tres desviaciones estándar de la D.O. de 40 sueros negativos (DO=0,280).

Electroforesis y Western blot con AFhES (WB-AFhES)

Se realizó electroforesis con 72 µg de AFhES en 300 µL de buffer de muestra, en gel de poliacrilamida al 12,5 % bajo condiciones disociantes y no reductoras, luego se transfirió a papel de nitrocelulosa (NC) (Cleveland *et al.*, 1977; Towbin *et al.*, 1979). A continuación, las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS-Tween 20 al 0,05%, al término de lo cual se secaron y guardaron a -20 °C hasta su uso.

El papel de NC se cortó en tiras de 2 mm, las cuales se expusieron a 800 µL (1/200) de suero humano en solución de bloqueo, por 90 min, en constante agitación a temperatura ambiente. Luego se realizaron 4 lavados de 15 min cada uno con PBS-Tween 20 al 0,05%. Seguidamente las tiras se colocaron en una solución de anti-IgG humana conjugada a peroxidasa (1/15.000) en solución de bloqueo por 90 min., en agitación constante. Se repitieron los lavados como ya se indicó y se procedió a exponer las tiras al sustrato quimioluminiscente por 1 min y se reveló la reacción usando placas fotográficas Hiperfilm®.

Tratamiento

Las personas que resultaron positivas en este estudio recibieron triclabendazole (Egaten®) a razón de 10 mg/kg de peso en dosis única y en presencia del médico tratante.

RESULTADOS

Se evaluaron 65 personas en un rango de edad de 2,5 a 59 años, 43 del sexo femenino y 22 del masculino. Del interrogatorio se conoció que 38% se quejaron de dolor abdominal persistente ó frecuente y 10,6% tenían diarrea al momento ó en los últimos días previos al examen. Se practicó ultrasonido abdominal a 33 personas quienes tenían síntomas y también algunos niños bajo riesgo de infección, en la mitad de ellas (48%) se encontraron alteraciones ecográficas del área hepato-biliar (engrosamiento de pared vesicular 18%, imágenes hiperecogénicas dentro de vesícula biliar 6%, colédoco dilatado hiperecogénico 18% y otras alteraciones como hígado graso y hepatomegalia).

De las muestras recolectadas, se obtuvieron 65 sueros, se realizaron 60 extendidos y solamente se colectaron 37 muestras de heces. Todos declararon la ingestión frecuente y diaria de vegetales crudos (lechuga, berros, etc.) provenientes de la misma área en la cual habitan. En general presentaron muy baja prevalencia de parásitos intestinales. *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica/dispar*, *Blastocystis hominis*, *Giardia lamblia*, *Endolimax nana* se presentaron con frecuencias, cada una de ellas menor o igual a 5,4%. Los huevos de *Ascaris lumbricoides* se observaron en 2,7% y los de *F. hepatica* en 8% de las muestras examinadas. El 27% presentaron al menos un parásito en las heces.

Fig. 1. ELISA-AFhES de sueros de personas de una comunidad bajo riesgo de infección con *Fasciola hepatica*, Timotes, Edo. Mérida, 2005.

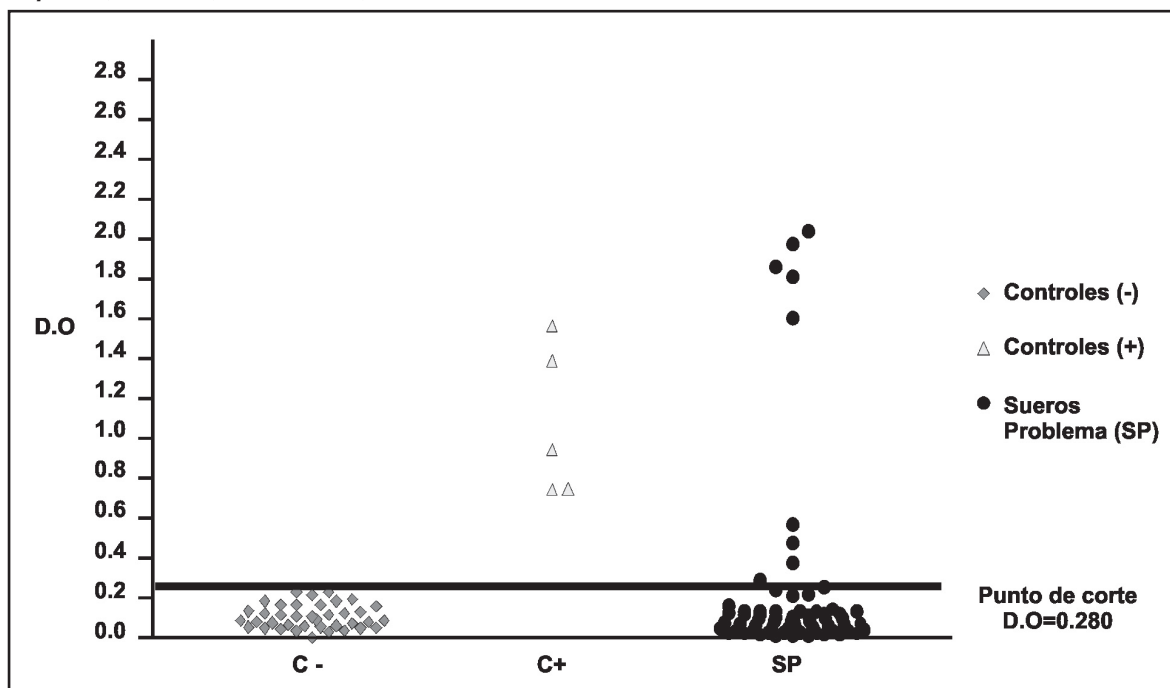
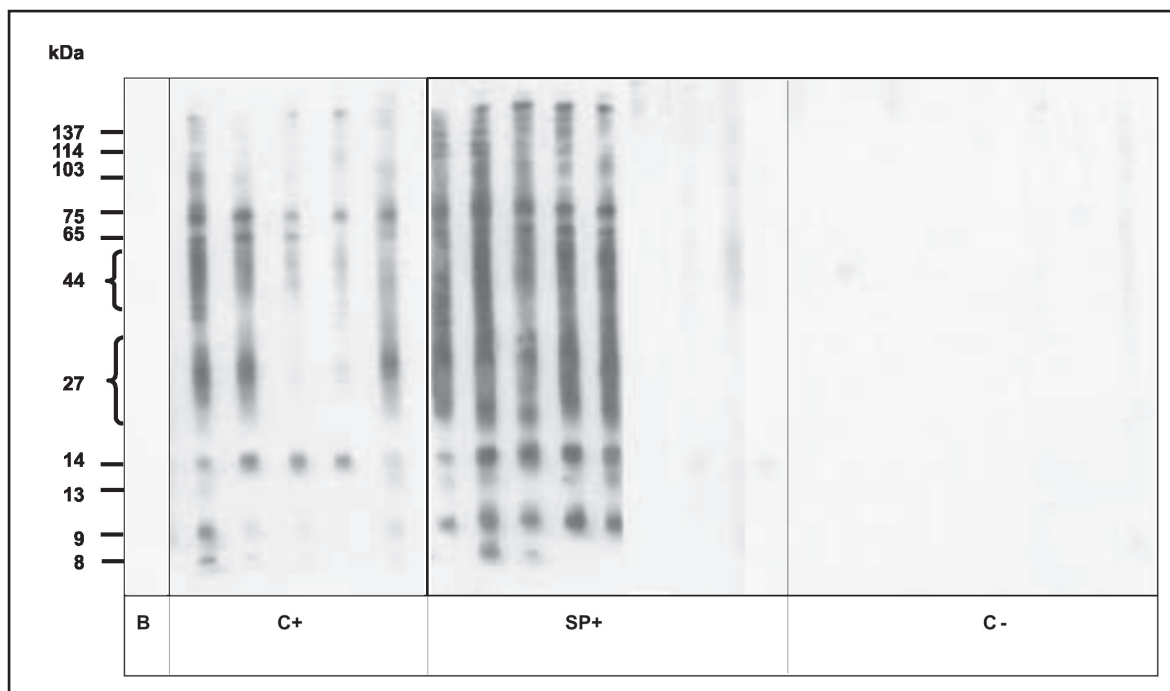


Fig. 2. "WB"-AFhES de sueros de personas positivas por ELISA-AFhES de una comunidad bajo riesgo de infección con *Fasciola hepatica*, Timotes, Edo. Mérida. C+= sueros controles positivos, C- = sueros controles negativos, SP+ = sueros de personas positivas por ELISA-AFhES .



Los resultados de ELISA-AFhES se muestran en la Fig. 1, en la cual 9 personas fueron positivas (14%), 4 de ellas con densidad óptica (D.O.) cercana al punto de corte y 5 resultaron francamente positivos (D.O.>1).

Se practicó WB-AFhES a todos los sueros positivos por ELISA-AFhES. Estos resultados se muestran en la Fig. 2. Los 5 sueros de personas que presentaron ELISA con D.O.>1, reconocieron las moléculas específicas de 9, 14, 65 y el área alrededor de 27 kDa del AFhES. Los restantes positivos por ELISA con valores cercanos al punto de corte fueron negativos por WB. Solamente se consideraron verdaderos casos de fascioliasis a las 5 personas cuyos sueros reconocieron este patrón de positividad por WB.

Se realizó conteo relativo de glóbulos blancos a 60 personas. Aquellas con inmunodiagnóstico positivo (ELISA + WB) presentaron de 18 a 51% de eosinófilos. Los 4 positivos por ELISA y negativos por WB tuvieron de 0 a 4% de eosinófilos. En las 51 personas restantes, se observó eosinofilia entre 0 a 39%, no atribuible a fascioliasis.

Las 5 pacientes diagnosticadas con fascioliasis recibieron tratamiento con triclabendazole (Egaten®). Estas personas resultaron ser hermanas, tres de ellas con huevos de *F. hepatica* en las heces. Cuatro meses después del tratamiento la clínica persistió y la coprología mostró huevos de *F. hepatica* en tres de los 5 casos. Por esta razón se les repitió el mismo tratamiento a todas las niñas, quienes controladas seis meses después, resultaron negativas a la coprología. Se mantiene control clínico, coprológico y serológico de estos pacientes.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontró 8% de personas con huevos de *F. hepatica* en heces. Sin embargo, ELISA-AFhES fue positivo en 14%, confirmándose 5 casos por WB de los 9 positivos por ELISA. Las moléculas de 9, 14, 27 y 65 kDa presentaron reconocimiento específico, no fueron detectadas por sueros de personas sin fascioliasis, ni por aquellos con otras parasitosis. Otros estudios han reportado estas mismas moléculas como relevantes para el diagnóstico de esta enfermedad parasitaria (Díaz *et al.*, 1998; Espino *et al.*, 2000; Colmenares *et*

al., 2003; Colmenares *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2003). La mayor positividad en ELISA podría explicarse por contacto con este parásito en el pasado, a través de la ingestión de verduras como ingredientes en distintas ensaladas o en jugos. Otra causa sería la reactividad cruzada con otros helmintos (Colmenares *et al.* 2005). En consecuencia, consideramos inmunodiagnóstico positivo para fascioliasis, cuando se presenten conjuntamente los dos ensayos positivos (ELISA y WB) con reconocimiento del mencionado patrón molecular por WB.

Los positivos por inmunodiagnóstico presentaron valores altos de eosinófilos (18-51%), parámetro de sospecha en los afectados por esta parasitosis. Las personas positivas por ELISA y negativas por WB tuvieron un porcentaje normal de eosinófilos en sangre. La cuantificación de eosinófilos se correspondió con los resultados obtenidos en el inmunodiagnóstico.

La presencia de imágenes ultrasonográficas relacionadas con patología hepática y biliar fue alta (48%) en personas quienes declararon molestias abdominales. En una de las pacientes se visualizó la ocupación de las vías biliares extrahepáticas por imagen móvil sugestiva de presencia de un helminto, comprobándose este caso por coprología y serología. El uso de ecografía abdominal ambulatoria debe incluirse en los programas de vigilancia epidemiológica de esta enfermedad, especialmente dirigida a aquellos con sintomatología abdominal, ya que pudiera utilizarse como un indicador de patología hepato-biliar para su posterior confirmación diagnóstica.

El efecto de administración periódica de albendazole en programas contra las helmintiasis intestinales en escuelas y consultas médicas se reflejó en la baja frecuencia de helmintos encontrados en este estudio. El primer tratamiento con triclabendazole (Egaten®) fue insuficiente en algunos de los afectados, persistiendo en éstos la sintomatología y huevos en las heces. Al repetirse el tratamiento la cura fue total. En Venezuela no se dispone de triclabendazole de uso humano, dificultando la terapéutica.

Llama la atención que los 5 casos positivos corresponden a niñas de una familia, todas hermanas y cuyos padres no tienen la infección. Toda la familia ingirió berros y ensaladas con productos de la región. Pudiese existir otra fuente de infección adicional

a la ingestión de hortalizas como ocurre en Bolivia donde se ha descrito transmisión de la parasitosis por ingestión de agua contaminada con metacercarias del parásito (Mas-Coma *et al.* 1999b). Esta hipótesis no pudo demostrarse en esta investigación, pues ambos factores de riesgo (ingestión de berros y consumo de agua no tratada) fueron admitidos por todas las personas encuestadas. Es importante destacar que muestreos recientes (octubre 2005) sobre la fauna malacológica de esta área demostró la presencia de abundantes caracoles del género *Lymnaea*, cuya ubicación taxonómica es objeto de estudio (Pointier & Noya: com. pers.).

El estudio integral de la infección humana por *F. hepatica* debe ser multifactorial, incluyendo clínica, hematología, ecografía, coprología e inmunodiagnóstico. Los resultados demuestran la utilidad de combinar dos técnicas inmuno-serológicas que permiten un despistaje inicial de la población con ELISA-AFhES y un examen confirmatorio para llegar al diagnóstico definitivo a través del WB-AFhES, superando así la baja sensibilidad de los estudios coprológicos.

Hasta ahora el diagnóstico de fascioliasis se ha logrado por coprología, detectándose casos fortuitos aislados. Desde que se cuenta en el país con metodologías adecuadas, nuestro grupo ha diagnosticado 9 casos mas en 3 años, incluyendo los presentes. Esta aproximación podría ser una forma de abordaje de comunidades bajo riesgo de infección, siendo el presente trabajo el primer estudio de este tipo que propone una estrategia de vigilancia epidemiológica para esta trematodiasis en Venezuela.

AGRADECIMIENTOS

A los representantes comunales, quienes organizaron de manera eficiente las jornadas de trabajo en el campo. A la compañía NOVARTIS de Venezuela por el suministro gratuito del medicamento. Proyecto FONACIT F-2005000199.

Family outbreak of fascioliasis in Venezuela

SUMMARY

Of the 9 cases of human fascioliasis recorded in Venezuela, 4 have been published in the last 10

years, 2 of them originating from Andean region. The well known transmission of fascioliasis in cattle and the clinical condition of a 14-year-old girl with abdominal discomfort, vomiting, eosinophilia and previous abundant ingestion of watercress, motivated the field study in the site of occurrence (Timotes, Edo. Mérida in the Andean region) to learn the risk of community infection. Sixty-five people were evaluated clinically and serologically. Coprology was done in 37 and abdominal ultrasound in 33 persons. ELISA with adult *Fasciola hepatica* soluble extract (AFhES-ELISA) was performed with 9 persons being positive. Western blot (WB) was carried out on all ELISA positive sera, resulting in 5 that recognized 9, 14, 27 and 65 kDa specific molecules. The remaining four sera, with weak reactivity by ELISA, did not have this recognition pattern. By stool examination, we found *Entamoeba coli*, *E. histolytica/dispar*, *Blastocystis hominis*, *Giardia lamblia*, *Endolimax nana* and *Ascaris lumbricoides*. Three of the 5 positive people by AFhES-ELISA and AFhES-WB had *F. hepatica* eggs in their feces. The 5 positive cases are girls of a family, sisters and whose parents do not have the infection, although all consume watercress in salads with other vegetables from that region. The present study constitutes the first report of a well established focus of fascioliasis with human repercussion in Venezuela.

Key words: Fascioliasis, Venezuela, ELISA, Western blot.

REFERENCIAS

- Abdul-Hadi S., Contreras R., Tombazzi C., Alvarez M. & Melendez M. (1996). Hepatic fascioliasis: case report and review. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. **38**: 69-73.
- Alarcón de Noya B., Sosa V. L., Colmenares C., Beker B., Contreras R. & Meo P. M. (2006). Localización pancreática de *Fasciola hepatica* en un caso humano autóctono proveniente del Edo. Bolívar, Venezuela. *GEN Rev. Soc. Venezolana Gastro*. **60**: 134-137.
- Barroeta J. F. (1911). *Gaceta Médica de Caracas*. **18**: 35-37.
- Cesari I. M. & Alarcón de Noya B. (1987). *Esquistosomiasis mansoni*. *Diagnóstico y Control*.

- Manual de campo y laboratorio. CEG. IVIC. Caracas, Venezuela.
- Cleveland D. W., Fischer S. G., Kirschner M. W. & Laemmli U. K. (1977). Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **252**: 1102-1106.
- Colmenares C., Castellano A., Méndez L., Bruce A. C., García F. & Alarcón de Noya B. (2003). Inmunodiagnóstico de Fascioliasis bovina y humana en Venezuela. *Acta Científica Venezolana.* **54** (Supl. 1): 221.
- Colmenares C., Méndez L., Díaz Z. & Alarcón de Noya B. (2005). Fraccionamiento del antígeno de excreción-secreción de adultos de *Fasciola hepatica* y su utilización en inmunodiagnóstico por Western Blot. *Parasitología Latinoamericana, FLAP.* **60**: 294.
- Díaz A., Li-Eliás O., Otero O., García C. & Espino A. M. (1998). Identificación, mediante "Western blot", de inmunógenos de *Fasciola hepatica*, reconocidos por los sueros de ratas infectadas experimentalmente. *Rev. Cubana Med. Trop.* **50**: 12-17.
- Espino A. M., Borges A. & Dumenigo B. E. (2000). Fecal antigens of *Fasciola hepatica* potentially useful in the diagnosis of fascioliasis. *Rev. Panam. Salud Pública.* **7**: 225-231.
- Esteban J. G., Flores A., Angles R. & Mas-Coma S. (1999). High endemicity of human fascioliasis between Lake Titicaca and La Paz Valley, Bolivia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **93**: 151-156.
- Fredes F. (2004). La Fascioliasis animal y humana. *Mon. Electr. Patol. Vet.* **1**: 38-67.
- Incani R. N., Vieira J. M., Pacheco M., Planchart S., Amarista M. & Lazdins J. (2002). Human infection by *Fasciola hepatica* in Venezuela: report of geriatric case. *Invest. Clin.* **44**: 255-260.
- Kim K., Yang H. J. & Chung Y. B. (2003). Usefulness of 8 kDa protein of *Fasciola hepatica* in diagnosis of fascioliasis. *Korean J. Parasitol.* **41**: 121-123.
- Mas-Coma S. (2004). Human fascioliasis. En: *World Health Organization (WHO), Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control.* pp. 305-322. Eds. Crotruvo J. A., Dufour A., Rees G., Bartram J., Carr R., Cliver D. O. et al. IWA Publishing, London, UK.
- Mas-Coma S. (2005). Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *Journal of Helminthology.* **79**: 207-216.
- Mas-Coma S., Esteban J.G. & Bargues M.D. (1999a). Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bull WHO.* **77**: 340-346.
- Mas-Coma S., Angles R., Esteban J. G., Bargues M. D., Buchon P., Franken M. et al. (1999b). The Northern Bolivian Altiplano: a region highly endemic for human fascioliasis. *Trop. Med. Int. Health.* **4**: 454-467.
- Mas-Coma S., Bargues M. D. & Valero M. A. (2005). Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int. J. Parasitol.* **35**: 1255-1278.
- Pessôa S. B. & Martins A. V. (1982). *Parasitología Médica.* 11 ed. Editorial Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro.
- Risquez J. R. (1929). Estado actual de la parasitología en Venezuela. *Gaceta Médica de Caracas.* (1904-1911). **25** (Nº extraordinario): 38-41.
- Rodríguez A. & González H. (1975). Sobre un nuevo caso humano de fascioliasis hepática en Venezuela. *Rev. Inst. Nac. Hig.* **8**: 111-114.
- Scorza J. V., Villegas E. & Morales C. (1999). Fascioliasis hepática en el Estado Trujillo, Venezuela: un segundo caso clínico. *Arch. Venez. Med. Trop.* **3**: 9-13.
- Towbin H., Staehelin T. & Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **76**: 4350-4354.

Voller A., Barlett A. & Bidweel D. (1976). Enzyme immunoassays for parasitic diseases. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **70**: 98-105.

Zali M.R., Ghaziani T., Shahraz S., Hekmatdoost A. & Radmehr A. (2004). Liver, spleen, pancreas and kidney involvement by human fascioliasis: imaging findings. *BMC Gastroenterology.* **4**: 15-17.

Recibido el 18/05/2006
Aceptado el 14/01/2007

Evaluation of conventional serological tests for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis

Néstor Añez*, Agustina Rojas & Gladys Crisante

Three serological tests (ELISA, IFAT, DAT) were evaluated using sera from selected individuals with different American cutaneous leishmaniasis (ACL) clinical conditions. Reactivity in at least 2 of the 3 named tests was established as a criterion for declaring a patient as sero-positive. Prior to serological testing, people were diagnosed by clinical (presence of lesion = pl or scar=Sc), parasitological (presence of parasites =pp), immunological (LST) and molecular (PCR) methods. For a statistical comparison of the evaluated tests 4 groups of people were made up: 1) patients with active leishmanial lesion (n=44; pl, pp, +LST, +PCR); 2) patients who had recovered from leishmanial infection (n=43; Sc, +LST, +PCR); 3) asymptomatic individuals from endemic areas showing evidence of having contacted *Leishmania*-parasites (n=40; +LST, +PCR) and 4) *Leishmania*-negative people from the above localities where leishmaniasis is endemic and living under the same risk conditions, considered as healthy controls (n=104; -LST, -PCR). Considering the above-established criteria for sero-positives, the analysis of the results obtained with the 3 tests employed revealed very low sensitivity values. Seropositive figures of 50% were recorded for the first group, 9% for the second group, and 12.5% for the third group. Statistical analysis also revealed a low positive predictive value (PPV=0.73), a low negative predictive value (NPV=0.49), and a low kappa coefficient value (k=0.114). The present results raise questions about the use of the 3 conventional serological tests compared here to detect ACL at any clinical condition.

Key words: American cutaneous leishmaniasis, diagnosis, serology.

INTRODUCTION

Leishmaniasis is a group of clinical manifestations recognized as cutaneous (CL), mucocutaneous (MCL) and visceral (VL) forms, produced as a consequence of the infection of susceptible people by parasites of the genus *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). This disease is among the more important public health problems facing populations worldwide, with an overall prevalence of 12 million people, an incidence of 2 million new cases occurring each year (1.5m CL and 0.5m VL), and with a 10th of the world's population living under risk conditions in nearly 100 countries (WHO/TDR, 2002, Roberts *et al.*, 2000). Its geographical distribution is determined by phlebotomine sandfly vectors, haematophagous insects in whose digestive tracts the parasite develops

its infective forms which are transmitted to the vertebrate hosts during the bite.

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is an anthroponotic disease circulating in the New World from the south of the United States to the north of Argentina (Marques *et al.*, 2001). It is caused by species of *Leishmania* grouped in the subgenera *Viannia* and *Leishmania* and transmitted by the bite of infected sand flies of the genus *Lutzomyia* (WHO, 2002). The infection in human population shows a variety of clinical pictures which range from localized, sometimes self-healing tegumentary lesion, to a much more aggressive deforming mucocutaneous lesion or to the diffuse form, although an inapparent infection is not uncommon (Rodrigues *et al.*, 2002). The immune cellular response for the control of the *Leishmania*-infection is related to the generation of helper T-cells by the host, which is able to deliver macrophage activating cytokines, particularly gamma interferon and interleukin-2 (Reiner & Locksley, 1992). In addition, the humoral immune response occurs during the active phase of the infection with the appearance

Investigaciones Parasitológicas "J. F. Torrealba", Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad de Los Andes, Mérida, 5101, Venezuela

*Autor de correspondencia: nanes@ula.ve

of low titers of antibodies (Ab), which may disappear later (Behin & Jacques, 1984).

Serological methods have been used over the years in the diagnosis of ACL. However, the diagnostic value of the assay using crude antigens is considered to be limited because of their low reproducibility and specificity (Celeste *et al.*, 2004). Despite this, there are serological tests still used in many diagnostic centers for detecting the prevalence of *Leishmaniasis* in endemic areas (Allain & Kagan, 1975). Among these the direct agglutination test (DAT), the indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) and ELISA are some of the most commonly used tests. The present work deals with the evaluation of the above-mentioned tests in groups of individuals at different ACL clinical conditions in order to compare them statistically to estimate their sensitivity and specificity and to reach conclusions about their reliability in the diagnosis of CL.

MATERIALS AND METHODS

Study groups

A total of 231 individuals (123 females and 108 males with a mean \pm SD age of 28.2 ± 17.9 yr) was selected from 4351 people from different Venezuelan regions and were examined for ACL at the Parasitological Research Center, Faculty of Science, University of Los Andes, Merida, Venezuela. The selected samples were grouped as follows: Group 1 consisted of 44 patients (17 females and 27 males with a mean age of 29 yr) recently infected and suffering from active ACL. They were diagnosed by the presence of lesion (pl), the microscopical visualization of amastigotes forms (pp), leishmanin skin test positive (+LST), and positive skin biopsy and blood samples processed by *Leishmania (Viannia)*-specific PCR assay (+PCR). Group 2 consisted of 43 individuals (19 females and 24 males with a mean age of 33 yr) who had recovered from ACL as diagnosed by the presence of scar (Sc), +LST and positive blood sample PCR assay (+PCR). Group 3 consisted of 40 individuals (24 females and 16 males with a mean age of 28 yr) living in areas where *Leishmaniasis* is endemic who showed no clinical manifestation but were +LST and +PCR. Group 4 consisted of 104 healthy people (63 females and 41 males with a mean age of 25 yr) from the same areas indicated above

and who also displayed negative LST (-LST) and negative PCR (-PCR). All individuals enrolled in the study provided written consent.

Sample collection and processing

Patient samples in active ACL cases

Tissue scrapings or small 3-mm biopsy specimens were taken with a surgical blade at the border of the lesion under sterile conditions and local anesthesia with 2% lidocaine. Part of the recovered tissue was smeared onto a glass slide, fixed with methanol and stained with 10% Giemsa stain for microscopical observations. In vitro culture was carried out by placing a tissue fragment into tubes containing NNN medium. They were then incubated at 25°C and weekly observed until 45 d. If positive they were transferred to fresh medium for maintenance and further work; otherwise, they were discarded. Either scraping or tissue fragments were also processed for PCR. Prior to the biopsy or lesion scraping, 5 ml of blood was collected by venipuncture from each patient. The serum was collected into two parts: the buffy coat was collected and used for PCR and hybridization assays, and the rest preserved at -20°C for serological analysis.

Leishmanin skin test (LST)

To assess the cellular immune response of individuals included in the different groups for the present study, a LST consisting of a promastigote antigen from resuspended *Leishmania braziliensis* was used. The soluble *Leishmania* antigen was prepared as described elsewhere (Reed *et al.*, 1986). The LST was considered positive when indurations \geq 5mm in diameter 48 h post injection were observed.

PCR and hybridization

Sera samples were processed for PCR using a *Viannia* subgenus specific primer set derived from *L. braziliensis* nontranscribed ribosomal gene spacer DNA sequences (Guevara *et al.*, 1992) [GenBank accession M75133]. The details on the DNA from buffy coat of the sera samples regarding isolation and processing were given in a previous publication (Guevara *et al.*, 1994). A repetitive sequence of 126 base pairs of ribosomal DNA of *L. braziliensis* was used as a PCR amplification target using the primers, forward 5'GCAGCACAGGGAAAG 3'; and reverse, 5'TACCTCTCTCCGTGATCG 3'. The reaction mixture (final volume, 25 μ l) was prepared

as previously described (Guevara *et al.*, 1994). DNA amplifications were carried out in a Perkin-Elmer thermal cycler (Gene Amp PCR System 2400) as follows: an initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 25 cycles of 94°C, 52°C, 72°C of 1 min each, with a final extension at 72°C for 5 min. All reactions were duplicated, and each set of reactions included a positive control consisting of 20 ng of purified DNA of *Leishmania braziliensis*, and a negative control containing no DNA. PCR products were visualized by electrophoresis in a 2% agarose gel stained with ethidium bromide. All the samples were hybridized with a *L. braziliensis* DNA probe labeled with digoxigenin (Roche Diagnostic GmbH- Mannheim, Germany) as previously reported (Guevara *et al.*, 1994).

Serology

Serological methods used to detect circulating anti-*Leishmania* antibodies (Abs) included a direct agglutination test (DAT) pretreated with 2-mercaptoethanol (concentration of 0.5 OD crude antigen); an indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) using 40 promastigotes/400X microscopical field and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-(4µg/µl soluble protein). Tests were performed following standard procedures and adapted for detection of *Leishmania* Abs in our laboratory as previously reported (Añez *et al.*, 2000). The equivalent dilution value for DAT and IFAT techniques to be considered as seropositive (cut-off titers) was that about 1:64 dilution, and for ELISA an optical absorbance $\geq 0.4 \pm 2SD$. Patients were considered seropositive when they showed reactivity in at least 2 of the 3 serological tests.

Statistical analysis

This consisted of a comparison of serological tests (DAT, IFAT, ELISA) with other alternative diagnostic criteria considered to be highly reliable. These included clinical (presence of lesion), parasitological (detection of parasites), immunological (LST) and molecular (PCR) methods, defined above for each clinical condition. Comparison included estimation of sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, observed agreement, expected agreement by chance, kappa coefficient with the standard error, Z statistic, and P value all at a 95 % of confidence interval. All these values were calculated by Epi Info 6.04.

RESULTS

Serological analysis in individuals with different ACL clinical conditions

From the 127 individuals selected to be examined by conventional serological tests to detect circulating specific *Leishmania* Abs at different ACL clinical conditions, 44 fulfilled the inclusion criteria to be considered as active cases (Group 1). They included 100% with pl, 88.6% (39/44) showing pp, 100% with + LST and 97% (38/39) showing +PCR for specific *L. braziliensis* DNA. The sera were examined using DAT, IFAT and ELISA methods. From the 44 sampled individuals, 20 (45%) revealed positive results in 2 of the 3 methods used, a condition established to consider a patient as seropositive. The analysis of the results with each particular serological test revealed a 9% seropositives when DAT was performed, 50% (22/44) with IFAT and 84% in the samples tested with ELISA test. Details of the obtained results of the serology of each single sample are shown in Table I. The analysis of the serological results obtained from the group made up by 43 individuals recovered from lesions at different time after infection (Group 2) revealed an overall percentage of seropositives of 9.3% (4/43) despite having 100% positive results with the diagnosis by LST and PCR (Table II). In this group values of 7%, 9% and 42% were recorded when DAT, IFAT, and ELISA methods were respectively performed (Table II). Similar results were detected in those asymptomatic individuals of the Group 3 bearing inapparent infection. In this case a 12.5% general sero-reactive was recorded and values of 15%, 8.0% and 30% were obtained with DAT, IFAT, and ELISA methods respectively (Table II).

Statistical analysis

Statistical analysis showed that serological (TAD, IFAT and ELISA) methods used here to diagnose people at different ACL clinical conditions did not result in very reliable results, judging by the low concordance between the sero-test outcome and the established clinical condition group. The sensitive value expressed as true positive rate (TPR) considering G1-G3 and the 3 serological methods revealed an overall result of 0.23, with particular TPR of 0.45, 0.093 and 0.125 for G1, G2 and G3 respectively. In Table II details are given on the sensitive measures as TPR and FNR for 3 different serological tests and

Table I. Comparative methods for diagnosis of individuals with active ACL in Venezuela.

Patient	Presence of lesion	Presence of parasites	LST	PCR	DAT	IFAT	ELISA	Serologic criterium for positive
1	+	+	+	+	-	-	-	-
2	+	+	+	+	-	+	+	+
3	+	+	+	+	-	+	+	+
4	+	nps	+	+	-	-	-	-
5	+	+	+	+	-	-	-	-
6	+	+	+	Nd	-	-	+	-
7	+	+	+	Nd	-	-	+	-
8	+	+	+	Nd	-	+	+	+
9	+	+	+	+	-	+	+	+
10	+	+	+	+	-	+	+	+
11	+	+	+	+	-	-	+	-
12	+	nps	+	+	-	-	+	-
13	+	+	+	Nd	-	+	+	+
14	+	+	+	+	-	+	+	+
15	+	+	+	Nd	-	+	+	+
16	+	+	+	+	-	+	-	-
17	+	+	+	+	-	-	-	-
18	+	+	+	+	-	+	+	+
19	+	nps	+	+	-	-	-	-
20	+	+	+	+	-	+	+	+
21	+	+	+	+	-	-	-	-
22	+	+	+	+	-	+	+	+
23	+	nps	+	+	+	+	+	+
24	+	nps	+	+	-	-	+	-
25	+	+	+	+	-	-	+	-
26	+	+	+	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	-	-	+	-
28	+	+	+	+	-	+	+	+
29	+	+	+	-	-	+	+	+
30	+	+	+	+	-	+	+	+
31	+	+	+	+	-	+	+	+
32	+	+	+	+	-	-	+	-
33	+	+	+	+	+	+	+	+
34	+	+	+	+	+	+	+	+
35	+	+	+	+	-	-	+	-
36	+	+	+	+	-	-	+	-
37	+	+	+	+	-	-	+	-
38	+	+	+	+	-	+	+	-
39	+	+	+	+	-	-	+	-
40	+	+	+	+	-	+	+	+
41	+	+	+	+	-	-	+	-
42	+	+	+	+	-	-	+	-
43	+	+	+	+	-	-	+	-
44	+	+	+	+	-	-	+	-
	44/44(100%)	39/44(88.6%)	44/44(100%)	38/39(97%)	4/44(9.0%)	22/44(50.0%)	37/44(84.0%)	20/44(45.0%)

nd: not done; nps: not parasite seen

Table II. Compared sensitivity of three serological tests at different ACL clinical condition.

Clinical condition	Serological tests						Serological criteria for positive		Total individuals
	DAT		IFAT		ELISA		N°+ (TPR)	N°- (FNR)	
	N°+ (TPR)*	N°- (FNR)**	N°+ (TPR)	N°- (FNR)	N°+ (TPR)	N°- (FNR)			
Active	4(0.09)	40(0.91)	22(0.50)	22(0.50)	37(0.84)	7(0.16)	20(0.45)	24(0.55)	44
Recovered	3(0.07)	40(0.93)	4(0.09)	39(0.91)	18(0.42)	25(0.58)	4(0.09)	39(0.91)	43
Asymptomatic	6(0.15)	34(0.85)	3(0.08)	37(0.92)	12(0.30)	28(0.70)	5(0.13)	35(0.87)	40
Total	13(0.10)	114(0.90)	29(0.23)	98(0.77)	67(0.53)	60(0.47)	29(0.23)	98(0.77)	127

* TPR: True positive rate; **FNR: False negative rate

3 ACL clinical conditions. Specificity, estimated as true negative rate (TNR), revealed more acceptable values, showing an overall TPR of 0.89 and values of 0.90, 0.87 and 0.83 for DAT, IFAT, and ELISA, respectively. Table III provides the statistical results used for comparison including PPV, NPV, Kappa coefficient, and p value.

DISCUSSION

In the present study, from a total of 4351 people from different rural villages of western Venezuela examined for leishmaniasis, 231 were selected to evaluate conventional serological tests used to diagnose the cutaneous form of the disease. The chosen people selected were divided into 4 groups according to their clinical conditions. The first group (G1) was made up of 44 individuals suffering of active american cutaneous leishmaniasis (ACL), who were diagnosed by clinical (presence of active lesion), parasitological (presence of parasite at the

lesion site), immunological (positive leishmanin skin test), and molecular (positive PCR) criteria. Another group (G2) consisted of 43 people who had recovered from ACL by the time they were sampled. Some of them had been diagnosed and treated at our laboratory, others in collaboration with the center for diagnosis and treatment of the Ministry of Health in Tovar, Merida, Venezuela. We were able thus to follow them during the course of the infection until they recovered. The Group 3 was made up of 40 people who, although living in areas where leishmaniasis is considered to be endemic, had never exhibited symptoms attributable to ACL according to their own testimony by the time of sampling. However, they showed positive results for LST and PCR. A fourth group (G4) of 104 healthy individuals also living in endemic areas as those of Group 3, but showing negative results for LST and PCR, were selected as the control group (G4).

The conformation of the selected study groups allowed us to have representative individuals with ACL at different clinical and immunological

Table III. Statistical comparison of serological tests used to diagnose ACL.

	DAT	IFAT	ELISA	Serological criteria for positive
Sensitivity (95% CI)	0.10(0.05-0.17)	0.23(0.16-0.31)	0.53(0.43-0.61)	0.23(0.16-0.31)
Specificity (95% CI)	0.90(0.82-0.90)	0.87(0.78-0.92)	0.83(0.73-0.89)	0.89(0.81-0.94)
PPV (95% CI)	0.56(0.34-0.76)	0.67(0.51-0.80)	0.79(0.68-0.86)	0.73(0.55-0.84)
NPV (95% CI)	0.45(0.38-0.52)	0.48(0.40-0.55)	0.59(0.50-0.66)	0.49(0.41-0.56)
Observed agreement	0.463203	0.515152	0.662338	0.528139
Expected agreement by chance	0.460130	0.468751	0.486854	0.467458
Kappa coefficient	0.005693	0.087343	0.341976	0.113946
Standard error of kappa	0.036310	0.047966	0.61527	0.046517
Z	0.16	1.82	5.56	2.45
P value	0.437707	0.034308	0.000000	0.007152

conditions. These circumstances appear to be ideal for comparing the product of the humoral response to the infection of *Leishmania* causing ACL using serological methods previously suggested as useful tools to detect circulating specific antibodies. Having created a statistically acceptable sample of the various groups and being able to use alternative methods to diagnose ACL at any clinical condition, we evaluated DAT, IFAT, and ELISA, 3 commonly used conventional serological methods, to assess its reliability as diagnostic tools. When all the clinical conditions and the diagnostic criteria established here to declare a seropositive (2 positive of the 3 tests used) were considered, an overall percentage of 23% was recorded, with values of sero-reactive of 45%, 9% and 13% for the clinical groups of active, recovered, and inapparent, respectively. When considering each particular serological test used to diagnose people with ACL at different clinical conditions, the examination also revealed low relative values for seropositives, including 10% for DAT, 23% for IFAT, and 53% for ELISA. This fact appears to indicate that the serological methods used in the present work under standard conditions do not offer confidence enough to be considered as reliable diagnostic tool for ACL. This assumption was particularly true when these serological tests were compared to other alternative methods recognized for their high specificity and sensitivity as LST, PCR, or the visualization of the parasite in active clinical cases (G1).

Under these circumstances, the present work demonstrated a remarkable inconsistency in the 3 serological tests used here to diagnose ACL. The fact that only a 45% of sero-reactive cases were detected compared to 88%, 97% and 100% for parasite detection, PCR and LST, respectively, appears to corroborate the above statement. In addition, statistical analysis of the results obtained using DAT, IFAT, and ELISA as serological tests also revealed a low positive predictive value (0.73), a low negative predictive value (0.49), and a low kappa coefficient value ($k=0.114$), indicating low concordance among them and a low level of reliability for considering these tests as recommendable tools for ACL diagnosis.

The results recorded in the present study appear to corroborate previous observations by other workers who reported that serological studies using whole serum may be considered of limited value in ACL because of the cross-reactivity and the

remarkable different patterns of reactivity (Ulrich *et al.*, 1988). Regarding sensitivity, none of the cases studied in the present work showed such a high value as to consider serology as a good diagnostic tool for ACL. This aspect appears to be a generalized problem for serology, and low values (63%) have also been reported for canine visceral *Leishmaniasis* (Ashford *et al.*, 1995). The authors stated that such results in relation to sensitivity of serological tests raise questions about the use of serology to detect *Leishmania*-infections, suggesting that more sensitive methods as PCR might serve as a better gold standard to define infection by this parasite.

Finally, taking into consideration the various difficulties in establishing serological tests as reliable tools for ACL diagnosis, new or improved tools need to be produced. In order to be considered as an ideal indicator, a good serological tool must be simple, non-invasive, easy to centralize, cheap, and reliable. Meanwhile, validation of a new serological test for ACL and development of new primers for diagnosis and identification are required.

Evaluación de pruebas serológicas convencionales para el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea americana

RESUMEN

Tres pruebas serológicas (TAD, IFI y ELISA) fueron evaluadas en sueros de pacientes con *Leishmaniasis* cutánea Americana (LCA) en diferentes condiciones clínicas. Para este propósito se estableció como criterio diagnóstico la reactividad de al menos dos de las tres pruebas para declarar un individuo seropositivo. Previo a la realización de la serología, los individuos seleccionados fueron diagnosticados clínicamente (presencia de lesión=pl o presencia de cicatriz =pc), parasitológicamente (presencia de parásitos =pp), inmunológicamente (IDR) y molecularmente (PCR). Para la comparación estadística de las pruebas serológicas evaluadas fueron conformados 4 grupos constituidos por: 1. Pacientes con lesiones activas (n=44; pl, pp, IDR+, PCR+); 2. Pacientes cicatrizados recobrados de una infección por *Leishmania* (n=43; pc, IDR+, PCR+); 3. Individuos asintomáticos de áreas endémicas con evidencias de haber tenido contacto previo con

Leishmania (n=40; IDR+, PCR+) y 4. Individuos negativos controles de áreas donde la *Leishmaniasis* es endémica y quienes vivían bajo condiciones de riesgo (n=104; IDR-, PCR-). Los análisis estadísticos de los resultados obtenidos utilizando las tres pruebas serológicas indicadas, revelaron valores muy bajos de sensibilidad, siendo de 50%, 9% y 12% para los grupos de pacientes con lesión activa (1), pacientes recobrados de infección previa (2) e individuos asintomáticos (3) respectivamente, con una especificidad general de 89%. Asimismo, fue detectado un bajo valor predictivo positivo (PVP=0,73); un bajo valor predictivo negativo (PVN=0,49) y un muy bajo valor de coeficiente kappa ($k=0,114$). Los resultados obtenidos en el presente estudio arrojan dudas sobre la confiabilidad de las tres pruebas de diagnóstico serológico evaluadas aquí para detectar LCA en cualquier condición clínica.

Palabras claves: Leishmaniasis cutánea americana, diagnóstico, serología.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Dr. G. Fermín for carefully reviewing of the manuscript; Mr. N. Diaz and Mr. A. Fernandez for helping on the statistical analysis. This work was supported by projects sponsored by CDCHT-ULA and FONACIT-G-2005000370 (complementary activities). The authors are grateful to REVELE for the very long discussion on the subject.

REFERENCES

- Allain D. S. & Kagan I. G. (1975). A direct agglutination test for leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **24**: 232-236.
- Añez N., Gonzalez C., Lugo de Yarbuh A., Gonzalez N., Rojas A., Crisante G., Percoco G., Guevara P. & Ramirez J. L. (2000). Association of trauma with *Leishmania* parasite recall. Clinical and experimental evidences. *Bol. Dir. Malarial. San Amb.* **40**: 13-20.
- Ashford D. A., Bozza M., Freire M., Miranda J. C., Sherlock I., Eulalio C., *et al.* (1995). Comparison of polymerase chain reaction and serology for detection of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**: 251-255.
- Behin R. & Jacques L. (1984). Immune response to leishmaniasis. *Crit. Rev. Trop. Med.* **2**: 141-188.
- Celeste B. J., Angel S. O. & Castro L. G. M. (2004). *Leishmania* infantum heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **37**: 1591-1593.
- Guevara P., Alonso G., DaSilveira J. F., DeMello M., Scorza J. V., Añez N. & Ramirez J. L. (1992). Identification of New World *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **56**: 15-26.
- Guevara P., Rojas E., Gonzalez N., Valera M., Scorza J. V., Añez N. & Ramirez J. L. (1994). Presence of *Leishmania braziliensis* in blood samples from cured patients or at different stages of immunotherapy. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **1**: 385-389.
- Marques M. J., Volpini A. C., Genaro O., Mayrink W. & Romanha A. J. (2001). Simple forms of clinical samples preservation and *Leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**: 902-906.
- Reed S., Badaró R., Masur H., Carvalho E. M., Lorencó R., Lisboa A., Teixeira R., Johnson W. & Jones T. C. (1986). Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**: 79-85.
- Reiner S. L. & Locksley R. M. (1995). The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu. Rev. Immunol.* **13**: 151-177.
- Roberts L. J., Handman E. & Foote S. J. (2000). Leishmaniasis – Clinical Review. *BMJ.* **321**: 801-804 (bmj.com).
- Rodrigues E. H., Felinto de Brito M. E. & Mendoca M. G. (2002). Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 3572-3576.

Ulrich M., Centeno M., Mattout Z. & Convit J. (1988). Serological patterns and specificity in American cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **39**: 179-184.

WHO/TDR. (2002). Special Programme for Research and Training in tropical disease. (2002.) *Leishmaniasis*. www.who.int/tdr.

Recibido el 18/05/2006
Aceptado el 07/02/2007

Malaria inducida en el estado Aragua, Venezuela

José Luis Cáceres G.¹, Olga Serrano², Fredy Peña² & Florencio Mendoza²

Las infecciones de malaria inducida son transmitidas por transfusión de sangre o productos sanguíneos, trasplante de órganos y agujas o equipos de inyección contaminados. Durante el período Junio 2005 a Abril 2006, fueron diagnosticados tres casos de malaria inducida en instituciones públicas y privadas del estado Aragua en Venezuela, donde se juntaron el retardo en el diagnóstico y la mala praxis de técnicas de enfermería. La evidencia de estos accidentes debe conducir a la Corporación de Salud regional, a revisar las normas y técnicas de perfusión endovenosa intrahospitalaria, a la actualización científica del personal de salud en el diagnóstico, tratamiento y manejo de pacientes con enfermedades transmisibles y mantener la correspondiente supervisión sobre el funcionamiento y atención hospitalaria.

Palabras claves: malaria inducida, transfusión, Aragua, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

El paludismo es un problema mundial grave que afecta de forma inaceptable la salud y el bienestar económico de las comunidades más pobres del mundo. A finales de 2004 había zonas de riesgo de transmisión del paludismo en 107 países y territorios, y unos 3.200 millones de personas vivían en zonas de riesgo de transmisión del paludismo (WHO, 2005).

En Venezuela, durante el período 1996 - 2005, fueron diagnosticados 301.311 casos de malaria, con una fórmula parasitaria de 84,22% a *Plasmodium vivax*, 15,21% a *Plasmodium falciparum*, 0,45% de Infecciones mixtas y 0,12% a *Plasmodium malariae*. El género masculino fue el más afectado con 188.163 (62,45%) de los casos y el grupo de 15 a 64 años o población económicamente activa fue el de mayor incidencia con 204.157 (67,75%) casos, mientras que los menores de 15 años presentaron 30% de las infecciones. Los estados con mayor incidencia en el decenio fueron: Bolívar, Sucre, Amazonas y Delta Amacuro.

En el estado Aragua, ubicado en el área de malaria erradicada del país, durante el mismo decenio fueron diagnosticados 706 casos, registrando una fórmula parasitaria de 87,53% a *P. vivax*, 10,91% a *P. falciparum*, 1,42% de Infecciones mixtas y 0,14% a *P. malariae*. El género masculino fue el de mayor número de diagnósticos de malaria (76%) y el grupo de 15 a 64 años fue el de mayor incidencia con 627 (89%) casos, mientras que los menores de 15 años presentaron 9,3% de las infecciones. Dentro de la clasificación de los casos de la enfermedad diagnosticados en el estado, se puede observar que 98,9% de los mismos fueron importados de los estados endémicos del país o del exterior, un solo caso fue registrado como introducido y fueron reportados 7 casos inducidos (Tabla I). De los 17.199 casos de malaria registrados en el país durante el primer semestre del año 2006, en el estado fueron diagnosticados treinta, de los cuales dos fueron clasificados como inducidos.

Esta última incidencia de infecciones inducidas, transmitida por medios mecánicos tales como transfusión de sangre o productos sanguíneos, trasplante de órganos y agujas o equipos de inyección contaminados (Taylor, 1996), ha despertado preocupación en las autoridades sanitarias del estado, ya que durante el período Junio 2005 a Abril de 2006, fueron reportados tres casos sospechosos de dicha

¹ Docente Investigador Universidad de Carabobo, Sede Aragua.

² Unidad de Enfermedades Endemo-Epidémicas. Corposalud- Aragua.

*Autor de correspondencia: jolucag@cantv.net

Tabla I. Resumen epidemiológico de la malaria, estado Aragua (1996 – 2005).

INDICADOR	Año										TOTAL	
	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005		
Casos	77	151	129	53	57	23	31	41	84	60	706	
Especie Parasitaria	<i>P. vivax</i>	61	142	113	48	49	22	30	34	67	52	618
	<i>P. falcip.</i>	13	8	13	4	8	1	1	7	15	7	77
	<i>P. malariae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
	Inf. Mixta	3	1	3	1	-	-	-	-	1	1	10
Grupo Etario	<15	5	13	6	5	15	3	5	3	7	4	66
	15-64	72	136	121	48	41	19	25	36	76	53	627
	65	-	2	2	-	1	1	1	2	1	3	13
Género	Masculino	67	128	109	38	36	17	20	28	54	40	537
	Femenino	10	23	20	15	21	6	11	13	30	20	169
Clasificación del caso	Importado	74	150	127	53	57	23	31	41	83	59	698
	Introducido	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	Inducido	3	1	2	-	-	-	-	-	-	1	7
Estado de Origen de la Infección	Bolívar	31	28	25	18	30	4	9	21	56	41	264
	Anzoátegui	2	-	-	-	-	-	-	1	-	-	3
	Portuguesa	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
	Barinas	1	8	2	1	-	-	-	-	-	-	12
	Sucre	5	16	20	12	14	14	18	5	13	5	122
	Zulia	1	-	1	-	-	-	1	-	-	-	3
	Táchira	-	3	1	2	3	1	-	-	-	-	10
	Apure	28	79	73	14	2	-	-	-	-	-	196
	Mérida	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	Amazonas	3	15	3	6	8	4	3	12	14	11	79
	Delta A.	1	-	-	-	-	-	-	2	-	-	3
	Del Exterior	1	1	1	-	-	-	-	-	-	2	5
Muertes	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	1	3

Fuente: Unidad Programática de Enfermedades Endemo – Epidémicas. Corporsalud Aragua.

transmisión en entidades asistenciales públicas y privadas del estado.

El 29 de julio de 2005, fue diagnosticada positiva a *P. vivax*, la gota gruesa de una paciente de 73 años de edad, residenciada al norte de la ciudad de Maracay, ama de casa, quien había sido ingresada en dos oportunidades (28/06/05) y 13/07/05) en el Hospital Central de Maracay (HCM), con diagnóstico de Enfermedad Cerebro Vascular de tipo Isquémica y la cual negó viajes a áreas endémicas de malaria en el país.

El 22 de febrero de 2006, el Servicio de Hematología del Hospital José María Benítez (JMB) de la ciudad de La Victoria en el estado, reportó positiva a *P. vivax*, la muestra hemática de un paciente de 64 años de edad, obrero jubilado, con residencia en la población de San Mateo, municipio Bolívar del estado Aragua, hospitalizado en dicho centro asistencial durante el mes de enero de 2006, con diagnóstico de hemorragia digestiva superior

por gastritis erosiva, miocardiopatía chagásica, hipertensión arterial (HTA), recibiendo como parte de su tratamiento, transfusión de hemoderivados.

El 15 de mayo de 2006, el Laboratorio Central de la Dirección General de Salud Ambiental en Maracay, reporta positivo a *P. vivax*, el examen de gota gruesa solicitado a un paciente masculino de 32 años de edad, de profesión oficinista, residenciado al sur de Maracay, quien había sido hospitalizado en una clínica privada, por presentar cefalea y algias de columna cervical.

En la literatura malárica se encuentra en diversos países, una serie de infecciones ocasionadas por malaria inducida. En Brasil, se destaca el registro de 20 casos por *P. vivax* entre 1980 y 1994. Los pacientes negaron haber realizado viajes recientes y menos a áreas con posibilidad de transmisión de malaria. Quince casos indicaron uso de drogas inyectadas, participando en círculos de conocidos afines que generalmente usaban la misma aguja y

jeringa en el uso de cocaína y los otros cinco, a través de transfusiones sanguíneas (Lo *et al.*, 1991; Alves *et al.*, 2000).

Cinco casos fueron reportados entre 1992 y el año 2000 en USA. Cuatro pacientes a *P. falciparum* quienes ameritaron transfusiones sanguíneas por diferentes patologías y otro por *P. malariae* quien se hirió con una jeringa después de tomar una muestra hemática de un paciente (Zucker, 1996; Causer, 2000). En Italia también fue registrado un caso mortal de paludismo inducido en un médico que trabajaba en la unidad de primeros auxilios de un hospital, por herida con una jeringa que había utilizado para una paciente positiva (Affronti, 1998).

Aunque la incidencia de malaria inducida en Venezuela es aparentemente baja, los riesgos que se corren pueden llegar a ser fatales. Esta investigación pretende dar a conocer los casos producidos en un área no endémica, los cuales como se observa, pueden presentarse en cualquier tipo de centro asistencial, público o privado, mostrar las fallas técnicas que se presentaron en los mismos, y a la vez, hacer el respectivo llamado de alerta al mejoramiento de los procedimientos desde el diagnóstico hasta la recuperación del paciente.

METODOLOGIA.

El presente estudio se realizó en el estado Aragua, situado en la región centro-norte de Venezuela, limitando con el mar Caribe por el norte, el estado Guárico por el sur, los estados Vargas, Miranda y Guárico por el este y Carabobo y Guárico por el oeste. Con una superficie de 7.014 km², representa 0,76 % del territorio nacional. Su población es aproximadamente de 1.450.000 habitantes. Su capital Maracay, con 477.000 habitantes, posee un estimado de casi 800.000 para su área metropolitana. Su relieve, de norte a sur, se clasifica en tres regiones; la costa, la cordillera de la Costa y la depresión del lago de Valencia (Venezuelatuya, 2005)

La Salud está regida por la Corporación de Salud del Estado Aragua (Corposalud Aragua), un Instituto Autónomo adscrito a la Gobernación del Estado, creado por la Ley de Salud de Aragua, para desarrollar el sistema estatal de salud y administrar y operar los establecimientos y servicios transferidos

del Ministerio de Salud y Desarrollo Social a la Gobernación. Tiene rango de Secretaría de Estado y expresa las políticas de salud del Estado Venezolano, asumiendo la representación del Ministerio de Salud en la región.

Para la investigación epidemiológica de los casos sospechosos de transmisión inducida, fueron practicadas entrevistas a los pacientes, familiares, vecinos y líderes comunitarios, igualmente al personal médico y de enfermería de las áreas de hospitalización donde fueron ingresados en su momento los pacientes. Fueron cotejadas las historias clínicas de los pacientes sospechosos con las de los casos de malaria registrados en cada establecimiento asistencial. Fueron realizados los correspondientes exámenes de gota gruesa a colaterales y vecinos de los pacientes, e igualmente, capturas e identificación entomológica de vectores en las comunidades y áreas adyacentes de los hospitales públicos y privados involucrados.

RESULTADOS.

Luego de realizar la investigación epidemiológica a cada uno de los casos sospechosos, la información obtenida y procesada de las entrevistas y análisis de las historias clínicas de los pacientes en los tres centros asistenciales, produjo los siguientes resultados:

Caso 1

A las 3:10 A.M. del día 28/06/05, fue ingresada en la sala de emergencia del HCM una paciente de 73 años de edad, ama de casa, residente al norte de Maracay, la cual presentaba "somnolencia", y cuyo diagnóstico de ingreso fue Enfermedad Cerebro Vascular (ECV) tipo isquémica. A las 4:35 A.M., fue ingresado en la misma sala, por fiebre y cefalea, un paciente de 32 años de edad, residiendo en la población de Turmero, con diagnóstico inicial de Síndrome Viral Tipo Dengue. Los dos pacientes fueron colocados en sus respectivas camillas en el pasillo de la sala de emergencia de adultos, uno frente al otro en las áreas demarcadas H1 y H2. Las condiciones generales de salud de los dos pacientes fueron reestablecidas, decidiendo su alta médica el día 29/06/05 para la mujer y el 30/06/05 para el hombre, con diagnósticos de egreso iguales a su ingreso.

Tres días después, el paciente por continuar con su sintomatología, consulta en el Ambulatorio de Turmero, donde se le diagnostica y se le trata de malaria a *P. vivax*, refiriendo visita reciente al estado Amazonas (área endémica de malaria). La paciente regresa al HCM el día 13/07/05, por somnolencia, e ingresa con diagnóstico de ECV isquémica. La familia refiere “quebrantos y fiebre” a partir del día 11/07/05, iniciando sus fiebres vespertinas y escalofríos fuertes, a partir del 19/07/05. El día 29/07/05 se le realiza gota gruesa, con resultado positivo a *P. vivax*. Los familiares niegan salida de la paciente a áreas endémicas de la enfermedad.

La investigación epidemiológica condujo a la realización de gota gruesa al grupo familiar y vecinos de la paciente, procesando 91 muestras, todas con resultado negativo. Igualmente fueron instalados puestos de captura de vectores, cerca de la casa de la paciente y en los alrededores del HCM, encontrando la presencia principalmente de *Aedes*, *Culex* y dípteros no hematófagos.

Al realizar la revisión correspondiente a las historias médicas de los pacientes, se observó que dentro de los horarios del plan de hidratación el día 28/06/05, hubo coincidencia a las 4 P.M., cuando se administró 500 ml de solución 09% a cada uno de los pacientes, cumplida y firmada por el mismo personal de enfermería. El Comité de Enfermedades Endemo-Epidémicas de Corposalud, analizados y discutidos los datos obtenidos del caso, concluyó estar en presencia de un Caso Inducido de Malaria, por “manejo mecánico y uso de inyectoras comunes”.

Caso 2

En enero de 2006 con diagnósticos de Hemorragia digestiva superior por gastritis severa, Miocardiopatía Chagásica e Hipertensión Arterial, es ingresado en el Hospital José María Benítez (JMB) de la Victoria, estado Aragua, un paciente de 64 años de edad, obrero jubilado, con residencia en la población de San Mateo, municipio Bolívar del estado Aragua. Durante su hospitalización recibe como parte del tratamiento Transfusión de Hemoderivado (concentrado globular). Es egresado el día 30 de enero en mejores condiciones generales.

El 16 de Febrero el paciente acude al servicio de Emergencia del Hospital JMB por presentar cuadro clínico de 7 días de evolución caracterizado

por hipertermia cuantificada de 40° C, a predominio vespertino, bimodal acompañándose de escalofríos y tos seca. Se decide su ingreso con impresión diagnóstica de: Fiebre Dengue, Hipertensión Arterial, Insuficiencia Cardíaca Congestiva compensada. El día 22 es evaluado por el servicio de Hematología el cual observa inclusiones en los eritrocitos y sugiere un examen de gota gruesa para descartar Malaria. El día 23 se realiza gota gruesa la cual se reporta positiva a *P. vivax*. Debido a que el paciente no refiere antecedentes de haber viajado fuera del estado y en el área donde reside el paciente no hay antecedentes de la presencia del vector anofelino, se inicia la investigación epidemiológica correspondiente.

Se pensó en la opción de un caso inducido, ya sea producto de una transfusión de sangre o por inoculación accidental. Para descartar la primera hipótesis (transfusión sanguínea), se obtuvo del banco de sangre del Hospital JMB los nombres y direcciones de los donantes en el mes de enero. Visitados e interrogados, negaron antecedentes de haber viajado a zonas endémicas de malaria y de haber tenido síntomas de la enfermedad. Se les tomó muestra para Gota gruesa, las cuales resultaron negativas. La segunda hipótesis (inoculación parenteral accidental) llevó a investigar los casos de Malaria ocurridos en el Hospital JMB durante la hospitalización del paciente, comprendida entre el 22 al 30 de enero de 2006, arrojando los siguientes resultados: el paciente permaneció hospitalizado en el área de Emergencia desde el 22 al 30 de enero. En dicha área coincidió los días 25, 26 y 27 de enero con dos pacientes diagnosticados con malaria. Un hombre de 36 años de edad y su esposa de 31 años, quienes visitaron desde el 02 al 07 de enero el estado Sucre (segundo estado en incidencia de la enfermedad del país). Al estudiar las historias clínicas se encontró que el día 26 de enero, el tratamiento endovenoso recibido a las 08:00 P.M. por los dos hombres, fue el mismo (Omeprazol y Vitamina K) y administrado por el mismo personal de guardia en el mismo horario. Por lo anteriormente expuesto, se da como causa probable de infección la inoculación parenteral, por lo que se decide clasificar al caso como Inducido a *P. vivax*.

La investigación se complementó con una actividad de captura de vectores en los alrededores de la vivienda del paciente y en el Hospital JMB, durante los días 20, 21 y 22 de marzo, no encontrándose anofelinos.

Caso 3

El 07/04/06 inicia su sintomatología un paciente masculino de 32 años de edad, Oficinista, residenciado al sur de Maracay, cuando presenta fiebre (40 °C). Acude al Hospital Los Samanes de Maracay, donde se le encontró prueba de ASTO positiva. Continúa la fiebre y el día 14 de abril, presentó diarrea, vómitos, coluria, tinte icterico de piel y mucosas, tos seca, artralgias y cefalea, motivo por el cual consulta el 15 de abril al HCM donde se decide su ingreso con el diagnóstico de Síndrome Viral tipo Dengue e Infección por virus hepatotrofo. Es egresado el día 21 de abril por estabilidad clínica con diagnóstico de Hepatitis "C" e infección por citomegalovirus, persistiendo la fiebre con períodos más espaciados.

Es llevado de emergencia el día 13 de mayo a una clínica privada, por presentar pérdida del conocimiento, por lo que es ingresado para estudio. El día 15 de mayo se le realiza examen de Gota Gruesa en el Laboratorio Central de Malaria de la Dirección de Salud Ambiental, resultando positiva a malaria por *P. vivax*. Ante la negativa del paciente de haber visitado áreas endémicas de malaria dentro y fuera del país y los antecedentes de hospitalizaciones, incluida una del mes de marzo (días 22 y 23), en dicha clínica privada por presentar dolor en el cuello y cefalea, se inicia la investigación de posibles contactos con pacientes maláricos en los centros donde estuvo recluso y en la comunidad donde reside.

Fueron tomadas 195 muestras de gota gruesa en su comunidad, resultando todas negativas a *Plasmodium* spp. Se realizaron capturas de vectores encontrando 0,5% de *Anopheles albimanus* y 0,2% de *Anopheles aquasalis*, 84,5% *Culex* spp, y 14,3% *Mansonia* spp. A pesar de la presencia de anofelinos en la zona, la ausencia de otros casos de malaria no permite clasificar el caso como introducido por lo que se decide continuar con la investigación y visitar el servicio de Epidemiología e Historias Médicas del Hospital Central de Maracay a fin de revisar la historia clínica del paciente y cotejar con otros casos de malaria registrados en ese centro. La búsqueda no arrojó ninguna información importante.

Debido al antecedente de hospitalización en una clínica privada de la ciudad y la presencia de un caso de malaria por *P. vivax* procedente del estado Sucre, registrado en dicho centro durante el

mes de Marzo, se decide visitar esta clínica y solicitar las historias de ambos pacientes para compararlas, encontrándose que el paciente con malaria estuvo hospitalizado entre el 18 y 27 de marzo, coincidiendo los días 22 y 23 de marzo en el mismo piso, en habitaciones contiguas, con tratamiento endovenoso indicado en los mismos horarios y practicado por el mismo personal de guardia.

DISCUSION

La malaria es transmitida en la naturaleza por la picada de un mosquito anofelino hembra infectado. La enfermedad puede ser adquirida en el laboratorio por el contacto inadvertido con un vector infectado de una colonia de mosquitos o accidentalmente ocasionada por contacto con sangre infectada de humanos o de animales huéspedes, a través de pinchazos con agujas o con heridas abiertas y se ha presentado de cuatro a diecisiete días después de la exposición (Reyes *et al.*, 2004).

El riesgo de adquirir malaria por vía de transfusión de componentes de la sangre es extremadamente bajo en países donde la malaria no es endémica, tales como Canadá y Estados Unidos. Se estima que en Estados Unidos puede haber un caso de malaria a través de transfusión por cada cuatro millones de unidades transfundidas, reportándose de uno a tres casos por año. En países donde la enfermedad es endémica, se pueden observar más de 50 casos por millón de unidades administradas (Bruce-Chwatt, 1982).

Para la prevención de la malaria inducida, se requiere realizar una selección de la sangre, tejidos, órganos, y especialmente definir la historia malárica de los donantes. La vigilancia debe ser mantenida en el tiempo para detectar prontamente los casos, identificando al donante infectado, para prevenir casos adicionales (Taylor, 1996).

El curso de la infección malárica inducida es diferente a la observada en un caso normal (WHO, 2005). Cuando la infección se debe a una transfusión de sangre, los períodos de incubación (que dependen del número de parásitos inoculados) suelen ser breves, pero pueden llegar a unos dos meses. Las observaciones sugieren que una parasitemia baja en el donante es suficiente para transmitir malaria (Slinger *et al.*, 2001)

y la supresión sub-óptima con medicamentos, puede prolongar el período de incubación (WHO, 2005). Los tres casos con diagnóstico de *P. vivax* en Aragua, tuvieron inicio de los síntomas promediando los 14 días después del contacto con el paciente infectado y fueron diagnosticados entre 14 y 28 días del inicio de la sintomatología.

En el estado Aragua, el primer diagnóstico a descartar ante un proceso febril es fiebre dengue, y es aceptado como norma en un área geográfica afectada por dicha enfermedad desde 1989. El problema se presenta cuando no se descartan otros diagnósticos y en la anamnesis no se investiga sobre el trabajo que desempeña o los viajes que haya podido efectuar recientemente el paciente. Aún con esta información, el olvido o desconocimiento de las áreas endémicas de las distintas enfermedades transmisibles en el país, complica más la situación.

La ciudad de Maracay, capital del estado, es considerada una “encrucijada”, donde convergen las distintas rutas hacia la capital de la república o, en sentido inverso, hacia el interior del país, de allí la gran cantidad de regiones o estados representados en los habitantes de la ciudad, los cuales serían los responsables de los casos de malaria importados desde las distintas áreas endémicas.

En el estado no habían sido clasificados casos de malaria inducidos desde el año 1999. Los tres reportados en el período junio 2005 a abril de 2006 tienen su importancia en Salud Pública por varias razones: primero, la falta de diagnóstico oportuno en los tres casos pudieron haber resultado potencialmente fatales, de haber sido diagnosticados a *P. falciparum*. Segundo, la sucesión de los casos en tan corto tiempo en instituciones públicas y privadas, hace pensar en las deficiencias de técnicas básicas en un personal que sirve de soporte al tratamiento y recuperación de los pacientes. Tercero, la perfusión intravenosa es una técnica básicamente de enfermería que requiere un conocimiento profundo de las bases fisiológicas y un manejo meticuloso de la atención al paciente y la aplicación correcta de un protocolo, para fundamentalmente prevenir las serias complicaciones que pueden presentarse (Merchán *et al.*, 2006). Se entiende entonces que muy probablemente fueron omitidas las normas y técnicas, incurriendo en mala praxis en el paso de administración de suero fisiológico al intentar “probar la vía”, o la contaminación de los

implementos o líquidos (o ambos) en la manipulación de tratamientos parenterales.

Aún siendo potencialmente fatal un caso de malaria inducido por *P. falciparum*, pudiera el paciente tener oportunidad de recuperarse con un diagnóstico y su respectivo tratamiento a tiempo, pero en caso de contaminación por el virus de inmunodeficiencia (HIV) no habría ninguna oportunidad. Es importante alertar a las autoridades de los Centros de Salud tanto públicos como privados y a los responsables del programa antimalárico, sobre la corresponsabilidad de actualización científica del personal de salud, de recordar que un paciente que sufra de una enfermedad transmisible debe ser aislado, atendido por personal capacitado que tenga conocimiento de la enfermedad en cuestión, la destreza necesaria para tratar el caso y su trabajo permanentemente supervisado a fin de evitar errores que pudieran ser fatales.

Induced malaria in Aragua state, Venezuela

SUMMARY:

Infections of induced malaria are transmitted by blood transfusion, transplant of organs and contaminated needles of injection equipment. During the period between June of 2005 and April of 2006, three cases of induced malaria were recorded in public and private health institutions because of to delayed diagnosis and bad praxis in nursing techniques. This situation should lead the regional Health Corporation to review the rules and techniques of endovenous transfusion in the hospital, updating health personnel in diagnostic techniques, treatment and handling of patients with contagious diseases and maintaining appropriate supervision over the functionality and hospital care.

Key words: induced malaria, transfusion, Aragua, Venezuela.

REFERENCIAS

Affronti M., Carella S., Cusumano G., Giannone G., La Manna N., Pezzati R. *et al.* (1998). A proposito di malaria. Atti II Congr. Società Italiana di Medicina Tropicale, 7-9-Maggio. Bardolino, Verona. 127-129.

- Alves M. J., Rangel O. & de Sousa S. S. (2000). Malaria in the region of Campinas, Sao Paulo, Brazil, 1980 to 1994. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **33**: 53-60.
- Bruce-Chwatt L. J. (1982). Transfusion malaria revisited. *Trop. Dis. Bull.* **79**: 827-840.
- Causser L., Newman R., Barber A., Roberts J., Stennies G., Boland P. *et al.* (2002). Malaria Surveillance United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* **51**: 9-21.
- Lo S., Andrade J. C., Condino M., Alves M., Semeghini M. & Galvão E. (1991). The association of malaria, HIV seropositivity and intravenous administration in drug users. *Rev. Saúde Pública.* **25**: 17-22.
- Merchán N., Rojo R., Rodríguez-Arias C. & Blas M. J. (1996). Actuación de Enfermería ante una transfusión de sangre y derivados. *Revista de Enfermería. Escuela Universitaria de Enfermería de Albacete, España.* **4**: 50-54.
- Reyes H., Navarro P. & Sánchez M. (2004). Infecciones por parásitos en trabajadores de la salud: transmisión y control. *INHRR. Caracas.* **35**: 32-45
- Slinger R., Giulivi A., Bodie-Collins M., Hindieh F., St. John R., Sher G., *et al.* (2001). Transfusion-transmitted malaria in Canada. *Can. Med. Assoc. J.* **164**: 377-379
- Taylor F. (1996). Transfusion-Associated Malaria. *Emerg. Inf. Dis.* **2**: 99-109
- Venezuelatuya.com S.A. (2006). <http://www.venezuelatuya.com/estados/aragua.htm?yozzw513pPKm>. Obtenida: 29 Jun 2006, 05:22:13 GMT
- WHO (2005). Roll Back Malaria. World Malaria Report. WHO/HTM/MAL/2005. 326
- Zucker J. R. (1996). Changing patterns of autochthonous malaria transmission in the United States: a review of recent outbreaks. *Emerg. Inf. Dis.* **2**: 37-43.

Recibido el 10/08/2006
Aceptado el 12/03/2007

Estudio preliminar sobre la distribución espacial del riesgo epidemiológico de la fiebre amarilla selvática, municipio Jesús María Semprún, estado Zulia, Venezuela

Vidal Sáez-Sáez¹, Milady Seijas², Dayana Montezuma³ & Hernán Paublini⁴

El presente trabajo es un estudio exploratorio cuyo objetivo es vincular las condiciones físico-ambientales y socioeconómicas del municipio Jesús María Semprún del estado Zulia con la identificación de áreas de riesgo epidemiológico para el virus de la fiebre amarilla selvática. Se seleccionaron registros físico-ambientales (precipitación, temperatura del aire, geomorfología, vegetación y fauna) y socioeconómicos (actividades de la población, presencia de servicios básicos). Se determinaron unidades espaciales de diversos grados de amenaza y vulnerabilidad los cuales permitieron la posterior espacialización de los riesgos dentro del municipio Semprún. Los resultados sugieren tres grandes unidades espaciales, en donde, los cursos de agua vinculados con bosques de galería en el centro y oeste del área de estudio representan los espacios de más alto riesgo epidemiológico.

Palabras claves: fiebre amarilla, precipitación, temperatura del aire, amenaza, vulnerabilidad, epidemiología, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades metaxénicas, es decir, transmitidas por un vector revelan una gran complejidad en su comprensión ya que vinculan al huésped intermediario (por ejemplo un mosquito), al hombre y al ambiente. Por tanto, los estudios geográficos en esta área, complementado a las investigaciones médicas y ecológicas, señalan una alternativa en la búsqueda de respuesta en el ámbito de la epidemiología (Machado-Allison, 1982, Sáez-Sáez, 2003, Sáez-Sáez *et al.*, 2004).

El vector responsable de transmitir el virus de la fiebre amarilla selvática es un mosquito que pertenece al género *Haemagogus*. Vive y se reproduce en las copas de los árboles de las zonas selváticas, y transmite la enfermedad a través de la picadura. En

días soleados o con vientos, los mosquitos suelen bajar a los claros del bosque, y succionan la sangre a las personas que se encuentren en el piso arbóreo, que por lo general están practicando labores agrícolas, ganaderas o extractivas. Igualmente sucede en el caso de los primates, pero a nivel de las ramas de los árboles (Linares, 1998). De esta manera, los trabajadores de la selva son vulnerables a la enfermedad, especialmente si no están protegidos por la vacuna antiamarilíca (Díaz & Gayoso, 1984; Navarro & Reyes, 1990; OPS, 1981; Paublini, 2004).

Según datos del Ministerio de Salud y Desarrollo Social (MSDS, 2005), la fiebre amarilla selvática se distribuye tradicionalmente en Venezuela en tres áreas, que se caracterizan como focos de infección y son: Guayana, San Camilo, y Lago de Maracaibo. También pueden presentarse en lugares fuera de ellas, con ocurrencias esporádicas de casos. El foco del Lago de Maracaibo está asentada al suroeste, sobre la zona selvática que rodea el Lago de Maracaibo, estado Zulia. Las selvas de los ríos Zulia y Catatumbo, con origen en los Andes Colombianos, unen la zona del lago con las regiones selváticas colombianas del Departamento Norte de Santander.

¹ Instituto de Geografía y Desarrollo Regional. FHE. UCV. Caracas, Venezuela.

² Oficina Técnica Nacional para la Regularización de la Tenencia de la Tierra Urbana. Caracas, Venezuela.

³ Soluciones Integrales GIS. SIGIS. Caracas, Venezuela

⁴ Instituto de Medicina Tropical. UCV. Caracas, Venezuela.

* Autor de correspondencia: vial2ss@cantv.net

Existen numerosos aserraderos, sobre todo en las regiones vecinas al Lago de Maracaibo, compartidos con la explotación petrolera en las márgenes del lago, y las explotaciones continúan con el mismo afán en regiones selváticas casi inaccesibles. En esta zona, la onda epizootica proviene de la República de Colombia, remonta hacia el norte por ambas márgenes del Lago, al mismo tiempo que invade el Departamento Norte de Santander, al Oeste de la Sierra de Perijá. La ocurrencia pareciera tener vinculación con las condiciones ambientales, en particular, con las lluvias (Carranza, 1998; Díaz y Gayoso, 1984; Strano *et al.*, 1975). En la Tabla I, se aprecia como la mayoría de los casos de la enfermedad se relacionan en el segundo semestre del año, para el período de 1941 a 1983 (MSDS, 2005).

El Departamento de Fiebre Amarilla y Peste, perteneciente a la Dirección de Vigilancia Epidemiológica (MSDS, 2005), reporta que los últimos casos mortales de fiebre amarilla habían ocurrido en el año 1980, habiéndose registrado 201 personas fallecidas entre 1941 y 1980. Las defunciones se presentaron en los tres focos epidemiológicos: 54 en Guayana (27,0%), 63 en el Lago de Maracaibo (31,5%) y 83 en San Camilo (41,5%).

Luego de aproximadamente 18 años de silencio epidemiológico (ausencia de casos), en Venezuela se han presentado nuevamente personas con esta enfermedad. En el mes de Julio de 1998, ocurrió un brote epidemiológico que totalizó 15 casos con cuatro personas fallecidas en la población indígena Yanomami del estado Amazonas. En 1999, se notificó un nuevo caso en un turista norteamericano, que visitó el área de Canaima y falleció en su país de origen (Paublina, 2004).

Durante el año 2003 (semana epidemiológica N° 40), se confirmaron 40 casos de fiebre amarilla selvática en los estados Táchira, Zulia y Portuguesa (Tabla II), con 20 defunciones. Estas tres entidades venezolanas representaron el 50% del total de casos en el país. Evaluaciones hechas en la región, en enero

de 2003, determinaron en diversas localidades en el área del Lago de Maracaibo, varios hospederos infectados por el virus de la fiebre amarilla, que se describen en la Tabla II.

Por esta razón en este trabajo nos planteamos el estudio de la distribución espacial de las áreas de riesgo epidemiológico del virus de la fiebre amarilla en el municipio Jesús María Semprún del estado Zulia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El área de estudio está ubicada al sur-oeste del estado Zulia en el occidente de Venezuela, a los 8°30' - 9°30' N y 72°16' - 72°23' O, aproximadamente (Fig. 1). Ésta se encuentra emplazada al suroeste del Lago de Maracaibo, estado Zulia; región selvática con uno de los promedios de precipitación más altos del país (MARN, 2005) entre 1500 y 3000mm por año, condiciones acompañadas con registros de temperatura del aire cálidos y cuya mínima media es mayor a los 22°C. Estas condiciones climáticas, aunadas a la presencia del mosquito vector y de los monos que actúan como reservorios, favorecen el establecimiento del ciclo selvático de transmisión del virus de la fiebre amarilla (Linares, 1998).

Se tomaron en consideración dos grupos de variables que luego se cruzaron para análisis posteriores. El primero se refiere a las condiciones físicas del área, descritas más adelante y que determinan las condiciones de vida del vector. El segundo grupo correspondió a las condiciones socio-económicas de la población que se emplaza en el área de estudio. El análisis de las variables del primer grupo de información sirvió para caracterizar la amenaza epidemiológica, y el segundo, para definir las áreas de vulnerabilidad epidemiológica. La integración de ellos permitió definir las unidades espaciales de riesgo epidemiológico. El cotejo de los resultados parciales es una aproximación al análisis espacial y

Tabla I. Distribución mensual de las muertes en Venezuela por fiebre amarilla selvática, (1941-1983). Dirección de Vigilancia Epidemiológica (MSDS, 2005).

Meses	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.	Tot.
Frec.	10	7	5	5	4	21	31	33	32	26	14	12	201
%	5,0	3,5	2,5	2,5	2,0	10,5	15,5	16,5	16,0	13,0	7,0	6,0	100

Fuente: Archivos del Departamento de Fiebre Amarilla y Peste, MSAS, Venezuela.

Tabla II. Número de casos de humanos y vertebrados silvestres infectados por el virus amarílico (Enero de 2003), en las localidades de Casigua-El Cubo, municipio J. M. Semprúm, estado Zulia (MSDS, 2005).

Número	Vertebrados humanos y subhumanos	Localidad
1	Humano	El Socorro
2	Humano	El Socorro
3	Humano	El Socorro
4	Humano	El Socorro
5	Araguato	Finca Monte Claro
6	Araguato	Finca Monte Claro
7	Araguato	Finca Monte Claro
8	Araguato	Finca El Galpón
9	Mono Cebú	Parcela Puerto Tigre
10	Mono Cebú	Parcela Puerto Tigre
11	Araguato	Parcela Puerto Tigre
12	Araguato	Finca San Luis
13	Araguato	Finca San Luis
14	Araguato	Finca San Luis

permite realizar estudios posteriores dentro de estos ámbitos (Hainning, 1994; Donald, 2000; Sáez-Sáez, 2003).

Criterios para el establecimiento de la amenaza epidemiológica de la enfermedad

La amenaza epidemiológica se determinó en función del análisis de los factores físico-naturales y epidemiológicos, que definen al virus de la fiebre amarilla selvática considerados para el municipio. Las variables tomadas en cuenta y que favorecen la ocurrencia de la enfermedad, fueron: precipitación y temperatura del aire, altitud, hidrografía, relieve, vegetación y las actividades antrópicas, como labores agrícolas, extractivas, entre otras. Para el caso de la hidrografía y vegetación, espacios donde están los criaderos y reservorios, se trazó un buffer o distancia de 0,25 Km de radio, el cual determinaba el grado de amenaza, respondiendo a la capacidad de movimiento del mosquito desde esos puntos y a sus alrededores,

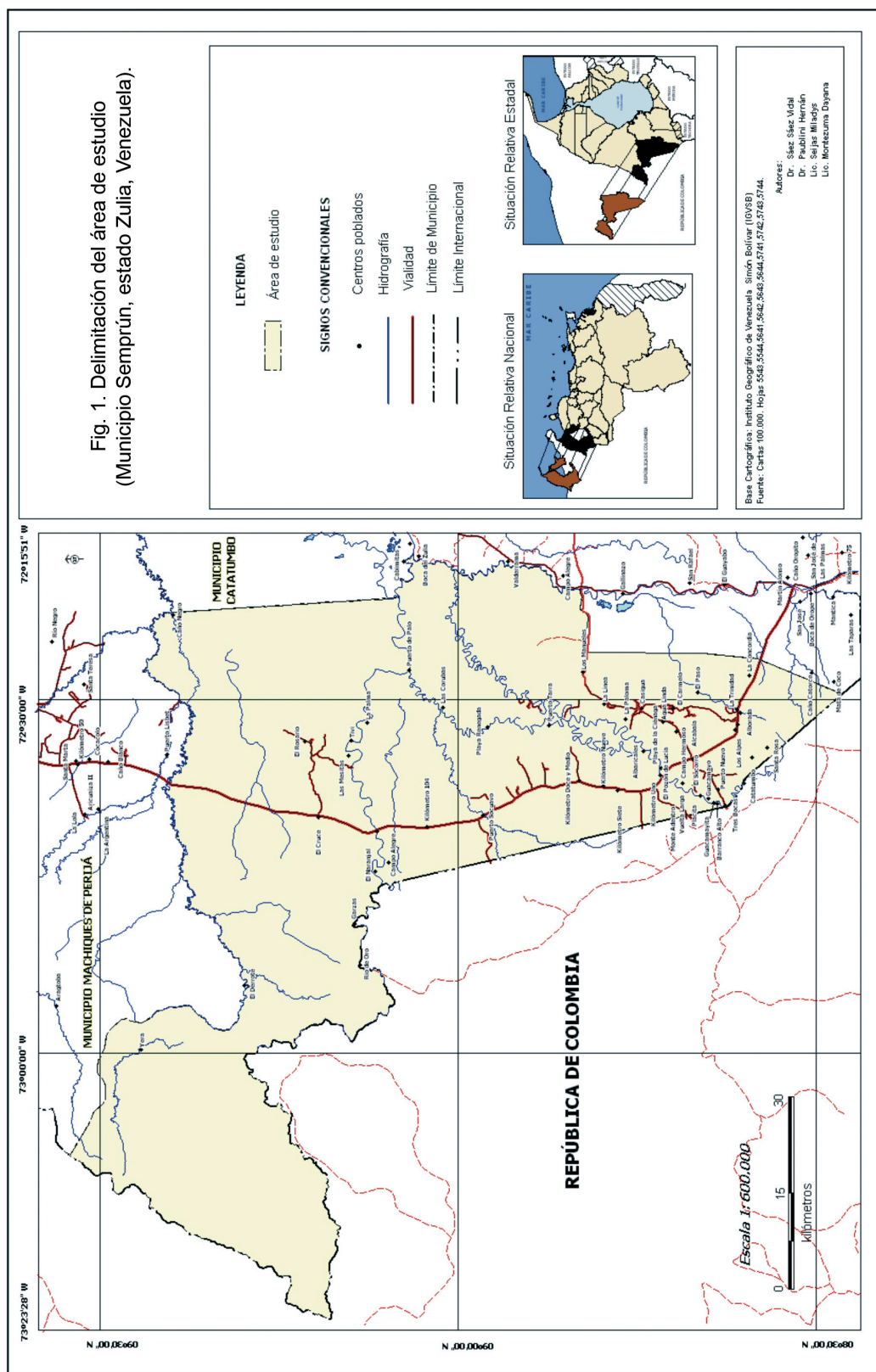
como una de las características ecológicas del mosquito. Finalmente se representaron espacialmente las unidades con los diferentes grado de amenaza para la población, asignándole a las variables valores numéricos 1, 2, 3 y 4 (escala arbitraria), directamente proporcional con las características que hacen posible la ocurrencia del virus amarílico (Tabla III).

Criterios para el establecimiento de la vulnerabilidad de la población ante el riesgo epidemiológico del virus amarílico

Se evaluaron aquellos factores antrópicos que determinan el riesgo epidemiológico a contraer el virus de la fiebre amarilla, en particular, las actividades socio-económicas que desempeñan los habitantes del área de estudio, la proximidad de los centros poblados y de la vialidad a las zonas de mayor amenaza que expone a su población a un mayor riesgo de contraer la enfermedad. Igual que en la situación de amenaza, se asignaron a las variables valores

Tabla III. Grados considerados para la amenaza y la vulnerabilidad según categorías asignadas a las variables a caracterizar el riesgo epidemiológico, Municipio J. M. Semprúm, estado Zulia.

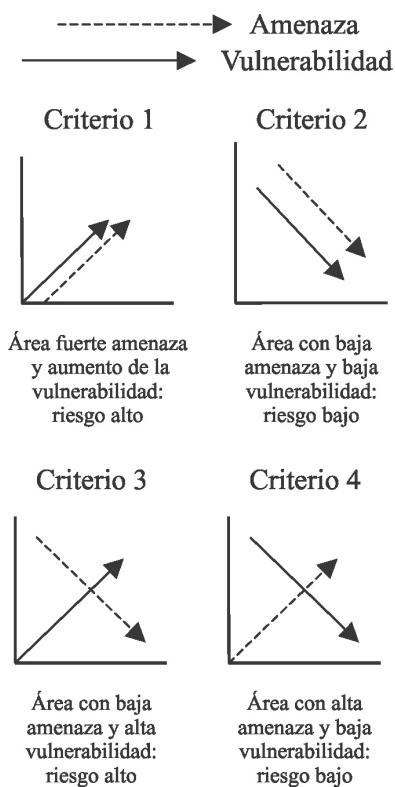
Grado de amenaza	Grados de vulnerabilidad	Categoría
Muy alta	Muy alta	4
Alta	Alta	3
Moderada	Moderada	2
Baja	Baja	1



numéricos 1, 2, 3 y 4 (escala arbitraria), directamente proporcional con las características que pudieran hacer posible la infección por el virus amarílico. El resultado de la caracterización de la vulnerabilidad fue su representación espacial por grados según criterios asignados a las variables consideradas (Tabla III).

Criterios para el establecimiento de los riesgos epidemiológicos asociados al virus de la fiebre amarilla selvática

Se estableció el riesgo epidemiológico a través de la superposición de la cartografía representada por la amenaza epidemiológica y la vulnerabilidad de la población, dando como resultado sectores que poseen diversos grados de riesgos a contraer la enfermedad, según varias categorías definidas: muy alto, alto, moderado y bajo. En el análisis espacial, la distribución de la enfermedad en el área de estudio se interpretó en función de la superposición de cada una de las capas temáticas cartográficas que se realizaron, con el uso de la herramienta de los Sistemas de Información Geográficos (SIG), programa MapInfo, versión 7.0 (2005). Se tomaron en cuenta las siguientes situaciones:



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Grado de amenaza epidemiológica

De acuerdo a las características físicas analizadas, se obtuvieron diversos rangos de distribución de la amenaza que dan origen a la Fig. 2, donde se aprecian las unidades espaciales que se resumen en el Tabla IV. En la Tabla V se aprecia, en resumen, el conjunto de variables seleccionadas para caracterizar la amenaza en el área de estudio.

La vegetación del área es heterogénea y cambia según los distintos pisos altitudinales. La mayor parte corresponde al bosque húmedo tropical en la planicie aluvial, mientras que en la Sierra de Motilones la vegetación es densa, de bosque muy húmedo tropical y árboles mayores a 20 metros de altura. Las zonas de bosques de galería, en la planicie aluvial con pendientes menores al 1% y altitudes desde los 0 metros sobre el nivel del mar (msnm), con frecuentes áreas cenagosas, hasta las mayores y más fuertes elevaciones montañosas de la Sierra de Motilones, situada al Noroeste de la zona, con pendientes entre 50% y 60%, y altitudes hasta de 3000 m snm resultan de muy alto grado de amenaza epidemiológica, para los habitantes del municipio Semprún. Esta región se ubica a ambos márgenes de los principales y más caudalosos cursos hídricos del área, localizada hacia la parte sur, ocupan 38.889 hectáreas (ha), representa el 7,50% del área de estudio (Fig. 2). La fisiografía del área va desde los relieves bajos de la planicie aluvial al Noreste y Sur de la zona. Presenta un promedio anual de precipitaciones entre 1.400 mm, hacia el Noreste y Sur en la planicie aluvial, y más de 4.400 mm en la Sierra de Motilones, al noroeste, presentándose lluvias durante todo el año sobre la zona (MARN, 2005). Las temperaturas mínimas medias del aire (como condición extrema a considerar de esta variable) son menores a los 22°C hacia el noroeste en la Sierra de Motilones, mientras

Tabla IV. Grado de amenaza de las unidades espaciales identificadas en el municipio J. M. Semprún, estado Zulia.

Grado	Ubicación de las zonas epidemiológicas
Muy alta	Bosques de galería
Alta	Planicie aluvial
De moderada a baja	Noroeste del municipio Semprún (Sierra de Motilones)

Tabla V. Resumen del grado de amenaza y vulnerabilidad de las variables consideradas para determinar el riesgo epidemiológico de la fiebre amarilla selvática, municipio J. M. Semprúm, estado Zulia

		Grado			
Variable		Muy Alta	Alta	Moderada	Baja
AMENAZA	Meses y número de días de lluvia		Mar a Nov 7 a 10 días, (*)Pp > 9,9 mm	Dic a Mar 3 días, Pp > 9,9 mm	
	Temperatura del aire		> 22 °C		< 22 °C
	Hidrografía Área de influencia		Hasta 250 metros	Mayores a 250 metros	
	Altitud msnm (**)	0-300	300-600	600-700	>900
	Criaderos	Hasta un kilómetro	Mayores a un kilómetro		
	Vegetación	Hasta un kilómetro	Mayores a un kilómetro		
VULNERABLE	Ocupación de la población	Agricultores y ganaderos	Madereros	Obreros de carretera	Estudiantes, trabajadores petroleros
	Vialidad		Hasta un kilómetro		Sin vialidad
	Centros Asistenciales		Sin instalaciones	Ambulatorio rural, hasta 5 km	Hospital, hasta 10 km
	Centros Poblados	Hasta un kilómetro			Mayores a un kilómetro

(*) Pp= precipitación; (**) msnm: altitud en metros sobre el nivel del mar.

que esta situación cambia para toda la planicie aluvial, donde las temperaturas superan los 22°C. Estas áreas de planicies y bosques de galería, representan también el hábitat de preferencia para el reservorio más importante del virus amarílico, el mono araguato (*Alouatta seniculus seniculus*) (Linares, 1998).

El grado de amenaza epidemiológica alta ocupa la mayor extensión de la planicie aluvial, ubicada hacia la parte Noreste y Sur del área de estudio, 379.506 ha y representa 73,12% del total de la zona. Casi toda el área que integra al municipio Semprúm posee las cualidades físico-ambientales propicias para el sostenimiento de la enfermedad, con precipitaciones entre 1400 a 2200 mm en promedio anual, temperatura del aire mínima media anual mayor a 22 °C, en espacios de cultivos, bosques, bosques remanentes, suelos desnudos y zonas de inundación. Los hábitats más favorables del hospedero y del vector, sin embargo, están únicamente localizados en los bosques de galería, en las copas de los árboles, para el caso de los primates, y en las bromelias y otras epifitas situadas en el techo arbóreo, para el caso del insecto (Fig. 2).

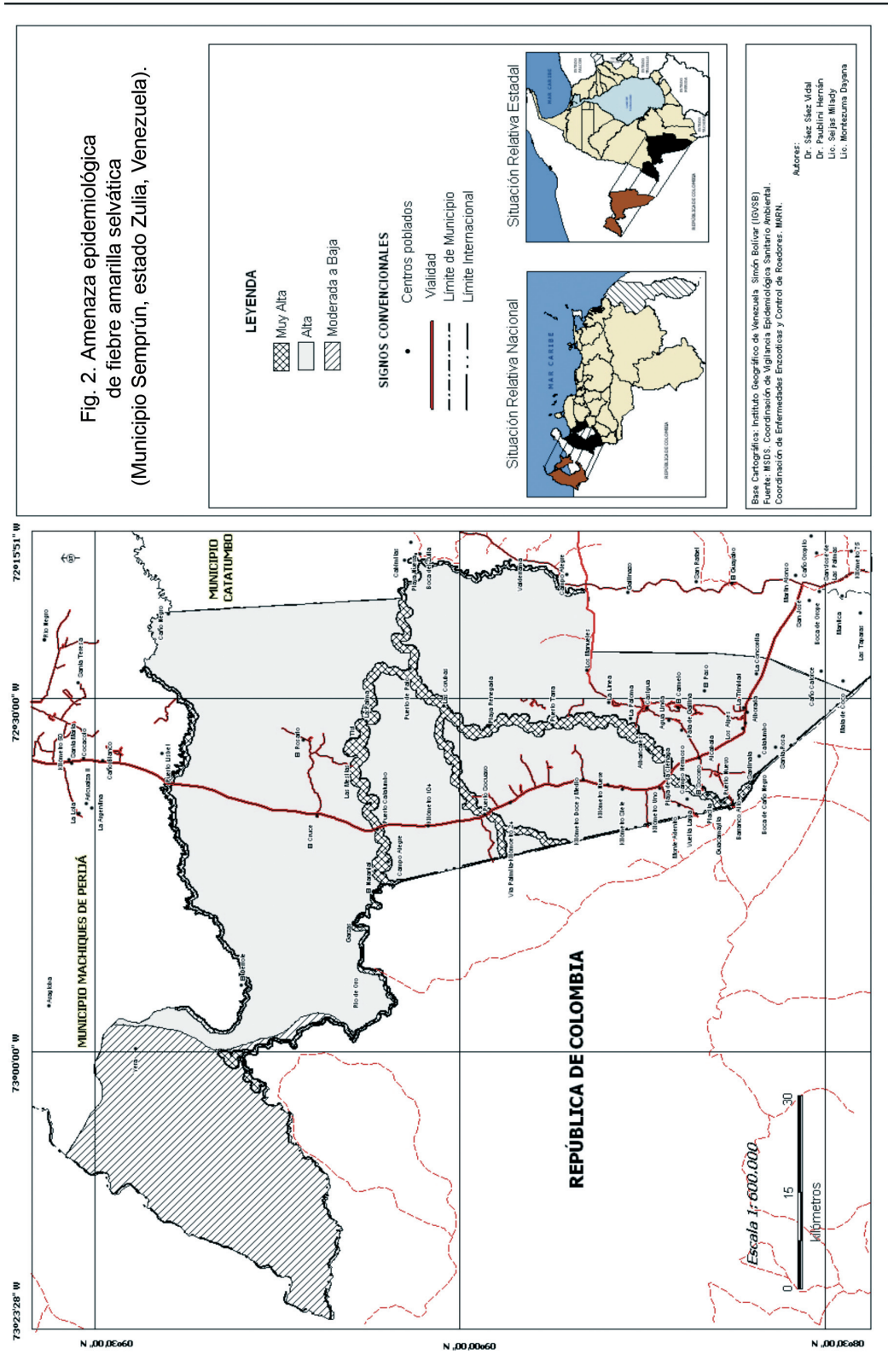
La Sierra de Motilones representa un grado de amenaza epidemiológica de moderada a baja. Se

localiza hacia la parte Noroeste, ocupa 100.605 ha, y representa 19,38% del municipio. Es importante destacar que esta zona tiene las mayores altitudes y menores temperaturas del área de estudio (Fig. 2). Se identifican espacios con alturas de 250 hasta más de 2000 msnm, pendiente de 5 a 60%, se caracteriza por presentar lluvias medias anuales de 3000 a 4000 mm, en la que en un mes lluvioso se pueden registrar hasta 600 mm de lluvia, la temperatura mínima media del aire puede estar entre 20-21 °C.

Esto no significa que las condiciones físico-ambientales no sean favorables para la enfermedad, dada las circunstancias de disminución progresiva de la temperatura del aire e incremento de la lluvia. Aunque se pueden identificar espacios bajo ciertas condiciones y niveles de altitud, para algunas especies de mosquitos, estos espacios no constituyen el hábitat del reservorio del virus amarílico, ni tampoco el de la especie *Haemagogus* transmisor de la infección.

Grado de vulnerabilidad de la población

De la combinación de los rangos expuestos y resumidos en la Tabla V, se generó el mapa de la vulnerabilidad de la población a adquirir el virus de la fiebre amarilla (Fig. 3), en donde los espacios



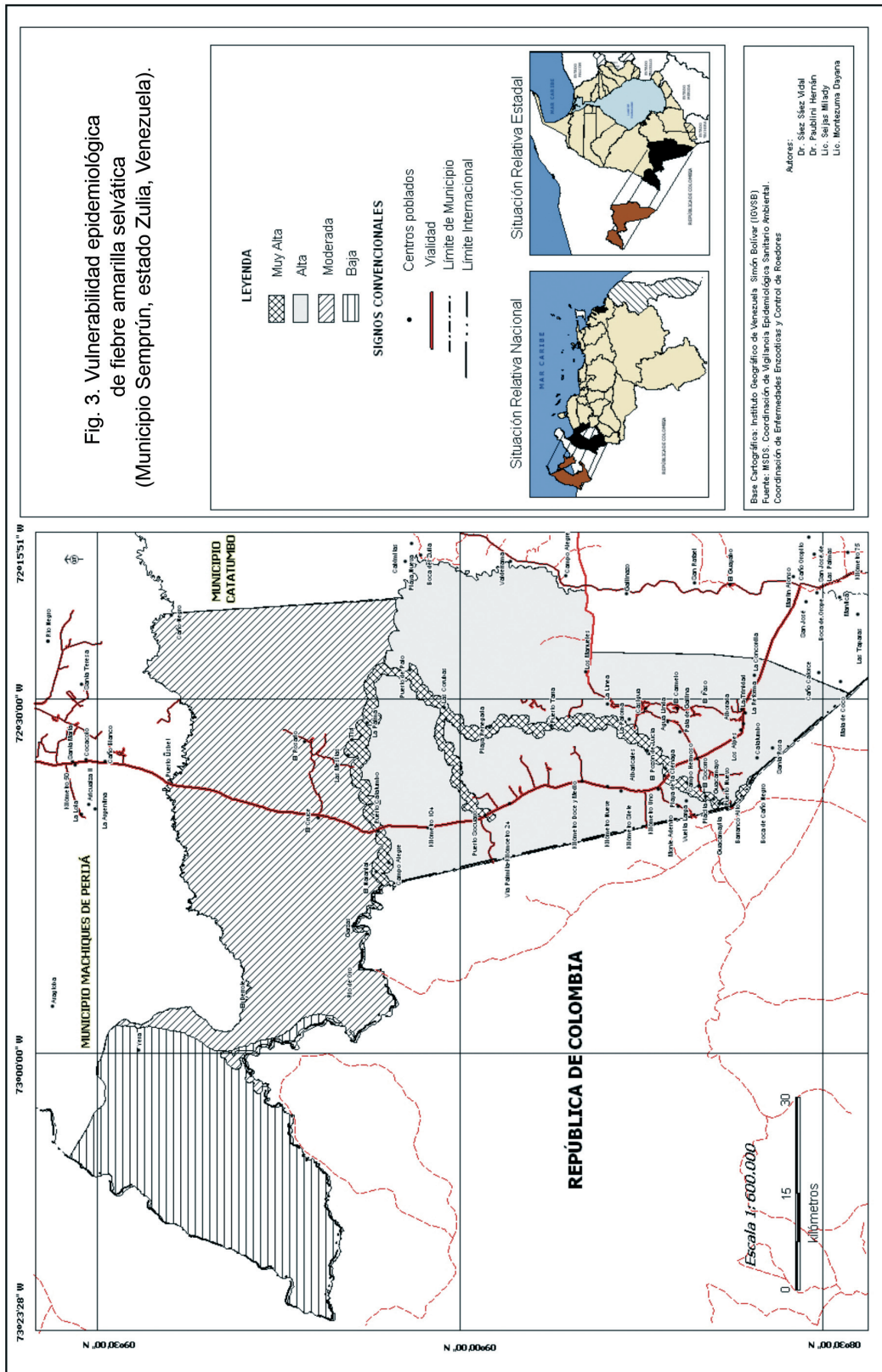


Tabla VI. Grados de vulnerabilidad en unidades espaciales identificadas en el municipio J. M. Semprún, estado Zulia.

Grados de vulnerabilidad de la población	Ubicación de la zona
Muy alta	Bosques de galería
Alta	Al sur del río Catatumbo (planicie aluvial)
Moderada	Al noreste del municipio (planicie aluvial)
Baja	Al noroeste del municipio (Sierra de Motilones)

de bosques de galería y al sur del río Catatumbo corresponden a las áreas de mayor vulnerabilidad (Tabla VI).

La vulnerabilidad de la población es muy alta hacia el Sur del río Catatumbo, en las zonas de los bosques de galería, ocupan 23.387 ha, y representa 4,5% del total del municipio. Esto se debe a que una de las principales actividades que practica la población, son las labores agrícolas-ganaderas y éstas se realizan muy próximas a las zonas de bosques de galería.

La vulnerabilidad de la población es alta, hacia el Sur del río Catatumbo, en la planicie aluvial, ocupa 207.366 ha y representa 40% del total del área de estudio. La principal característica que tiene esta zona es que está atravesada por la principal y única vía de comunicación existente entre los centros poblados del municipio Semprún: la carretera Machiques-Colón, en consecuencia pone en contacto a las personas con los focos de infección, agilizando su cercanía con las áreas endémicas de fiebre amarilla selvática.

La vulnerabilidad de la población es moderada, hacia el noreste del área de estudio, en la planicie aluvial, representan 187.642 ha, 36,12% del municipio. En la parte Noreste de la planicie aluvial, los recursos hídricos existentes son menos abundantes, poco caudalosos y tienen un régimen intermitente, en consecuencia, son bosques de galería menos densos en comparación a los bosques de galería de los ríos caudalosos y de régimen permanente, tales como: Lora, Oro, Catatumbo, Socuavo, Tarra y Zulia (Fig.1). Los bosques de galería de ríos con regímenes intermitentes, tienen árboles más dispersos, menos frondosos y de porte mediano a bajo, crecen y se transforman durante las temporadas de intensas precipitaciones (desde abril hasta noviembre)

Tabla VII. Niveles de riesgo epidemiológico para el municipio J. M. Semprún, estado Zulia, Venezuela.

Niveles de riesgo	Ubicación de la zona
Muy alto	Bosques de galería
Alto	Al sur del río Catatumbo, en la planicie aluvial
Moderado	Al noreste del municipio, en la planicie aluvial
Bajo	Al noroeste, en la sierra de Motilones

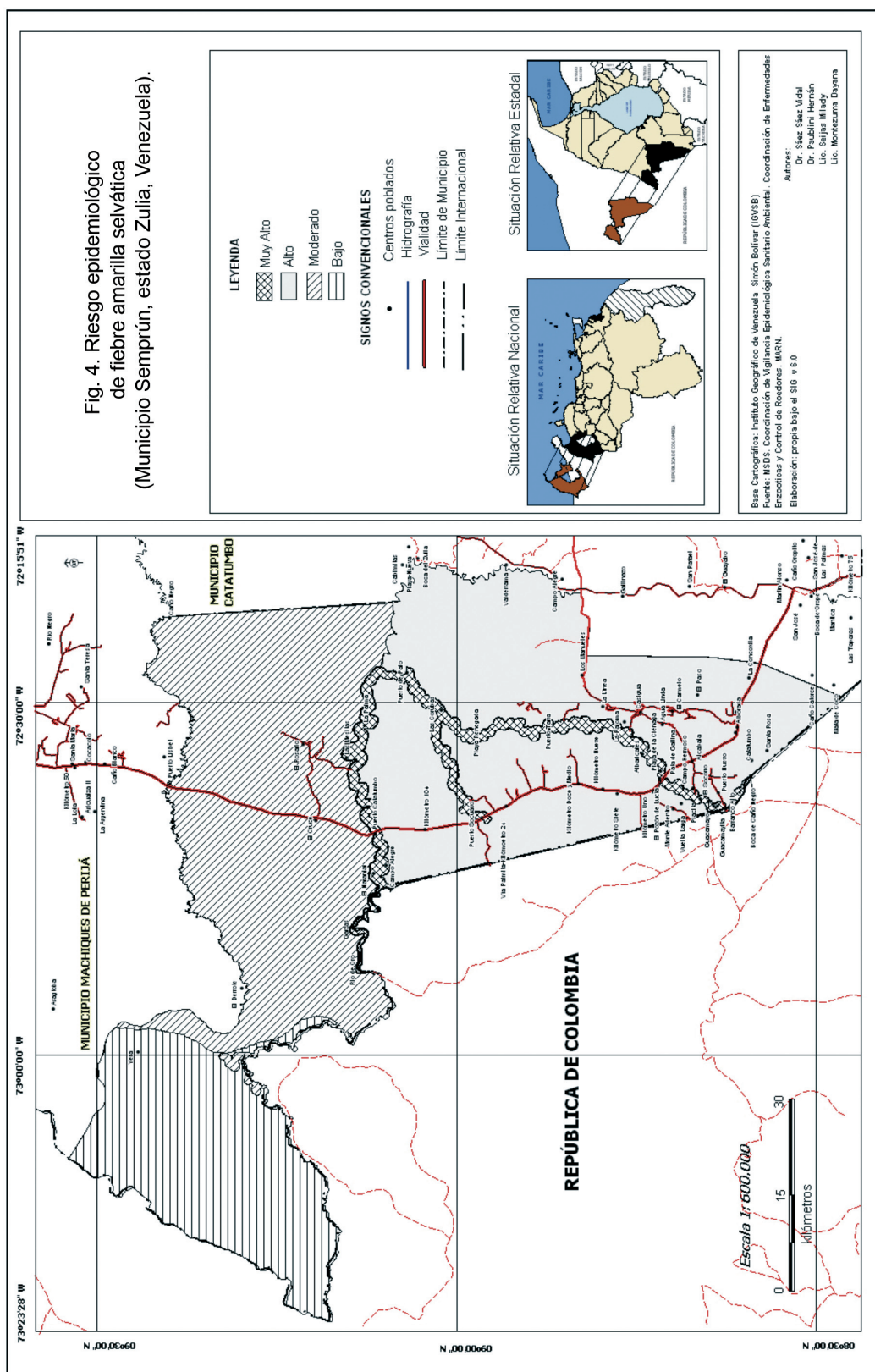
renovándose y dando vida a sus tallos, hojas, flores y frutos, sólo bajo elevadas condiciones de humedad. Causan la escasa presencia de insectos y de primates reservorios del virus, ya que en medios con estas características, las condiciones mínimas ambientales no son favorables para el establecimiento y hábitat permanente de las especies animales portadoras y vectores de la fiebre amarilla selvática.

La vulnerabilidad de la población es baja, hacia el noroeste del municipio Semprún, en la Sierra de Motilones, con una extensión de 100.605 ha, y representa 19,38 % del área de estudio. La principal característica que tiene esta zona, es el emplazamiento de un solo centro poblado denominado Yera, de difícil acceso, por no tener vías de comunicación que permitan su paso. Además no debería haber presencia del vector transmisor, ni del primate reservorio de la enfermedad, motivado a los niveles altitudinales que presenta la zona y la abrupta topografía existente en la Sierra de Motilones, los cuales difieren significativamente de los límites favorables para la presencia de estos organismos.

Determinación del riesgo epidemiológico

Para la espacialización del riesgo epidemiológico del municipio Jesús María Semprún del estado Zulia, se procedió a la superposición de las unidades estimadas en los mapas de amenaza epidemiológica, dada por los elementos físicos y vulnerabilidad de la población, asignándole un mayor peso a esta última, debido a que esta es la que afecta a la población.

En función de estos criterios al combinar los niveles o grados de amenaza epidemiológica con la vulnerabilidad de la población descritos



anteriormente, surgen los niveles de riesgo epidemiológico, expresadas igualmente en unidades espaciales, especificados en la Tabla VII.

En la Fig. 4, se aprecia que gran parte del municipio Jesús María Semprún, está en muy alto riesgo epidemiológico, unas 23.387 ha, correspondientes a 4,5% del área de estudio. Esta zona pertenece a los espacios conformados por los bosques de galería, a lo largo de los principales cursos de aguas del área, tales como: el río Catatumbo, Socuavo y Tarra, entre otros, donde están la mayoría de los centros poblados de esta área de estudio: Campo Alegre, Campo Hermoso, el Naranjal, Placita, Puerto Catatumbo, Puerto Socuavo, Río de Oro, Sardinata Tibi y Tres Bocas. En esta área se concentran las condiciones físico-naturales propicias para el hábitat del vector transmisor y para el reservorio de la fiebre amarilla selvática.

La zona de alto riesgo epidemiológico la conforma la planicie aluvial, con unas 207.366 ha, representa 40% del total de la zona, localizada al sur del municipio Semprún. En esta área están numerosos centros poblados, muchos de ellos alejados de la zona de bosques de galería, teniendo un alto riesgo epidemiológico cuando se acercan a las fajas de los bosques de galería, donde está el hábitat de *Haemagogus* spp., y del mamífero primate reservorio (araguatos del género *Alouatta*) de la fiebre amarilla (Fig. 4).

La zona de moderado riesgo epidemiológico esta localizada al noreste del área de estudio y forma parte de la planicie aluvial y ocupa 187.642 ha, equivalentes al 36,12%. Esta porción del municipio es atravesada por la carretera Machiques-Colón, permitiendo a pobladores y visitantes desplazarse libremente a través del municipio Semprún. Esta unidad alcanza esta denominación porque los limitados recursos hídricos existentes, no permiten la formación de bosque de galería de abundante y densa vegetación, apto para el hábitat de las especies animales que guardan y transmiten la fiebre amarilla selvática. La unidad espacial cuenta con asistencia médica de dos ambulatorios rurales tipo I y II, en los centros poblados de El Rosario y El Cruce (Fig. 4).

La zona de bajo riesgo epidemiológico se localiza hacia el noroeste del municipio en la Sierra de Motilones, ocupa 100.605 ha y representa 19,38% del área de estudio. Esta parte tiene ciertas condiciones

físico-naturales para la endemicidad del virus, pero aunque se pueden encontrar a ciertas altitudes el vector transmisor de la enfermedad, no es el hábitat del primate reservorio del virus, ni tampoco hay concentración de centros poblados, que puedan ser expuestos a la enfermedad. Además, la inexistencia de vialidad hacia la Sierra de Motilones, dificulta el desplazamiento de los habitantes (Yera) hacia otras zonas de la planicie aluvial que constituyen mayor riesgo epidemiológico para el hombre (Fig. 4), por tanto, el riesgo queda disminuido al mínimo nivel en esta unidad espacial.

En conclusión, el presente estudio constituye un aporte de la Geografía Médica a la caracterización epidemiológica de la amenaza y riesgo de fiebre amarilla selvática en el municipio Semprún del estado Zulia.

La determinación del riesgo epidemiológico de la fiebre amarilla selvática a través del cotejo de las condiciones físicas naturales que favorecen al vector, a los reservorios y la vulnerabilidad a la que está sometida la población es un método, que puede ser visto como una propuesta que atenúe el problema de salud en la población, ya que ofrece la alternativa de espacializar áreas para el control de la enfermedad. Se aprecia que el riesgo epidemiológico es una constante para la población humana que habita o se desplaza dentro del área, debido a su carácter de endemicidad y a las condiciones físico-naturales existentes; por tanto, se recomienda una serie de propuestas con el fin de aportar soluciones que minimicen el problema que causa esta enfermedad a los pobladores del municipio Semprún, entre ellas, mejorar los servicios de redes como vías de comunicación entre los centros poblados pequeños y medianos, fortalecer la red ambulatoria del municipio y asignar especialistas en el área de epidemiología, aumentar la campaña y medidas sanitarias con el objeto de ejercer mayor control sobre la población de mosquitos, así como considerar la aplicación de la vacuna anti-amarilica con la frecuencia del caso en la población del municipio o en las áreas de mayor riesgo epidemiológico.

El conocimiento físico de las condiciones del medio y la evaluación de las actividades que desempeña la población, se convierten en herramientas que posibilitan la comprensión de la complejidad que representa la ocurrencia de casos de

fiebre amarilla selvática y de otras enfermedades de origen metaxénico.

Preliminary study of the epidemiological spatial risk of sylvatic yellow fever in the municipality of Jesús María Semprún, Zulia State, Venezuela

SUMMARY

The present work represents an exploratory study whose objective is to link the physical-environmental and socioeconomic conditions of the municipality Jesús María Semprún with the identification of areas epidemiological risk for yellow fever virus. We selected environmental physical records (vegetation, precipitation, air temperature, geomorphology, fauna) and socioeconomic records (activities of the population, presence of basic services). We determined spatial units of diverse degrees of threat and vulnerability which allowed the later spatialization of risks within the Semprún municipality. The results suggest three large spatial units, where water courses link forests in the center and the west of the study area representing the spaces of the highest epidemiological risk.

Key words: rainfall, air temperature, yellow fever, risk, vulnerability, epidemiology, Venezuela

REFERENCIAS

- Carranza F. (1998). *Revolucionarios de la ciencia. Vida e historia de los creadores de la medicina moderna*. Ed. Vergara J. Buenos Aires, Argentina.
- Díaz I. & Gayoso R. (1984). La fiebre amarilla en Venezuela 1941–1983. *Rev. Soc. Venez. Histor. Méd.* **36**: 223-242.
- Donald A. (2000). *Spatial Analysis, GIS and Remote Sensing Applications in the Health Sciences*. Ed. Sleeping Bear Press, London, U.K.
- Haining R. (1994) *Spatial Data Analysis in the Social and Environmental Sciences*. Cambridge University Press. Cambridge, London, U.K.
- Linares O. (1998). *Mamíferos de Venezuela*. Ed. Sociedad Conservacionista Audubon de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Machado-Allison C. (1982). Ecología de los mosquitos (Culicidae). III Adultos. *Acta Biol. Venezuela*. **11**: 133-237.
- MapInfo Corporation (2005). *Guía del usuario*. One Global View Edition. New York, USA.
- MSDS (2005). *Boletines epidemiológicos semanales de los años 1999 a 2004*. Dirección de Vigilancia Epidemiológica. Caracas, Venezuela.
- MARN (2005). *Series climatológicas mensuales y diarias de los años 1967 a 2004*. Dirección de Hidrología, Meteorología y Oceanología. Caracas, Venezuela.
- Navarro P. & Reyes H. (1990). Fiebre Amarilla. *Revista Facultad de Medicina*. **1**: 10-15.
- OPS (1981). *Guía para la vigilancia, prevención y control de la fiebre amarilla*. Publicación Científica. **410**: 1-3.
- Paublini H. (2004). *Fiebre Amarilla*. Medicina Tropical Programa de Enseñanza. Cátedra de Medicina Tropical. Año 2003-2004, Tomo I, Facultad de Medicina. Caracas, Venezuela.
- Sáez-Sáez V. (2003). La geografía médica: consideraciones sobre su orientación multidisciplinaria en el ámbito de la investigación y la aplicación. *Akademios*. **5**: 91-110
- Sáez-Sáez V., Puerta A. & Valladares M. (2004). Geografía médica y multidisciplinaria. Caso: el cólera y su relación con las condiciones socioeconómicas y ambientales (1996-1998), municipios Mara y Maracaibo. Estado Zulia. Venezuela. *Tharsis*. **5**: 85-94.
- Strano A., Dooley J. & Ishak K. (1975). *Manual sobre la fiebre amarilla y su diagnóstico diferencial histopatológico*. Publicación científica de OPS/OMS N° 299. Washington, USA.

Recibido el 14/07/2006
Aceptado el 05/03/2007

Uso de proteínas como alternativa diagnóstica para discriminar infecciones entre *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi*

Ana María Bolívar¹, Armando Reyna-Bello², Francisco García³, Pablo García-Lugo¹, Gladys Crisante¹, Agustina Rojas¹ & Nestor Añez^{1*}

Tripomastigotes sanguíneos de *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi* obtenidos de infecciones experimentales en ovejas y ratones respectivamente, fueron utilizados para purificar y caracterizar proteínas citosólicas mediante el método de partición con Tritón X-114. Los resultados revelan diferencias en los patrones proteicos entre las dos especies. Asimismo, las reacciones antigénicas mediante Western blot utilizando suero de animales naturalmente infectados, permitió discriminar las infecciones entre ambos parásitos. Se sugiere la utilización de esta metodología como una prueba diagnóstica confiable.

Palabras claves: *T. vivax*, *T. evansi*, diagnóstico, proteínas.

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma (Duttonella) vivax y *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* han sido incriminados como responsables de infecciones sufridas en una amplia gama de hospedadores en regiones tropicales y subtropicales de Suramérica, Asia y el norte de África. Entre los grupos más afectados se destacan bovinos, equinos, bufalinos, caprinos, ovinos, caninos, suinos, ciervos y camellos, los cuales presentan variaciones clínicas durante la infección observándose desde una forma aguda hasta la crónica, pasando por estados completamente asintomáticos o de portador sano, situación por la cual algunos de ellos pudieran actuar como reservorios naturales (Luckins, 1988; Sandoval *et al.*, 1996; Tamasaukas & Roa, 1996; Espinoza *et al.*, 2002). En Venezuela, el efecto de estos parásitos sobre el

contingente ganadero es poco conocido debido a los escasos estudios sobre su incidencia y su prevalencia, situación que plantea carencia de datos precisos sobre aspectos epidemiológicos para ambas infecciones (Rivera, 1996; García *et al.*, 2000).

Las infecciones causadas por *T. vivax* y *T. evansi* se ubican entre las principales entidades nosológicas de importancia económica en América, ejerciendo un fuerte impacto sobre la salud y reproductividad en rebaños vacunos y equinos. De allí la relevancia de su estudio y el desarrollo de investigaciones que coadyuven a su control, siendo uno de los aspectos indispensables para ello, obtener un diagnóstico certero y efectivo que supere la baja sensibilidad y especificidad de los métodos convencionales empleados hasta el presente (García & Mendoza-León, 2000; Tamasaukas *et al.*, 2000). Esto se impone ya que debido a la dificultad de aislar y caracterizar antígenos de *T. vivax*, es común la utilización de antígenos de *T. evansi* aprovechando la similitud antigénica compartida para realizar diagnósticos en infecciones por *T. vivax* (Uzcanga *et al.*, 2002, 2004). Esta práctica diagnóstica pudiera arrojar falsos positivos en zonas ganaderas donde ambas tripanosomiasis coexisten (Toro *et al.*, 1980). Justificado por lo anterior, en el presente trabajo se

¹Investigaciones Parasitológicas "J. F. Torrealba", Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Mérida, 5101, Venezuela.

²Universidad Simón Rodríguez-IDECYT, Laboratorio de Inmunología, Caracas, Venezuela.

³Cátedra de Parasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Aragua, Venezuela

*Autor de correspondencia: nanes@ula.ve

presenta el desarrollo de una metodología que permite discriminar infecciones causadas por ambos parásitos utilizando proteínas específicas para cada especie cuya inmunogenicidad permite un diagnóstico alternativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fraccionamiento proteico de las formas sanguíneas de T. vivax y T. evansi

Las formas sanguíneas de *T. vivax* fueron aisladas y purificadas siguiendo la metodología descrita por González *et al.* (2005). Una vez obtenidos los parásitos libres de elementos sanguíneos (2×10^8), fueron fraccionados siguiendo la metodología descrita por Ko & Thompson (1995) y Añez-Rojas *et al.* (2006) utilizando el método de partición con el detergente Tritón X-114. Brevemente, el concentrado de parásitos (pellet) colectado fue resuspendido en buffer 1 (10mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2% Triton X-114, pH 7.4) el cual contenía un pool de inhibidores de proteasas (Roche), en agitación durante 1h a 0°C y luego centrifugado a $7.200 \times g$ a 0°C por 10 min. El pellet (Pi) obtenido conteniendo las proteínas de membrana no solubilizadas por el Tritón X-114, fue lavado con buffer 2 (10mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.06% Tritón X-114, pH 7.4) y mantenido a -20°C. El sobrenadante fue mantenido a -20°C durante 24 h y luego descongelado lentamente a temperatura ambiente colocándose durante 12 min a 32°C para obtener la primera partición (P1). P1 fue luego centrifugado a $3.000 \times g$ por 3 min obteniéndose dos fases. La fase acuosa obtenida, conteniendo las proteínas hidrofílicas (F3) fue separada y mantenida a -20°C. La fase detergente fue resuspendida en 3V del buffer 2 arriba indicado y mantenido por 15 min a 0°C. El proceso de partición (P1) fue repetido y la fase acuosa conteniendo el resto de proteínas hidrofílicas fue descartado. La fase detergente fue mezclada con 3V del buffer 2, mantenida a 0°C por 10 min y centrifugada a $18.000 \times g$ a 0°C por 10 min. El pellet conteniendo proteínas hidrofóbicas, no ancladas por GPI (F1) fue mantenido a -20°C. El sobrenadante fue sometido a un segundo proceso de partición. Las proteínas contenidas en la fase detergente resultante fueron precipitadas con 3V de acetona fría y centrifugadas a $3.000 \times g$ durante 7 min a 0°C para obtener proteínas ancladas por GPI (F2). Este procedimiento permitió la separación de las proteínas de *T. vivax* en cuatro fracciones: Pi conteniendo proteínas de membrana que no solubilizan con el Tritón X-114;

F1 conteniendo proteínas integrales de membrana no ancladas por glicosil-fosfatidil-inositol(GPI); F2 proteínas de membrana ancladas por GPI y F3 proteínas citoplasmáticas (hidrofílicas). Las proteínas de F2 y F3 fueron precipitadas con tres volúmenes de acetona fría y cada fracción fue homogeneizada en buffer de muestra (Tris-HCl 62 mM, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,05%, pH 6,8). Para evidenciar la presencia específica de proteínas ancladas por GPI se procedió a realizar un tratamiento con fosfolipasa C como fue previamente indicado por Ko & Thompson (1995) y Añez-Rojas *et al.* (2006), el resto de las proteínas lograron separarse por sus características de hidrofóbicas (F1) y de hidrofílicas o citoplasmáticas (F3).

El fraccionamiento proteico de las formas sanguíneas de *T. evansi* se realizó siguiendo el procedimiento descrito para *T. vivax*. Los parásitos ($1,5 \times 10^8$) fueron obtenidos al infectar experimentalmente ratas albinas con *T. evansi* aislado de *Hydrochoerus hydrochoerus*, procedente del estado Apure, Venezuela y purificados siguiendo la metodología descrita por Lanham & Godfrey (1970).

Electroforesis en geles de poliacrilamida con Dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

La electroforesis fue realizada en presencia de SDS, sobre geles de poliacrilamida al 12% y 0,75 mm de espesor en un sistema de Mini-Protean III-BIO-RAD, siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (1970). Los geles fueron corridos a voltaje constante de 100v. Las proteínas fueron coloreadas con Azul de Comassie R-250. Cada carril contenía 15% de cada fracción (15 μ l) previamente calentados a 90°C durante 3 minutos, en presencia de 50 mM de ditioneitol (DTT).

Análisis por Western blot.

Realizada la electroforesis (SDS-PAGE) de la fracción F3 de cada parásito, las proteínas fueron electro-transferidas a membranas de PDVF (Inmobilon P), aplicando una corriente de 30V, durante 14 horas a 4°C, según Winston *et al.* (1987). La inmunodetección de antígenos fue realizada previa permeabilización de la membrana con alcohol isopropílico 70% e incubadas con suero de bovino o equino (dilución 1:100). Las membranas fueron incubadas con la apropiada dilución de los

anticuerpos secundarios, conjugado anti-bovino IgG peroxidasa (1:10.000) o conjugado anti-equino IgG fosfatasa alcalina (1:10.000). Finalmente, las bandas de los polipéptidos fueron visualizadas por la adición de 4-chloro-1-naphthol-H₂O₂ y NBT (Nitroblue tetrazolium)-BCI (5-Bromo-4-Cloro-3-indolyl-fosfato) respectivamente.

RESULTADOS

Aislamiento y análisis de proteínas de Trypanosoma vivax y T. evansi.

El patrón electroforético mostrado por ambos parásitos en las diferentes fracciones permitió visualizar una mayor concentración proteica en las muestras correspondientes a las proteínas del citoplasma (F3). Para *T. vivax* el patrón proteico detectado en la F3, reveló la presencia de bandas polipeptídicas entre los 33,9 kDa y 73 kDa de masa molecular, con dos bandas bien diferenciadas cercanas a los 47,5 kDa. El patrón detectado en las fracciones de *T. evansi* fue similar al observado en las fracciones de proteínas obtenidas para *T. vivax*. Sin embargo, fue posible detectar diferencias notables entre las fracciones. Los polipéptidos mayoritarios de la F3 de *T. evansi* se concentraron entre 34,0 kDa y 70,0 kDa con una banda bien diferenciada sobre los 33,9 kDa no detectada para *T. vivax*. Las proteínas

insolubles en Tritón X-114 bajo las condiciones utilizadas (P1) presentan bandas de proteínas que pudieran ser consideradas similares a las presentes en F1 y F2 en ambas especies. Detalles sobre los patrones proteicos revelados en las dos especies de *Trypanosoma* (Fig.1).

Caracterización inmunológica de proteínas citoplasmáticas de T. vivax y T. evansi.

Las proteínas de la fracción F3 de *T. vivax* y de *T. evansi* fueron confrontadas con sueros de referencia de equino y bovino positivos a *T. evansi* (Fig. 2A) y *T. vivax* (Fig. 2B), respectivamente. Este ensayo permitió visualizar proteínas de *T. evansi* en presencia del suero de bovino positivo a *T. vivax* (Fig. 2B), representado por dos bandas de 34 kDa y 70 kDa y proteínas de *T. evansi* en presencia de suero de equino positivo a *T. evansi* (Fig. 2A), mostrando bandas de 29 kDa y 64 kDa. Asimismo, como era de esperarse, se revelaron proteínas de *T. vivax* en presencia del suero de bovino positivo a *T. vivax* (Fig. 2B), mostrando 2 bandas de 32 kDa y 66 kDa. Sin embargo, no se observó respuesta inmunogénica sobre las proteínas F3 de *T. vivax* cuando estas fueron confrontadas con suero de equino positivo a *T. evansi* (Fig. 2A). En las proteínas insolubles en Tritón X-114 (P1-*T. vivax*) se visualizó un polipéptido de 54 kDa al incubar las membranas con el suero de bovino positivo a *T. vivax* [no mostrado, ver Bolívar *et al.* (2006)].

Fig. 1. Fraccionamiento proteico en formas sanguícolas de *Trypanosoma vivax* y *T. evansi*. F2, F1, F3 y P1, corresponden a las fracciones obtenidas de cada parásito. Los carriles contienen 10% de las proteínas presentes en cada fracción. M: marcador de peso molecular.

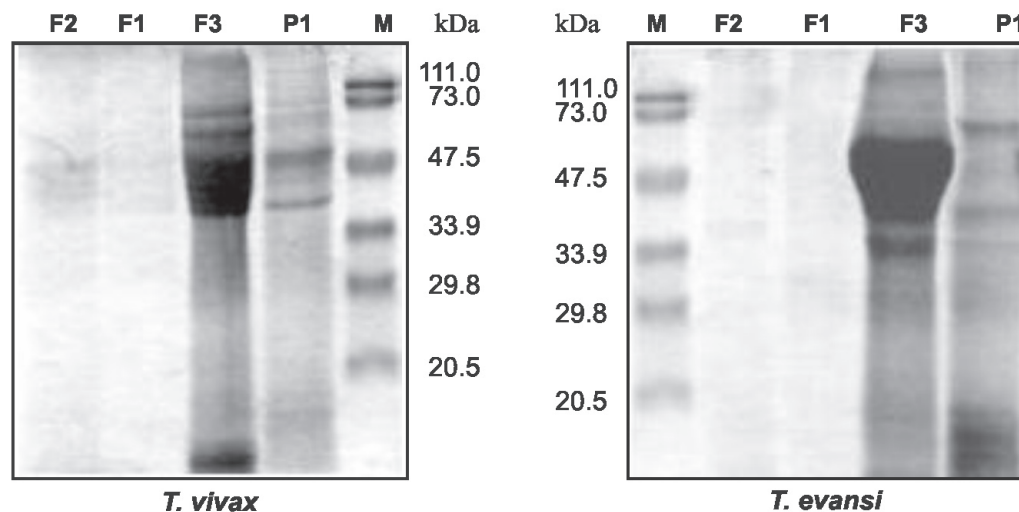
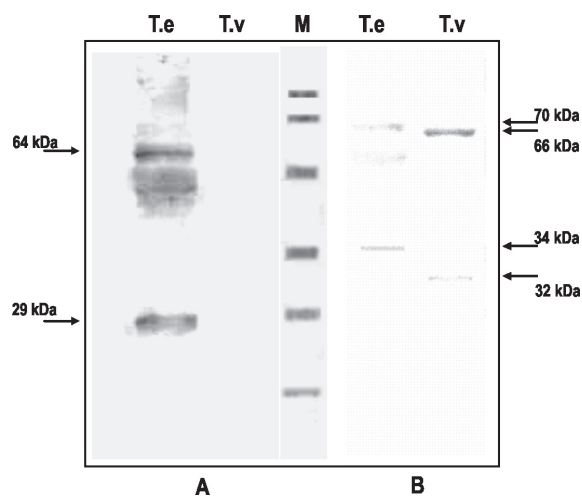


Fig. 2. WESTERN BLOT para la detección de proteínas inmunogénicas en fracciones citosólicas (F3) de *T. vivax* (T.v) y *T. evansi* (T.e). A: fracciones reveladas con suero de equino positivo a *T. evansi*; B: fracciones reveladas con suero de bovino positivo a *T. vivax*. M: marcador de peso molecular.



Pruebas de especificidad

Con el fin de determinar la especificidad de la reacción, fracciones proteicas de *T. vivax* fueron enfrentadas con sueros de bovinos positivos a *Anaplasma marginale*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium paratuberculosis* y suero de equino positivo a *T. evansi* no evidenciándose respuesta antigénica alguna.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se registra el desarrollo y ejecución de una metodología basada en el fraccionamiento de las formas sanguíneas de *T. vivax* y *T. evansi*, la cual permitió la obtención de proteínas inmunogénicas capaces de diferenciar los dos parásitos y reconocer su capacidad antigénica. Este hallazgo preliminar pudiera ser de utilidad en la consecución de un método de valor diagnóstico potencial en áreas donde ambas parasitosis circulen considerando la especificidad detectada para cada caso.

En este respecto bandas antigénicas fueron reveladas en la fracción citoplasmática (F3) de *T. vivax*, evidenciándose polipéptidos de 32 kDa y 66 kDa cuando se desarrolló un Western blot en presencia de suero anti-*T. vivax* de bovino, las cuales no fueron detectadas cuando se utilizó el suero anti-*T. evansi* obtenido de un equino naturalmente infectado, indicando la gran especificidad de estas fracciones proteicas, las cuales sólo son reconocidas por anticuerpos generados por *T. vivax*.

Por otra parte, el Western blot de la fracción citoplasmática (F3) de *T. evansi* permitió la detección de dos polipéptidos de 29 kDa y 64 kDa cuando fue revelado con suero de equino anti-*T. evansi*, además de bandas antigénicas de 34 kDa y 70 kDa cuando se reveló con suero bovino anti-*T. vivax*, indicando la similitud antigénica entre ambas especies de *Trypanosoma*. Esto último pareciera justificar el empleo de antígeno de *T. evansi* en la detección de infecciones por *T. vivax* en bovinos, práctica diagnóstica que recientemente se ha venido llevando a cabo en Venezuela (Uzcanga *et al.*, 2004).

En conclusión, las diferencias observadas entre ambos parásitos en estas experiencias preliminares, parecieran dar al sistema desarrollado un valor diagnóstico potencial. El hecho de que se pueda discernir específicamente entre infecciones naturales por *T. evansi* en suero de equinos e infecciones por *T. vivax* en suero de bovinos, utilizando fracciones proteicas *T. evansi* y *T. vivax* respectivamente, permite considerar estas proteínas como un marcador bioquímico candidato para identificar y diferenciar infecciones por ambos parásitos en áreas donde las dos tripanosomiasis son endémicas. Establecidas las condiciones para el desarrollo de este sistema a nivel experimental, sólo quedaría probarlo en muestras poblacionales para valorar su bondad diagnóstica en masa y concluir sobre su practicidad y costo relativo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. T. Perrone por su asesoramiento y colaboración en la realización de este trabajo. Trabajo financiado por CDCHT-ULA, Proyecto C-1210-03-03-EM (NA).

Use of proteins as diagnostic tool to discriminate between *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma evansi* infections

SUMMARY

Trypanosoma vivax and *Trypanosoma evansi* blood trypomastigotes, obtained respectively from sheep and mice experimentally infected, were used to isolate and characterize proteins using the partition Triton X-114 method. Results showed a different protein pattern between the 2 species. Additionally, results by Western blot, using sera from naturally infected animals, revealed specific discrimination between these two species of *Trypanosoma*. The potential use of this method as a reliable diagnostic tool is suggested.

Key words: *T. vivax*, *T. evansi*, diagnosis, proteins.

REFERENCIAS

- Añez-Rojas N., García-Lugo P., Crisante G., Rojas A. & Añez N. (2006). Isolation, purification and characterization of GPI-anchored membrane proteins from *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. **97**: 140-145.
- Bolívar A. M., García-Lugo P., Crisante G., Rojas A., Teixeira M. M. G. & Añez N. (2006). Detección de infecciones subclínicas por *Trypanosoma vivax* en bovinos de fincas ganaderas de Mérida, Venezuela. *Bol Mal San Amb*. **46**: 87-90.
- Espinoza E., González N., Primera G., Rivero E., Hidalgo L. & González B. (2002). Efectos del *Trypanosoma evansi* en cabras (*Capra hircus*) infectadas experimentalmente. *Rev. Cientf. FCV-LUZ*. **12**: 103-107.
- García H. & Mendoza-León A. (2000). Diagnóstico molecular en protozoarios Kinetoplastida. Principios y aplicaciones. *Rev. Fac. Cs. Vets. UCV*. **41**: 109-130.
- García F., Rivera M., Ortega M. & Suárez C. (2000). *Trypanosomiasis equina* causada por *Trypanosoma evansi* en tres hatos ganaderos del Estado Apure, Venezuela. *Rev. Fac. Cs. Vets. UCV*. **41**: 91-100.
- González L., García J., Núñez C., Perrone T., González-Baradat B., Gonzatti M. *et al.* (2005). *Trypanosoma vivax*: A novel method for purification from experimentally infected sheep blood. *Experimental Parasitology*. **111**: 126-129.
- Ko Y. & Thompson G. (1995). Purification of glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anchored proteins by modified Triton X-114 partitioning and preparative gel electrophoresis. *Annals Biochem*. **224**: 166-172.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Lanham S. & Godfrey D. (1970). Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Experimental Parasitology*. **28**: 521-534.
- Luckins A. (1988). *Trypanosoma evansi* in Asia. *Parasitol. Today*. **4**: 137-142.
- Rivera M. (1996). *Tripanosomiasis* En: *Hemoparasitosis bovinas*. UCV. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Venezuela.
- Sandoval E., Espinoza E. & Valle A. (1996). Leucopenia y trombocitopenia en ovejas infectadas experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. *Veterinaria Trop*. **21**: 13-33.
- Tamasaukas R. & Roa N. (1996). *Tripanosomiasis bovina* (*T. vivax*): una revisión. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Maracay, Venezuela.
- Tamasaukas R., Aguirre A., Ron J., Roa N. & Cobo M. (2000). Tetralogía hemoparasitaria en algunas fincas bovinas del Municipio Santa Rita, Estado Guárico, Venezuela. *Rev. Fac. Cs. Vets. UCV*. **41**: 101-108.
- Toro M., León E., López R., García J. & Ruiz A. (1980). Resultados de un muestreo sobre tripanosomiasis bovina mediante técnicas serológicas. *Veterinaria Trop*. **5**: 43-50.
- Uzcanga G., Mendoza M., Aso P. & Bubis J. (2002). Purification of a 64Kda antigen from

- Trypanosoma evansi* that exhibits cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. *Parasitology*. **124**: 287-299.
- Uzcanga G., Perrone T., Noda J., Pérez-Pazos J., Medina R., Hoebake J. & Bubis J. (2004). Variant surface glycoprotein from *Trypanosoma evansi* is partially responsible for the cross-reaction between *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax*. *Biochemistry*. **43**: 595-606.
- Winston E., Fuller S. & Hurrell J. (1987). Western blotting. Chap 10.8. En: *Current protocols in molecular biology*. (Eds. Ausubel F., Brent R., Kingston R., Moore D., Seideman J., Smith J., Struhl K.) (g.P.A & Wiley-Interscience, NY-USA).

Recibido el 04/05/2006
Aceptado el 05/02/2007

***Wyeomyia trujilloi* Pulido y Sutil, 1981, nuevo sinónimo de *Wyeomyia bicornis* (Root, 1928) (Culicidae: Sabethini), con redescrición de la pupa y parte de la larva**

Juan-Carlos Navarro^{1*} & Jonathan Liria²

Wyeomyia (*Wyeomyia*) *trujilloi* Pulido & Sutil, 1981 es reconocido como sinonimia de *Wyeomyia* (*Nunezia*) *bicornis* (Root, 1928), con base en la morfología de larva, piezas bucales, pupa y genitales del macho en comparación con el holotipo de *Wy. bicornis*, topotipos y conforme con un análisis del holotipo de *Wy. trujilloi*. Se provee una explicación e ilustración sobre las características a nivel subgenérico de *Nunezia*. Para *Wy. bicornis* la morfología cefálica de la larva es redescrita. La morfología y quetotaxia de la pupa y las piezas bucales de la larva son descritas e ilustradas por primera vez.

Palabras claves: Fitotelmata, morfología, mosquitos, *Nunezia*, Sabethini, *Wyeomyia*.

INTRODUCCIÓN

La Tribu Sabethini está integrada por 360 especies (204 y 160 en el Nuevo Mundo y Viejo Mundo, respectivamente) de acuerdo con Knight & Stone (1977) y Guimarães (1997). No obstante, esta cifra pudiera estar fuertemente subestimada de acuerdo a revisiones realizadas a la colección del Museo de Historia Natural, Smithsonian Institution (Judd, Com. pers.).

Igualmente, el poco conocimiento y la confusión existente en la sistemática de Sabethini es claramente observada en intentos recientes de un ordenamiento y clasificación natural del grupo (Zavortink, 1985; Harbach, 1991a,b, 1994, 1995; Harbach & Peyton, 1990, 1991, 1993; Harbach & Petersen, 1992; Judd, 1996; Harbach & Peyton, 2000).

Judd (1996, 1998) sugiere que esta clasificación, en algunos casos no natural, es consecuencia de la escasa comparación entre fases inmaduras en las descripciones originales, del pobre tratamiento sistemático y la carencia de claves adecuadas para una correcta y eficiente identificación de diferentes especies tratadas en Lane y Cerqueira (1942) y Lane (1953).

Particularmente, el género *Wyeomyia* Theobald no escapa a este caos sistemático. Este género incluye más de 100 especies, 37 de ellas en Venezuela (Sutil, 1980) que son difíciles de reconocer en su mayoría. Infragenéricamente, está representado por 15 subgéneros (Judd, 1998; Porter & Wolf, 2005; Motta & Lourenço-de-Oliveira, 2005) luego que recientemente, miembros de este género han sido transferidos a otros géneros, se han creado tres subgéneros nuevos, e inclusive especies del género *Sabethes* Robineau-Desvoidy han sido trasladados hacia *Wyeomyia* (Zavortink, 1985; Harbach & Peyton, 1990, 1991; Judd, 1998).

El género *Wyeomyia* es uno de los taxa de Sabethini más numeroso y quizás menos estudiado con respecto a su clasificación natural debido al desconocimiento de las fases inmaduras. A nivel subgenérico, *Nunezia* Dyar es muy poco conocido,

¹ Lab. Biología de Vectores, Instituto de Zoología Tropical, Universidad Central de Venezuela, Apdo. 47058, Caracas 1041-A.

² Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo. Campus Bárbula, Naguanagua. Estado Carabobo.

*Autor de correspondencia: jnavarro@ciens.ucv.ve

siendo hasta el presente un taxón con sólo dos especies, *Wy. lateralis* Petrocchi, 1927 y *Wy. bicornis* (Root, 1928), esta última, la especie tipo del subgénero y el único representante conocido en fase larval.

El presente trabajo es parte y consecuencia de un estudio en gran escala acerca de la fauna de mosquitos en Parques Nacionales de Venezuela, cuyas fases inmaduras se desarrollan en plantas Fitotelmata, las cuales poseen estructuras morfológicas (brácteas, espatas, axilas, etc.) que pueden almacenar agua de lluvia en donde se desarrollan una variedad de insectos acuáticos (Varga, 1928; Fish, 1983). Los Sabetinos representan cerca del 50% de la fauna de Culicidae de las fitotelmata en Venezuela (Navarro *et al.*, 2007) y especies del género *Wyeomyia* son importantes cohabitantes en diferentes especies y tipos de estas plantas.

En el inventario (identificación, revisión) de especies nos hallamos la curiosa descripción de *Wyeomyia* (*Wyo.*) *trujilloi* por Pulido & Sutil (1981) como una especie nueva, cuya morfología no concordaba con las características del subgénero al cual fue asignado por estos autores, y con el tipo de criadero en el cual estaba señalado en la descripción bionómica. Luego de un análisis metódico determinamos que *Wy. trujilloi* debe ser sinonimizada con *Wy. (Nunezia) bicornis*, lo cual es el propósito de este trabajo.

Igualmente, se realizó la descripción para *Wy. bicornis* de la pupa y de las piezas bucales de la larva, las cuales no estaban descritas, así como parte de la cabeza y sifón respiratorio las cuales presentaban un pobre tratamiento taxonómico. Finalmente, se proporcionan explicaciones morfológicas, bionómicas y biogeográficas en las cuales se basó la sinonimia con el objetivo de realizar un aporte al conocimiento de la historia natural y sistemática de los sabetinos en Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material examinado

Se analizó el holotipo (macho) de *Wy. trujilloi* Pulido & Sutil con los números, 21-40-1 y 21-40-2 depositado en la colección del Laboratorio de Morfología de Insectos, División de Endemias

Rurales, Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental, Maracay, Estado Aragua, Venezuela, (DERM sensu Knight & Stone, 1977; Guimarães, 1997) colectada en Altamira, Municipio Altamira, Estado Barinas. Este holotipo consiste de los genitales del macho montados en lamina (21-40-2), una exuvia de pupa (Pe, 21-40-2) y una exuvia de larva (Le, 21-40-1).

También fue revisado el holotipo (macho) de *Wy. bicornis* (Root) depositado en el Museo de Historia Natural (NMNH sensu Knight & Stone 1977; Guimarães 1997), en el Walter Reed Biosystematic Unit, Museum Support Center, Washington DC, Estado Unidos. El holotipo (# 44162) consiste de los genitales masculinos montados en lámina, con etiqueta: "Venezuela / Ocumare / July 6 1927 / No 108-1".

Para el análisis comparativo se utilizaron los holotipos de *Wy. trujilloi* y *Wy. bicornis*, así como ejemplares de *Wy. bicornis* de la colección del Laboratorio de Biología de Vectores, Museo de Biología, Universidad Central de Venezuela (LBV-MB-UCV-IX sensu Guimarães, 1997) colectadas en:

1. Localidad tipo (Topotipos) Parque Nacional (PN) Henri Pittier (Estación Biológica Rancho Grande); vía Ocumare de La Costa, con los números 500-Le, 508-Le, Pe, 509a,b-L4. Fitotelmata hospedadora: *Aechmea* sp. (*Bromeliaceae*). Colectores: JC Navarro y H Piñango. Fecha: 13 / V / 1994. Determinación: J. C. Navarro y J. Liria.
2. Sierra de San Luis, PN Juan Crisóstomo Falcón, Edo. Falcón, 2.000 m snm, con los números 722, L-023.1. Fitotelmata hospedadora: *Vriesea platynema* (*Bromeliaceae*). Colectores: Equipo LBV. Fecha: IV / 1994. Determinación: J. C. Navarro, J. Ingunza y J. Liria.
3. Páramos Batallón y La Negra, PN Juan Pablo Peñaloza, Edo. Táchira 1.445-1.475 msnm, con los números 1048-L4, 1106-Le,P. Fitotelmata hospedadora: *Aechmea* sp. (*Bromeliaceae*). Colectores: Equipo LBV. Fecha: X / 1995. Determinación: J. C. Navarro y J. Liria.
4. Monte Zerpa, Mérida, Edo. Mérida, PN Sierra Nevada, 2.020 msnm, con el número 906-L4. Fitotelmata hospedadora: *Guzmania mitis*. (*Bromeliaceae*). Colectores: Equipo LBV. Fecha: 09 / III / 1995. Determinación: J. C. Navarro y J. Liria.

Especies de Nunezia no descritas

Wý. (*Nunezia*) sp. 3

5. Guanay Tepuí, Edo. Amazonas, 1.250 m, bajo los números 691-Le, Pe; 705-Le; L-023.3-L4; L-023.4-L4. Fitotelmata hospedadora: *Brocchinia tatei* (*Bromeliaceae*). Colectores: J. C. Navarro y J. Ingunza. Fecha: 16 / II / 1995.

6. Yutaje Tepuí. Edo. Amazonas, 1.750 m bajo los números 676-Le,Pe; 780-Le,Pe; 1704-L4. Fitotelmata hospedadora: *Brocchinia tatei* y *Vriesea rubra*. (*Bromeliaceae*). Colectores: J. C. Navarro y J. Ingunza. Fecha: II / 1995.

Wý. (*Nunezia*) sp. 2

7. Auyantepuí, PN Canaima, Edo. Bolívar, 1.730 m., con los números 433-L4. (Harbach y Navarro 1996). Fitotelmata hospedadora: *Brocchinia tatei* (*Bromeliaceae*). Colectores: J. C. Navarro y J. Liria. Fecha: 03 / II / 1994.

Wý. (*Nunezia*) sp. 1

8. La Gran Sabana (La Escalera), PN Canaima, Edo. Bolívar, 1.040 m, con los números 400 y 405 (L4). Fitotelmata hospedadora: *Brocchinia* sp. (*Bromeliaceae*). Colectores: Equipo LBV. Fecha: IX / 1993.

Preparación de muestras

Las fases inmaduras de estos ejemplares se preservaron en etanol al 80%, se transparentaron en KOH al 10% (Harbach, 1977; Harbach & Knight, 1977) y se transfirieron a una batería de deshidratación alcohólica (Belkin, 1962).

Las piezas bucales se disecaron en una gota de Hoyer o una mezcla de bálsamo de Canadá y fenol (Wirth, 1961), bajo el microscopio estereoscópico. Las láminas (conteniendo larvas, sifón respiratorio y piezas bucales) se incubaron en estufa a 45-50°C durante dos a tres semanas (Harbach & Peyton, 1993; Pérez & Navarro, 1996; Liria & Navarro, 1999) Para la denominación de las estructuras se siguió la nomenclatura y el sistema de abreviaturas propuesto por Harbach & Knight (1980). Las abreviaturas genéricas y subgenéricas siguen el sistema de Reinert (2001).

Las estructuras de interés se fotografiaron por medio de un microscopio óptico Leitz Wetzlar laborlux con cámara automática de 0.32X, modelo MPS51-Wild y controlador MPS45-Wild.

Análisis cuantitativo de datos

Ordenamiento: Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) con el programa de computación PAST 1.3 (Hammer & Harper, 2004), como técnica de ordenamiento de especies para verificar estadística y gráficamente la diferenciación morfológica a nivel de subgéneros y comprobar además, la exclusión de *Wý. trujilloi* del subgénero *Wyeomyia*. Se utilizaron 31 caracteres (Apéndice I) de la larva (28 de la quetotaxia y tres morfométricos). En el análisis se incluyeron especies como *Wý. (Wyo.) arthrosigma* (Lutz 1905) (130.1-1.4, Torondoy, Edo. Mérida) y *Wý. (Dec.) felicia* (Dyar & Nuñez-Tovar 1927) (288-L4, Sierra de San Luis, Edo. Falcón), los topotipos de *Wý. bicornis* y el holotipo de *Wý. trujilloi* como especies problema, y tres especies no descritas del subgénero *Nunezia* pertenecientes a las cinco localidades antes señaladas.

Filogenético: Se realizó un análisis cladístico con los programas de computación NONA + WINCLADA (Goloboff, 1996; Nixon, 1999) con base a los caracteres larvales anteriormente señalados y previa codificación (Apéndice II) mediante el método de Gap-Weighting (Thiele, 1993; Kitching *et al.* 1998; Rae, 1998). Se emplearon las especies de *Nunezia*, *Wý. trujilloi*, *Wý. arthrosigma*, *Wý. felicia* y *Wý. (Phoniomyia) deanei* (Lourenço-de-Oliveira 1983), y como grupo externo a *Onirion imparis* Peyton & Harbach, 2000.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Luego del análisis comparativo entre los holotipos de *Wý. trujilloi* Pulido & Sutil (1981) con *Wý. bicornis* (Root, 1928), llegamos a la conclusión de sinonimizar la primera con la última, señalada en conformidad con evidentes características presentes en la larva y sus partes bucales, así como en los genitales del macho de *Wý. trujilloi* que corresponden con la descripción de *Wý. bicornis*.

Extrañamente, Pulido & Sutil (1981) en su descripción, incluyeron a *Wý. trujilloi* como perteneciente al subgénero *Wyeomyia*, sin señalar las características utilizadas para llegar a esa errónea conclusión: sic. “*Wý. trujilloi* esta agrupada en el subgénero *Wyeomyia* porque la proboscis es casi tan larga como el fémur anterior. Además, las características de la genitalia del macho son

Tabla I. Quetotaxia para la cabeza y segmento abdominales VIII y X para la larva de IV estadio de Wyeomyia (Nunezia) bicornis, (n=4).

Seta No.	Cabeza	Segmentos Abdominales	
		VIII	X
0	1	1	-
1	1	8,7(8)	3,4(4)
2	1	1	7,8(8)
3	1	6,7,9(7)	2
4	10,8(9)	1	7,8(8)
5	9,6(8)	6,7(7)	-
6	9,8(9)	-	-
7	7	1-S	7
8	?,1	1a-S	17,19,20,32(22)
9	10	1b-c-S	1
10	1	2-S	1
11	2,1(2)	2a-d-S	2
12	2,1(2)	6-8-S	1
13	?,1	-	-
14	2,?	1	-
15	1	-	-

Leyenda: El número de setas entre paréntesis indica la media; “?” significa que el carácter no pudo ser apreciado.

inconfundibles” (págs. 222 y 226). Esta aseveración, fue probablemente la que llevó a estos autores a no verificar la clara asociación de la larva (particularmente en el sifón, seta 1-S) (Fig. 1b) con la única especie de *Nunezia* presente en el país y cuya localidad tipo precisamente está en Venezuela (Edo. Aragua). Una posible explicación a esto se relaciona con las figuras mostradas en Lane (1953), texto ampliamente utilizado para la identificación de mosquitos Suramericanos, las cuales no corresponden con la descripción original en Dyar (1928: 51) para *Wyeomyia bicornis*, obviando la presencia del mechón de setas en 1-S: sic. “a paired tuft toward base and two single hairs toward apex...” característica no descrita por Pulido & Sutil (aunque sí dibujada) y que claramente lo presenta *Wyeomyia trujilloi*.

En la misma descripción, Pulido & Sutil (1981) indican: “dorsalmente con 5 pares de pelos lisos, el primer simple y más pequeño...” concuerda exactamente con Dyar (1928) y Lane (1953): “on dorsal aspect five split hair, the basal one single” y “dorsal aspect five split hairs, the basal one simple...”, respectivamente.

Estas características están presentes en *Wyeomyia bicornis* de Rancho Grande; vía Ocumare (Edo. Aragua), Sierra de San Luis (Edo. Falcón) y del Páramo Batallón y La Negra (Edo. Táchira) esta última localidad en la misma vertiente -suroriental de la cordillera andina- de la localidad tipo de *Wyeomyia trujilloi*.

Igualmente, en la larva se puede observar la ramificación presente en las setas 4,5,6,7-C las cuales son múltiples (7-9) en *Nunezia* (*Wyeomyia bicornis*, *Wyeomyia trujilloi*, *Wyeomyia* (*Nunezia*) sp. 1, 2, y 3 (Fig. 1a), y por otro lado simples o en pares para los subgéneros *Wyeomyia*, *Exallomyia* Harbach & Peyton, *Caenomyiella* Harbach & Peyton, *Zinzala* Zavortink y *Decamyia* Dyar, de acuerdo con especímenes observados en la colección LBV-MB-UCV-IX y a las descripciones de estos subgéneros por Harbach & Peyton (1990,1991).

Adicionalmente, la descripción y dibujo de Pulido & Sutil (1981) para los genitales concuerda paso a paso con la descripción proporcionada por

Fig. 1. Cabeza (a) y segmento VIII (b) de la larva de 4to estadio de *Wy. bicornis*.

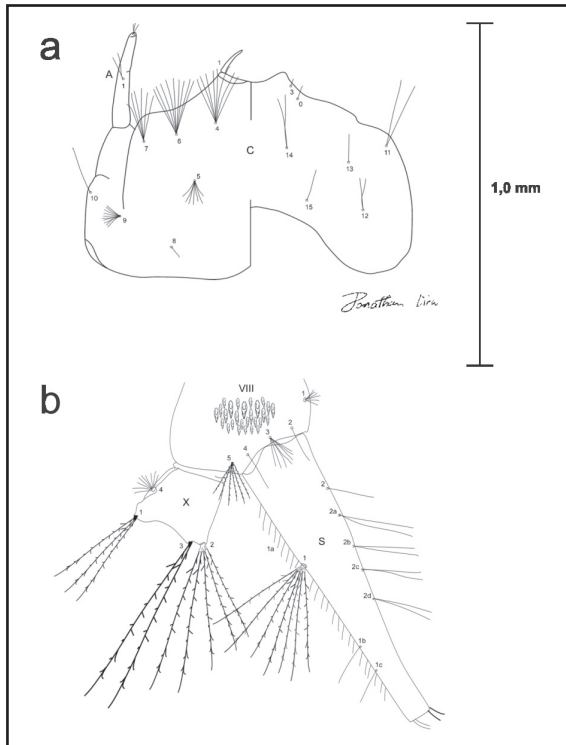
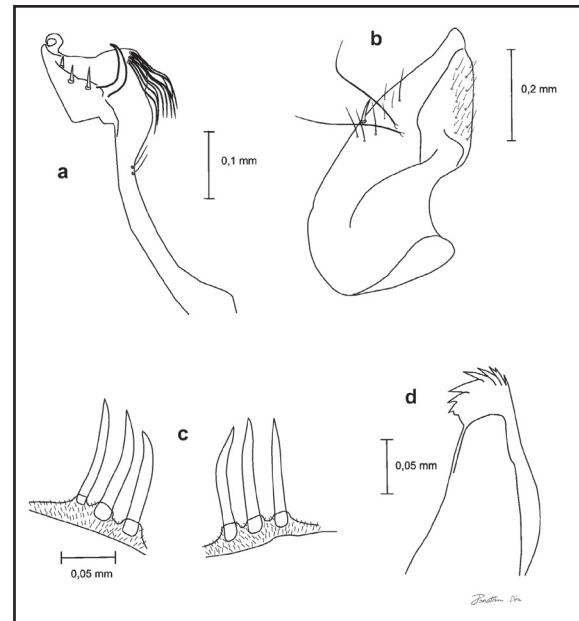


Fig. 2. Genitales masculinos del holotipo de *Wy. bicornis*: a) Gonoestilo (200x), b) gonocoxito (100x), c) tergo IX (400x) y d) proctiger (400x).



Dyar (1928) y Lane (1953) para *Wy. bicornis*, lo cual puede ser verificado en los holotipos de *Wy. bicornis* y en *Wy. trujilloi* (Fig. 2 y 3, respectivamente).

La hembra de *Wy. trujilloi* no fue colectada ni obtenida en cría asociada por Sutil & Pulido (1981), por lo que esta fase no pudo ser comparada con los topotipos, ni con la descripción de *Wy. bicornis*. No obstante, esta fase es la de menor importancia en la diagnosis específica en comparación con la larva y los genitales del macho.

La importante utilización de la morfología de las piezas bucales larvales, en el diagnóstico genérico de la Tribu, igualmente proporciona características diagnósticas para el subgénero *Nunezia*. El cuerpo maxilar (MxB), presenta una relación largo/ancho de aproximadamente 1.3x para *Nunezia*, mientras que en *Wyeomyia* (*Wyeomyia*) *grayii* Theobald 1901 esta relación es igual a 1; la seta 4-Mx es tan larga como el MxB y ramificada apicalmente, mientras que en *Wyeomyia* es claramente sencilla. La seta 6-Mx es delgada y corta en *Nunezia* y cerca de 0.5x el largo del palpo maxilar (MpLp), por el contrario *Wy. grayii* es gruesa y 0.7x el largo de MpLp (Fig. 4c).

Fig. 3. Genitales masculinos de *Wy. trujilloi* (tomado de Pulido & Sutil, 1981).

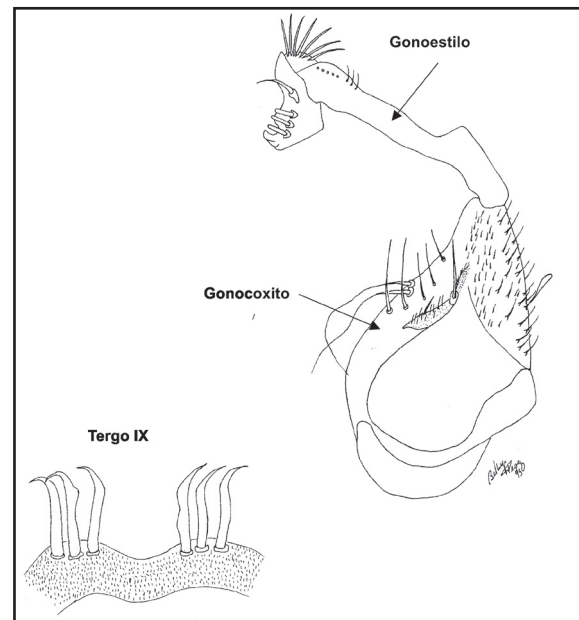


Fig. 4. Maxila de *Wy. bicornis* (a), detalle de la seta Mx-4 (b), y maxila de *Wy. grayii* (c) tomado de Harbach & Peyton (1993).

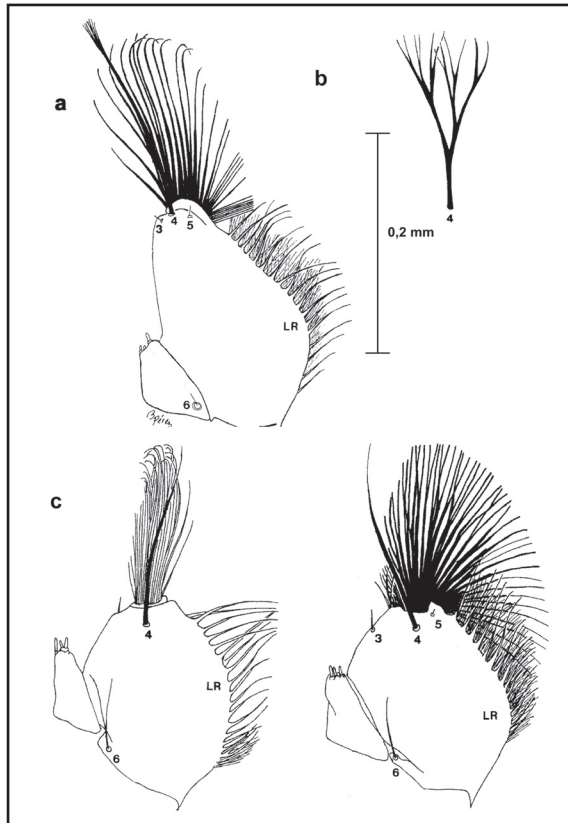
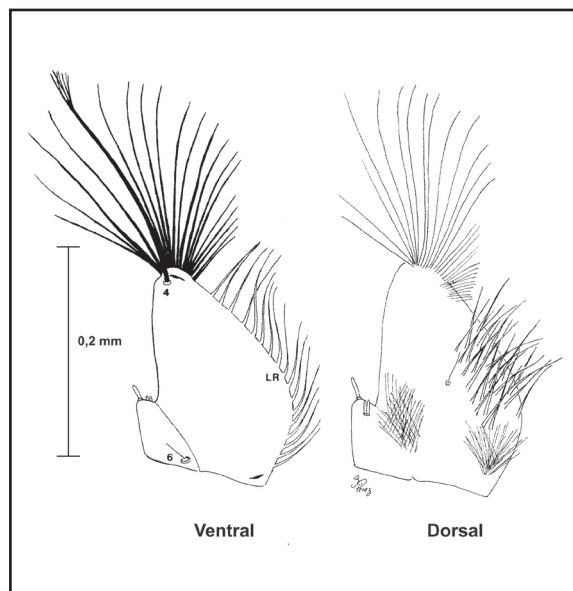


Fig. 5. Maxila de la larva de 4to estadio de *Wy. trujilloi* (= *Wy. bicornis*).



Debido a que la muda de la larva del holotipo de *Wy. trujilloi* presenta la cápsula cefálica completa (sin disección de las piezas bucales) fue necesario observar estas características en el ejemplar completo. En la Fig. 5 se observa la forma de la maxila en el holotipo de *Wy. trujilloi*, la cual al ser comparada con la Fig. 4a de *Wy. bicornis* y la Fig. 4c de *Wy. grayii*, tipo del subgénero *Wyeomyia* (mostrada por Harbach & Peyton 1993), se comprueba que la morfología corresponde con la del subgénero *Nunezia*.

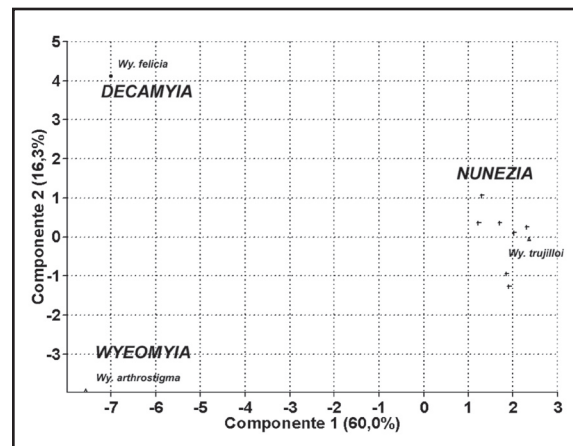
Análisis de Ordenamiento

El ACP (Fig. 6) arrojó una diferenciación entre las especies de los subgéneros *Wyeomyia* y *Decamyia* de las especies de *Nunezia*, incluyendo en este grupo a *Wy. trujilloi*. El componente principal número uno representado primordialmente por las setas 4-7-C, la 1-S y la relación ancho/largo del sifón explicó el 60% del total de la varianza. Este resultado indica claramente la ubicación subgenérica de *Wy. trujilloi* en *Nunezia* y no en *Wyeomyia*.

Análisis Filogenético

Los análisis realizados con Parsimonia Máxima (Fig. 7) muestran dos topologías o soluciones más parsimoniosas (7a y 7b), de las once encontradas. En las cuales se observa, que el clado X incluye dos subclados (X1 y X2). En el primero (X1) se ubican los individuos de *Wy. (Nuz.)* sp de Auyantepui y Gran Sabana, pudiendo representar ambos una entidad taxonómica no descrita y el clado X2 con dos subramas que incluyen a *Wy. bicornis*.

Fig. 6. Análisis de Componentes principales en tres subgéneros de *Wyeomyia*.



En la Fig. 7b, la subrama X2.1 incluye los individuos pertenecientes *Wý. bicornis* de los Andes (Tama y Sierra Nevada) incluyendo a *Wý. trujilloi*, mientras que la otra subrama X2.2 incluye a los individuos de Guayana (Guanay y Yutaje) y la localidad tipo (*Wý. bicornis* s.s., Rancho Grande).

El cladograma que muestra el consenso estricto (7c), colapsa ambas subramas en una politomía, sugiriendo así que el clado X2 muestra los individuos de *Wý. bicornis* y sus variedades geográficas, mientras que el clado X1 a otra especie de *Nunezia* no descrita hasta ahora.

También se aprecian las relaciones entre el subgénero *Nunezia*, y *Wý. (Wyeomyia) arthrostigma*, *Wý. (Decamyia) felicia*, *Wý. (Phoniomyia) deanei* y *Onirion imparis*. El género *Onirion* fue utilizado como taxa de enraizamiento, debido al arreglo mostrado por Harbach & Peyton (2000) en donde este género es grupo hermano del clado (*Isostomyia*+*Shanoniana*) + (*Phoniomyia (Wyeomyia (Limatus+Sabethes))*). Luego *Wý. (Phoniomyia) deanei* es grupo hermano de *Nunezia*, tal como se aprecia en uno de los cladogramas más parsimoniosos presentados por Judd (1996; 1998).

Bionomía

Similarmente, la data bionómica suministrada por Pulido & Sutil (1981), no corresponde con las características ecológicas de las especies de *Nunezia* ni de *Wyeomyia*. (Lane & Cerqueira, 1942; Lane, 1943; Lane, 1945; Lane, 1953).

Estos autores señalan haber colectado esta especie en plantas del género *Heliconia* sp., y asociada a otras especies de *Wyeomyia* como *Wý. felicia* y *Wý. ulocoma* (ambas del subgénero *Decamyia*). De acuerdo a estudios realizados en la taxonomía y bioecología de mosquitos en Parques Nacionales de Venezuela (Navarro *et al.*, 1995; 2007), el subgénero *Nunezia* se ha obtenido asociada estrictamente en especies de bromeliáceas, mientras que las especies del subgénero *Wyeomyia* se han colectado en bromeliáceas, aráceas e internudos de bambú, pero nunca en Heliconiaceas en donde se encuentran exclusivamente especies de *Decamyia*. Esto podría evidenciar que los autores, mezclaron muestras de diferente origen (bromelias y heliconias) y confundieron ejemplares de las tres especies de *Wyeomyia*.

Sobre la base de los diferentes análisis descritos, el nombre válido para *Wý. (Wý.) trujilloi* es *Wý. (Nunezia) bicornis*. Por consiguiente, realizamos a continuación el tratamiento taxonómico de *Wý. bicornis* y por último se muestra una descripción parcial detallada de la larva (cabeza y piezas bucales) así como la primera descripción de la pupa.

TRATAMIENTO TAXONÓMICO

Género *Wyeomyia* Theobald

Subgénero *Nunezia* Dyar, Ortotipo: *Dendromyia (Eunicemyia) bicornis* Root. Especie tipo: *Wyeomyia bicornis* (Root, 1928). Venezuela, Brasil, Bolivia y Perú, Incluye especies: *Wý. lateralis* Petrocchi 1927, Argentina.

Wyeomyia (Nunezia) bicornis (Root, 1928)

bicornis Root, 1928. En: Dyar, 1928: 50 (*Dendromyia*), holotipo: macho y larva. Localidad tipo: Ocumare, Aragua, Venezuela (NMNH).

Wyeomyia (Nunezia) bicornis de Lane, 1953: 931 (Macho, hembra y larva) Figs. 912 y 913.

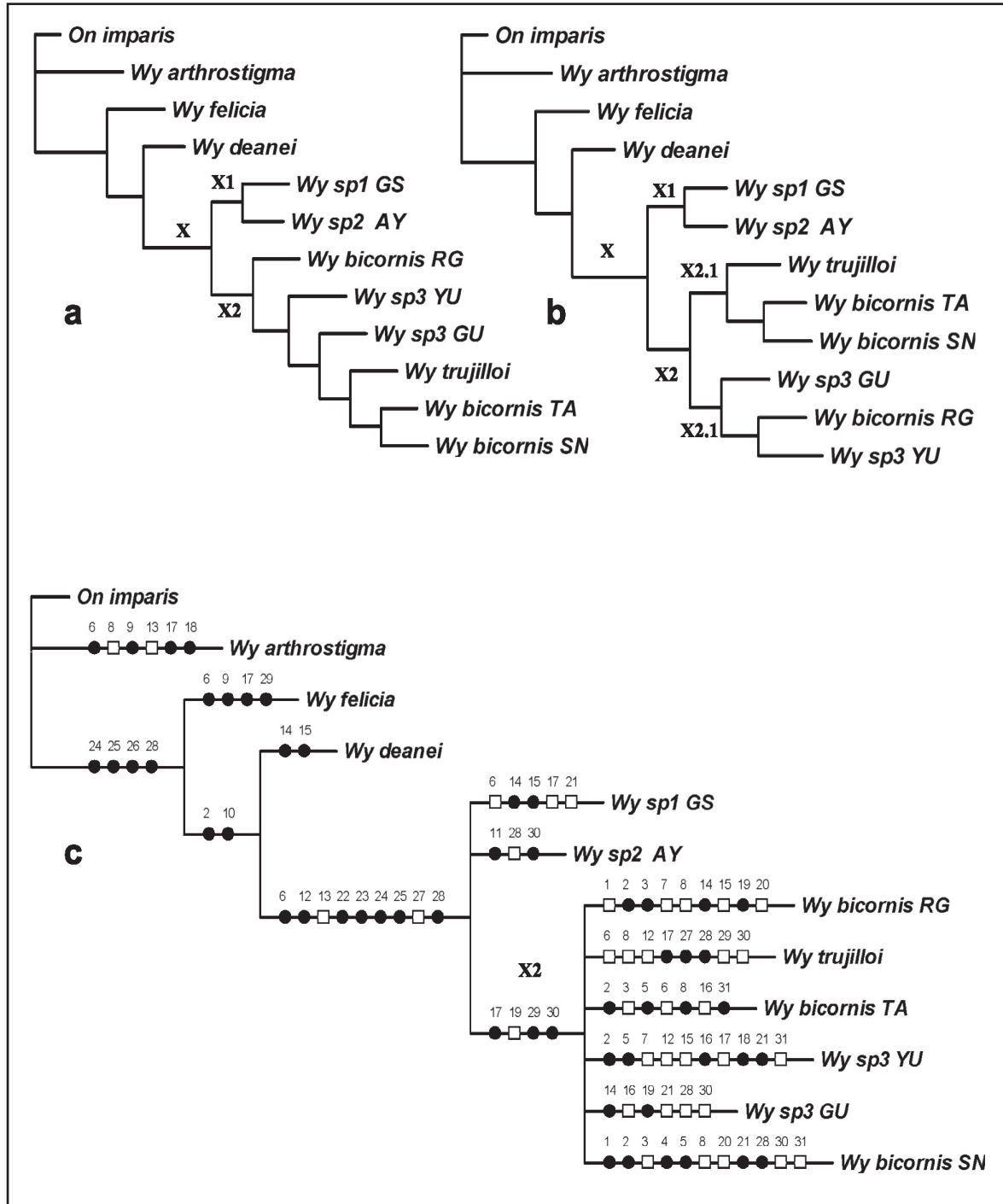
Wyeomyia (Nunezia) bicornis de Knight y Stone, 1977: 332 (información del holotipo y distribución geográfica en América).

Wyeomyia (Nunezia) bicornis de Sutil, 1980: 19 (distribución geográfica en Venezuela).

Wyeomyia (Wyeomyia) trujilloi Pulido & Sutil 1981: 219. NUEVA SINONIMIA, localidad tipo: Altamira, Municipio Altamira, Barinas, Venezuela. Holotipo: GM, Le, Pe, (DERM)

Larva (Fig. 1a,b y 5): Se presenta parte de los caracteres y posiciones; el número de ramas se describen en la Tabla I. Maxila (Fig. 5): 1-Mx ausente, setas 2-6-Mx simples (4-Mx larga, gruesa y ramificada en el ápice), LR1 con 18 setas conspicuas, MxB con 22 filamentos. Mandíbula con cuatro dientes ventrales el primero de mayor tamaño que el resto, MnS1 y MnS2 múltiples, MnR con cuatro filamentos, MSA hacia el borde distal. Cabeza: (Fig. 1a) Setas 1,8,10,13,15-C simples, 11-12-C simples o dobles, 14-C doble, 4-C de ocho o diez ramas, 5-C con seis o nueve ramas, 6-C con ocho o nueve ramas, 7-C con

Fig. 7. (a,b) Dos de los 11 árboles más parsimoniosos, y (c) cladograma de consenso para las muestras de *Wy. (Nuz.)* sp. (círculos negros indican apomorfías y rectángulos blancos homoplasias).



siete ramas. Abdomen. 1-VIII con siete u ocho ramas, 2,4-VIII simples, 3-VIII con siete o nueve ramas, 5-VIII con seis o siete ramas, CS con tres hileras de escamas. Sifón: Pseudopeine variable, con 20 a 32 setas. 1-S con siete ramas, 1b,c,d-S simples, 2-S simple, 2a,b,c,d-S dobles, 7-9-S simples. Segmento X: 1-X triple o cuádruple; 2-X con siete u ocho ramas, 3-X doble; 4-X con siete u ocho ramas.

Pupa, redescrición (Fig. 8): Se muestran las posiciones y números de las setas (Tabla II). Cefalotórax: Seta 1-CT doble y larga; 2-7-CT y 9-CT con aproximadamente 1/6 del largo de 1-CT; 2-3,9-CT dobles, 5,7-CT triples, 6-CT cuádruple; 8-CT doble y la mitad de larga que 1-CT; 10-12-CT simples y largas. Trompeta: Larga y cilíndrica. Abdomen: Seta 1-I con diez ramas tipo dendrítico, 1-II doble o con seis ramas, 1-III con seis ramas, 1-IV-V con ocho ramas, 1-VI-VIII dobles; 2-I-VI simples; 3-I-III,IV-VIII simples, 3-IV con cuádruple, 3-V simple o doble; 4-1 con cinco o seis ramas, 4-II cuádruples, 4-III-IV simples, 4-VI triple, 4-VII-VIII doble; 5-I-II simples, 5-III doble, 5-IV-VI triples y largas, 5-VIII simple o triple y larga; 6-I-II simple y larga, 6-III simples y corta, 6-IV doble o triple, 6-V cuádruple o quintupla, 6-VI simple o doble, 6-VII doble; 7-I con cuatro a seis ramas, 7-III doble o cuádruple, 7-IV-V simples o dobles, 7-VI doble, 7-VII simple; 8-II-III triples o

Fig. 8. Quetotaxia de la pupa de *Wy. bicornis*.

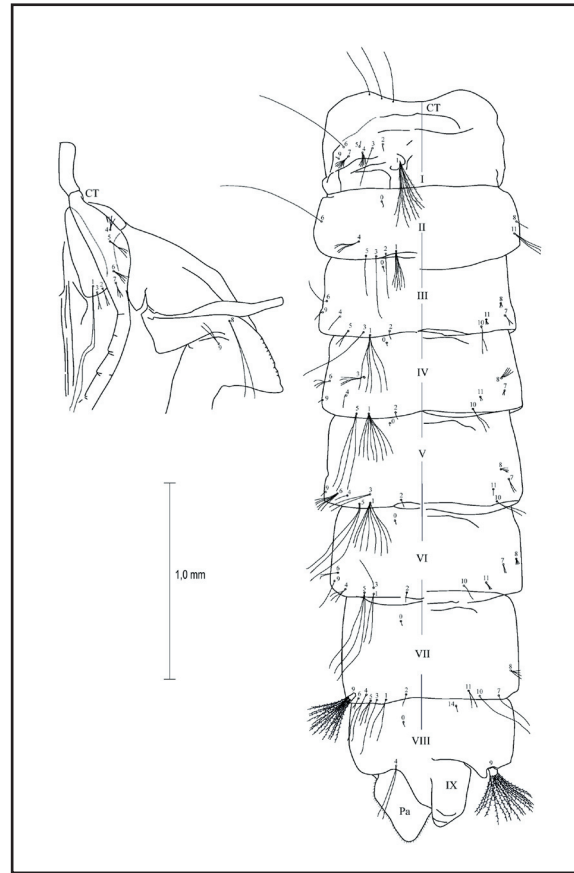


Tabla II. Quetotaxia de la pupa de *Wyeomyia (Nunezia) bicornis*, (n=2).

Seta No.	Cefalotórax	Segmentos Abdominales										
	CT	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	Pa	
0	-	-	1	1	1	1	1	1	1	-	-	
1	2	10	6,2(4)	6	8,?	8,?	2	1,2(2)	-	-	-	
2	2,1(2)	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	
3	2,3(3)	1	1	1,?	4	2,1(2)	1,2(2)	1	-	-	-	
4	3	6,5(6)	4	1	1	1	3	2	2	-	-	
5	4,?	1	1,?	2	3,?	3,?	3,?	3,1(2)	-	-	-	
6	4	1	1	1	1,2(2)	5,4(5)	2,1(2)	2	-	-	-	
7	3,5(4)	6,4(5)	?	4,2(4)	4	2,1(2)	2	1	-	-	-	
8	2	-	1	3,4(4)	1	4	4,3(4)	4,5(5)	-	-	-	
9	2	1	?	1	2,1(2)	1	1	16,15(16)	30,27(29)	-	-	
10	1	-	?	2	2,3(3)	2	1,2(2)	1	-	-	-	
11	1	?	3	3,1(2)	2	1,2(2)	4,2(3)	2,1(2)	-	-	-	
12	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
14	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	

Leyenda: El número de setas entre paréntesis indica la media; “?” significa que el carácter no pudo ser apreciado.

cuádruples, 8-IV-V cuádruples, 8-VI con tres o cuatro ramas, 8-VII cuádruple o quintupla; 9-I-VI simples, 9-VII con quince ramas tipo dendrítico, 9-VIII de veintisiete o treinta ramas tipo dendrítico; 10-III, V dobles, 10-IV, VI simples o dobles 10-VIII simple; 11-II triple y larga, 11-III simple o triple, 11-IV doble o triple, 11-V simple o doble, 11-VI doble o cuádruple, 11-VII simple o doble; 14-VIII simple. Paleta: Con una hilera de espículas en el borde interior o distal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer su valiosa colaboración a las siguientes personas e instituciones: Insp. Jesús Amarista (†) e Ing. Carmen Escalante de Ugueto por facilitarnos el holotipo de *Wy. trujilloi* de la colección DERM; al Dr. Richard Wilkerson y Sr. Thomas Gaffigan, por el préstamo del holotipo de *Wy. bicornis* de la colección NMNH, MSc. Belkys Pérez por el trabajo de disección, montaje en laboratorio (partes bucales) y dibujos de piezas bucales; a Adriana Zorrilla por la búsqueda de los datos de colección; Lic. Norberto Rebolledo, Director del Centro de Ecología de las Tierras Altas, El Cobre, Edo. Táchira (CETA-PN Juan Pablo Peñaloza); los Doctores Armando Michelangeli y Ricardo Guerrero, Fundación Terramar (Expediciones Yutaje-Guanay y Auyantepui) e INPARQUES; al Dr. Luis Daniel Otero y Lic. Jorge Avila (ULA-Mérida). Al CDCH – UC y la Facyt (Decana Dra. Yaqueline Loyo de Sardi), por facilitar los viáticos y pasaje (JL) para la visita a NMNH. Este trabajo fue financiado por CONICIT-RP-VII-240060 (JCN) y FONACIT LAB-2000001593, Grupo CNRA (J Clavijo y JCN).

***Wyeomyia trujilloi* Pulido & Sutil, 1981, new synonym of *Wyeomyia bicornis* (Root, 1928) (Culicidae: Sabethini), with redescription of the pupa and part of the larva**

SUMMARY

Wyeomyia (*Wyeomyia*) *trujilloi* Pulido & Sutil, 1981, is recognized as the synonym of *Wyeomyia* (*Nunezia*) *bicornis* (Root 1928), based on larval chaetotaxy and mouthparts morphology, pupae and male genitals in comparison and analysis with *Wy. bicornis* holotype, topotypes and *Wy. trujilloi* holotype. Discussion and characteristics

illustration about subgeneric level are provided. The larval mouthparts morphology and pupae chaetotaxy are described and illustrated by first time, and head of larvae chaetotaxy are re-described.

Key words: morphology, mosquitoes, *Nunezia*, Phytotelmata, Sabethini, *Wyeomyia*.

REFERENCIAS

Belkin J. N. (1962). *The Mosquitoes of the South Pacific (Diptera: Culicidae)*. Vol. 1 y 2. University of California Press, Los Angeles, USA.

Dyar H. G. (1928). *The Mosquitoes of the Americas*. Carnegie Institution of Washington, USA.

Fish D. (1983). Phytotelmata: Flora and Fauna. pp 1-25. En: *Phytotelmata: Terrestrial plants as host aquatic insect communities*. Eds. Frank J. H. & Lounibos L. P. Plexus publishing, New Jersey, USA.

Guimarães J. H. (1997). *Systematic Database of Diptera of the Americas South of the United States, Family Culicidae*. Ed. Pleide. São Paulo: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Brasil.

Goloboff P. A. (1996). Nona. Nona ver. 1,50 (versión 32-bit). Programa y manual distribuido por J. M. Carpenter. Dept. Entomology, American Museum of Natural History, New York, USA.

Hammer O. & Harper D. A. T. (2004). PAST: Palaeontological Statistics, version 1.30. Disponible en URL: <http://folk.uio.no/ohammer/past>.

Harbach R. E. (1977). Comparative and functional morphology of the mandibles of some fourth stage mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *Zoomorphologie*. **87**: 217-236.

Harbach R. E. (1991a). A new Subgenus of the Genus *Sabethes* (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* **23**: 1-9.

Harbach R. E. (1991b). Neotype designation, Generic realignment and description of *Dendromyia shnusei* Martini (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* **23**: 175-181.

- Harbach R. E. (1994). The Subgenus *Sabethinus* of *Sabethes* (Diptera: Culicidae). *Syst. Entomol.* **39**: 207-234.
- Harbach R. E. (1995). A new *Sabethes* of the Subgenus *Peytonulus* (Diptera: Culicidae) with an unusual fourth-instar larva. *Ent. Scand.* **26**: 87-96.
- Harbach R. E. & Knight K. L. (1977). A Mosquito Taxonomy Glossary X. The Larval Mandible. *Mosq. Syst.* 9:25-27
- Harbach R. E. & Knight K. L. (1980). *Taxonomists' Glossary of Mosquito Anatomy*. Plexus Publishing, Inc., Marlton, New Jersey, USA.
- Harbach R. E. & Navarro J. C. (1996). A new species of *Anopheles* subgenus *Kerteszia* (Diptera: Culicidae) from Venezuela. *Ent. Scand.* **27**: 207-216.
- Harbach R. E. & Petersen J. L. (1992). Two species previously confused under the concept of *Sabethes tarsopus* in Central America (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* **24**: 102-124.
- Harbach R. E. & Peyton E. L. (1990). A new Subgenus in *Wyeomyia* (Diptera: Culicidae) with the reclassification and redescription of the type species, *Sabethes fernandezyepezi*. *Mosq. Svst.* **22**: 15-23.
- Harbach R. E. & Peyton E. L. (1991). A new Subgenus in *Wyeomyia* (Diptera: Culicidae), with the reclassification and redescription of *Wyeomyia (Davismyia) arborea*, *Wyeomyia (Dendromyia) tarsata* and *Sabethes (Sabethes) carrilloi*. *Mosq. Svst.* **23**: 92-109.
- Harbach R. E. & Peyton E. L. (1993). Morphology and evolution of the larval maxilla and its importance in classification of the Sabethini (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* **25**: 1-16.
- Harbach R. E. & Peyton E. L. (2000). Systematics of *Onirion*, a new genus of Sabethini (Diptera: Culicidae) from the Neotropical Region. *Bull. Mus. Nat. Hist. Lond (ent)*. **69**: 115-169.
- Judd D. (1996). Review of the systematics and phylogenetic relationships of the Sabethini (Diptera: Culicidae). *Syst. Entomol.* **21**: 129-150.
- Judd D. (1998). Review of a bromeliad-ovipositing lineage in *Wyeomyia* and the resurrection of *Hystatomyia* (Diptera: Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **91**: 572-589.
- Kitching I., Forey P., Humphries C. & Williams D. (1998). *Cladistics: The Theory and Practice of the Parsimony Analysis*. Oxford University Press.
- Knight K. L. & Stone A. (1977). *A Catalog of the Mosquitoes of the World (Diptera: Culicidae)*. San Thomas Foundation, Entomological Society of America, Vol. VI. USA.
- Lane J. (1943). The Geographical distribution of Sabethini. *Rev. Ent.* **14**: 409-429.
- Lane J. (1945). Os sabetíneos da América (Addenda e Corrigenda). *Rev. Ent.* **16**: 132-157.
- Lane J. (1953). *Neotropical Culicidae*. Vol. II. Published by the University of São Paulo, Brasil.
- Lane, J. & Cerqueira N. L. (1942). Os sabetíneos da América (Diptera: Culicidae). *Arq. Zool. São Paulo.* **3**: 473-849.
- Liria J. & Navarro J. C. (1999). Morfología bucal larval de *Deinocerites melanophylum* Dyar & Knab y *D. cancer* Theobald (Diptera: Culicidae). *Bol. Entomol. Venezolana.* **14**: 53-62.
- Motta M. I. & Lourenço de Oliveira R. (2005). *Spilonympha*, a new subgenus of *Wyeomyia* (Diptera: Culicidae) and description of a new species *Wyeomyia aninge*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **98**: 832-852.
- Navarro J. C., Ingunza J., Fernández Z. & Barrera R. (1995). Mosquitoes and bromeliads: species-specific selectivity patterns on the northern coast and southern Guayana Shield in Venezuela. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **11**: 345-346.
- Navarro J. C., Liria J., Piñango H. & Barrera R. (2007). Biogeographic area relationships in Venezuela: A parsimony analysis of Culicidae-Phytotelmata relationships distributions in national Parks. *Zootaxa.* **500**: 1500 (en prensa).
- Nixon K. C. (1999). Winclada (BETA) ver. 0.9.99m24 publicado por el autor, Ithaca, NY. Disponible en URL: <http://www.cladistics.com>.

- Pérez B. Y. & Navarro J. C. (1996). Morfología bucal de larvas de mosquitos: herramienta taxonómica a nivel subgenérico *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *Acta Zool. Mex.* **68**: 13-26.
- Porter, C. H. & Wolf M. I. (2004). A new species of *Wyeomyia* (*Hystatomyia*) (Diptera: Culicidae) from Colombia and a redescription of *Wy. intonica* Dyar & Knab. *Zootaxa.* **477**: 1-31.
- Pulido J. & Sutil E. O. (1981). *Wyeomyia* (*Wyeomyia*) *trujilloi* (Diptera, Culicidae) nueva especie de Venezuela. *Bol. Direcc. Marariol. San. Amb.* **21**: 219-226.
- Rae T. C. (1998). The Logical Basis for the use of Continuous Characters in Phylogenetic Systematics. *Cladistics.* **14**: 221-228
- Reinert J. F. (2001). Revised list of abbreviations for genera and subgenera of Culicidae (Diptera) and notes on generic and subgeneric changes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **17**: 51-55.
- Sutil O. 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.
- Thiele K. (1993). The Holy Grail of the perfect character: the cladistic treatment of morphometric data. *Cladistics.* **9**: 275-304.
- Varga L. (1928). Ein interenssanter biotop der bioconosse von Wasser-organismen. *Biologisches Zentralblatt.* **48**: 143-162.
- Wirth W. W. (1961). Instructions for preparing studies of Ceratopogonidae and Chironomidae. *Studia Ent.* **4**: 553-554.
- Zavortink T. J. (1985). *Zinzala*, a new Subgenus of *Wyeomyia* with two new species from, pitcher-plants in Venezuela (Diptera, Culicidae, Sabethini). *The Wasman Journal of Biology.* **43**: 46-59.

Recibido el 08/11/2005
Aceptado el 15/12/2006

Apéndice I.- Matriz de datos merísticos y morfométricos para quetotaxia larval.

	1 1 1 1 1 1 1															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6
	4C	5C	6C	7C	9C	0P	1P	1M	2M	4M	5M	6M	7M	9T	13T	1VIII
<i>Wy. bicornis</i> RG	10	9	9	7	10	8	3	5	1	2	1	2	1	10	7	8
<i>Wy. (Wyo.) trujilloi</i>	8	6	8	7	10	9	2	4	1	2	1	3	1	13	10	7
<i>Wy. bicornis</i> TA	8	5	10	8	12	9	2	2	1	2	1		1	13	10	6
<i>Wy. bicornis</i> YU	8	8	8		8	8	3	3	1	2	1	3	1		7	9
<i>Wy. bicornis</i> GU						8	2	3	1	2	1		1	16		5
<i>Wy. bicornis</i> SN	9	4	10	9	5	8	2	4	1	2	1	2	1	12	10	7
<i>Wy. bicornis</i> GS	10		8	10	7	9	3	3	1	2	1			14	6	8
<i>Wy. bicornis</i> AY						8	3	3	1	2	2	2	1		11	8
<i>Wy. (Pho.) deanei</i>	7	6	7	8		10	11	6	1	2	1	1	2	1	16	8
<i>Wy. (Den.) ypsipola</i>	1	1	1	1	5	10	2	2	1	3	1	1	3	11	12	4
<i>Wy. (Wyo.) arthrostigma</i>	1	1	1	4	2	4	12	5	5	1	1	1	1	6	10	6
<i>Wy. (Dec.) felicia</i>	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1	1	1	2	13	12	5
<i>Onirion imparis</i>	1	1	1	1	2	10	1	1	1	1	1	1	2	11	7	10
	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3
	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	
	3VIII	5VIII	1X	2X	4X	2aS	2bS	2cS	2dS	1bS	A	1aS	a/l	L	r/R	
<i>Wy. bicornis</i> RG	6	6	3	7	7	2	2	2	2	1	5	24	0,25	7	0,83	
<i>Wy. (Wyo.) trujilloi</i>	9	7	4	8	7	2	2	2	2	1	4	32	0,17	8	0,83	
<i>Wy. bicornis</i> TA	6	9	4	8	7	2	2	2	2	1	5	25	0,24	7	0,85	
<i>Wy. bicornis</i> YU	5	8	4	8	4	2	2	2	2	1	5	24	0,24	7	0,91	
<i>Wy. bicornis</i> GU		6	5	8	6	2	2	2	2	1	6	28	0,24	8	0,83	
<i>Wy. bicornis</i> SN	6	9	4	7	8	2	2	2	2	1	6	23	0,24	12	0,79	
<i>Wy. bicornis</i> GS	5	10	2	8	6	2	2	2	2	1	6	25	0,28	12	0,79	
<i>Wy. bicornis</i> AY	7	7	2	7	7	2	2	2	2	1	6	30	0,26	11	0,80	
<i>Wy. (Pho.) deanei</i>	7	4	2	2	7	1	1	1	1	1		2				
<i>Wy. (Den.) ypsipola</i>	4	1	2	5	6	4	0	0	0	0						
<i>Wy. (Wyo.) arthrostigma</i>	2	2	4	7	3	1	1	0	0	0	3	0	0,28	6	0,91	
<i>Wy. (Dec.) felicia</i>	4	1	2	4	1	1	1	1	1	1	0	4	0,46	12	0,67	
<i>Onirion imparis</i>	7	1	1	1	5	4	0	0	0	0		1	0,18		0,82	

RG = Rancho Grande; TA = Tama; YU = Yutaje; GU = Guanay; SN = Sierra Nevada; GS = La Gran Sabana; AY = Auyantepui.

Apéndice II. Matriz de datos merísticos y morfométricos para quetotaxia larval, con codificación Gap-Weighting.

										1	1	1	1	1	1	1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6
	4C	5C	6C	7C	9C	0P	1P	1M	2M	4M	5M	6M	7M	9T	13T	1VIII
<i>Wy. bicornis</i> RG	9	9	8	6	7	7	2	7	0	5	0	5	0	5	1	6
<i>Wy. (Wyo.) trujilloi</i>	7	6	7	6	7	8	1	5	0	5	0	9	0	7	4	5
<i>Wy. bicornis</i> TA	7	5	9	7	9	8	1	2	0	5	0	?	0	7	4	3
<i>Wy. bicornis</i> YU	7	8	7	?	6	7	2	4	0	5	0	9	0	?	1	8
<i>Wy. bicornis</i> GU	?	?	?	?	?	7	1	4	0	5	0	?	0	9	?	2
<i>Wy. bicornis</i> SN	8	3	9	8	3	7	1	5	0	5	0	5	0	7	4	5
<i>Wy. bicornis</i> GS	9	?	7	9	5	8	2	4	0	5	0	?	?	8	0	6
<i>Wy. bicornis</i> AY	?	?	?	?	?	7	2	4	0	5	9	5	0	?	5	6
<i>Wy. (Pho.) deanei</i>	6	6	6	7	?	9	8	9	0	5	0	0	5	0	9	6
<i>Wy. (Den.) ypsipola</i>	0	0	0	0	3	9	1	2	0	9	0	0	9	6	5	0
<i>Wy. (Wyo.) arthrostigma</i>	0	0	0	3	1	2	9	7	9	0	0	0	0	3	4	3
<i>Wy. (Dec.) felicia</i>	1	0	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0	5	7	5	2
<i>Onirion imparis</i>	0	0	0	0	1	9	0	0	0	0	0	0	5	6	1	9

	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3
	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	
	3VIII	5VIII	1X	2X	4X	2aS	2bS	2cS	2dS	1bS	A	1aS	a/l	L	r/R	
<i>Wy. bicornis</i> RG	5	5	5	8	8	3	9	9	9	9	8	7	2	2	6	
<i>Wy. (Wyo.) trujilloi</i>	9	6	7	9	8	3	9	9	9	9	6	9	0	3	6	
<i>Wy. bicornis</i> TA	5	8	7	9	8	3	9	9	9	9	8	7	2	2	7	
<i>Wy. bicornis</i> YU	4	7	7	9	4	3	9	9	9	9	8	7	2	2	9	
<i>Wy. bicornis</i> GU	?	5	9	9	6	3	9	9	9	9	9	8	2	3	6	
<i>Wy. bicornis</i> SN	5	8	7	8	9	3	9	9	9	9	9	6	2	9	5	
<i>Wy. bicornis</i> GS	4	9	2	9	6	3	9	9	9	9	9	7	3	9	5	
<i>Wy. bicornis</i> AY	6	6	2	8	8	3	9	9	9	9	9	8	3	8	5	
<i>Wy. (Pho.) deanei</i>	6	3	2	1	8	0	5	5	5	9	0	1	?	?	?	
<i>Wy. (Den.) ypsipola</i>	3	0	2	5	6	9	0	0	0	0	0	0	?	?	?	
<i>Wy. (Wyo.) arthrostigma</i>	0	1	7	8	3	0	5	0	0	0	5	0	3	0	9	
<i>Wy. (Dec.) felicia</i>	3	0	2	4	0	0	5	5	5	9	0	1	9	9	0	
<i>Onirion imparis</i>	6	0	0	0	5	9	0	0	0	0	?	0	0	?	6	

RG = Rancho Grande; TA = Tama; YU = Yutaje; GU = Guanay; SN = Sierra Nevada; GS = La Gran Sabana; AY = Auyantepui.

Comparación de métodos de captura intradoméstica de triatominos vectores de la enfermedad de Chagas en Venezuela

M. Dora Feliciangeli^{1*}, Mayeli Hernández², Benny Suarez^{1,3}, Cinda Martínez², Arturo Bravo¹, José Bracho⁴, José Toyo⁵, Annhymariet Torrellas¹ & Rosalba Marrero¹

La estratificación de riesgo para priorizar las acciones de control en función de optimización de recursos, es de gran importancia dentro de las actividades de vigilancia epidemiológica para el control de la Enfermedad de Chagas. Para esto es necesario contar con un método para la detección de la infestación intradomiliaria por triatominos vectores, que sea de alta sensibilidad, especialmente en condiciones de baja densidad. En este estudio se compararon los resultados obtenidos con 5 métodos de capturas de vectores, 2 de búsqueda pasiva: caja Gómez-Nuñez y papel A4 Bond colocados en el dormitorio principal de las casas, 2 de búsqueda activa por personal técnico especializado: captura directa y captura con un excitante (cypermetrina+tetrametrina) durante ½ hora y por último la recolección efectuada durante un mes por los habitantes, oportunamente entrenados. El estudio se realizó en 11 localidades y 200 casas del Estado Portuguesa y 29 localidades y 350 casas del Estado Barinas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos con los diferentes métodos en los dos estados. Sobre el total de las 550 casas exploradas, 132 fueron positivas: en 131 (99,2%) la presencia de triatominos fue detectada por lo habitantes vs. 5,3% por búsqueda activa; 3,38 por la caja Gómez-Nuñez; 3,03% por búsqueda con excitante y 0% por la hoja de papel. Se colectaron en total 5 especies y 563 individuos. *Rhodnius prolixus* fue la especie predominante seguido por *Triatoma maculata*, *Panstrongylus geniculatus* y *R. pictipes*. Se calcularon índices entomológicos de dispersión, de colonización y de infección a *Trypanosoma cruzi* para cada localidad. Los datos obtenidos soportan la hipótesis de un nuevo escenario epidemiológico en Venezuela donde, en las localidades en las cuales se ha interrumpido el ciclo intradoméstico, la transmisión es fundamentalmente mantenida por *R. prolixus* visitantes procedentes de las palmeras cercanas. Se demuestra de forma inequívoca y se resalta la importancia de la incorporación de la participación comunitaria en la vigilancia epidemiológica dentro del Programa de Control de la Enfermedad de Chagas.

Palabras claves: triatominos vectores, métodos de captura, Enfermedad de Chagas, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

Rhodnius prolixus, el principal vector de la Enfermedad de Chagas en Venezuela, Colombia y algunos países de América Central (Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua) (Dujardin *et al.*, 1998) fue descrito por Stål en 1859 con ejemplares

capturados en La Guaira, Venezuela. El primer caso de Enfermedad de Chagas fue reportado en este país por Enrique Tejera en el año 1919, 10 años después que Carlos Chagas describiera la enfermedad en Brasil. Investigadores pioneros, como José Francisco Torrealba (1934) y Felix Pifano (1941), aportaron los primeros datos sobre aspectos clínicos y sobre su magnitud como problema de salud pública y social en nuestro País, enfatizando que su existencia parecía estar inexorablemente ligada al “rancho” de techo de palma y paredes de bahareque donde *R. prolixus* gozaba de condiciones ideales para su alimentación y reproducción. Una vez declarada erradicada la malaria del territorio nacional, presupuesto, esfuerzos y experticia del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social fueron volcados a la Enfermedad de Chagas. Cova García & Suarez (1959) estudian los triatominos de Venezuela y su distribución y se inicia la Campaña (Guerrero *et al.*, 1965) que en el año 1966 se denomina

¹ Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud, Centro Nacional de Referencia de Flebótomos y Otros Vectores (CNRFV- BIOMED), Apartado 4873, Maracay, Venezuela.

² Dirección General de Salud Ambiental, Ministerio de Salud, Maracay, Venezuela.

³ Instituto de Altos Estudios en Salud Pública “Dr Arnoldo Gabaldon”, Ministerio de Salud, Maracay, Venezuela.

⁴ Coordinación Regional de Salud Ambiental y Contraloría Sanitaria del Estado Portuguesa, Ministerio de Salud, Acarigua, Venezuela.

⁵ Coordinación Regional de Salud Ambiental y Contraloría Sanitaria del Estado Barinas, Ministerio de Salud, Barinas, Venezuela.

* Autor de correspondencia: mdora@movistar.net.ve

oficialmente Programa de Control de la Enfermedad de Chagas (PCECh). Su objetivo era la interrupción de la transmisión intradomiciliaria a través del control de los vectores intradomésticos por medio de insecticidas de acción residual. Sin embargo, ya en 1961, Gamboa Cuadrado había comprobado la presencia de *R. prolixus* selvático en palmas (*Copernicia tectorum*) en el Estado Guárico. En el año 1968 se implementaron el Programa de Vivienda Rural, iniciado en el año 1958 y el Programa de Mejoramiento de la Vivienda Campesina (1964) y más tarde, a partir de 1988, se consolidaron a nivel nacional los esfuerzos para la interrupción de la transmisión por vía transfusional en los Bancos de sangre (Aché & Matos, 2001).

Después de 30 años, el éxito del PCECh se concreta en la reducción del índice de infestación de casas a *R. prolixus*, de 60-80% en la década 1958-1968 a 1,6-4,0% en 1990-1998 y se cristaliza en la disminución paulatina pero sostenida de los índices de seroprevalencia de 44,5% en 1958-1968 a 15,6% en 1969-1979, 13,7% en 1980-1989 y 8,1% en 1990-1999. En los niños menores de 10 años de edad, las cifras fueron 20,5%, 3,9%, 1,1% y 0,8%, respectivamente (Aché & Matos, 2001). Estudios clínicos prospectivos en zonas originariamente de alta endemia confirman las cifras del PCECh a nivel nacional (Acquatella *et al.*, 1987).

En la década de los años 1990, entre las enfermedades endémicas, malaria y dengue encabezan la lista de prioridades del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, mientras el PCECh entra en una nueva etapa, no menos importante y dificultosa, la etapa de la vigilancia epidemiológica. Sin embargo, mientras los bajos índices de infestación a triatominos arriba reportados no parecen justificar una inversión importante en las costosas acciones de control a través del uso de insecticidas de acción residual, inquietan la aparición de casos agudos sin presencia de triatominos en las casas (Añez *et al.*, 1999a, 2004; Feliciangeli *et al.*, 2002) y los casos inaparentes (Añez *et al.*, 2001) y se publican nuevos aportes clínicos en pacientes crónicos (Añez *et al.*, 1999b; Acquatella *et al.*, 1999; Layrisse *et al.*, 2000). Por otro lado, en el ámbito de las ciencias sociales, se enfatiza la necesidad de un nuevo enfoque en la conducción de los programas de salud a ser llevados a cabo NO “para” la comunidad, mas “con” la comunidad (Briceño-León, 1998).

En este contexto, con la finalidad de avalar una metodología que fuera útil para la detección de la infestación intradomiciliaria de vectores de la

Enfermedad de Chagas, especialmente en situaciones de baja densidad, se diseñó un ensayo a gran escala para evaluar y comparar la eficacia de varios métodos de detección, incluyendo la recolección de triatominos por los habitantes y cuantificar el posible impacto de la intervención de la comunidad en la vigilancia epidemiológica, pre-requisito indispensable para el diseño de un programa de control de vectores a ser planificado en función de estratificación de riesgo y optimización de los recursos disponibles. Este estudio permitiría además actualizar los índices entomológicos (WHO, 2002) en los caseríos donde se realizaría, útiles para la evaluación y el seguimiento espacio-temporal de la dinámica de la transmisión a nivel local, municipal y estatal (Aché & Sifontes, 1995).

MATERIALES Y MÉTODOS

Area de estudio y actividades preliminares de campo

El estudio se llevó a cabo en los Estados Portuguesa (Mayo-Agosto 2002) y Barinas (Mayo 2003-Marzo 2004), el primero con largo historial de Programa de control, sin embargo con persistencia de infestación e infección; el segundo estado, tradicionalmente “malárico”, sin un programa de Chagas sostenido, más con acciones eventuales de control del vector en especial tras la denuncia de infestación por parte de los habitantes. En **Portuguesa** el estudio fue efectuado en 4 municipios y 11 localidades: **Araure** (Morichal), **Ospino** (Santa Lucía, San Bartolo y Pele el Hojo), **Monseñor José Vicente de Hunda** (El Helechal, Agua Clara, Palma Sola y La Pica), **Sucre** (La Esperanza, El Mosquito y Quebrada Negra) y 8 municipios y 29 localidades en el estado **Barinas**: **Barinas** (Parangula, Gallegos, Laguna Hermosa, Rio Bravo, Guaranda, Guachiquin, Carvajal), **Bolívar** (El Castillo, Los Morenos, Barragán, Las Carabelas), **Pedraza** (Ticoporo, Carreterón, Cascabel II, Sta Maria de Canaguá, Salomé, Rosalía, La Tigra), **Obispo** (Mata de Agua, Sta. Cruz de Obispo), **Antonio José de Sucre** (Chameta), **Sosa** (Chaparrito, Paso Real, Machado), **Rojas** (Caño Hondo, Trueno, Florida) y **Cruz Paredes** (Socó, Quebradón). La ubicación geográfica de estas localidades se muestra en la Fig 1. Este mapa fue construido con las coordenadas obtenidas utilizando un sistema de posicionamiento global (GPS, Modelo GeoExplorer III, Garmin Corp) utilizando el software Arc view v 3.1

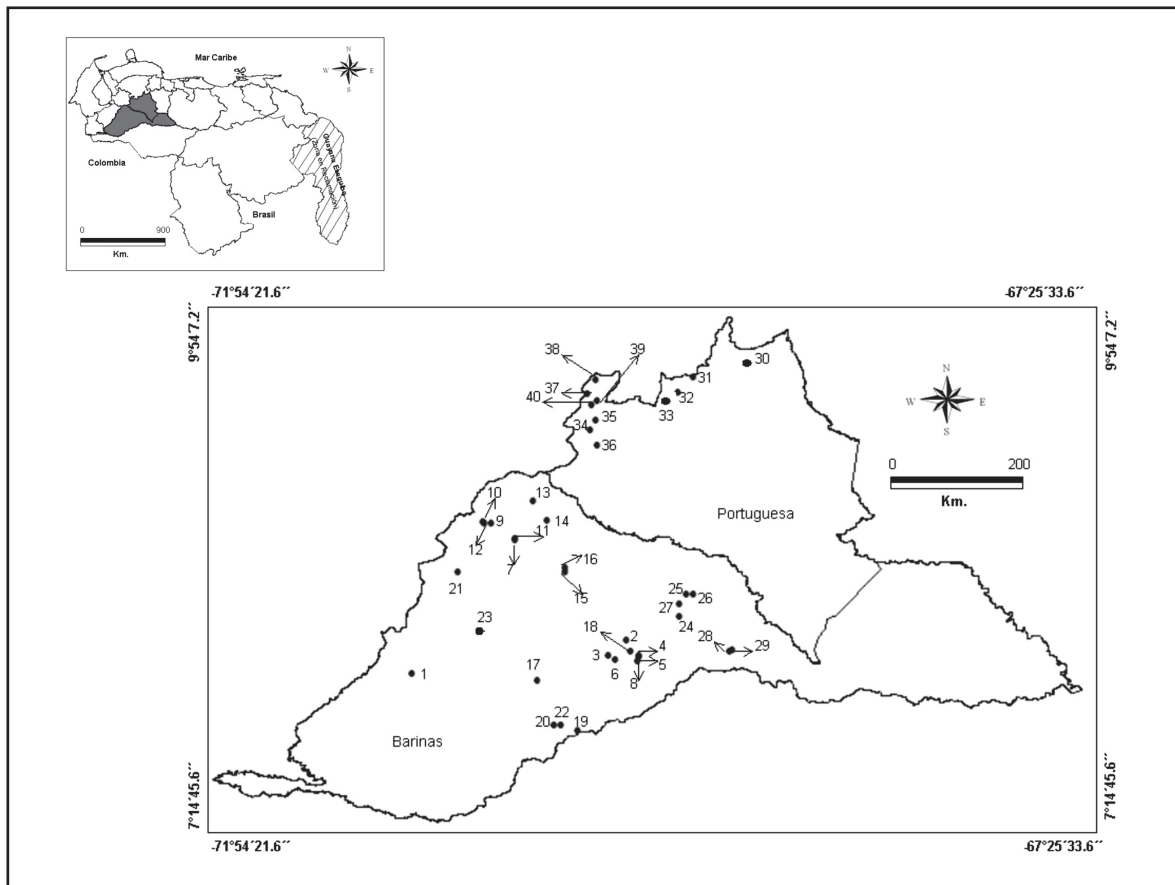


Fig. 1. Ubicación de las localidades de estudio: **Barinas:** 1. Chameta, 2. Carvajal, 3. Gallegos, 4. Guachiquín, 5. Guaranda, 6. Laguna Herosa, 7. Parangula, 8. Río Bravo, 9. Barragán, 10. El castillo, 11. La Carabela, 12. Los Morenos, 13. Quebradón, 14. Socó, 15. Mata de Agua, 16. Santa Cruz, 17. Carreterón, 18. Cascabel II., 19. La Tigra, 20. Salomé, 21. Santa María de Canaguá, 22. Rosalía, 23. Ticoporo, 24. Caño Hondo, 25. Florida, 26. Machado, 27. Trueno, 28. Chaparrito, 29. Paso Real; **Portuguesa:** 30. Morichal, 31. Pele el Ojo, 32. San Bartolo, 33. Santa Lucía, 34. El Mosquito, 35. La Esperanza, 36. Quebrada Negra, 37. Agua Clara, 38. El Helechal, 39. La Pica, 40. Palma Sola.

El estudio fue programado en el marco de un estudio epidemiológico diseñado para actualizar los índices de prevalencia en niños < de 15 años (Feliciangeli *et al.*, 2007a) en el cual las localidades fueron seleccionadas al azar en cada Municipio hasta llegar al número de localidades que proporcionarían la muestra requerida para ese estudio, acorde al índice de prevalencia para ese grupo de edad conocido para ese municipio, utilizando la extracción simple de los códigos de localidades reportadas en el Nomenclador de centros poblados para Portuguesa (OCEI, 1994) y de la lista centros poblados georeferenciados de la Gacetilla del Estado Barinas editado por el Instituto Geográfico “Simón Bolívar” (1995), en el cual se tomó como elemento adicional, la distribución altitudinal

de los caseríos. Todas las localidades tenían que llenar el requisito previo de no haber sido rociadas por lo menos durante los 2 años previos al ensayo, según datos obtenidos de los registros del PCECh. El estudio entomológico abarcó 35,48% (11/31) y 34,12% (29/85) de las localidades y 24,5% (200/816) y 28,36% (350/1236) de las casas muestreadas para el estudio epidemiológico en Portuguesa y Barinas respectivamente.

En la primera visita a los caseríos seleccionados, se proporcionaba a los habitantes una explicación sencilla y exhaustiva acerca de los objetivos del trabajo a realizar y un folleto educativo sobre la Enfermedad de Chagas y se solicitaba a cada

jefe de la casa su participación voluntaria para permitir la toma de muestras hemáticas en los niños para el estudio de seroprevalencia y el estudio entomológico, de la cual quedaba constancia en el consentimiento escrito, cuyo modelo había sido avalado por la Comisión de Bioética y Bioseguridad de FONACIT.

Después de levantar el croquis y registrar las coordenadas y altitud de la localidad, se realizaba una encuesta epidemiológica contentiva de datos demográficos y datos ecológicos. Estos últimos incluían la descripción detallada de los componentes de las casas, las cuales fueron clasificadas en (1) “ranchos” (casas con alguno(-os) de los siguientes componentes: piso de tierra, paredes de adobe, bajareque, madera, palma, zinc u otro material que no fuese de bloques o ladrillos, techo de palma); (2) casas, que incluían las típicas “viviendas rurales” construidas por el MS (con paredes de bloques, piso de cemento y techo de zinc) y las casas construidas por sus ocupantes o los anteriores, con las mismas características o mejores que las de vivienda rural.

Métodos de captura

Para la detección de la infestación intradoméstica a triatominos, en este estudio se utilizaron 5 métodos: 2 métodos de búsqueda activa, 2 métodos de búsqueda pasiva y la recolección por parte de los habitantes de la casa durante el periodo de un mes, según instrucciones impartidas a cada núcleo familiar.

La búsqueda activa directa fue realizada en cada vivienda durante media hora, por personal técnico (2 personas/caserío) con experiencia acumulada de varios años de trabajo en esta tarea. Es éste el método utilizado tradicionalmente por el personal del MS y el procedimiento está descrito en el Manual del Visitador Rural del Ministerio de Salud, así como en la literatura (Schofield, 1978). Este método se basa en la búsqueda sistemática de los insectos en las grietas de las paredes, las camas, colchones, cajas de ropa y enseres varios, usando una linterna, pinzas y envases para la recolección. El 2º método de búsqueda activa fue la búsqueda con excitante, así llamada ya que se utiliza piretróides a baja concentración con la finalidad de estimular los insectos a salir de sus escondites. Este método ha sido utilizado en Venezuela (Gamboa Cuadrado, 1961) y en otros países (Pinchin *et al.*, 1981; Gurtler *et al.*, 1993). En este estudio se usó una

solución acuosa (1:1) de una mezcla de cypermetrina OMS-2002 (2,5 gr/L) y tetrametrina OMS-1821 (4 gr/L) (DRAGON®, Induagro, Medellín, Colombia) (para una concentración final de 0,125% de cypermetrina + 0,20% de tetrametrina) que era rociada sobre las paredes y enseres. Después de esperar 15' el colector procedía a la búsqueda y recolección de los insectos. En cuanto a los métodos de búsqueda pasiva se utilizaron (1) la “caja” ideada en Venezuela por Gómez-Núñez (1965) que lleva su nombre, hecha de cartulina de 15x30x5 cm con una hoja de papel tamaño carta plegada en su interior y (2) el método sugerido por García Zapata *et al.* (1985) el cual consiste en una simple hoja de papel de escribir colocada sobre las paredes de la casa. La caja Gómez-Núñez permite evidenciar la presencia de triatominos en la casa por el encuentro en su interior, de ejemplares vivos o muertos o bien por la presencia de huevos, exuvias, o rastros de heces. Para *R. prolixus* el método sugerido por García-Zapata permite sólo detectar su presencia por rastros de heces o huevos adheridos.

Procedimiento en la aplicación de los métodos

El diseño del ensayo fue concebido de manera de garantizar, en lo posible, que no hubiese sesgo causado por conocimiento previo del personal técnico encargado de la recolección acerca del estado de infestación de las viviendas a muestrear. A tal fin, en las fechas previamente programadas para cada caserío, este personal procedía a colocar en cada casa tres cajas Gómez-Núñez, en tres paredes del dormitorio principal (si había mas de 1), a una altura de aproximadamente 1,70 m., excluyendo la pared con la puerta. Tres hojas de papel de escribir blanco (Bond A4) fueron colocadas cada una a aproximadamente 50 cm de cada caja Gomez-Nuñez a la misma altura. Las cajas y las hojas eran identificadas con el N° del código de la casa y fecha de colocación. Se advirtió a los habitantes de no tocar las cajas o papeles, y tampoco remplazarlos en caso que se desprendieran de la pared.

Para instruir a los habitantes acerca del método de recolección de los triatominos, se les mostraban ejemplares adultos y ninfas de las principales especies en el País, *R. prolixus*, *Triatoma maculata* y *Panstrongylus geniculatus*, advirtiéndoles de toda manera de guardar también otros insectos parecidos encontrados dentro de la casa durante el periodo de un mes, hasta la próxima visita del personal

técnico. Para esto, se les hacía entrega de un recipiente plástico con cartulina doblada en su interior y cubierto con fina organza, además de un gancho de carpeta doblado por la mitad a ser usado como pinza blanda para que evitaran el contacto directo con los insectos. Se les recomendaba no entregar los recipientes a este personal hasta que ellos mismos lo solicitaran. Ésto con la finalidad de que el colector, al llegar a la casa a muestrear, procediera de inmediato a la búsqueda activa y evitar por lo tanto que fuera influenciado por los resultados obtenidos por los habitantes.

Un mes después, el equipo asignado a cada caserío regresaba al sitio para llevar a cabo la búsqueda activa que debía realizar sin conocer los resultados de los otros métodos de captura aplicados anteriormente. Con esta finalidad cada uno de los colectores efectuaría en primer lugar, el primer día de trabajo, la búsqueda activa utilizando solamente linternas y pinzas durante ½ h en la mitad de las casas en estudio en cada caserío. Sólo después de la búsqueda activa, el colector procedía a recoger en el orden siguiente: (1) los recipientes de la recolección de triatomíneos efectuada por los habitantes, (2) las hojas de papel pegadas a la pared, las cuales eran revisadas en el lugar para detectar rastros de heces o huevos y llevadas al laboratorio para posterior chequeo y (3) las cajas Gomez-Núñez guardando, en caso de estar positivas, el material colectado en recipientes debidamente rotulados y registrando todos los datos preliminares en las planillas correspondientes a cada captura que también serían chequeadas de nuevo en el laboratorio.

Al día siguiente los colectores intercambiaban las casas, de manera que, al realizar la búsqueda activa con excitante, no estarían sesgados por los resultados obtenidos el día anterior con los otros métodos de captura, ya que tenía instrucciones de no intercambiar ni comentar los resultados hasta finalizar el muestreo con todos los métodos.

Actividades de laboratorio

Todo el material era llevado al Centro Nacional de Referencia de Flebótomos y Otros Vectores de la Universidad de Carabobo (CNRFB-BIOMED-UC) en Maracay para las siguientes actividades: (1) separación, identificación y censo de los insectos contenidos en los diferentes recipientes de recolección; (2) examen de heces para búsqueda

de infección natural a *T. cruzi*, toda vez que fuera posible. Es de notar que mucho del material colectado por los habitantes durante el periodo de un mes llegaba muerto o en condiciones de ayuna al laboratorio. Por otro lado, cuando eran colectadas hembras, en muchos recipientes habían huevos eclosionados y ninfas nacidas en el frasco. La mayoría eran ninfas de Ier estadio, por lo tanto cuando habían sido recolectadas hembras, sólo se contabilizaron las Ninfas de III estadio en adelante como producto de la recolección de los habitantes, tomando en cuenta el conocido fenómeno de canibalismo o hemocleptohematofagia (Feliciangeli *et al.*, 1988; Sandoval *et al.*, 2000), que podría permitir la evolución, durante un periodo de un mes, de las ninfas nacidas hasta el estadio de Ninfas II. Cuando no había hembras en el recipiente, se incluyeron en la muestra todas las ninfas, cualquiera fuera el estadio.

Para la búsqueda de infección natural a *T. cruzi* en los triatomíneos, las muestras fecales se examinaron en fresco en una gota de solución fisiológica a un aumento de 40x. En caso de visualización de flagelados se practicaba la coloración de las láminas con Giemsa y se intentaba el cultivo en medio NNN para posterior identificación del linaje de *T. cruzi* por técnicas moleculares.

Análisis de los resultados

Para evaluar la eficacia de los métodos utilizados, se compararon las proporciones de los insectos colectados con los diferentes métodos, utilizando la prueba del χ^2 con corrección de Yates y la prueba de Fisher cuando las muestras a comparar tenían algún elemento <5. Para los cálculos se usó el programa EpiInfo 6.

Los indicadores operacionales epidemiológicos, dispersión o índice de infestación en un área determinada por localidades, índice de infestación intradomiciliaria, índice de colonización e índice de infección de especies triatomínicas a *T. cruzi* para cada estado, fueron calculados según WHO (2002).

RESULTADOS

Comparación de métodos de captura

En las Tablas I y II se presentan los datos de los triatomíneos colectados en Portuguesa y Barinas

utilizando los 5 métodos de recolección de triatominos arriba descritos, por especie y estadio de desarrollo y el número de examinados y positivos a *T. cruzi*.

De las 11 localidades de Portuguesa donde se muestrearon un total de 200 casas, 7 se encontraron positivas con 32 casas infestadas (16%), 31 fueron detectadas positivas por el método de recolección de los habitantes (2 de las cuales fueron positivas también para búsqueda activa y búsqueda activa con excitante), mientras que una sólo fue detectada positiva por el método de las caja Gomez-Nuñez. Es de notar que una casa en San Bartolo aportó el 40,75% (n=71) de todos los triatominos colectados con presencia de todos los estadios ninfales. De las 29 localidades de Barinas donde se muestrearon 350 casas, fueron positivas 27 localidades y 101 casas (28,86%): 1 fue detectada positiva sólo por la caja Gómez-Nuñez, y 1 sólo por búsqueda activa con excitante, mientras que de las restantes 99, todas detectadas positivas por los habitantes, una lo fue también por búsqueda activa, 1 por búsqueda activa por excitante y una a ambos metodos, recolección por habitantes y caja Gómez-Nuñez.

En el estado Portuguesa se colectaron en el intradomicilio 3 especies, *R. prolixus*, *Rhodnius pictipes* y *P. geniculatus*, mientras que en Barinas se colectaron además *Eratyrus mucronatus* y *T. maculata*. En ambos estados *R. prolixus* constituyó más del 80% de la población total de triatominos.

Como era de esperarse, la mayoría de los insectos colectados fueron adultos en ambos estados por ser éstos de mayor tamaño y por lo tanto más fácilmente detectados tanto por los recolectores, como por los habitantes. Por lo tanto no parece apropiado tomar estos resultados como representativos de la composición etaria de la población en condiciones naturales intradomiciliaria, aún cuando, en algunas oportunidades, los habitantes colectaron hasta ninfas de 1er estadio. No hubo una diferencia significativa en la proporción de Ninfas vs. adultos en las muestras colectadas entre los dos estados ($\chi^2= 0,87$; $P=0,35$; $df= 1$; $OR= 0,83<0,57<1,21$) lo cual fue corroborado también a través de la comparación del índice de colonización.

Tabla I. Triatominos colectados en 32 casas de 7 localidades del estado Portuguesa (2000-2004) disecados y positivos a *Trypanosoma cruzi*, distribuidos por método de captura, especie y estadio de desarrollo.

<i>R. prolixus</i>	No. localidades infestadas	No. casas infestadas	♂	♀	N V	N IV	N III	N II	N I	Total	% de la especie % del total triatominos \square
Recolección por los habitantes	7	31	40	49	31	14	10	-	-	144	82,28
Búsqueda activa	2	2*	1	1	7	2	4	-	-	15	20,00
Búsqueda activa con excitante	2	2*	2	2	7	1	3	-	-	15	20,00
Cajas Gómez-Nuñez	1	1**	0	0	0	0	0	0	1	1	0,57
Total			43	52	45	17	17	0	1	175	97,22 \square
Total disecados			20	18	33	9	11			91	
Total positivos a <i>T. cruzi</i>				1						1	1,09
<i>P. geniculatus</i>											
Recolección por los habitantes		4	4							4	2,22 \square
<i>R. pictipes</i>											
Recolección por los habitantes		1								1	0,55 \square

*estas casas también resultaron positivas por el método de recolección por habitantes

** esta casa sólo fue positiva por este método

Tabla II. Triatominos colectados en 101 casas de 27 localidades del Estado Barinas (2003-2004), distribuidos por método de captura, especie y estadio de desarrollo, examinados y positivos a *Trypanosoma cruzi*.

<i>R. prolixus</i>	I. No. localidades ininfestadas	No. casas infestadas	♂	♀	NV	NIV	N III	N II	N I	Total	% colectado por método % del total triatominos [□]
Recolección por los habitantes	27	100	55	125	10	12	12	3#	34#	251	80,71
Búsqueda activa	1	5	2	1	8	5	16	13		45	14,47
Búsqueda activa con excitante	1	1		1						1	0,32
Cajas Gómez-Núñez	3	3*			1				13**	14	4,50
Total			57	127	19	17	28	16	47	311	81,20 [□]
Total examinados			42	88	9	11	13	0	0	163	49,84
Total positivos a <i>T. cruzi</i>			5	11	2	0	1	-	-	19	11,66
<i>T. maculata</i>											
Recolección por los habitantes	8	16	6	3	8	3	12	8	0	40	61,54
Búsqueda activa	1	1	1	1	13	2	3	2		22	33,85
Búsqueda activa con excitante	1	1					2			2	3,07
Cajas Gómez-Núñez	1	1					1			1	1,54
Total			7	4	21	5	18	10	1	65	16,97 [□]
Total examinados			7	4	2	4	11	2	0	30	46,15
Total positivos a <i>T. cruzi</i>			1				1			2	6,67
<i>P. geniculatus</i>											
Recolección por los habitantes	2	2	3	1						4	1,04 [□]
<i>E. mucronatus</i>											
Recolección por los habitantes	2	2	2							2	0,52 [□]
<i>R. pictipes</i>											
Recolección por los habitantes	1	1		1						1	0,26 [□]

Ninfas encontradas en casas donde no habían sido colectados adultos ; * 1 de estas casas sólo fue detectada positiva por las Cajas Gomez-Núñez

** 9 de estas Ninfas I fueron colectadas en casas donde se colectaron adultos hembras, pero 4 NI se colectaron en una casa donde no fueron encontrados adultos

En la Tabla III se presenta el análisis de la comparación del rendimiento obtenido para cada método utilizado sobre el número de casas detectadas positivas, no encontrándose diferencias significativas en la eficacia de un mismo método en los dos estados. Cuando se compararon los resultados obtenidos con el método de recolección por los habitantes vs. los obtenidos con todos los otros métodos, la diferencia fue altamente significativa a favor de la recolección

de los triatominos por los habitantes, tanto en Portuguesa como en Barinas, siendo por lo tanto obvio que este método fue superior a cada uno de los otros, si considerado separadamente. Esto a pesar de que la información recopilada en las encuestas epidemiológicas sobre la estructura de un total de 481 viviendas en el estado Barinas y 237 en el estado Portuguesa arrojó los siguientes resultados: 320 “ranchos” vs. 161 “casas” en Barinas y 112 “ranchos”

Tabla III. Resultados de 5 métodos de captura intradoméstica de triatominos en las casas detectadas positivas en Portuguesa (n=32) y Barinas (n=101), Venezuela.

	Portuguesa n (%)	Barinas n (%)	Yates χ^2	<i>P</i>	
Recolección habitantes	31 (96,9)	101 (100)	0,37	0,54	
Búsqueda activa	2 (6,25)	5 (4,95)	-	0,54**	
Búsqueda activa con excitante	2 (6,25)	2 (1,98)	-	0,24**	
Caja Gómez-Núñez	1* (3,1)	4 (3,96)	-	0,65**	
Hoja de papel	0 (0)	0 (0)			
	n (%)	<i>P</i>	n (%)	χ^2 Yates	<i>P</i>
Recolección habitantes vs. todos otros métodos	31 (96,9) 5 (15,6)	0.0000**	101 (100) 11(10,9)	157,78	0,0000

* Esta casa fue detectada positiva sólo con este método; ** *P* de Fisher.

Nota: en cada comparación. los grados de libertad siempre fueron igual es a 1

vs. 125 “casas” en Portuguesa, siendo la diferencia de proporciones estadísticamente significativa con mas “ranchos” en el Edo Barinas que en Portuguesa ($\chi^2 = 23,80$; $df=1$; $P= 0,0000$), lo cual indicaría que el tipo de casas no afectó los resultados de los métodos de captura.

Ya habiendo descartado que hubiera diferencia entre los resultados obtenidos en los dos estados, tratando la muestra Portuguesa-Barinas como un solo conglomerado, en la Fig. 2 se grafican los resultados totales de infestación sobre la muestra de las 132 casas positivas y sobre las 550 casas exploradas en total. Sobre el total de casas positivas, en 131 (99,2%) la presencia de triatominos fue detectada por lo habitantes vs. 5,3% por búsqueda activa; 3,38 por la caja Gómez-Nuñez; 3,03% por búsqueda con excitante y 0% por la hoja de papel. Sobre el total de casas exploradas, el valor mayor de infestación intradomiciliaria fue obtenido por los habitantes: 23,95% vs.0,23% con la búsqueda activa; 0,07% con la búsqueda activa con excitante y 0,91% con la Caja Gómez-Núñez. En ambos casos la comparación de proporciones evidenció la eficacia muy superior de este método con respecto a todos los otros.

Índices entomológicos

En las Tablas IV y V se presentan datos crudos y algunos indicadores entomológicos (infestación intradomiciliaria, colonización e infección natural

a *T. cruzi*), referidos únicamente a *R. prolixus*, el vector predominante por localidad en cada estado. Tomando en cuenta todos los métodos utilizados, el índice de dispersión (No. de localidades positivas a triatominos /No. de localidades investigadas x 100) fue de 63,3% (7/11) en Portuguesa y 93,10% (27/29) en Barinas ($P=0,03$; OR: $0,01<0,13<1,19$); el índice de infestación intradomiciliaria a triatominos (No. de casas positivas /No. casas exploradas x 100) fue igual a 16% (32/200) en Portuguesa y significativamente mayor, 28,86% (101/350) en Barinas ($\chi^2= 10,78$; $P=0,001$; $0,29<0,47<0,75$). Este indicador cambió muy poco cuando se calculó solamente para *R. prolixus*, el cual, como era de esperarse, fue la especie predominante.

En cambio, no hubo diferencias en el índice de colonización a *R. prolixus* (No. de casas con ninfas / No. de casas exploradas x 100) de 4% (8/200) en Portuguesa con respecto al 6% (21/350) en Barinas ($\chi^2= 0,66$; $P= 0,41$; OR= $0,26<0,65<1,59$).

Finalmente, el índice de infección registrado en la muestra del estado Portuguesa fue de 1,09 % (1 *R. prolixus* positivo/91 *R. prolixus* examinados x 100) y de 11,66 (19/163 x 100) en Barinas ($\chi^2= 5,95$; $P= 0,01$; OR= $0,02 <0,10<0,44$). Los flagelados en heces coloreadas con Giemsa, por características morfológicas del núcleo, kinetoplasto y pliegues de la membrana ondulante fueron identificados todos como *T. cruzi*.

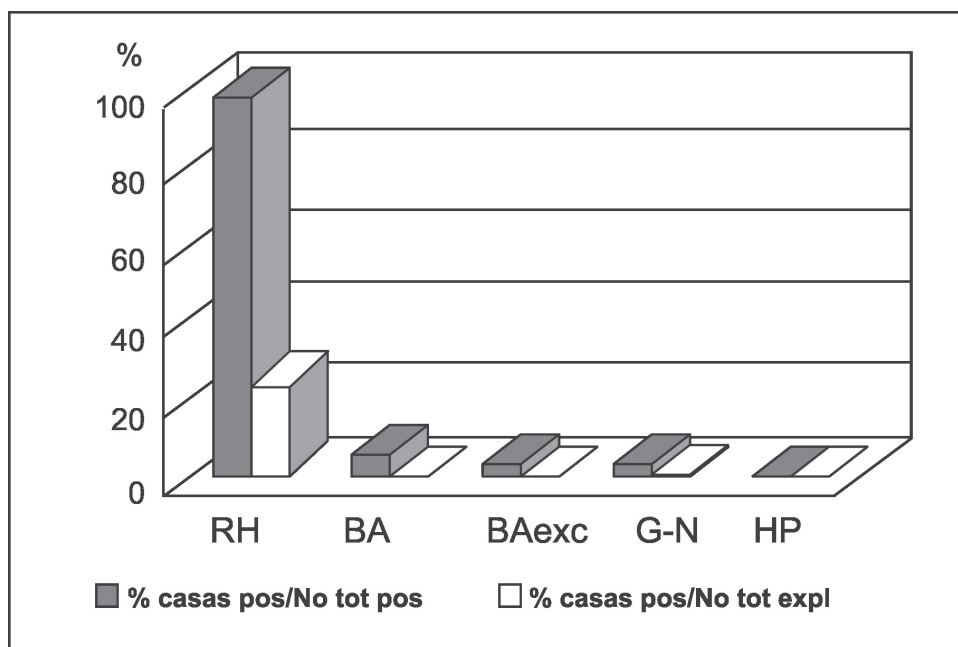


Fig. 2. Resultados de diferentes métodos de captura intradoméstica de triatominos por casas positivas (n=132) y por el total de casas exploradas (n= 550): RH (recolección por los habitantes), BA (búsqueda activa), BA exc (búsqueda activa con excitante), G-N (cajas Gómez-Núñez), HP (Hoja de papel).

Tabla IV. Índices entomológicos de 11 localidades del Estado Portuguesa (2002)

Municipio/ Localidad	No casas exploradas	No casas infestadas por triatominos= No casas Infest. por <i>R.p.</i>	Infestación. a triatom/casa (%)=infest a <i>R.p./casa</i>	Colonización por <i>R.p.</i> / casas exp. (%)	No. Rp examin.	Infección a <i>T. cruzi</i> (%)
Unda	12	2	16,7	0	0	
Palma Sola	2	0	0	0	-	-
Agua Clara	15	0	0	0	-	-
La Pica	14	0	0	0	-	-
El Helechal	10	5	50	30	10	0
Morichal	21	7	33,3	0	4	0
Qda. Negra	10	0	0	0	-	-
La Esperanza	21	5	23,8	4,8	1	0
El Mosquito	23	3	13,04	0	4	0
Pele el Ojo	34	7	20,59	5,8	21	4,76
Santa Lucia	38	3	7,5	7,9	51	0
San Bartolo	200	32			91	
Total						
\bar{x}			16,00	4		1,09
IC 95%			11,21-21,82	1,74-7,72		0,03-5,97

Tabla V. Índices entomológicos para 29 localidades del Estado Barinas (2003-2004).

Municipio/ Localidad	No casas exploradas	No casas infestadas por triatominos	Infestación Intradom. a triatom (%).	No casas infestadas por <i>Rp</i>	Infestación intradomiciliaria a <i>Rp</i> (%)	Colonización por <i>Rp</i> (%)	No. <i>Rp</i> exam	Infección a <i>T. cruzi</i> (%)
Barinas								
Parangula	6	3	50	3	50	0	2	0
Lag Hermosa	6	3	50	3	50	16,6	10	40
Gallegos	10	4	40	3	30	10	7	0
Rio Bravo	10	9	90	5	50	30	15	6,7
Guaranda	10	7	70	6	60	10	12	0
Guachiquin	15	6	40	4	26,7	0	4	0
Carvajal	23	9	39,1	8	34,8	4,35	12	33,3
Bolívar								
Barragan	10	8	80	8	80	30	13	15,4
El Castillo	4	3	75	2	50	0	5	60
Los Morenos	10	5	50	5	50	0	8	12,5
La Carabela	4	1	25	1	25	0	1	0
Pedraza								
Ticoporo	10	2	20	2	20	0	1	0
Carreterón	11	5	45,5	5	45,5	0	13	0
Cascabel II	20	9	45	9	45	10	18	5,6
Sta Maria de Canaguá	12	2	16,7	1	8,3	0	2	0
Salomé	10	2	20	2	20	10	3	0
Sta Rosalia	10	3	30	2	20	10	2	0
La Tigra	10	0	0	0	0	0	0	--
Cruz Paredes								
Soco	10	6	60	6	60	20	21	9,5
Quebradón	10	3	30	3	30	0	6	0
Obispo								
Mata de Agua	8	1	12,5	1	12,5	12,5	2	0
Sta Cruz	10	1	10	1	10	10	0	
Antonio José de Sucre								
Chameta	9	1	11,1	1	11,1	0	1	0
Sosa								
Chaparrito	10	2	20	1	10	0	1	0
Paso Real	15	2	13,3	2	13,3	6,7	1	0
Rojas								
Machado	22	0	0	0	0	0	0	0
Caño Hondo	13	2	15,4	1	7,7	7,7	1	0
Trueno	27	1	3,7	1	3,7	0	2	0
Florida	25	1	4,0	1	4,0	0	0	--
Total	350	101		87			163	
\bar{x}			28,86		24,85	6,0		11,65
IC 95%			24,16-33,91		20,41-29,73	3,75-9,02		7,17-17,60

DISCUSION

Los resultados obtenidos con los 5 métodos para la detección de la presencia de triatominos (recolección por los habitantes, búsqueda activa, búsqueda activa con excitante, caja Gómez-Nuñez y hoja de papel) en 550 casas en los Estados Portuguesa y Barinas, demostraron de manera inequívoca la mayor eficiencia del método de recolección por los habitantes con relación a todos los otros métodos.

Los métodos de captura pasivas vs. los métodos de captura activa de triatominos han sido comparados en diferentes países por varios autores. El método tradicional más usado, la búsqueda activa, no necesariamente prueba la ausencia de los triatominos y a menudo falla en situaciones de baja densidad (Schofield, 1978). Su confiabilidad depende además del número de colectores y el tiempo invertido en la búsqueda y de la experticia y fatiga de los colectores (Forattini *et al.*, 1969; Gomez-Nuñez, 1965). La búsqueda activa con excitantes proporcionó mejores resultados, siendo recomendado especialmente para el monitoreo de la infestación post-rociado (Pinchin *et al.*, 1981). Sin embargo en nuestro trabajo la búsqueda con excitante no fue mucho más efectiva que la búsqueda activa, lo cual puede encontrar explicación en que ya la mayoría de los insectos presentes en la casa habían sido recolectados sea bien por los habitantes o por el técnico que efectuó el día anterior la búsqueda activa sin excitante. La caja Gómez-Nuñez ha tenido en varios países buena aceptación como método no influenciado por variables inherentes al colector y por demostrar una alta sensibilidad incluso en situaciones de baja densidad, por lo tanto muy útil (Schofield, 1978), sin embargo, según García-Zapata *et al.* (1985), es demasiado costoso para ser adoptado para la vigilancia epidemiológica. Estos autores comparan este método y proponen remplazar la caja Gómez-Nuñez por una hoja de papel de menor costo, por demostrar la misma sensibilidad en la detección de la presencia de triatominos por rastros fecales.

En este trabajo, ni los métodos de búsqueda activa, ni los de búsqueda pasiva fueron realmente útiles para un conocimiento adecuado de la situación epidemiológica, puesto que todos estos métodos en conjunto llegaron a detectar sólo el 12,03% vs. el 99,25 % de todas las casas positivas detectadas por los habitantes. Estos resultados sugieren un nuevo escenario epidemiológico en Venezuela, donde, en

las localidades en las cuales se ha interrumpido el ciclo doméstico, la presencia de los insectos dentro de la casa parece ser principalmente producto de la invasión continua de *R. prolixus* visitantes que incursionan a las viviendas procedentes de las palmas cercanas y, debido a sus características estructurales, sea bien “viviendas rurales” o “casas de bloques” en el estado Portuguesa, o “ranchos” de tablas de madera en el estado Barinas, los insectos no encuentran un hábitat propicio para el establecimiento de colonias estables, como lo demuestran los bajos índices de colonización. Esto explicaría porqué su presencia es detectada fácilmente por los habitantes durante las horas nocturnas cuando éstos llegan a las casas o salen de sus precarios escondites, mientras que no son colectados por el personal de salud que efectúa la búsqueda durante las horas del día. Esto no excluye la persistencia de focos en los cuales se mantiene el ciclo intradoméstico y en éstos, después del rociamiento de las casas, pueden reaparecer poblaciones residuales.

En Barinas se ha demostrado que la densidad de las palmas alrededor de la casa es factor de riesgo de la presencia de *R. prolixus* en la casa (Sánchez-Martín *et al.*, 2006), así como a través del estudio de seroprevalencia realizado en las 85 localidades, se demostró que la distancia de las mismas a las casas es factor de riesgo de infección a *T. cruzi* en la población (Feliciangeli *et al.*, 2007a). Estos datos avalan esta hipótesis confirmada por estudios morfométricos (Feliciangeli *et al.*, 2007b) y moleculares (Fitzpatrick *et al.*, 2007) que han demostrado la existencia de flujo genético de las poblaciones silvestres de la palma a las casas y al peridomicilio.

Casos de transmisión vectorial mantenida por triatominos silvestres visitantes ha sido reportadas en otros Países. La emergencia de la Enfermedad de Chagas en Paó de Lumiar, Estado de Maranhão, Brazil fue atribuida a *R. prolixus* y *Rhodnius neglectus* ancestralmente adaptados a la palma *Attalea phalerata* (Texeira *et al.*, 2001). La palma “tagua” (*Phytelephas aequatorialis*) infestada por *Rhodnius ecuadoriensis*, el segundo vector en Ecuador y Perú, es considerada un “ecotopo de riesgo” para los habitantes que viven en su cercanía (Abad-Franch *et al.*, 2005) y la aparición en 1987 de dos casos agudos en niños en Posocol de San Carlos, y más tarde de dos casos crónicos en dos niñas en Los Chiles, en Costa Rica, en ausencia de *Triatoma dimidiata*, sugirió que estos casos fueron debido a

transmisión por *R. pallescens*, habitante de *Attalea butyracea* y visitante consuetudinario de las casas en los llanos de Nicaragua y Costa Rica (Zeledón *et al.*, 2006). Estas situaciones ponen en duda la posibilidad de eliminación de la Enfermedad de Chagas celebrada en el Cono Sur (Schofield & Dias, 1999) y perseguida por las Iniciativas de los Países Andinos (WHO, 1997) y de Centro-América (WHO, 1998).

Indudablemente son necesarias bases científicas para el entendimiento de las diferentes situaciones epidemiológicas para la optimización de los recursos disponibles y los resultados de este trabajo resaltan la importancia de la educación para la salud y la incorporación efectiva de la comunidad al PCECh como una ayuda muy valiosa en la vigilancia epidemiológica de la Enfermedad de Chagas. Su efectividad, a través de puestos de notificación de triatominos (PNT), fue ampliamente comprobada en Brasil (Pinto Dias & Ribeiro García, 1978; García Zapata & Marsden, 1993). En Venezuela, ya en 1995, Aché y Sifontes propusieron esta alternativa para la actualización permanente de los indicadores a nivel de los caseríos a través de estimaciones puntuales, necesarias para la estratificación de riesgo y focalización de las medidas de control, sin embargo para esa fecha no fue implementada y solo recientemente se ha iniciado un estudio piloto con el establecimiento de los PNT en el Estado Trujillo (Benítez *et al.*, 2006). La implementación de este método a escala nacional debería ser vista como una necesidad y una prioridad.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el Dr. Clive Davies y Dr. Diarmid Campbell-Lendrum por las útiles discusiones en el diseño del estudio, la Dra. Giomar Hernández de Valenzuela, Coordinadora Regional de Salud Ambiental y Contraloría Sanitaria del estado Portuguesa, al Dr. Roberto Rangel y a la Dra. Leonidas Escalona, Coordinadores Regionales de Salud Ambiental y Contraloría Sanitaria del Estado Barinas por su interés y apoyo para su realización y todo el personal de las Demarcaciones por su colaboración. También agradecemos a los habitantes de las localidades estudiadas su cordial receptividad y colaboración.

Este trabajo fue financiado por el FONACIT (Agenda Salud - Proyecto 20000088) y Wellcome

Trust (Proyecto No. 062984/Z/00Z) y TDR/ UNDP/ WORLD BANK Proyecto ID: A00877.

Comparison of methods of intradomestic capture of Chagas disease vectors in Venezuela

SUMMARY

Among the epidemiological surveillance activities, risk stratification is needed in order to establish priorities in the Chagas disease control program for the purpose of resource optimization. It is therefore necessary to rely on a method of high sensitivity for the detection of domestic infestation by triatomine vectors, mainly in situations of low density. In this study the results obtained with 5 capture methods were compared, 2 of passive search: Gomez-Nuñez boxes and A4 bond paper located on the walls of the bedrooms, 2 methods of active search carried out by trained personnel: direct capture without and direct search with the aid of a flushing agent (cypermethrin + tetramethrin) and the collection of live triatomine vectors by the inhabitants, during 1 month. The study was carried out in 11 localities and 200 houses of Portuguesa State and in 29 localities and 350 houses in Barinas State. Results obtained with the different methods were not significantly different in the 2 states. Of the total of 550 houses explored, 132 were positive, in 131 (99.2%) the presence of bugs was detected by the inhabitants vs. 5.3% by active search: 3.38% by Gomez-Nuñez boxes; 3.03% by flushing out search and 0% by paper. Five species and 563 individuals were collected: *Rhodnius prolixus* was the predominant species, followed by *Triatoma maculata*, *Panstrongylus geniculatus* and *R. pictipes*. The epidemiological indices of dispersion, colonization and infection to *Trypanosoma cruzi* were calculated for each locality. Results support the hypothesis of a new epidemiological scenario where, in the localities in which the domestic cycle has been interrupted, the transmission is primarily maintained by visiting *R. prolixus* coming in from nearby palms. The unequivocal importance of community participation in the epidemiological surveillance in the Control Program of Chagas disease in Venezuela is pointed out.

Key words: triatomine vectors, capture methods, Chagas disease, Venezuela.

REFERENCIAS

- Abad-Franch F., Palomeque F. S., Aguilar H. M. & Miles M. A. (2005). Field ecology of sylvatic *Rhodnius* populations (Heteroptera, Triatominae): risk factors for palm tree infestation in western Ecuador. *Trop. Med. Int. Health*. **10**: 1258-1266.
- Aché A. & Matos A. J. (2001). Interrupting Chagas disease transmission in Venezuela. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **43**: 37-43.
- Aché A. & Sifontes R. (1995). Alternativas para las evaluaciones epidemiológicas en el Programa de Control de la Enfermedad de Chagas en Venezuela. *Bol. Dir. Mal. San. Amb*. **35**: 34-38.
- Acquatella H., Cataliotti F., Gómez-Mancebo J. R., Dávalos V. & Villalobos L. (1987). Long-term control of Chagas disease in Venezuela: effects on serologic findings, electrocardiographic abnormalities and clinical outcome. *Circulation*. **76**: 556-562.
- Acquatella H., Perez J. E., Condado J. A., Sanchez I. (1999). Limited myocardial contractile reserve and chronotropic incompetence in patients with chronic Chagas' disease: assessment by dobutamine stress echocardiography. *J. Am. Coll. Cardiol*. **33**: 522-529.
- Añez N., Carrasco H., Parada H., Crisante G., Rojas A., Gonzalez N., Ramirez J. L., Guevara P., Rivero C., Borges R. & Scorza J. V. (1999a). Acute Chagas' Disease in western Venezuela: A clinical, seroparasitologic and epidemiologic study. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. **60**: 215-222.
- Añez N., Carrasco H., Parada H., Crisante G., Rojas A., Fuenmayor C., et al. (1999b). Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. **60**: 726-732.
- Añez N., Crisante G., Rojas A., Carrasco H., Parada H., Yopez Y. et al. (2001). Detection and significance of inapparent infection in Chagas disease in western Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. **65**: 227-232.
- Añez N., Crisante G. & Rojas A. (2004). Update on Chagas disease in Venezuela. A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **99**: 781-787.
- Benítez J., Reyes P. & Maldonado C. (2006). Programa de Control de la Enfermedad de Chagas en Venezuela. Situación actual. Año 2005. pp 34-39. En: *Memorias Curso-Taller Internacional. El uso de Sistemas de Información Geográfica (SIG) y Sensores Remotos (SR) en Salud Pública*. Eds. Guhl F. & Danes C. Bogotá, Colombia.
- Briceño Leon R. (1998). El contexto político de la participación comunitaria en América Latina. *Cad. Saude Publ*. **14** (Suppl 2): 141-147.
- Cova García P. & Suárez M. (1959). *Estudio de los Triatomíneos en Venezuela*. Publicación No 11. División de Malariología. MSAS; Tipografía Vargas, S. A. Caracas, Venezuela.
- Dujardin J. P., Muñoz M., Chavez T., Ponce C., Moreno J. & Schofield C. J. (1998). The origin of *Rodnius prolixus* in Central America. *Med. & Vet. Entomol*. **12**: 113-115.
- Feliciangeli M. D., Cracavallo R. & Fernandez E. (1988). Canibalismo y transmisión directa de *Trypanosoma cruzi* entre ninfas de *Rhodnius prolixus*. *Chagas*. **5**: 18-22.
- Feliciangeli M. D., Dujardin J. P., Bastrenta B., Mazzarri M., Villegas J., Flores M. & Muñoz M. (2002). Is extradomestic *Rhodnius robustus* (Hemiptera: Reduviidae) responsible for sporadic transmission of Chagas disease in western Venezuela? *Trop. Med. & Intern Health*. **7**: 280-287.
- Feliciangeli M. D., Campbell-Lendrum D., Martinez C., Gonzalez D., Coleman P. & Davies C. (2003). Chagas disease control in Venezuela: lessons for the Andean Region and beyond. *Trends Parasitol*. **19**: 44-49.
- Feliciangeli M. D., Sánchez-Martín M. J., Suárez B., Marrero R., Torrellas A., Bravo A. et al.. (2007a). Risk factors for *Trypanosoma cruzi* human infection in Barinas state, Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. **76**: 915-921.
- Feliciangeli M. D., Sanchez-Martin M. J., Marrero R, Davies C. & Dujardin J. P. (2007b). Morphometric evidence for a possible role of *Rhodnius prolixus* from palm trees in house reinfestation in the State of Barinas (Venezuela). *Acta Tropica*. **101**: 169-177

- Fitzpatrick S. (2005). *The analysis of the relationship between sylvatic and domestic populations of R. prolixus/robustus (Hemiptera: Reduviidae) in Venezuela by morphometric and molecular methods*. Infectious & Tropical Diseases PhD Thesis. London, London School of Hygiene & Tropical Medicine. University of London.
- Forattini O. P., Hurez E. & Correa R. R. (1969). Medida de infestação domiciliar por *Triatoma infestans*. *Rev. Saude Publica*. **3**: 159-172.
- Gamboa Cuadrado J. (1961). Comprobación de *Rhodnius prolixus* extradoméstico. *Bol. Inf. Dir. Mal. San. Amb*. **1**: 139-142.
- García Zapata M. T., Schofield C. J. & Marsden P. D. (1985). A simple method to detect the presence of live triatomine bugs in houses sprayed with residual insecticides. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **79**: 558-559.
- García-Zapata M. T. & Marsden P. D. (1993). Chagas' disease: control and surveillance through use of insecticides and community participation in Mambai, Goiás, Brazil. *Bull. Pan. Am. Health Organ*. **27**: 265-279.
- Gómez Núñez J. C. 1965. Desarrollo de un nuevo método para evaluar la infestación intradoméstica por *Rhodnius prolixus*. *Acta Cient. Venez.* **16**: 26-31.
- Guerrero L., Domínguez-Quesada M., García-Martín G. & Borges L. (1965). Estado actual de la campaña contra la enfermedad de Chagas en Venezuela. *Arch. Venez. Med. Trop. Parasit.* **5**: 219-265.
- Gürtler R. E., Schweigmann N. J., Cecere M. C., Chuit R. & Wisnivesky-Colli C. (1993). Comparison of two sampling methods for domestic populations of *Triatoma infestans* in north-west Argentina. *Med. Vet. Entomol.* **7**: 238-242.
- Instituto Geográfico de Venezuela Simón Bolívar. (1995). Gacetilla del Estado Barinas. Ministerio del Ambiente y del los Recursos Naturales Renovables. Servicio Autónomo de Geografía y Cartografía Nacional.
- Layrisse Z., Fernandez M.T., Montagnani S., Matos M., Balbas O., Herrera F., Colorado IA, Cataliotti F., Acquatella H. (2000). HLA-C(*)03 is a risk factor for cardiomyopathy in Chagas disease. *Hum. Immunol.* **61**: 925-929.
- OCEI (1994). *Nomenclador de centros poblados*. XII. Censo General de Población y Vivienda 1990. Taller Gráfico de la Oficina Central de Estadística e Informática.
- Pinchin R., Fanara D. M., Castleton C. W. & Oliveira Filho A. M. (1981). Comparison of techniques for detection of domestic infestations with *Triatoma infestans* in Brazil. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **75**: 691-694.
- Pifano F. (1941). La epidemiología de la Enfermedad de Chagas en el estado Yaracuy. *Rev. San. Asist. Soc.* **6**: 303-310.
- Pinto Dias J. C. & Ribeiro García A. L. (1978). Vigilância epidemiológica com participação comunitária. Um Programa de Enfermedad de Chagas. *Bol. Of. Sanit. Panam.* **84**: 533-544.
- Pinto Dias J. C. (1998). Problemas e possibilidades de participação comunitária no controle das grandes endemias no Brasil. *Cad. Saúde Publ.* **14** (Suppl. 2): 19-37.
- Sánchez-Martin M. J., Feliciangeli M. D., Campbell-Lendrum D. & Davies C. (2006). Could the Chagas Disease elimination programme be compromised by reinvasion of houses by sylvatic *Rhodnius prolixus* bug populations?. *Trop. Med. Int. Health.* **11**: 1585-1593.
- Sandoval C. M., Joya M. I., Gutierrez R. & Angulo V. M. (2000). Cleptohaematophagy of the Triatomine bug *Belminus herreri*. *Med. Vet. Entomol.* **14**:100-101.
- Schofield C. J. (1978). A comparison of sampling techniques for domestic populations of Triatominae. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**: 449-55.
- Tejera E. (1919). La trypanosomose americaine ou maladie de Chagas au Venezuela. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **12**: 509-513.
- Teixeira A. R., Monteiro P. S., Rebelo J. M., Arganaraz E. R., Vieira D., Lauria-Pires L. *et al.* (2001). Emerging Chagas disease: trophic network and

- cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 100-112.
- Torrealba J. F. (1934). *Investigaciones sobre la Enfermedad de Chagas*. Recopilación de trabajos. Fasc 1-6, San Juan de los Morros, Estado Guárico, Venezuela.
- Zeledón R., Marin F., Calvo N., Lugo E. & Valle S. (2006). Distribution and ecological aspects of *Rhodnius pallescens* in Costa Rica and Nicaragua and their epidemiological implications. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **101**: 75-79.
- WHO (1997). Andean countries initiative launched in Colombia. *TDR News.* **53**: 3.
- WHO (1998). Chagas Disease: Central America initiative launched. *TDR News.* **55**: 6.
- WHO (2002). *Control of Chagas disease*. Technical Report. Series 905. Geneva.

Recibido el 18/01/2007
Aceptado el 15/05/2007

Eficacia del Griselesf® (*Bacillus sphaericus* 2362) como controlador biológico de larvas de *Anopheles aquasalis* Curry Frances Osborn¹, Melfran Herrera² & Armando Salazar²

Actualmente existen diferentes productos a base de *Bacillus* spp. que tienen un efecto larvicida sobre *Anopheles* spp., vectores de la malaria. Sin embargo, su eficacia es variable dependiendo de la especie blanco y las condiciones ambientales. Se evaluó la efectividad del producto Griselesf® (*Bacillus sphaericus* 2362) como controlador biológico de *Anopheles aquasalis*, principal vector de malaria en el estado Sucre, en dos ocasiones bajo las mismas condiciones de laboratorio, en el año 2002 y luego en el 2006. Se prepararon soluciones del producto a concentraciones de 1, 5, 10, 50 y 100 ppm (año 2002) y 5, 25, 50, 75 y 100 ppm (año 2006), en 600 mL de agua potable. Luego se trasvasaron 100 mL de cada una de las soluciones en envases plásticos de 250 mL y se colocaron 10 larvas de los estadios tercero tardío o cuarto temprano en cada uno de los recipientes. En el 2002, a los 48 horas en 100 ppm el Griselesf® había matado solamente 0,84% de la población aumentando a 25% a las 72 horas. En el 2006, en 100 ppm, hubo mortalidades de 6,67 y 11,67% de las poblaciones de las larvas a las 48 y 72 horas respectivamente. Los resultados sugieren que Griselesf® no es efectivo contra las larvas de *An. aquasalis* del estado Sucre.

Palabras claves: *Anopheles*, biolarvicida *Bacillus sphaericus* (2362).

INTRODUCCIÓN

Actualmente existen diferentes productos comerciales a base de bacterias del género *Bacillus* spp. que tienen un efecto larvicida sobre *Anopheles* spp., vectores de la malaria. Sin embargo, la eficacia de las diferentes formulaciones puede variar dependiendo de la especie blanco y las condiciones ambientales, entre otras (Becker *et al.*, 1989). Por lo tanto, es importante seleccionar la formulación más efectiva para asegurar su eficiencia para controlar las poblaciones de las diferentes plagas de salud pública en las regiones donde se encuentran.

La formulación comercial Griselesf®, a base de *Bacillus sphaericus* 2362, ha sido empleada en varios países de Centro y Suramérica desde el año 1991, con un alto grado de éxito. Montero *et al.*, (1991), aplicaron este producto en 160 criaderos de *Culex quinquefasciatus*, *Aedes taeniorhynchus* y *Anopheles albimanus* en el municipio Santa Cruz, La Habana, Cuba, donde causó un 100% de reducción larvaria hasta por 5 meses. Estos estudios fueron replicados en el municipio Buenaventura (Colombia) (Villarreal, 1995), Managua (Nicaragua) (Rivera, 1997), Guatemala (Blanco *et al.*, 2000) y Honduras (Blanco *et al.*, 2002). En todos estos reportes se empleó una dosis de 10 mL/m² del producto, obteniéndose reducciones larvarias entre 78,12 (Blanco *et al.*, 2002) y 100% durante periodos de tres a cinco meses (Villarreal, 1995; Rivera, 1997; Blanco *et al.*, 2000, 2002). Todas las pruebas se hicieron contra *An. albimanus*, excepto la realizada en Colombia, donde se aplicó el producto en criaderos de *An. albimanus* y *An. nuneztovari*.

¹ Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Cerro del Medio, Universidad de Oriente, Cumaná, Edo. Sucre. Venezuela

² Laboratorio de Entomología "Dr. José V. Scorza", Gerencia de Saneamiento Ambiental, FUNDASALUD. Carúpano, Edo. Sucre. Venezuela.

*Autor de correspondencia: fosborn2001@yahoo.com

Sin embargo, Delgado *et al.* (2001) compararon Vectolex WDG® (al 51,2%) y Griselesf®, ambos a 0,25 g de ingrediente activo por m² (equivalente a 51 mL/m²), contra larvas de *Anopheles* sp. en Boca de Nigua, República Dominicana. El Vectolex WDG® tuvo un mejor desempeño hasta el cuarto día con un 100% de reducción comparado con un 58,2% producido por el Griselesf®. No obstante, ambos productos presentaron 0% de reducción para el día once.

Además, Berti *et al.* (2006), realizaron ensayos de efectividad y persistencia de Griselesf®, aplicando 0,25 g/m² contra poblaciones larvales de *An. aquasalis* en un pantano arbóreo en el municipio Mariño, estado Sucre, Venezuela, obteniendo como máximo de mortalidad alrededor del 62,8% en los primeros dos días de iniciado el ensayo para luego caer a partir del octavo día, hasta llegar a 48,6% a los 16 días.

En el año 2002, el Ministerio de Salud de Venezuela importó el Griselesf® para el control de las poblaciones de *Anopheles* spp., vectores de la malaria en este país. En el estado Sucre, como parte del programa de control vectorial de anofelinos se realizaron aplicaciones aéreas durante los meses de marzo y abril de 2002 en criaderos inabordables por vía terrestre debido a su gran extensión o dificultad de acceso. Dichos criaderos se encontraban localizados en los municipios Mariño, Cajigal, Libertador y Benítez (Informes Internos de la Gerencia de Saneamiento Ambiental (GSA) de FUNDASALUD, estado Sucre, 2002). Sin embargo, en esta oportunidad no se realizaron evaluaciones previas de laboratorio o de campo sobre la eficacia y persistencia de la formulación contra larvas del vector local, *An. aquasalis*.

Debido a lo anterior, y a que el Griselesf® ha mostrado una eficiencia variable contra diferentes especies de *Anopheles*, se consideró necesario realizar estudios de laboratorio para evaluar el efecto larvicida del Griselesf® sobre *An. aquasalis*, principal vector de la malaria en el estado Sucre.

MATERIALES Y MÉTODOS

La formulación de Griselesf® (0.6% IA, 600 ITU/mg) empleada fue importada a Venezuela por el

Ministerio de Salud de la empresa Labiofam, Cuba, y fue enviada a la Gerencia de Saneamiento Ambiental (GSA). Se realizaron dos ensayos, el primero en septiembre de 2002 y el segundo en mayo de 2006. El producto empleado en ambas experiencias provenía de lotes diferentes, recién importados a Venezuela y viables según la etiqueta.

Las larvas fueron obtenidas a partir de hembras adultas de *An. aquasalis* capturadas de un potrero de vacas en el pueblo de Río de Agua, municipio Libertador, Estado Sucre (10° 35' 11,7'' N; 62° 58' 09,8'' O), según la metodología de Delgado (1998) y Gómez & Osborn (2002) e identificadas utilizando las claves de Cova-García & Sutil (1977).

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Entomología Dr. J. V. Scorza (LEJVS) de la GSA, en Carúpano, estado Sucre. En ambos casos, las larvas de *An. aquasalis* se criaron hasta los estadios tercero tardío o cuarto temprano en bandejas plásticas de 24 x 16 x 6 cm con 200 mL de agua potable a una temperatura de 27 ± 0.5°C, % humedad 80 ± 5, y fotoperiodo 12:12, utilizando la metodologías de Delgado (1998) y Gómez & Osborn (2002).

Se prepararon soluciones del producto a concentraciones de 1, 5, 10, 50 y 100 ppm (año 2002) y 5, 25, 50, 75 y 100 ppm (año 2006), en 600 mL de agua potable. Luego se trasvasaron las larvas a envases plásticos con una superficie de 83 cm² y profundidad 5 cm, con 100 mL de cada una de las concentraciones a probar y se colocaron 10 larvas en cada uno de los recipientes. En cada ensayo se utilizaron 6 réplicas por concentración de producto más sus respectivos controles, todos montados durante un lapso de no más de dos horas. Se anotó la mortalidad de las larvas 48 y 72 horas después del inicio del experimento y se corrigió utilizando la fórmula de Abbott (Abbott, 1925), en el caso que la mortalidad de los controles excediera el 5%:

$$\% \text{ mortalidad corregida} = (X - Y / X) \times 100$$

donde: X = % de larvas vivas en el control

Y = % de larvas vivas en el tratamiento.

RESULTADOS

En el ensayo del año 2002, se observó que a las 48 horas luego de la exposición de las larvas

al Griselesf®, hubo mortalidades de 2,5, 1,02 y 0,84% en las concentraciones de 10, 50 y 100 ppm, respectivamente. Las mortalidades aumentaron luego de las 72 horas en todas las concentraciones, alcanzando un 25% de la población a 100 ppm. No se produjo ninguna mortalidad en los controles (Fig. 1).

En cuanto al bioensayo realizado en el año 2006, a las 48 horas hubo mortalidades de 6,67; 1,67; 0, 3,33 y 6,67% en las concentraciones de 5, 25, 50, 75 y 100 ppm, respectivamente. A las 72 horas, luego de la exposición, la única concentración donde hubo un aumento significativo fue en 100 ppm donde siete larvas murieron, representando solamente 11,67% de la población. No se produjo ninguna mortalidad en los controles (Fig. 2).

DISCUSIÓN

En ambos ensayos, el Griselesf® produjo mortalidades muy bajas en todas las concentraciones probadas, por lo cual no fue posible el cálculo de las concentraciones letales CL50 y CL95. Es también necesario resaltar que algunas de las concentraciones menores produjeron mayores mortalidades en las larvas que las concentraciones superiores, destacando especialmente la de 5 ppm en el año 2006, que mató más larvas que las concentraciones de 25, 50 y 75 ppm, tanto a las 48 como a las 72 horas. No sabemos que podría haber causado este hecho, sin embargo, es posible que se deba a las diferentes tasas de alimentación de los individuos. En todo caso, es obvio el bajo efecto del Griselesf® en todas las concentraciones probadas.

Fig. 1. Porcentaje de mortalidad de larvas de 3er-4to instar de *Anopheles aquasalis* producido por el producto comercial Griselesf® 2362, a las 48 y 72 horas luego de la exposición, año 2002.

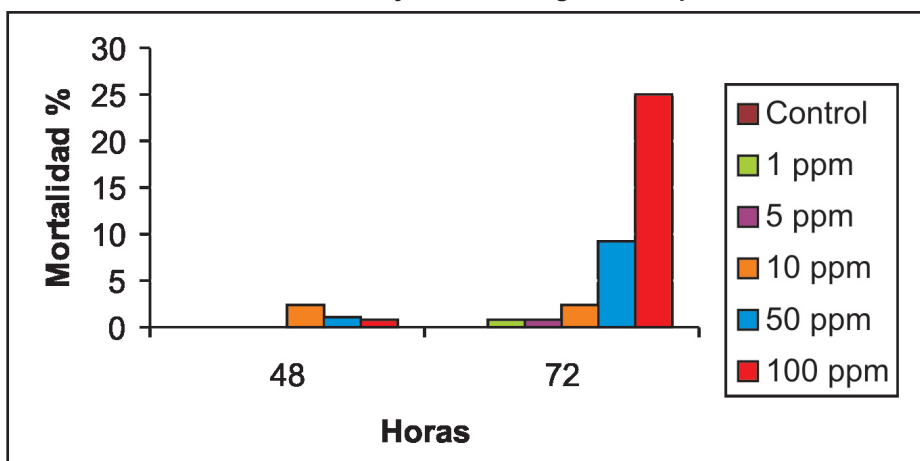
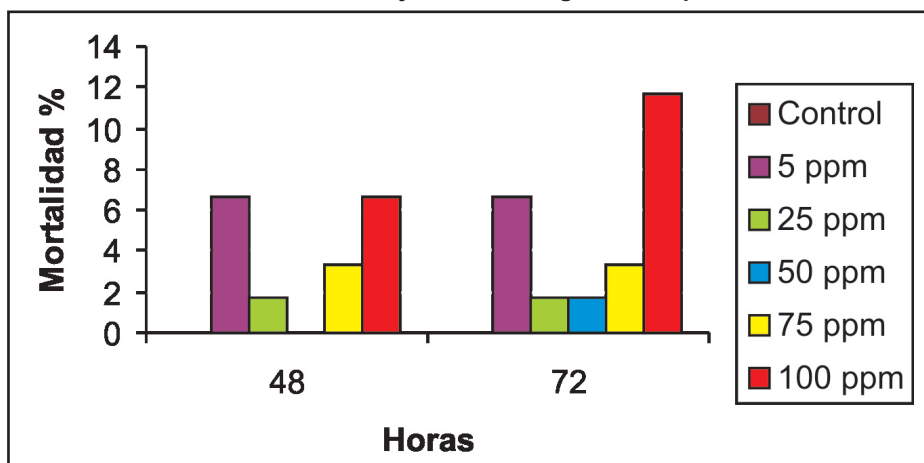


Fig. 2. Porcentaje de mortalidad de larvas de 3er-4to instar de *Anopheles aquasalis* producido por el producto comercial Griselesf® 2362, a las 48 y 72 horas luego de la exposición, año 2006.



Ensayos realizados por otros autores, con el mismo producto, han producido mortalidades de 50% y 95% a 2,27 y 152,9 ppm, respectivamente, y 67,36 de eficiencia, para larvas de *An. aquasalis* provenientes de mosquitos hembras colectados en la ribera del Lago de Valencia, estado Aragua (Delgado, 2001).

Delgado *et al.* (2001), también realizaron estudios de laboratorio con este producto sobre larvas de *An. albimanus* en Santo Domingo, República Dominicana, donde obtuvieron 73% de mortalidad en 10 ppm (48 horas), lo cual fue comparable con la mortalidad producida por Vectolex WDG® (al 51,2%) para el mismo periodo: 82%.

Esas mortalidades son mucho mayores que las obtenidas en este trabajo, lo cual pudiera deberse a que los individuos de la población de *An. aquasalis* aquí estudiada presenten mayor resistencia al producto que los que se emplearon en los estudios arriba mencionados.

Las larvas de *An. aquasalis* colectadas del estado Sucre han mostrado una mayor resistencia a otros productos bacterianos, específicamente Vectobac®-12AS y Bactivec®, comparadas con larvas de esta misma especie colectadas de otra localidad en Venezuela. Delgado (1996) y Moreno *et al.* (2003), probaron Vectobac®-12AS y Bactivec®, respectivamente, en agua dulce contra las larvas de *An. aquasalis* criadas de adultas colectadas del mismo sitio en el Lago de Valencia, estado Aragua, encontrándose valores de las CL50 y CL95 de 0,013 y 0,10 ppm para Vectobac®-AS12 (Delgado, 1996) y 0,111 y 0,263 ppm para Bactivec® (Moreno *et al.*, 2003), mientras que en un estudio realizado por Osborn *et al.* (2007) con los mismos productos contra *An. aquasalis* del estado Sucre, los valores de las CL50 y CL95 fueron 0,2 y 0,67 ppm respectivamente para Vectobac®-12AS, y 0,89 y 5,05 ppm, respectivamente, para Bactivec®.

Estos resultados sugieren que *An. aquasalis* aparentemente tiene una mayor resistencia natural que *An. albimanus* y que las poblaciones de *An. aquasalis* del estado Sucre son más resistentes que las del Lago de Valencia, al menos a los productos a base de *Bacillus thuringiensis* probados. Sin embargo, es también aparente que *An. aquasalis* es más susceptible a las formulaciones de *Bacillus thuringiensis* Vectobac®-

AS12 y Bactivec® que al Griselesf®. Otras formulaciones de *B. thuringiensis* también han dado buenos resultados contra esta especie, por ejemplo Vectobac®-G (0,2 %), Vectobac®-AS (0,6%), Teknar® (1,6 %) y una formulación experimental microencapsulada M-Bti® (0,1 %), que dieron CL50 y CL95 de entre 0.006 y 0.05 ppm, respectivamente (M-Bti®) y 0,48 y 4,8 ppm (Vectobac®-G) (Delgado, 2004).

Esto pudiera implicar que *An. aquasalis* es más susceptible a *B. thuringiensis* que a *B. sphaericus*. No obstante, trabajos de laboratorio realizados con otra formulación de *B. sphaericus* han arrojado buenos resultados, como por ejemplo Narváez (2003), quien obtuvo mortalidades de 99% cuando enfrentó larvas de *An. aquasalis* también colectados del estado Sucre, con Vectolex® CG 7,5% a una concentración de 0,75 ppm.

Estudios de campo realizados por Berti *et al.* (2002, 2006) también sugieren la susceptibilidad de *An. aquasalis* a formulaciones de *B. sphaericus*. La aplicación de Vectolex® CG 7,5% a una concentración de 0,2 g/m² produjo porcentajes de reducción de 100% hasta los cuatro días, bajando a un 67,5% a los 21 días en una sabana inundada en el municipio Cajigal, estado Sucre (Berti *et al.*, 2002). Vectolex® WDG-51,2%, en un manglar en el municipio Mariño, estado Sucre, produjo porcentajes de reducción de 100% hasta los ocho días y 90,2% hasta los 16 días (Berti *et al.*, 2006).

Lo expuesto anteriormente nos demuestra que existe una variabilidad en la respuesta dosis-mortalidad entre especies, e incluso entre diferentes poblaciones de la misma especie, a un mismo producto, y diferencias de la susceptibilidad de la misma especie o población frente diferentes formulaciones, lo que implica la necesidad de un monitoreo constante en las regiones donde se utilizan. En este caso, los resultados resaltan que *An. aquasalis* del estado Sucre tiende a tener una mayor resistencia natural a los larvicidas biológicos que otros anofelinos y que es más resistente al Griselesf® que otras formulaciones tanto de *B. thuringiensis* como a *B. sphaericus*.

En conclusión, los resultados producidos por esta formulación de *B. sphaericus* 2362 (Griselesf®) demuestran un bajo desempeño contra larvas de *An. aquasalis* del estado Sucre, comparados con los

presentados contra larvas de la misma especie de otras localidades de Venezuela y contra larvas de otras especies de anofelinos.

En base a lo anterior, no recomendamos su uso como controlador biológico de las larvas de esta plaga, al menos en dicho Estado. Además, recomendamos realizar ensayos de este tipo con las otras principales especies vectoras de malaria de nuestro país (*An. darlingi*, *An. nuneztovari* y *An. albimanus*).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos al personal de la Gerencia de Saneamiento Ambiental, Región XI por su ayuda en la colecta de los adultos de *An. aquasalis*. También quisiéramos agradecer las sugerencias de un árbitro anónimo, las cuales mejoraron sustancialmente el manuscrito. Este trabajo fue financiado en parte por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, Proyecto No. CI-5-1901-0957/00 y el FONACIT Proyecto No. GI-200000-1541

The effectiveness of Griselesf® (*Bacillus sphaericus* 2362) as a biological control of larvae of *Anopheles aquasalis* Curry

SUMMARY

There are many different formulations of *Bacillus* spp. used as larvicides against the malaria vectors, *Anopheles* spp. Nevertheless, their effectiveness is variable depending on the target species and environmental conditions. The effectiveness of Griselesf® (*Bacillus sphaericus* 2362) as a biological control agent for the principal malaria vector in Sucre state, *Anopheles aquasalis*, was evaluated under similar laboratory conditions on two occasions, in 2002 and later in 2006. Solutions of the product were prepared at concentrations of 1, 5, 10, 50 and 100 ppm (2002) and 5, 25, 50, 75 and 100 ppm (2006), in 600 mL of potable water and for each concentration 100 mL was poured into each of six 250 mL plastic recipients. Ten late third or early fourth instar larvae were then placed into each recipient. In 2002, after 48 hours in 100 ppm Griselesf® had only killed 0,84% of the population, rising to 25% after 72 hours. In 2006, in 100 ppm, the mortality rates were 6,67 and 11,67% after 48 and 72 hours respectively. The results suggest that Griselesf® is not effective against *An. aquasalis* from Sucre state.

Key words: *Anopheles*, biolarvicide, *Bacillus sphaericus* (2362).

REFERENCIAS

- Abbott W. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* **18**: 265-267.
- Becker N., Zgomba M., Ludwig M., Pectric D. & Rettich F. (1989). Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* treatment. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **8**: 285-289.
- Berti J., Ramírez X., González J. & Herrera M. (2002). Evaluación de la efectividad de *Bacillus sphaericus* contra larvas de *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae) en criaderos naturales del estado Sucre, Venezuela. *Entomotropica.* **17**: 1-5.
- Berti J., González J., Herrera M. & Puentes N. (2006). *Field evaluation of efficacy of two formulations of Bacillus sphaericus against Anopheles aquasalis larvae in seasonal brackish mangrove of Sucre state, Venezuela.* 72nd Annual AMCA Meeting and 16th Latin American Symposium, Detroit, EE.UU.
- Blanco S., Martínez A., Rolando O., Velásquez C., Tello R. & Mendoza I. (2000). Introducción del *Bacillus sphaericus* cepa-2362 (Griselesf) para el control biológico de vectores maláricos en Guatemala. *Rev. Cubana Med. Trop.* **52**: 37-43.
- Blanco S., Colombi E., Nery L. & Canales D. (2002). Aplicación del biolarvicide *Bacillus sphaericus*-2362 (Griselesf) para el control de la malaria en un área de salud de la República de Honduras. *Rev. Cubana Med. Trop.* **54**: 134-41
- Cova-García P. & Sutil E. (1977). *Claves gráficas para la clasificación de anofelinos de Venezuela.* Pub. Div. End. Rurales Dir. Malarol. San. Amb. MSDS. Maracay, Venezuela.
- Delgado N. (1996). *Implicaciones ecofisiológicas de la introducción de Bacillus thuringiensis var. israelensis como controlador biológico de Anopheles aquasalis (Diptera: Culicidae).* Trab.

- Grado Dr. Ciencias Biológicas. Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela.
- Delgado N. (1998). Parámetros demográficos de las fases inmaduras de *Anopheles aquasalis* Curry 1932 (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. *Bol Entomol Venezolana*. **13**: 27-43.
- Delgado N. (2001). *Evaluación de la eficacia de un insecticida biológico a base de Bacillus sphaericus contra Anopheles aquasalis*. Informe Técnico. Unidad de Asesoramiento y Evaluación de Plaguicidas, Instituto de Zoología Agrícola, U.C.V., Maracay.
- Delgado N. (2004). *Evaluación de la eficacia y persistencia de dos formulaciones a base de Bacillus thuringiensis var. israelensis y de dos formulaciones a base de B. sphaericus contra tres especies de Culicidae, en condiciones de laboratorio y campo*. Simposio Uso de *Bacillus* spp. para el control biológico de insectos de importancia médica en Venezuela. Maracay, estado Aragua.
- Delgado N., Solis A., Guzmán G., Ventura G., De Los Santos J., Montero D. *et al.* (2001). *Determinación de las concentraciones diagnóstico de cuatro formulaciones comerciales de Bacillus thuringiensis var. israelensis y B. sphaericus, sobre Aedes aegypti, Culex quinquefasciatus y Anopheles albimanus (Diptera: Culicidae), en Santo Domingo, República Dominicana*. XVII Congreso Venezolano de Entomología. Maturín, Monagas.
- Gómez C. & Osborn F. (2002).- Efectos de diferentes concentraciones salinas sobre el desarrollo de larvas y pupas de *Anopheles aquasalis* Curry, 1932 (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. *Entomotropica*. **17**: 121-127.
- Montero G., Díaz M., Marrero A. & Castillo F. (1991). Resultados de las aplicaciones en pilotaje del biolarvicida *Bacillus sphaericus* 2362 en criaderos de mosquitos del municipio de Santa Cruz del Norte (Provincia La Habana). *Rev Cubana Med Trop*. **43**: 39-44.
- Moreno J., Delgado N. & González J. (2003). *Evaluación de la eficacia de una formulación comercial de Bacillus thuringiensis israelensis en condiciones de laboratorio sobre Anopheles albimanus Wied. y Anopheles aquasalis Curry del lago de Valencia*. XVII Congreso Venezolano de Entomología, Maracay, Venezuela.
- Narváez C. (2003). *Evaluación de una formulación de Bacillus sphaericus Neide 1904 para el control de larvas de Anopheles aquasalis Curry 1932 (Diptera: Culicidae) a diferentes concentraciones de sal en condiciones de laboratorio*. Trab. Grado Lcda. Bioanálisis. Cumaná, Venezuela.
- Osborn F., Herrera M., Gómez C. & Salazar A. (2007). Comparison of two commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis for the control of *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) at three salt concentrations. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **102**: 69-72
- Rivera P. (1997). Evaluación de la efectividad biolarvicida y residualidad de *Bacillus sphaericus* (cepa-2362) para el control de *Anopheles albimanus* en la costa del lago Xolotlan, Managua, Nicaragua, 1995. *Rev. Nicar. Ent.* **42**: 7-14.
- Villareal L. (1995). *Bacillus sphaericus*: para el control de vectores de enfermedades tropicales. *Rev. Latinoam. Salud San. Amb.* **1**: 12-14.

Recibido el 29/05/2006
Aceptado el 11/03/2007

Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae).

Gabriel Parra-Henao^{1,2}, Carlos Mario García Pajón² & José Miguel Cotes Torres²

Se realizaron bioensayos con los extractos etanólicos de las especies vegetales *Annona muricata*, *Mammea americana*, *Melia azedarach*, *Ricinus communis* y los insecticidas nicotina y deltametrina sobre ninfas y huevos de *R. prolixus* y *R. pallescens*. Se determinó la toxicidad, repelencia y actividad ovicida. Los valores mas bajos de CL50 expresados en %p/p obtenidos respectivamente para *R. prolixus* y *R. pallescens* fueron: *A. muricata* 1,02 y 1,74; *M. azedarach* 1,77 y 1,74. El extracto de *M. americana* presentó menor actividad insecticida sobre las dos especies de triatomos: CL50 4,33 y 2,61. La repelencia osciló entre 51 y 58% y la eclosión de los huevos fue inhibida entre 10 y 25%. Los resultados de toxicidad se consideran poco promisorios por ser superiores a la concentración máxima de 5.000 ppm recomendada por la GTZ.

Palabras claves: *Rhodnius*, Enfermedad de Chagas, Insecticidas Botánicos, Colombia

INTRODUCCIÓN

En Colombia las especies *Rhodnius prolixus*, Stål 1859 y *Rhodnius pallescens*, Barber 1932 (Hemiptera: Reduviidae) se consideran entre los principales vectores de la enfermedad de Chagas a nivel silvestre y doméstico (Lent & Wygodzinsky, 1979; Angulo & Sandoval, 2001); estas especies se encuentran distribuidas principalmente en el norte, centro y oriente del país (Guhl *et al.*, 2007).

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad parasitaria crónica causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), es considerada un problema de salud pública en la zona oriental de Colombia que afecta el 7% de la población y ocasiona altos costos económicos en el tratamiento de la cardiopatía chagásica crónica (Guhl & Nicholls, 2001). Los estudios epidemiológicos realizados por el Ministerio de la Protección Social y la Dirección General de Salud Pública de Colombia estiman entre

700.000 a 1.200.000 personas infectadas y 8.000.000 más en riesgo de adquirir la infección (Padilla, 2005). Desde el punto de vista social y económico, esta enfermedad se considera la más importante del continente americano (World Bank, 1993).

Debido a que los medicamentos solo son efectivos en la fase aguda de la enfermedad y a la ausencia de vacunas para realizar tratamientos a gran escala, se ha considerado como una alternativa viable la interrupción de la transmisión de la enfermedad controlando los vectores mediante insecticidas y mejorando las condiciones físicas de las viviendas rurales para eliminar el hábitat de los triatomos (Schofield, 1985).

La subfamilia Triatominae esta compuesta por 17 géneros, entre los cuales el género *Rhodnius* contiene especies de importancia epidemiológica como vectores de la enfermedad de Chagas. *Rhodnius prolixus* es considerado el principal vector en Colombia y Venezuela y *R. pallescens* en Panamá (Dujardin, Schofield & Panzera, 2002). En el control de las especies domiciliarias se utilizan insecticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides sintéticos. Actualmente en las campañas gubernamentales se emplean insecticidas piretroides

¹ Instituto Colombiano de Medicina Tropical-CES, Medellín.

² Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

*Autor de correspondencia: gparra@ces.edu.co

por ser los más efectivos (Oliveira, 1984; Schofield, 1985; Zerba *et al.*, 1987), destacándose los de tercera generación, que están enriquecidos con isómeros de mayor potencial insecticida. En el marco de las iniciativas regionales, la aplicación casi excluyente de estos productos como medio de control químico puede conllevar al riesgo latente de desarrollo de mecanismos de resistencia (Zerba, 1999), y contaminación ambiental (OMS, 2002). Se conocen más de 200 especies de artrópodos de importancia médica que presentan resistencia a muchos de los pesticidas contemporáneos y requieren para su control materiales más potentes, que originan mayores costos económicos y ambientales (Brown, 1986).

En triatomínos han sido realizados reportes de resistencia a insecticidas; Picollo *et al.* (2005), reportan altos niveles de resistencia a la deltametrina, betacipermetrina, betaciflutrina y lambdacihalotrina en la especie *Triatoma infestans* de la región norte de Argentina; en Colombia se halló menor susceptibilidad de *R. prolixus* al Malatión, explicada con base a un elevado metabolismo de carboxiesterasas (Sandoval *et al.*, 2000). Para minimizar estos riesgos es necesario desarrollar otras estrategias de manejo y tecnologías que permitan obtener nuevas alternativas químicas o biológicas para el control de triatomínos.

Una alternativa viable para el control de estos insectos surge del concepto de manejo integrado de plagas, incluyendo controladores biológicos, manejo ambiental y la utilización de insecticidas de origen biológico que proporcionan modos de acción novedosos y reducen el riesgo de resistencia cruzada (Arnanson *et al.*, 1989). En Brasil y Paraguay se han realizado investigaciones orientadas al estudio de la respuesta de los triatomínos y del parásito *T. cruzi* a algunos productos naturales. García *et al.* (2000), encontraron que la azadirachtina A obtenida de los frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae) tiene efectos tóxicos sobre *R. prolixus*, hallando que los componentes mayoritarios de esta especie vegetal no solo afectan los triatomínos sino también el desarrollo del *T. cruzi* en estos vectores; en forma análoga encontraron que algunas lectinas del tipo de las aglutininas obtenidas de *Ricinus communis* actúan sobre el ducto gastrointestinal de la especie *R. prolixus*. Otros grupos de investigación (Schmutterer, 1987) han estudiado la toxicidad de los aceites y extractos vegetales de las semillas de algunas especies de la familia Meliaceae. Leite *et al.* (1987), reportan

efecto insecticida de *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) y *Eucaliptus argenteum* L. (Myrtaceae) sobre ninfas de *Dipetalogaster maximus*. Arias & Schmeda-Hirschmann (1988) hallaron efecto repelente del aceite y del extracto etanólico obtenido de frutos de *Melia azedarach* L. (Meliaceae) sobre ninfas de *Triatoma infestans*, igualmente observaron que el extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) posee actividad insecticida sobre las ninfas de *Rhodnius neglectus* y que los extractos de *Tagetes erecta* inhiben el proceso de muda de estos insectos (Schmeda-Hirschmann & Arias, 1992).

En las evaluaciones de actividad insecticida realizadas con algunas especies de Asteraceae paraguayas, Schmeda-Hirschman & Arias (1992), encontraron que los extractos obtenidos con hexano de las flores de *Achyrocline satureoides* producen mortalidades del 45% al aplicar 0,05 µg sobre los tergitos abdominales de *T. infestans*, y los extractos etanólicos obtenidos de los tallos de *Mikania cordifolia* y *Vernonia brasiliensis* inhiben el proceso de muda en *T. infestans*.

Cabral *et al.* (2000), evaluaron el efecto inhibidor de la ecdisis y la alteración del balance hídrico producido por seis lignanos y neolignanos en ninfas de cuarto instar de *R. prolixus* al aplicar los tratamientos por vía oral, tópica y contacto continuo, observaron que los lignanos burchellin, pinosresinol, sesamina, lacarin A y ácido nordihydroguaiaretico no causan inhibición de la alimentación al aplicarlos en una concentración de 100 µg/mL; y el lignano podofilotoxina no presenta efecto antialimentario, causando inhibición del proceso de muda y toxicidad significativa al aplicarlo por vía oral o tópica. El efecto más significativo de inhibición de la ecdisis se presenta con el pinosresinol y el ácido nordihydroguaiaretico con valores que alcanzan el 58 y 50% respectivamente al ser aplicados por vía oral; a la misma concentración de 100 µg/mL la burchelina inhibe en un 30% el proceso de muda. Mediante tratamiento tópico ninguno de los compuestos presenta influencia en el ciclo de la muda y la podofilotoxina y la burchelina reducen significativamente la excreción de los insectos en 24 horas.

El uso de insecticidas botánicos es una alternativa de control accesible y de bajo costo para los campesinos y comunidades indígenas que habitan las zonas infestadas por triatomínos, debido a que varias

especies vegetales que poseen actividad insecticida reconocida crecen con facilidad o son nativas de estas áreas geográficas y la obtención de los extractos activos no requiere de metodologías complejas, además los insecticidas de origen vegetal tienen la ventaja de ser biodegradables, de disponibilidad inmediata, bajo costo y pueden ser preparados artesanalmente mediante tratamientos caseros y ser aplicados de forma inmediata sin requerir de la utilización de aspersores o implementos costosos.

En Colombia no se han realizado investigaciones orientadas a la evaluación del potencial insecticida de especies vegetales sobre triatomínicos; sin embargo, se conoce que a nivel etnobotánico y de tradición los indígenas que habitan en algunas comunidades de la vertiente norte de la Sierra Nevada de Santa Marta utilizan los extractos acuosos de los frutos de higuierillo (*Ricinus communis*) aplicados en las paredes de las chozas y obtienen buenos resultados en el control de insectos domiciliarios, incluyendo entre ellos a los triatomínicos vectores de la enfermedad de Chagas (Parra, 2005). Con el objetivo de hacer una aproximación biorracional al control de los vectores de la enfermedad de Chagas, hemos evaluado los extractos provenientes de cuatro especies vegetales sobre las especies *R. prolixus* y *R. pallescens*. En esta investigación se presentan y analizan los resultados de las evaluaciones realizadas bajo condiciones de laboratorio con los extractos etanólicos obtenidos de las semillas de *Annona muricata* (Annonaceae) y *Mammea americana* (Clusiaceae); de los frutos maduros de *Melia azedarach* (Meliaceae) y *Ricinus communis* (Euphorbiaceae). La potencialidad insecticida se determinó con base en las evaluaciones de toxicidad y repelencia sobre ninfas de cuarto instar de *R. prolixus* y *R. pallescens* y la actividad ovicida sobre las posturas recientes de ambas especies. Como nivel de referencia se evaluó la actividad del insecticida piretroide deltametrina y del insecticida natural nicotina al 98% (grado analítico).

MATERIALES Y METODOS

1. Material vegetal

Las semillas de *M. americana* y *A. muricata* se obtuvieron de frutos comerciales y los frutos completos de *R. communis* y *M. azedarach* se recolectaron en los predios de la Universidad

Nacional de Colombia Sede Medellín procedentes de árboles sanos. Los cuatro materiales vegetales se secaron a 45 °C por 72 horas, posteriormente se trituraron y se realizó la extracción de 500 gramos de material mediante percolación con tres litros de etanol al 95% a temperatura ambiente. El extracto obtenido se filtró y se destiló a presión reducida en un rotaevaporador a una temperatura controlada de 40° C. Se empleó solvente grado analítico, redistilado antes de ser utilizado.

2. Insectos

Las colonias de triatomínicos (*R. prolixus* y *R. pallescens*) se obtuvieron del Laboratorio de Entomología del ICMT-CES y del Grupo de Chagas de la Universidad de Antioquia. Ambas especies se mantuvieron y reprodujeron en condiciones controladas de humedad relativa del 80% y temperatura de 27°C. Las ninfas y los adultos se alimentaron semanalmente sobre gallinas (*Gallus gallus*).

3. Bioensayos

3.1. Estudio de la actividad insecticida de los extractos

Mediante un diseño completamente al azar se establecieron bioensayos para evaluar toxicidad, repelencia y actividad ovicida de los extractos. La toxicidad se evaluó siguiendo el protocolo de Schmeda-Hirschman & Arias (1992), la repelencia se evaluó siguiendo el protocolo de Arias & Schmeda-Hirschman, (1988) y la actividad ovicida se evaluó siguiendo el protocolo de Valladares *et al.* (1999).

En todos los bioensayos las ninfas se seleccionaron de la misma edad (ninfas IV de 10 días en el estadio), peso (130±30 mg) y tiempo de ayuno (seis horas).

3.2. Evaluación de toxicidad

Para la realización de los bioensayos de toxicidad se usó un microaplicador "Microliter Syringe Hamilton", cada extracto se aplicó a un volumen de 10 µL en los tergos abdominales de 10 ninfas por dosis o concentración que fluctuaron en el rango de 5% y 70% (p/p), se realizaron como mínimo tres réplicas de cada experimento y se evaluaron entre 4 y 5 dosis que registraron por lo menos 4 puntos entre el 10 - 80% de mortalidad. Se pretendió encontrar bajo este diseño la mínima concentración a la cual

cada extracto presenta actividad estadísticamente significativa.

En los bioensayos de toxicidad se usaron ninfas de 4º estadio de *R. prolixus* y *R. pallescens*, la mortalidad de las ninfas se registró a las 72 horas, se consideraba muerta cada ninfa que colocada sobre un papel de filtro no presentaba actividad locomotora propia o estimulada. En todos los bioensayos las mediciones se hicieron por triplicado, confrontando la actividad de los extractos con los respectivos controles y blancos absolutos.

El insecticida deltametrina fue aplicado a un volumen de 0,5 µL sobre los tergos abdominales de las ninfas de 4º estadio de *R. prolixus* y *R. pallescens* por triplicado y a las concentraciones de 0.01, 0.025, 0.050, 0.075 y 0.1 % p/p; el insecticida nicotina se aplicó a un volumen de 0,5 µL sobre los tergos abdominales de las ninfas de 4º estadio de *R. prolixus* y *R. pallescens* por triplicado a las concentraciones de 0.1, 0.15, 0.25, 0.40 y 0.60 % p/p.

3.3 Evaluación de repelencia

En el bioensayo de repelencia, se realizaron cinco repeticiones, estando conformada la unidad experimental por 18 ninfas de cada especie que se liberaban al interior de un sistema que se construyó siguiendo la metodología de Arias & Schmeda-Hirschmann (1988) (Fig. 1), en el cual se construyeron 6 refugios con viales de plástico de 25 ml recubiertos en su interior con papel de filtro (las tiras de papel previamente pesadas e impregnadas se dejaron evaporando a temperatura de 30 °C durante 24 horas antes de ponerlas en el interior de los viales. La

concentración se expresó en miligramos de extracto por kilogramo de papel mg/kg) cada análisis se realizó con 3 viales tratados con el solvente (etanol al 95 %) y tres con extracto. Se evaluaron las concentraciones de 5.000, 10.000 y 15.000 mg/kg para cada extracto. La variable evaluada fue el número de insectos que ingresaron en los refugios tratados con el extracto a cada concentración durante dos horas de exposición para cada repetición.

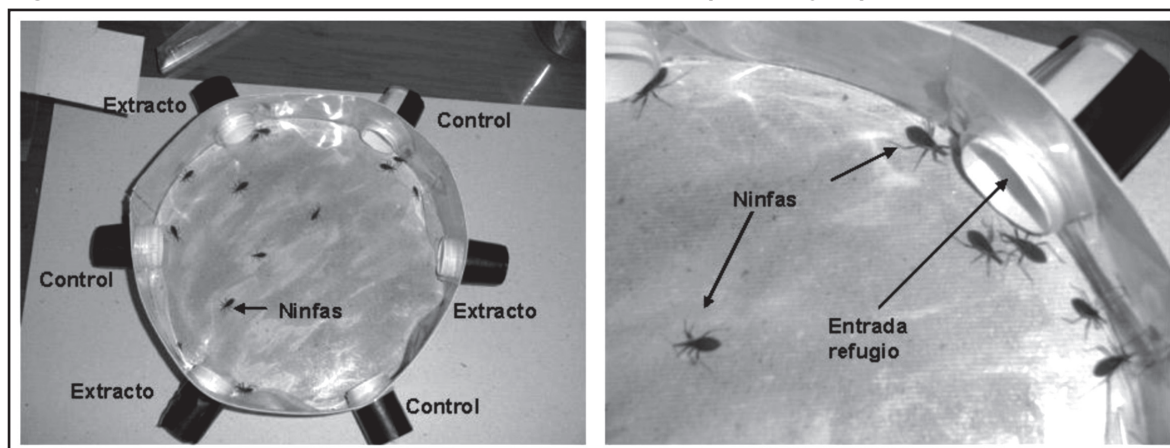
3.4 Evaluación de actividad ovicida

En la evaluación de actividad ovicida, se utilizó la metodología descrita por Valladares *et al.* (1999). Se realizaron tres repeticiones, estando conformada la unidad experimental por lotes de 10 huevos. Se evaluaron las concentraciones entre 1.0 y 4 %p/p de cada extracto vegetal. Se tuvo en cuenta la eclosión natural que presentan los huevos de *R. prolixus* y *R. pallescens* (22 días a 25 °C y 80% HR). En los ensayos se impregnaron con los extractos 3 lotes de 10 huevos de cada especie para cada concentración. En los ensayos de control se impregnaron 3 lotes de 10 huevos con el solvente, el proceso de eclosión se observó durante 60 días. Luego de aplicado el tratamiento los huevos fueron depositados en caja de Petri. La variable evaluada fue el porcentaje de eclosión de los huevos.

4. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante el paquete estadístico SAS System v 8.2. Los bioensayos de toxicidad se analizaron mediante el procedimiento PROBIT para la determinación de la concentración letal 50 de los extractos e insecticidas evaluados.

Fig. 1. Sistema para evaluación de repelencia en ninfas de *R. prolixus* y *R. pallescens*.



El bioensayo de repelencia se analizó utilizando el procedimiento FREQ, se calculó la tasa de repelencia y se aplicó una prueba de χ^2 para evaluar el efecto de la repelencia. Para el bioensayo de actividad ovicida se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA), mediante el procedimiento GLM.

RESULTADOS

La relación entre el peso de material fresco y material seco expresado como porcentaje obtenido para las especies vegetales fue de: 56% para *A. muricata*, 44% para *M. azedarach*, 60% para *M. americana* y 40% para *R. communis*. El rendimiento de la extracción expresado en %p/p fue de 28% para *A. muricata*, 10% para *M. americana*, 48,58% para *M. azedarach* y 70,84% para *R. communis*.

Potencial insecticida de las especies vegetales estudiadas

Toxicidad de los extractos vegetales y de los insecticidas nicotina y deltametrina sobre *R. prolixus* y *R. pallescens*

En el Tabla I y en las Fig. 2 y Fig. 3 se presentan los valores de toxicidad media CL50 obtenidas con las cuatro especies vegetales sobre *R. pallescens* y *R. prolixus*; similarmente en el Tabla I y la Fig. 4 se presentan los valores de CL50 obtenidos con los insecticidas deltametrina y nicotina. Se observó

una mortalidad significativa de las dos especies de triatominos con los cuatro extractos evaluados a las 72 horas. Los extractos de *A. muricata* y *M. azedarach* presentaron la mayor actividad sobre las dos especies de triatominos con concentraciones letales medias sobre *R. prolixus* de 1,02 % p/p (IC95%: 0,39-1,59) y 1,77 % p/p (IC95%: 0,59-2,45) respectivamente y sobre *R. pallescens* con concentraciones letales medias de 1,74 % p/p (IC95%: 0,015-3,16) y 1,74 % p/p (IC95%: 0,44-2,6). Se observó una diferencia interespecífica en la respuesta de las dos especies de triatominos al extracto de *A. muricata*, lo que sugiere que los metabolitos de esta especie vegetal son más activos sobre la especie *R. prolixus*. Esta diferencia en la respuesta es muy notoria con el extracto de *R. communis* para la cual se obtuvieron valores de concentración letal media de 1,87 % p/p para *R. prolixus* y 3,77 % p/p para *R. pallescens*. El extracto menos activo fue el de *M. americana* con valores de mortalidad media de 4,33 % p/p (IC95%: 3,48-5,81) para *R. prolixus* y 2,61% p/p (IC95%: 1,33-3,42) en *R. pallescens*.

Respecto a los insecticidas nicotina y deltametrina se observó que la concentración letal media obtenida para *R. pallescens* con deltametrina es 6,6 veces más baja que la obtenida con nicotina. Un comportamiento similar se observó con la especie *R. prolixus* que requiere una concentración de deltametrina 5,3 veces más baja para alcanzar la concentración letal media con relación a la nicotina.

Tabla I. Concentración letal media (CL50) obtenida para cada especie vegetal sobre las ninfas de IV estadio de *R. prolixus* y *R. pallescens*.

Especie de insecto	Especie vegetal	CL50		CL95		MMO**	CMMO***
		Estimativa	IC*	Estimativa	IC*		
<i>R. prolixus</i>	<i>A. muricata</i>	1,02	0,39-1,59	4,48	2,94 – 10,60	90,00	3
	<i>M. azedarach</i>	1,77	0,59-2,45	5,73	3,81 - 18,83	80,00	3
	<i>M. americana</i>	4,33	3,48-5,81	21,74	12,85 – 63,16	76,67	7
	<i>R. communis</i>	1,87	0,015-3,27	10,18	5,93 – 859,49	83,33	4
	Deltametrina	0,0440	0,0229 – 0,0555	0,1200	0,0912 – 0,2852	100,00	0,1
	Nicotina	0,24	0,05-0,37	1,08	0,71-3,88	86,67	0,6
	<i>R. pallescens</i>	<i>A. muricata</i>	1,74	0,015 - 3,16	11,74	5,52 – 134,13	76,67
<i>M. azedarach</i>	1,74	0,44 - 2,6	7,63	5,06 – 32,53	93,33	4	
<i>M. americana</i>	2,61	1,33 - 3,42	5,88	4,95 – 7,61	83,33	7	
<i>R. communis</i>	3,77	3,26 - 4,1	6,01	5,44 – 6,98	76,67	5	
	Deltametrina	0,0331	0,0258 – 0,0412	0,1554	0,1078 – 0,2899	100,00	0,1
	Nicotina	0,2123	0,0233 – 0,3779	1,1246	0,6410 – 3,4456	86,67	0,6

* Intervalo de confianza al 95%; ** Concentración con la máxima mortalidad observada; *** Máxima Mortalidad Observada en porcentaje.

Fig. 2. Mortalidad de *R. pallescens* en las evaluaciones de actividad biológica realizadas con los extractos de *M. americana*, *A. muricata*, *R. communis* y *M. azedarach*.

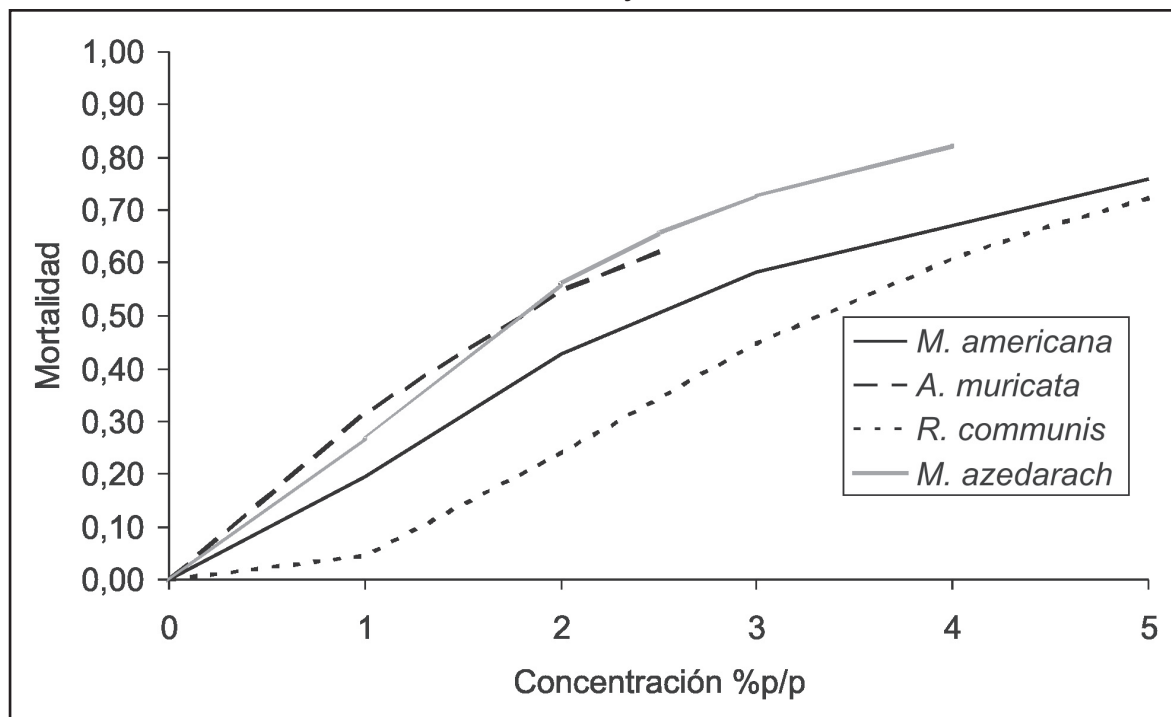


Fig. 3. Mortalidad de *R. prolixus* en las evaluaciones de actividad biológica realizadas con los extractos de *M. americana*, *A. muricata*, *R. communis* y *M. azedarach*.

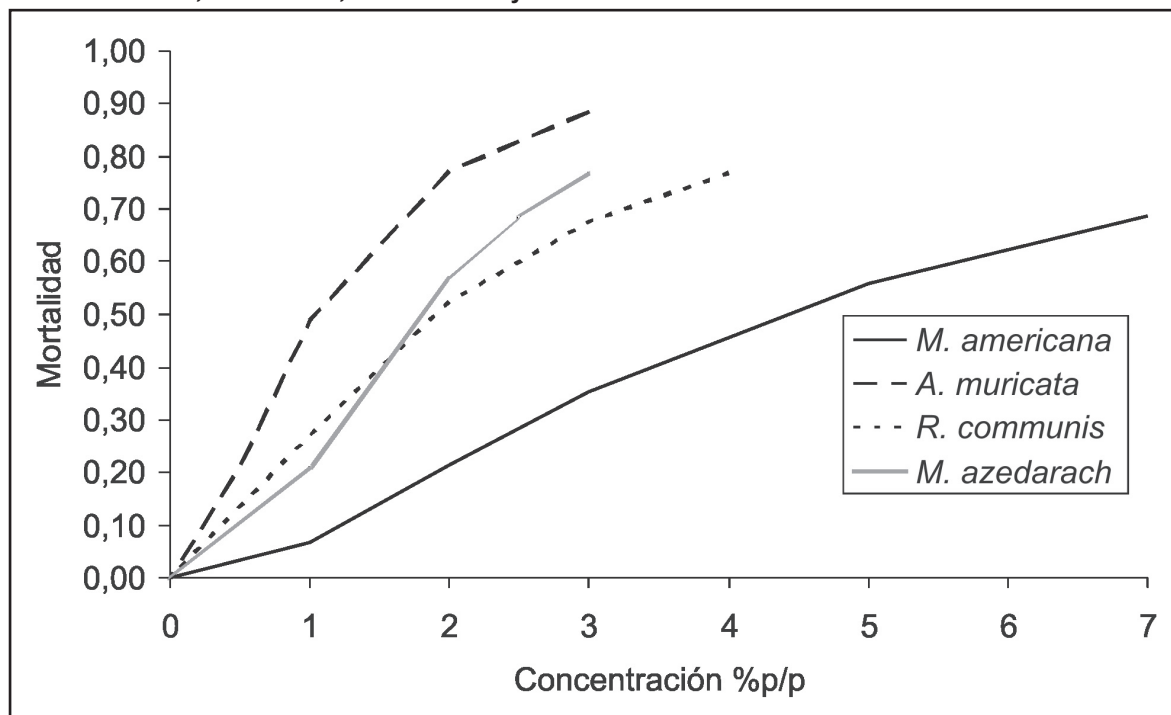
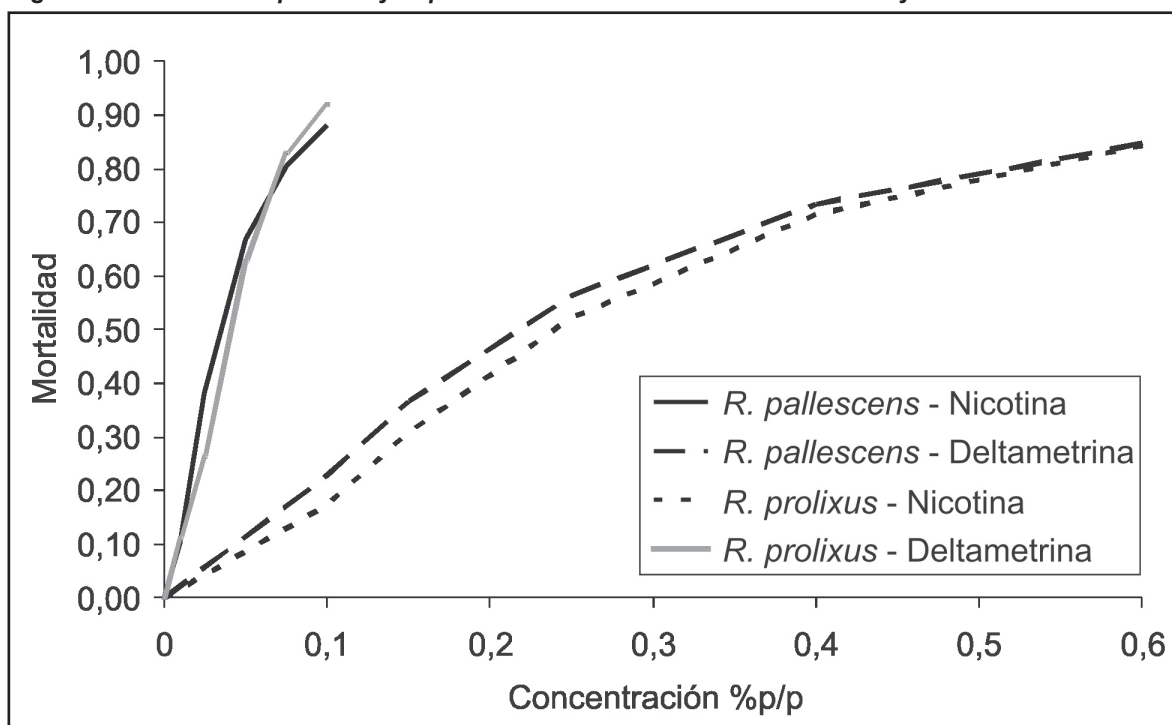


Fig. 4. Mortalidad de *R. prolixus* y *R. pallescens* con los insecticidas nicotina y deltametrina.

Las diferencias de actividad observadas entre los dos insecticidas de referencia sugieren que la especie *R. pallescens* es más susceptible a los insecticidas que *R. prolixus*. El extracto de *A. muricata* presentó la actividad más alta y requirió una concentración 231 veces mayor que deltametrina y 48 veces mayor que nicotina para alcanzar la CL50 sobre la especie *R. prolixus*. No se observó mortalidad en los controles.

Repelencia de los extractos vegetales sobre ninfas de 4° estadio de *R. prolixus* y *R. pallescens*.

Los porcentajes de repelencia obtenidos con los tres extractos evaluados oscilaron entre 51 y 58%. El extracto de *M. azedarach* a la concentración de 1,0% p/p produjo el mayor efecto sobre las ninfas de *R. prolixus*: 58%, mientras que el extracto de *R. communis* a la concentración del 1,0 % p/p fue el que causó la mayor repelencia sobre *R. pallescens* con un valor de 57,5% (Tabla II). El extracto de *A. muricata* actuó como repelente de las dos especies de triatomíneos a la concentración de 1,5% p/p alcanzando los valores de 55,33 % para *R. prolixus*, ($P= 0,0023$) y de 55,33% para *R. pallescens*, ($P= 0,0023$). Con el extracto de *M. azedarach* se observó una respuesta

de repelencia diferencial ya que *R. prolixus* presentó repelencia a la concentración de 0,5% p/p ($P= 0,047$) y un porcentaje de repelencia de 53,69%, mientras que *R. pallescens* alcanzó este porcentaje de repelencia a la concentración de 1% p/p ($P= 0,019$). El extracto de *R. communis* presentó un efecto repelente similar al del extracto de *M. azedarach*, y en este caso la especie *R. pallescens* fue más susceptible alcanzando el valor de 56,08 % a la concentración más baja: 0,5% p/p ($P= 0,0072$) y *R. prolixus* requirió una concentración de 1,5% p/p ($P= 0,03$) para alcanzar un valor de repelencia estadísticamente significativo.

Actividad ovicida

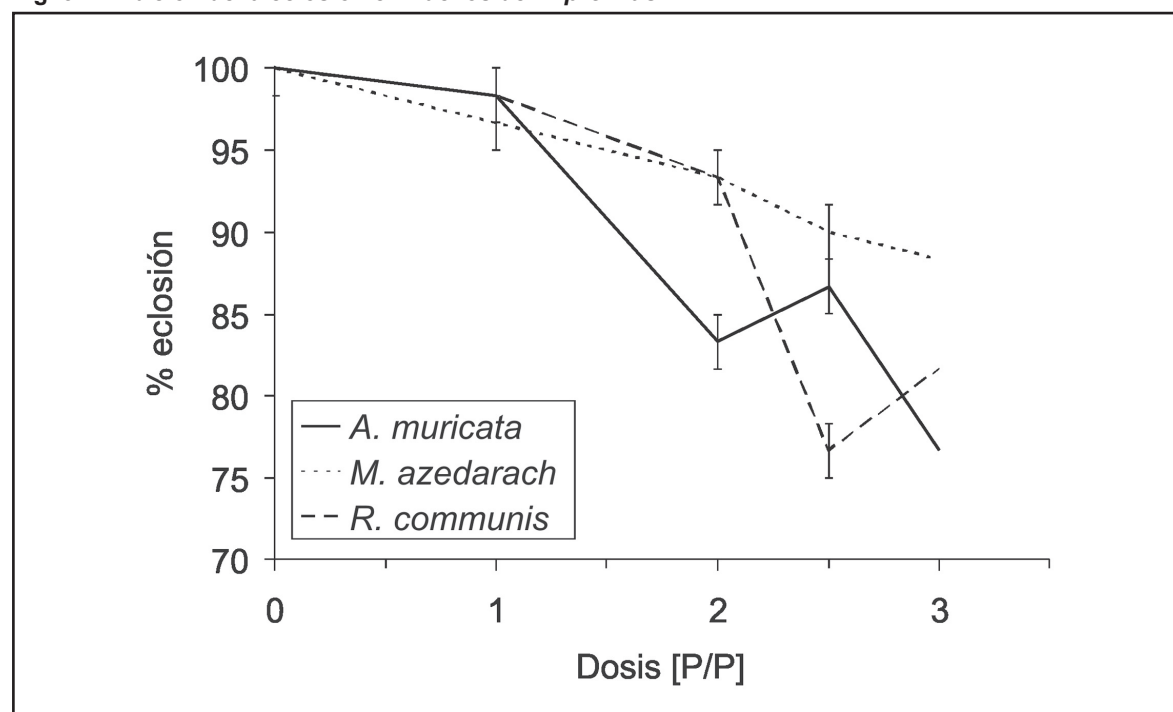
Los extractos de *A. muricata* y *R. communis* inhibieron en 25% la eclosión de los huevos de *R. prolixus*. El extracto de *A. muricata* produjo inhibición del 25% de la eclosión en los huevos de *R. prolixus* a la concentración de 3,0% p/p; mientras que el extracto de *R. communis* requirió una concentración menor, 2,5% p/p, para alcanzar este mismo porcentaje de inhibición de la eclosión de los huevos de esta especie; el extracto de *M. azedarach* solo produjo una inhibición del 10% a la concentración de 3,0% p/p (Fig. 5). Se observó que el extracto de *M. azedarach* fue el

Tabla II. Efecto de repelencia de los extractos etanólicos sobre ninfas de IV estadio de *R. pallescens* y *R. prolixus*.

Especies evaluadas (planta / insecto)	Repelencia (%)		Tasa de repelencia	Valor <i>P</i>
	Etanol	Extracto		
<i>A. muricata</i> / <i>R. pallescens</i>	47,40	52,60	1,10	0,1367
	46,58	53,42	1,14	0,0856
	44,67	55,33	1,23	0,0023**
<i>A. muricata</i> / <i>R. prolixus</i>	48,34	51,66	1,06	0,4178
	46,58	53,42	1,14	0,0856
	44,67	55,33	1,23	0,0023**
<i>M. azedarach</i> / <i>R. pallescens</i>	48,75	51,25	1,05	0,4776
	45,00	55,00	1,22	0,190*
	43,33	56,67	1,30	<0,0001**
<i>M. azedarach</i> / <i>R. prolixus</i>	46,31	53,69	1,15	0,0472*
	42,00	58,00	1,38	<0,0001**
	45,70	54,30	1,19	0,0140*
<i>R. communis</i> / <i>R. pallescens</i>	43,92	56,08	1,27	0,0007**
	42,47	57,53	1,35	<0,0001**
	42,95	57,05	1,33	<0,0001**
<i>R. communis</i> / <i>R. prolixus</i>	47,10	52,90	1,12	0,0939
	48,00	52,00	1,08	0,3174
	45,89	54,11	1,18	0,0352*

* Nivel de significancia 5% $\alpha=0.05$; ** Nivel de significancia 1% $\alpha=0.01$.

Fig. 5. Inhibición de la eclosión en huevos de *R. prolixus*.



que ocasionó el mayor porcentaje de inhibición de la eclosión de los huevos de *R. pallescens* alcanzando el valor de 25% a la concentración de 3% p/p y los extractos de *A. muricata* y *R. communis* inhibieron en un 20% la eclosión de los huevos de esta especie de triatomo a las concentraciones de 3% p/p y 2,5% p/p respectivamente (Fig. 6).

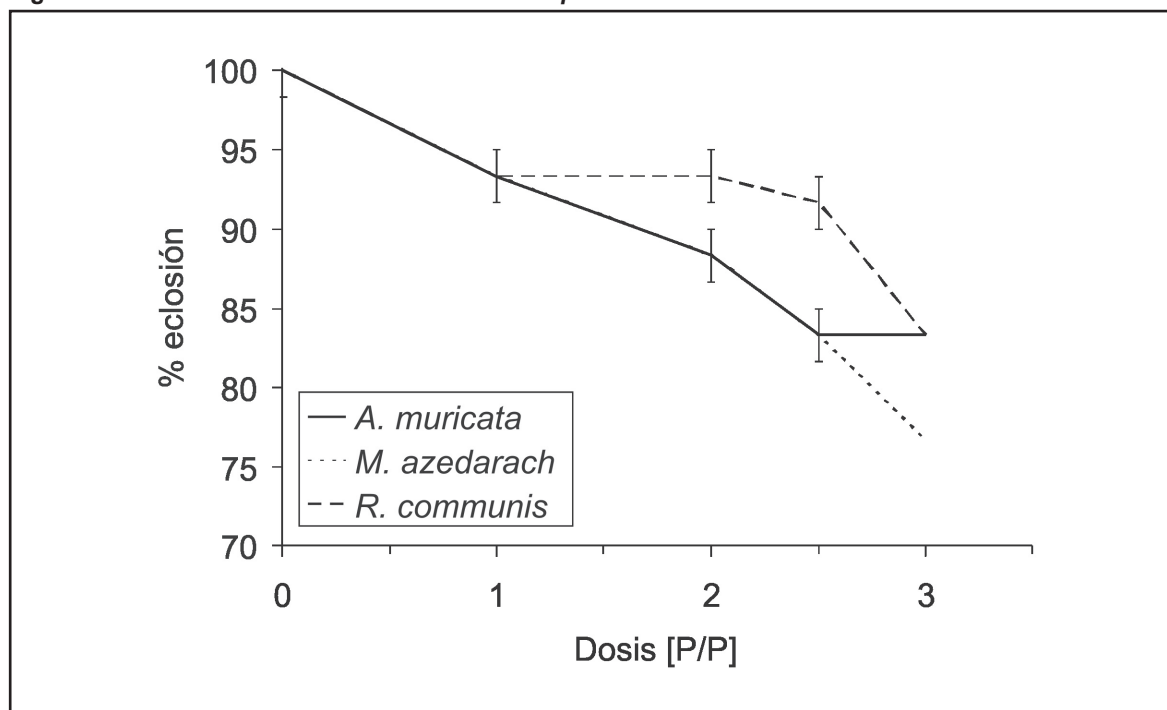
DISCUSIÓN

En las especies más activas (*A. muricata* y *M. azedarach*) se observó que el rendimiento de la extracción fue de 28% para *A. muricata* y de 48.5% para *M. azedarach*, esto se debe a que los rendimientos obtenidos desde semillas y frutos son muy diferentes para una misma planta y difieren de planta a planta. De las cuatro especies vegetales evaluadas se observó que el extracto de *A. muricata* fue el de mayor toxicidad sobre las ninfas de *R. prolixus* y *R. pallescens*; en la literatura no hay publicaciones previas de la toxicidad de esta especie vegetal sobre triatominos, sin embargo no es sorprendente la actividad insecticida observada debido a que el género *Annona* posee acetogeninas bistetrahidrofuránicas y monotetrahidrofuránicas que presentan actividad biológica (Rupprecht *et al.*, 1990). Feras *et al.* (1999), reportan la toxicidad sobre cucarachas (*Blattella germanica*) resistentes

a insecticidas tradicionales de las acetogeninas obtenidas de algunas especies de anonáceas y Morales *et al.* (2004) encontraron que las larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* son muy susceptibles a los extractos polares, no polares y a las mezclas de acetogeninas de *A. muricata*, en los estudios realizados obtuvieron valores de CL50 de 74,7; 236,2 y 20,3 ppm respectivamente. Ohsawa *et al.* (1990), publicaron la actividad de los extractos de *Annona glabra*, *A. montana*, *A. muricata*, *A. squamosa*, *A. chirimolia* y *A. reticulata* sobre *Callosobrochus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae) y observaron porcentajes de mortalidad variables, los cuales fueron inferiores a los hallados en esta investigación debido posiblemente a que los coleopteros se caracterizan por una mayor tolerancia a los tóxicos. La toxicidad de *A. muricata* contrasta con el efecto de repelencia observada, la cual fue más baja que la de los otros extractos evaluados, lo que indica que los metabolitos activos pueden ser efectivos contra triatominos solo por contacto directo.

El extracto de los frutos de *M. azedarach* mostró actividad tóxica sobre las ninfas de *R. prolixus* con una CL50: 1,77 % p/p; IC95%: 0,59-2,45 y sobre las ninfas de *R. pallescens* con una CL50: 1,74% p/p; IC:95%: 0,44-2,6; los resultados obtenidos contrastan

Fig. 6. Inhibición de la eclosión en huevos de *R. pallescens*.



con los hallados por Schmeda-Hirschmann & Arias, (1992), debido a que el extracto obtenido con éter de petróleo a partir de los frutos de *M. azedarach* colectados en Paraguay y evaluados sobre la especie *R. neglectus* mostraron una mortalidad muy baja siendo considerados no promisorios para el control de triatomíneos, sin embargo en este mismo estudio la evaluación del extracto obtenido con éter de petróleo de las hojas de *M. azedarach* fue activo alcanzando mortalidades del 32,5% con la misma especie de triatomíneo. Estos resultados confirman las observaciones hechas por Schmeda-Hirschmann & Arias (1992), en las cuales detectaron diferencias en la actividad de los extractos de *M. azedarach* obtenidos de plantas colectadas en diferentes sitios.

La actividad ovicida de los extractos evaluados se considera baja, pues no supero en ninguno de los bioensayos el 25% de inhibición de la eclosión de los huevos, valor que está muy cercano a los porcentajes de eclosión natural de los huevos de *R. prolixus*, que en condiciones de laboratorio a 21°C y 90% de humedad relativa han sido reportados del 85% (Picollo & Zerba, 1997); en los controles evaluados en este estudio la eclosión de los huevos de ambas especies de triatomíneos fue del 100% a 80% HR y 27°C; en otros estudios de evaluación de la actividad de extractos vegetales sobre huevos de *T. infestans* (Valladares *et al.*, 1999), al evaluar los extractos etanólicos de las hojas y frutos de *M. azedarach* sobre *T. infestans* hallaron que los huevos tratados con concentraciones de 5,5 y 11,1 % p/v presentaban porcentajes de eclosión superiores al 80%. En este mismo estudio los autores observaron efecto repelente del extracto de *M. azedarach* con valores de repelencia que fluctuaron entre el 50 y el 100%.

En las evaluaciones de repelencia efectuadas en este estudio se obtuvieron porcentajes que oscilaron entre el 51 y el 58%, estos valores de repelencia se pueden considerar representativos. Los estudios fitoquímicos realizados por Valladares *et al.* (1999), sobre la especie *M. azedarach* dieron pruebas positivas para la presencia de flavonoides, limonoides y lignanos, y negativas para alcaloides y azadiractina, la cual posee actividad insecticida reconocida y es considerada como una de las moléculas más activas presente en algunas especies de la familia Meliaceae.

La actividad tóxica observada en este estudio con los extractos etanólicos obtenidos de los frutos de *M. azedarach* coincide con el efecto de repelencia diferencial obtenida para las dos especies de triatomíneos evaluadas que alcanza los mismos índices a las concentraciones 0,5% p/p para *R. prolixus* y 1% p/p para *R. pallescens*.

Se observó que la especie *R. pallescens* es menos susceptible que *R. prolixus* al efecto tóxico del extracto etanólico obtenido de los frutos de *R. communis* y las semillas de *A. muricata* ya que es necesaria una concentración mayor que alcanza casi el doble para obtener la CL50. La susceptibilidad de la especie *R. prolixus* a los metabolitos presentes en los dos extractos citados puede ser debida a factores genéticos o a factores de adaptación frente al contacto con insecticidas de origen natural o sintéticos.

El extracto etanólico obtenido de los frutos de *R. communis* presentó toxicidad sobre las dos especies de triatomíneos con valores de concentración letal media de 3,77 % p/p para *R. pallescens* y 1,87% p/p para *R. prolixus*. Estos resultados sugieren que este extracto es poco promisorio para el control de estos insectos. En los frutos de *R. communis* se ha hallado la presencia del alcaloide ricinina y de la toxoalbúmina ricina, los cuales presentan una toxicidad muy alta para humanos, mamíferos e insectos (Farias & Tokarnia, 1996), sin embargo no se observó actividad tóxica significativa contra los triatomíneos lo cual puede indicar que estos materiales no están presentes en el extracto etanólico o lo están en cantidades muy pequeñas debido a la alta polaridad de estas dos sustancias. En las evaluaciones realizadas con los extractos acuosos obtenidos a partir de las hojas de *R. communis*, Upasani *et al.* (2003), encontraron una actividad insecticida muy alta al aplicarlos sobre *C. chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidae), de este extracto aislaron varios flavonoides que mostraron potencial insecticida, ovicida y disuasor de la oviposición en *C. chinensis*.

En las evaluaciones de toxicidad de los extractos evaluados se observa que no se incrementa significativamente la pendiente de las curvas aún cuando se aumentan las dosis de los extractos, esto puede deberse a dosis subletales por no realizar las evaluaciones con ingredientes activos que se obtendrían luego de varias extracciones con solventes polares y no polares. Por lo tanto, los resultados de

toxicidad obtenidos con los extractos de las cuatro especies vegetales evaluadas se pueden considerar poco promisorios atendiendo las recomendaciones de la Agencia de Cooperación Técnica Alemana (GTZ) debido a que los valores de CL50 obtenidos en esta evaluación se encuentran por encima de la concentración máxima (5.000 ppm: 0,5% p/p) recomendada para condiciones de laboratorio (Hellpap, 1993); sin embargo, por tratarse de extractos totales, en éstos los metabolitos que presentan actividad biológica pueden hallarse en concentraciones muy bajas, por lo tanto el posterior fraccionamiento y análisis de dichas fracciones podría llevar a la detección de actividad a concentraciones mas bajas de cada extracto.

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Nicolás Jaramillo y Omar Triana del Grupo de Chagas de la Universidad de Antioquia por suministrar ninfas de *R. prolixus* y *R. pallescens*. A la estudiante Dignora Rentaría por su colaboración en los bioensayos. El estudio fue financiado por el Instituto Colombiano de Medicina Tropical-CES

Insecticidal activity of vegetal extracts on *Rhodnius prolixus* and *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae).

SUMMARY

Extracts from vegetal species *Annona muricata*, *Mammea americana*, *Melia azedarach*, *Ricinus communis* and the insecticides nicotine and deltamethrin were tested for repellent, ovicidal and insecticidal properties against eggs and nymphs of *Rhodnius prolixus* and *R. pallescens*. The lowest values of LC50 in %W/W to *R. prolixus* and *R. pallescens* was: *A. muricata* 1.02 - 1.74 and *M. azedarach* 1.77 - 1.74. The extract of *M. americana* had a weaker effect on the triatominae species LC50 4.33 and 2.61. Repellency fluctuated between 51-58% and hatching was inhibited between 10- 25%. Toxicity tests were considered less promising as being above the maximum concentration recommended by GTZ.

Keywords: *Rhodnius*, Chagas disease, insecticides, botanical, vector control, Colombia.

REFERENCIAS

- Angulo V. & Sandoval C. (2001). *Enfermedad de Chagas en Colombia*. Memorias ECLAT IV. 1-6.
- Arias A. R. & Schmeda-Hirschmann G. (1988). The effects of *Melia azedarach* on *Triatoma infestans* bugs. *Fitoterapia*. **59**: 148-149.
- Arnanson J. T., Philogéne B. J. R. & Morand P. (1989). *Insecticides of plant origin*. Washington D.C. A.C.S. Symposium series. American Chemical Society. 45pp.
- Bowers W. S., Ohta T., Cleere J. S. & Marsehla P. A. (1976). Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants. *Science*. **193**: 542-547.
- Brown A. W. (1986). Insecticide resistance in mosquitoes; a programatic review. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* **2**: 123-140.
- Cabral M. M. O., Azambuja P., Gottlieb O. R. & García E. S. (2000). Effects of some lignans and neolignans on the development and excretion of *Rhodnius prolixus*. *Fitoterapia*. **71**: 1-9.
- Dujardin J. P., Schofield C. J. & Panzera F. (2002). *Los Vectores de la Enfermedad de Chagas*. Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer, Classe des Sciences naturelles et médicales, N.S., Tomo 25. Fascículo 3, Bruselas. 189 pp. Versión ampliada y traducida al español de Dujardin J. P., Schofield C. J. & Panzera F. (2002).
- Farias Brito M. & Tokarnia C. H. (1996). Intoxicação experimental pelas sementes trituradas de *Ricinus communis* (*Euphorbiaceae*) em coelhos. *Pesq. Vet. Bras.* **16**: 1-7.
- Feras Q. A., Xiao X., & McLaughlin J. L. (1999). Annonaceous acetogenins recent progress. *J. Nat. Prod.* **62**: 504-540.
- García E. S., Cabral M. M. O., Schaub G. A., Gottlieb O. R. & Azambuja P. (2000). Effects of Lignoides on a hematophagous bug *Rhodnius prolixus*: feeding ecdysis and diuresis. *Phytochemistry*. **55**: 611-616.
- Guhl F. & Nicholls S. (2001). *Manual de procedimientos para el diagnóstico de la*

- enfermedad de Chagas. Universidad de los Andes, Instituto Nacional de Salud, OMS. Bogotá, Colombia. 60 pp.
- Guhl F., Aguilera G., Pinto N. & Vergara D. (2007). Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. *Biomédica*. **27** (Suppl. 1): 143-162.
- Hellpap C. (1993). *Steps for developing botanical pesticides*. Manuscrito G.T.Z. 20 pp.
- Leite F. E. M., Zapata M. T. G., Soares V. A. & Marsden P. D. (1987). Avaliação laboratorial de insecticidas de origen vegetal utilizando *Dipetalogaster maximus* como agente de teste. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **82** (Suppl. 2): 84-122.
- Lent H. & Wygodzinsky P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* **163**: 410-411.
- McLaughlin J. L., Chang C. J. & Smith D. L. (1991). Bench top bioassay for the discovery of bioactive natural products: an update. pp 383-409. En: *Studies in Natural Products Chemistry*. Ed. Elsevier. AU Rahman. The Netherlands, Amsterdam.
- Morales C. A., González R. & Aragón R. (2004). Evaluación de la actividad larvicida de extractos polares y no polares de acetogeninas de *Annona muricata* sobre larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Rev. Col. Entomol.* **30**: 187-192.
- Ohsawa K., Kato S., Honda H. & Yamamoto I. (1990). Pesticidal active substances in tropical plants: insecticidal substance from the seeds of *Annonaceae*. *J. Agric. Sci.* **34**: 253-258.
- Oliveira Filho A. M. (1984). New alternatives for Chagas' disease control. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*. **79**: 117-123.
- OMS (2002). Serie de informes técnicos 905. *Control de la enfermedad de Chagas*. Informe de un Comité de Expertos de la OMS. Ginebra.
- Padilla J. C. (2005). Situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia. pp 19-24. En: *Memorias del primer Taller Internacional sobre Control de la Enfermedad de Chagas*. Ed. Guhl F. Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.
- Parra G. J. (2005). Evaluación de la actividad insecticida de algunos extractos vegetales sobre *Rhodnius prolixus* y *R. pallescens*. pp 102-107. En: *Memorias VIII Curso Internacional Ecoepidemiología de la Enfermedad de Chagas y Métodos para su Estudio*. Eds. Jaramillo N., Parra G., Triana O. Instituto Colombiano de Medicina Tropical-CES, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
- Picollo M. I., Vassena C., Santo Orihuela P., Barrios S., Zaidemberg M. & Zerba E. (2005). High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *J. Med. Entomol.* **42**: 637-642.
- Picollo M. I. & Zerba E. (1997). Embryogenesis. pp 265-270. En: *Atlas of Chagas' Disease Vectors in the Americas*. Eds. Carcavallo R. U., Galíndez Girón I., Jurberg J. & Lent H. Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Ruppert J. K., Huí Y. H. & McLaughlin J. L. (1990). Annonaceous acetogenins: a review. *J. Nat. Prod.* **53**: 237-78.
- Sandoval C. M., Amaya M., Luna S. & Angulo V. (2000). Ensayos toxicológicos para el monitoreo de la susceptibilidad a los insecticidas en triatominos. pp 113-117. En: *Memorias Curso Taller Internacional: Biología, Epidemiología y Control de Tripanosomosis Americana y Leishmaniosis*. Eds. Vallejo G., Carranza J., Jaramillo J. Universidad del Tolima. Ibagué, Colombia.
- Schmeda-Hirschmann G. & Arias A. R. (1992). A screening method for natural products on triatominae bugs. *Phytother. Res.* **6**: 68-73.
- Schmutterer H. (1987). Insect growth disrupting and fecundity reducing ingredients from the neem and chinaberry trees. pp 119-170. En: *CRC Handbook of Natural Pesticides*, Vol. III. Insect Growth Regulators. Eds. Morgan D. H. & Mandava B. N. CRC Press. Boca Ratón. USA.

- Schofield C. J. (1985). Control of Chagas' disease vectors. *Br. Med. Bull.* **41**: 187-94.
- Upasani S. M., Hemlata M. K., Prashant S. M. & Maheshwari V. L. (2003). Partial characterization and insecticidal properties of *Ricinus communis* L foliage flavonoids. *Pest Manag Sci.* **59**: 1349-1354.
- Valladares G. R., Ferreyra D., Defago M. T., Carpinella M. C. & Palacios S. (1999). Effects of *Melia azedarach* on *Triatoma infestans*. *Fitoterapia.* **70**: 421-424.
- World Bank. (1993). *World Development Report. Investing in Health*. New York. Oxford University Press.
- Zerba E. (1999). Past and Present of Chagas Vector Control and Future Needs. Position Paper WHO/CDS7WHOPES/GCDPP/99.1
- Zerba E. N., Licastro S. A. de Wood E. J. & Villar M. I. P. (1987). Insecticides: mechanism of action. En: *Chagas' disease vectors*, Vol. III. pp 102-121. Eds. Brenner R. R. & Stoka A. M. CRC Press. Boca Ratón, USA.

Recibido el 30/08/2006
Aceptado el 25/04/2007

Evaluación ambiental rápida como procedimiento de vigilancia ambiental en Sorocaima II, municipio Mariño, estado Aragua, Venezuela

José Luis Cáceres G.¹, Karys Khilzi², Indira Estanga², Yalexandra Cortez², Jaibeth Durán², Pedro Fuentes², Angela González², Said González², Greyla González², María Hernández² & Andrés Larroverre²

Una Evaluación Ambiental Rápida, fue realizada durante el año 2006, en 76 hogares de la localidad Sorocaima II, municipio Santiago Mariño del estado Aragua, para conocer su condición ambiental. Fueron evaluadas, la vulnerabilidad, la propensión del medio, la Calidad de los Servicios Públicos y las características de la contaminación. La calificación de 83 puntos señala a la comunidad "con problemas", aunque cercana a valores de "situación positiva", significando que la misma no estaría expuesta a contaminación, que existe poca probabilidad de cambios en el ambiente en contra de la salud humana y que sus instituciones públicas prestan buenos servicios. Sin embargo, las cifras de categorías "moderada" y "alta" en algunas condiciones de variables como: contaminación atmosférica, polución sonora y amenaza a flora y fauna, hacen necesaria su tratamiento para consolidar una mejor calidad de vida de la comunidad, mediante la protección por medios oficiales de la flora y la fauna en la localidad, la limpieza y mantenimiento de las vías después de la temporada de invierno y al término de nuevas construcciones, debido a que el desplazamiento de residuos sólidos y arena en las mismas, ocasionan contaminación y posiblemente sean la causa de la morbilidad por enfermedades del sistema respiratorio.

Palabras claves: Evaluación Ambiental Rápida, vulnerabilidad, propensión del medio, calidad de Servicios Públicos, características de contaminación, Sorocaima II, estado Aragua, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

Desde el inicio de las investigaciones acerca de las causas de las enfermedades, se hicieron afirmaciones como la Hipocrática: "las causas hay que buscarlas en el medio ambiente y no cubrir la ignorancia con el manto de la divinidad". Edwin Chadwich, impulsor del Saneamiento Ambiental y considerado el fundador de la Salud Pública, afirmaba que las enfermedades eran causadas por factores ambientales pobremente definidos denominados "miasmas". Ferviente defensor de la teoría "miasmática", la cual prevaleció hasta el siglo XIX, murió 30 años después de los descubrimientos bacteriológicos de Pasteur, sin haberlos aceptado (Beaglehole *et al.*, 1996).

Es reconocido que la actividad humana genera impactos ambientales que repercuten en los medios: físico, biológico y socioeconómico, afectando a los recursos naturales y a la salud humana. Esos impactos se hacen sentir en las aguas, aire y suelos y en la propia actividad humana, por lo tanto, debemos contribuir con el control de todos estos elementos y situaciones que impactan nuestro ambiente, como el control de las sustancias químicas peligrosas, el manejo adecuado de los recursos hídricos y de los residuos sólidos, el control de los vectores, los ruidos, las vibraciones y radiaciones, como esencia para la protección del ambiente material y del ambiente modificado donde vive y trabaja el hombre (Urrutia *et al.*, 2003).

El deterioro del ambiente ha sido durante los últimos años, un tema de importancia primordial para los países del primer mundo. En Venezuela, clasificado como uno de los seis países "megadiversos" de Latinoamérica y considerado entre los diez lugares más importantes del mundo para la conservación

¹ Docente Investigador Universidad de Carabobo, Sede Aragua. Maracay, Venezuela.

² Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Sede Aragua. Maracay, Venezuela.

*Autor de correspondencia: jolucag@cantv.net

de la biodiversidad, el debate sobre la problemática ambiental no ha cobrado la misma intensidad, aunque se tengan algunos avances al respecto (González & Nagel, 1996).

La mejora y conservación del ambiente al contrario de lo que se pensaba tres décadas atrás, no estorba el proceso de desarrollo económico. Por el contrario, ambiente y desarrollo van de la mano. A medida que los países se desarrollan, las posibilidades de mejorar el ambiente van creciendo. Por otra parte, dado que las clases sociales más necesitadas usualmente se encuentran cerca de regiones con problemas ambientales, políticas ambientales ayudarían a aliviar la pobreza mediante la generación de empleo y el mejoramiento de la productividad de los trabajadores y las condiciones de los suelos y aguas cercanas (González & Nagel, 1996).

Aunque todos los ambientes estén ligados, es útil tratar separadamente cada uno de ellos para que se identifiquen mejor los problemas y a la vez, el mantenimiento de una vigilancia ambiental produzca medidas correctivas o preventivas.

La Vigilancia Ambiental ha sido sustituida en muchos países del mundo, transfiriendo los Sistemas Nacionales de Salud con base en el desarrollo de los Sistemas Locales de Salud (SILOS), los cuales nacieron del principio de democratizar los Servicios de Salud. Éstos son unidades político-administrativas, territoriales y poblacionales básicas, los cuales tienen responsabilidades administrativas, financieras y de prestación de servicios, y comprenden personal e instalaciones, cuyo quehacer incide en las condiciones de salud de las poblaciones de su área de influencia y enfatizan la estructuración de comunidades saludables, el control del ambiente y la integración de programas con enfoque en la familia y la comunidad (Texeira *et al.*, 1996).

Su ocupación principal es el desarrollo de la Atención Primaria Ambiental, definida como una estrategia de acción básicamente preventiva y participativa en el nivel local, que reconoce el derecho del ser humano a vivir en un ambiente sano y adecuado, y a ser informado sobre los riesgos del ambiente en relación con su salud, bienestar y supervivencia; pero a la vez define sus responsabilidades y deberes en relación con la protección, conservación y recuperación del ambiente y la salud (OPS, 1998).

Una herramienta sencilla para la consolidación de dicha estrategia es la Evaluación Ambiental Rápida (EAR), la cual pretende proveer elementos que posibiliten el desarrollo de las capacidades de medir los problemas, consistiendo en que a partir de informaciones de variables ambientales recogidas mediante encuestas, observaciones in situ, datos e informaciones de órganos gubernamentales y de la comunidad, se logren establecer evaluaciones rápidas que generen acciones integradas para reducir los riesgos a la salud pública y al medio ambiente (Texeira *et al.*, 1996).

La misma permitiría conocer las condiciones ambientales de la localidad de Sorocaima II, con la finalidad de realizar las mejoras necesarias en búsqueda de soluciones a la problemática de enfermedades del aparato respiratorio y demás morbilidad existentes.

METODOLOGÍA

La localidad de Sorocaima II (Fig. 1), es un asentamiento poblacional de “viviendas rurales”, situado en el valle central del municipio Santiago Mariño, estado Aragua, con temperatura entre 23°C y 24°C, consolidado desde 1975, compuesto de 310 familias de clase media baja y aproximadamente 1.550 habitantes, cuyas proporciones asignan 55% al género masculino y 45% al femenino, dedicados a labores agrícolas y comerciales. La morbilidad presentada en el año 2006 reveló que las cinco primeras causas fueron: enfermedades del sistema respiratorio (22,32%), otras causas de consulta (11,56%), enfermedades del sistema digestivo (10,90%), enfermedades de la piel y tejido celular subcutáneo (9,64%) y traumatismos y envenenamiento (9,28%).

La EAR fue realizada mediante una encuesta (Tabla I), practicada en 25% de los hogares de la localidad, interrogados sobre las variables: enfermedades infecciosas y transmisibles (comunidad expuesta a: diarreas, dengue, sarampión, gripe, amigdalitis), contaminación atmosférica (exposición a polvo de construcciones o empresas, humo de quemaduras o vehículos), disposición de los residuos sólidos (recolección y eliminación de residuos sólidos), amenaza a flora y fauna en la comunidad, polución sonora (exposición a ruidos de equipos de sonido, talleres, industrias, cornetas de carros, etc.), presencia de radiaciones ionizantes en la comunidad,

Tabla I. Evaluación ambiental rápida como procedimiento de Vigilancia Ambiental Sorocaima II, Municipio Mariño, estado Aragua - Venezuela.

VARIABLE	Clasificación	Vulnerabilidad de la comunidad	Propensión del medio	Calidad de los servicios públicos	Características de la contaminación
		Existencia o no de enfermedades y riesgo de contaminación ambiental	Si el medio es propenso a la contaminación	Eficiencia de los servicios públicos	Características de toxicidad del ambiente
Enfermedades infecciosas y transmisibles	ALTA (1)	Cuando gran parte de la comunidad está expuesta a un factor de contaminación ambiental. Puede ocurrir cuando la población posee escasa inmunidad protectora y no está informada sobre la relación: disturbios ambientales y la salud	Cuando el medio es muy propenso o si existe contaminación ambiental grave o condiciones para que se verifique un brote epidémico.	Débiles o inexistentes: si no existen organismos públicos para tratar de las cuestiones ambientales y la comunidad no posee acceso a cuidados médicos y realizar reclamos	Muy adversa: si la contaminación potencial o efectiva es insoluble, de difícil o demorada solución por su naturaleza
Contaminación atmosférica					
Disposición residuos sólidos					
Amenaza a flora y fauna	MODERADA (2)	Cuando pocas personas están expuestas a la contaminación ambiental que no representa peligro a su vida. Focos aislados de contaminación ambiental y la comunidad está informada de principios básicos de higiene y saneamiento de la vivienda y ambiente de trabajo.	No hay, pero ya hubo ocurrencia y registros de contaminación ambiental con enfermedades asociadas Hay indicios que pueden volver a ocurrir. El medio puede desequilibrarse bajo alteraciones inducidas por la acción del hombre.	Medianos: Cuando existen servicios públicos, pero insuficientes y la comunidad tiene acceso con dificultad y recibe asistencia parcial a problemas de emergencia.	Moderada: si el daño potencial o efectivo a la salud y al medio es reversible a largo plazo y si existen recursos suficientes para la solución
Polución sonora					
Radiaciones ionizantes					
Vertidos de aguas servidas	BAJA (3)	Cuando la comunidad no está expuesta a contaminación ambiental y posee buenos conocimientos sobre contaminación del medio y su relación con la salud.	No hay o hay muy poca probabilidad, que cambios en el ambiente lo vuelva peligroso a la integridad de las especies y a la salud humana	Buenos: existen instituciones públicas capacitadas con esquema de vigilancia ambiental a través de fiscalización y control sistemático sobre las fuentes de contaminación. Existen canales para hacer reclamos, ser inmunizado, atención primaria y emergencias	Poco adversa: si no hay potencial significativo de contaminación con daño a la salud o al ambiente que sea irreversible y si existen los recursos necesarios para una solución a corto plazo
Lanzamientos efluentes industriales					
Uso plaguicidas					

Fuente: OPS. Manuales Operativos PALTEX.

Tabla II. Evaluación ambiental rápida como procedimiento de Vigilancia Ambiental Sorocaima II, Municipio Mariño, estado Aragua - Venezuela.

VARIABLE	Ptos.	Vulnerabilidad de la comunidad	Propensión del medio	Calidad de los servicios públicos	Características de la contaminación
Enfermedades infecciosas y transmisibles	A=1	Comunidad expuesta a: Diarreas, Dengue Sarampión, gripe, amigdalitis, enferm. transmisibles	Contaminación ambiental grave o condiciones para que ocurra un brote epidémico.	Accesibilidad a servicios médicos públicos.	Permanente situación de brotes epidémicos de enfermedades.
	M=2				
	B=3				
Contaminación atmosférica	A=1	Comunidad expuesta a polvo de construcciones o empresas, humo de quemados o vehículos	Contaminación ambiental grave o condiciones para que ocurra un brote epidémico.	Hay vigilancia ambiental a través de control sistemático sobre las fuentes de contaminación.	Dificultad para solucionar, daño constante a la salud
	M=2				
	B=3				
Disposición residuos sólidos	A=1	El problema de la basura afecta a todos, pocos. No hay problema	Es común ver residuos sólidos en las calles, aceras y terrenos	Aseo pasa cada: 2, 4, 8 días	El problema de la basura es solucionado rápidamente, a mediano tiempo, dura demasiado.
	M=2				
	B=3				
Amenaza a flora y fauna	A=1	Hay conservación de flora y fauna en la comunidad?	Existen amenazas contra la flora y la fauna?	La flora y fauna son protegidos por algún organismo oficial?	Es posible solucionar el problema en breve, mediano, largo plazo?
	M=2				
	B=3				
Polución Sonora	A=1	Exposición a ruidos de equipos de sonido, talleres, industrias, cornetas de carro, etc.	La zona es constantemente asediada de ruidos molestos	Existen y funcionan medios para solucionar el problema?	Es posible solucionar el problema en breve, mediano, largo plazo?
	M=2				
	B=3				
Radiaciones ionizantes	A=1	Exposición de la comunidad a radiaciones	Existen sitios que produzcan radiaciones?	Existe control de lugares con emisión de radiaciones?	Es posible solucionar el problema en breve, mediano, largo plazo?
	M=2				
	B=3				
Derrame superficial de aguas servidas	A=1	La comunidad presenta aguas negras en sus calles, o lugares cercanos?	Es común la contaminación por aguas negras en la comunidad?	Existen y funcionan medios para solucionar el problema?	Es posible solucionar el problema en breve, mediano, largo plazo?
	M=2				
	B=3				
Lanzamientos efluentes industriales	A=1	Existen empresas que pongan en riesgo la salud en la comunidad	Es común la contaminación por efluentes industriales?	Existe control de lugares con emisión de efluentes?	Es posible solucionar el problema en breve, mediano, largo plazo?
	M=2				
	B=3				
Uso plaguicidas	A=1	¿Se usan plaguicidas en la comunidad? ¿conocen los riesgos?	Son usados de tiempo atrás, plaguicidas en la comunidad?	Los contaminados con plaguicidas son atendidos en el ambulatorio?	Es posible solucionar el problema en breve, mediano, largo plazo?
	M=2				
	B=3				

Fuente: OPS. Manuales Operativos PALTEX. A=1 (Alta=1 punto) M=2 (Moderada=2 puntos) B=3 (Baja= 3 puntos)

y su significado se presentan de la siguiente manera: "Grave" (36 a 56 puntos), requiere acciones urgentes. "Con problemas" (57 a 87 puntos), resolver a corto o mediano plazo y "situación positiva", cuando alcanza entre 88 y 108 puntos (Texeira *et al.*, 1996).

RESULTADOS

La comunidad de Sorocaima II obtuvo una puntuación de 83, lo cual nos indica que la misma aparece clasificada "con problemas", que deben ser resueltos a corto o mediano plazo. La vulnerabilidad general de la comunidad es aparentemente "baja" con 55%. Cuando se examinan cada una de las variables, a excepción de la contaminación atmosférica que se presenta como "alta" con 45% de los hogares encuestados otorgándole dicha categoría, las demás variables fueron calificadas con vulnerabilidad "baja", y proporciones entre 42 y 97 por ciento.

Igualmente, cuando fue medida la propensión de la comunidad a la contaminación ambiental, aparte de la contaminación atmosférica que obtuvo 38% y fue clasificada "moderada", las demás variables presentaron una propensión "baja", con proporciones entre 36 y 97 por ciento. Su valor general alcanzó 55% dentro del rango "baja".

Cuando la comunidad fue interrogada sobre la "calidad de los servicios públicos" prestados en el sector de Sorocaima II, tres de las nueve variables a investigar referidas a: contaminación atmosférica, amenaza a la flora y la fauna y polución sonora, fueron calificadas como "alta", o sea, débiles o inexistentes o con deficiencias en cuestiones ambientales y servicios de reclamos. Dados los promedios obtenidos por las demás variables la clasificación general de la comunidad fue de 51%, ubicándosele como "baja".

Las "características de la contaminación" observadas por los habitantes de la localidad obtuvieron una proporción de 52% dentro de la clasificación "baja" y las variables tuvieron valores entre 28 a 97 por ciento. Sin embargo, la contaminación atmosférica dentro del rango de "moderada" alcanzó 34%, siendo la única excepción.

Ante estos resultados se debe hacer la aclaratoria que las proporciones de mayor valor fueron encontradas en las variables radiaciones

ionizantes y efluentes industriales, calificadas como "baja", con 78% y 97% respectivamente, esto debido a que las personas contestaron que no eran problemas para la comunidad, dándoles valores de tres puntos, pues no existen. Dichos valores lógicamente producen una desviación de la proporción hacia resultados superiores. Al eliminar estas dos variables por tal motivo, aunque la comunidad continuó siendo de vulnerabilidad, propensión del medio, calidad de servicios públicos y características de la contaminación "baja", las proporciones disminuyeron considerablemente, aumentando además las cifras para las consideraciones "moderada" y "alta" (Tabla III).

En la búsqueda de explicación al resultado de 83 puntos para la comunidad, aún cuando existen variables con cifras "moderadas" y "altas", fueron sumados los valores correspondientes a cada tipo de "categoría", alcanzados por la variable en las cuatro "condiciones" investigadas, dando como resultado que a excepción de la contaminación atmosférica que obtuvo el mayor valor (37%), en la categoría "alta", con cifras de 30% y 33% para las categorías "moderada" y "baja" respectivamente, las ocho restantes se situaron en porcentajes entre 42 (enfermedades transmisibles) y 89 (radiaciones ionizantes), en la categoría "baja", lo cual hace ascender el resultado definitivo.

DISCUSIÓN

En realidad, aunque los principios y el objetivo de la atención primaria ambiental se remontan a Alma-Ata (OMS, 1978), su definición y aplicación datan de época más reciente. El concepto es nuevo y se relaciona con el proceso real de desarrollo de las naciones y los temas ambientales actuales. La atención primaria ambiental es un proceso en el cual los grupos de personas o comunidades locales se organizan entre ellos mismos, con apoyo externo, para aplicar su conocimiento y pericia técnica a fin de proteger sus recursos y ambiente natural y encontrar al mismo tiempo fuentes para sus necesidades básicas de supervivencia (Borrini, 1990).

En los países en desarrollo, a diferencia de los desarrollados, se observa que las iniciativas de atención primaria ambiental se centran en el crecimiento y la modernización y en la autosostenibilidad antes que en la capacidad humana. Las iniciativas estimulan nuevos

Tabla III. Evaluación ambiental rápida como procedimiento de Vigilancia Ambiental Sorocaima II, Municipio Santiago Mariño, estado Aragua.

VARIABLE	Vulnerabilidad de la comunidad						Propensión del medio						Calidad de los servicios públicos						Características de la contaminación					
	ALTA		MOD		BAJA		ALTA		MOD		BAJA		ALTA		MOD		BAJA		ALTA		MOD		BAJA	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Enfermedades Inf. y Transm.	21	28	23	30	32	42	23	30	26	34	27	36	31	41	14	18	31	41	8	11	31	41	37	42
Contaminación atmosférica	34	45	21	28	21	28	22	29	29	38	25	33	33	43	16	21	27	36	23	30	26	34	27	28
Disposición residuos sólidos	15	20	25	33	36	47	15	20	26	34	35	46	14	18	25	33	37	49	12	16	31	41	33	47
Amenaza aflora y fauna	18	24	17	22	41	54	12	16	13	17	51	67	42	55	11	14	23	30	16	21	27	36	33	54
Polución sonora	26	34	17	22	33	43	23	30	17	22	36	47	32	42	13	17	31	41	22	29	24	32	30	43
Radiaciones ionizantes	0	0	2	2,6	74	97	0	0	2	2,6	74	97	16	21	1	1	59	78	3	4	9	12	64	97
Vaciamiento de aguas servidas	28	37	13	17	35	46	26	34	21	28	29	38	29	38	15	20	32	42	27	36	22	29	27	46
Efluentes industriales	0	0	6	7,9	70	92	0	0	9	12	67	88	13	17	3	4	60	79	4	5	10	13	62	92
Uso plaguicidas	8	11	36	47	32	42	13	17	28	37	35	46	13	17	17	22	46	61	4	5	27	36	45	42
Total	150	22	160	23	374	55	134	20	171	25	379	55	223	33	115	17	346	51	119	17	207	30	358	52
% Ajustada	28		29		43		25		30		45		36		21		43		21		35		44	

trabajos para hombres y mujeres, pero la mayoría reflejan la falta de contacto entre los representantes nacionales y los locales. Además, todavía están estrechamente vinculadas con la atención primaria de la salud, los servicios básicos y el desarrollo de recursos humanos también pesa hacia el lado de los asuntos de salud y enfermedad. Hay una falta general de prioridad para desarrollar la capacidad humana en general y mejorar el ambiente (OPS, 1998).

Los resultados encontrados en la localidad de Sorocaima II en el Municipio Mariño del estado Aragua durante la Evaluación Ambiental Rápida, para la vulnerabilidad de la comunidad, propensión del medio, calidad de los servicios públicos y características de la contaminación fueron de categoría “baja”. Sin embargo, existieron valores de algunas variables (contaminación atmosférica, amenaza a la flora y la fauna y polución sonora), que para cada una de las características investigadas arrojaron calificaciones “altas” o “moderadas”, motivo por el cual su puntaje final de 83 sugiere que dicha comunidad tiene problemas ambientales que deben ser resueltos a corto o mediano plazo. La contaminación atmosférica y la polución sonora fue referida por la mayoría de los habitantes como la emisión de polvo y ruido respectivamente, producidos por vehículos automotores al pasar por las vías principales de la localidad, especialmente en los sectores adyacentes a la Avenida Intercomunal y la calle Luisa Cáceres de Arismendi (Fig. 1), las cuales comunican a esta población con al menos dos municipios vecinos.

En una evaluación similar realizada en la Región Occidental de la Cuenca del Canal de Panamá (Autoridad del Canal de Panamá, 2003), la ponderación de las enfermedades infecciosas fue “alta” desde la perspectiva de vulnerabilidad, propensión del medio, calidad de los servicios públicos y accesibilidad económica y cultural. La evaluación de los residuos sólidos obtuvo una calificación de “moderada” debido a la quema y enterramiento de los residuos. La flora y fauna sufrieron una amenaza “alta” dado el daño ambiental a los bosques, poniendo en peligro la salud de quienes viven en el área. Las aguas servidas fueron un problema de calificación “alta”, por no poseer un tratamiento adecuado y por ser derramadas cerca de las viviendas, lo cual producía contaminación y criaderos de vectores. La falta de conocimiento y de un programa educativo en la comunidad para el uso de insecticidas hizo que esta variable fuera calificada

como “alta” en cuanto a la vulnerabilidad y propensión del medio. En general dicha área fue calificada como de condición “Grave”, requiriendo la realización de acciones urgentes.

Las metas de salud se centran en la equidad para lograr el desarrollo sostenible, mientras que las metas ambientales se centran en el desarrollo sostenible para lograr la equidad. Las metas de salud se basan en la justicia social, cohesión, socialización y continuidad que brinda la responsabilidad social ejercida por generaciones. Las metas ambientales se basan en la sostenibilidad, el desarrollo económico y los derechos ambientales de las especies humanas y no humanas (Brown, 1994).

Según los artículos 127, 128 y 129 de la Constitución de la República Bolivariana de Venezuela, es un derecho y un deber de cada generación proteger y mantener el ambiente en beneficio de sí misma y del mundo futuro, de una vida y de un ambiente seguro, sano y ecológicamente equilibrado. El Estado protegerá el ambiente, la diversidad biológica, genética, los procesos ecológicos y con la activa participación de la sociedad, garantizará que la población se desenvuelva en un ambiente libre de contaminación, en donde el aire, el agua, los suelos, las costas, el clima, la capa de ozono, las especies vivas, sean especialmente protegidos. Además el Estado desarrollará una política de ordenación del territorio atendiendo a las realidades ecológicas, geográficas, poblacionales, sociales, culturales, económicas, políticas, de acuerdo con las premisas del desarrollo sustentable, que incluya la información, consulta y participación ciudadana. Refiere también que, todas las actividades susceptibles de generar daños a los ecosistemas deben ser previamente acompañadas de estudios de impacto ambiental y socio cultural y se impedirá la entrada al país de desechos tóxicos y peligrosos, así como la fabricación y uso de armas nucleares, químicas y biológicas.

En Sorocaima II y en cualquier localidad evaluada, la identificación geográfica de áreas de mayor riesgo ambiental, la estimación de la magnitud de los disturbios y la asociación de estos datos con el perfil de salud de la población llevará a la adopción de estrategias locales de vigilancia ambiental para la solución final de sus problemas (Texeira *et al.*, 1996). Aunque su resultado significa que la comunidad no está expuesta a contaminación, que existe poca

probabilidad de cambios en el ambiente en contra de la salud humana y que sus instituciones públicas prestan buenos servicios; aparecen variables como “contaminación atmosférica”, “amenaza a la flora y fauna”, y “polución sonora”, cuyos valores individuales deberían ser analizados y tratados para consolidar una mejor calidad de vida de la comunidad. Es de imperiosa necesidad el hacer mantenimiento y limpieza de las calles de la localidad, especialmente después de las lluvias y al término de nuevas construcciones, cuando se observa el desplazamiento de residuos sólidos y arena en las mismas, que ocasionan contaminación y posiblemente sean la causa de la gran morbilidad de enfermedades del sistema respiratorio. También se podría pensar en la colocación de barreras en las avenidas que limiten la velocidad de los vehículos que las transitan y la protección por medios oficiales de la flora y la fauna en la comunidad. Se debe pensar como factor importante en la necesidad de la participación de la población y del personal de salud en la solución de dichos problemas. En la base de la investigación y solución, está el concepto de autodeterminación lo cual significa que son las personas directamente interesadas el factor principal de desarrollo social y económico en un determinado contexto (Borrini G., 1991).

Rapid environmental evaluation as a procedure of environmental surveillance at Sorocaima II, municipio Mariño, state Aragua, Venezuela

SUMMARY

A rapid environmental evaluation was carried out during 2006 in 76 dwellings in the locality of Sorocaima II, Municipality of Santiago Mariño, Aragua State, to learn its environmental conditions. The vulnerability, the condition of the environment, the quality of public services and the characteristics of the contamination were evaluated. A score of 83 points suggests that this is a community “with problems” even though close to the values of a “positive situation” meaning that it is not exposed to contamination, that there is little probability of environmental changes adverse to human health and that public institutions give good service. However, moderate and high scores for some variables such as air pollution, noise pollution, and the threat to flora and fauna make their treatment necessary to

consolidate a better quality of life of the community, by means of protection by official means of flora and fauna in the locality, the cleaning and maintenance of roads after the winter season and at the end of new construction because the displacement of solid residues cause contamination and possibly are the cause of morbidity from diseases of the respiratory system.

Key words: Fast environmental evaluation, vulnerability, propensity of the environment, quality of Public Services, contamination, Sorocaima II, Aragua state, Venezuela.

REFERENCIAS

- Autoridad del Canal de Panamá (2003). Recopilación y presentación de datos socioeconómicos de la Región Occidental de la Cuenca del Canal de Panamá. URS-D&M/IRG/GA. 171 pág. www.pancanal.com/ (Consulta 11/08/06).
- Beaglehole R., Bonita R. & Kjellström T. (1996). Nociones de Estadística. En: *Epidemiología Básica*. pp 59-74. 2a. Ed. OPS. Washington, D.C., USA.
- Borrini G. (1991). Participatory rapid appraisal: its application in some urban squatter communities, Salvador, Bahia (Brazil). *La Medicina Tropical nella Cooperazione allo Sviluppo*. 7: 19-30.
- Borrini G. (1990). Lessons learned in community-based environmental management: *Proceedings of the Primary Environmental Care Workshop*. Rome, Istituto Superiore di Sanità. 246 pp.
- Brown V. (1994). Health and environment. pp 1-10. En: *Ecological public health: From vision to practice*. Eds. Chu C. & Simpson R. Center for Health Promotion. Toronto, Canada.
- González M. & Nagel J. (1996). La problemática ambiental en Venezuela. *Revista electrónica bilingüe* N° 7. www.analitica.com/ (Consulta 10/08/06).
- OMS (1978). Declaración de Alma-Ata. pp 3-4. En: *Alma-Ata 1978: Atención primaria de salud. Informe de la Conferencia Internacional*

Evaluación para la vigilancia ambiental

sobre Atención Primaria de Salud. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, Suiza.

OPS (1998). Atención primaria ambiental para el siglo XXI. *Rev. Panam. Salud Pública*. 4: 87.

Texeira P., Pompeia S., Cúneo C., Borrás C., Zepeda F. & Novaes H. (1996). *Manual sobre Vigilancia Ambiental*. OPS. Serie HSP-UNI/Manuales Operativos PALTEX, 4, 12; 105.

Urrutia R., Parra O. & Acuña A. (2003). *Los recursos hídricos: Una perspectiva global e integral*. Colección: Educar para el Ambiente. Manual para el docente. Proyecto INET-GTZ. Argentina.

Recibido el 24/11/2006
Aceptado el 30/03/2007

Nota Científica

DNA degradation of *Anopheles darlingi* collected at high relative humidity and preserved in isopropanol

José Rivero¹, Normig Zoghbi¹, Yasmin Rubio-Palis^{1,2}, Ludmel Urdaneta³ & Flor Herrera^{1*}

Anopheles darlingi mosquitoes, exposed to variable relative humidity (RH) in the field, were preserved during transportation to the laboratory using two different methods: 100% isopropanol at ambient temperature or frozen in liquid nitrogen or dry ice. The DNA isolated from samples collected at RH greater than 91% and preserved in isopropanol was degraded, while DNA isolated from insects kept in liquid nitrogen or dry ice maintained its integrity when collected under conditions of up to 95% RH.

Key words: *Anopheles darlingi*; relative humidity; mosquito preservation; DNA integrity, mosquito transportation.

The preservation of DNA from insects is an essential prerequisite in using molecular biology techniques for taxonomy, evolutionary, and population genetic studies (Copeland *et al.*, 1992, *J. Med. Entomol.* **29**: 361-363; Cooper, 1998, *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **14**: 58-60). Ideally, insect samples should be transported from the field to the laboratory, either alive or frozen, using liquid nitrogen or dry ice. Endemic regions, however, present problems for efficient transportation of insect material. For example, time consumed during transportation may result in high mortality and thus the degradation of fragile insects like mosquitoes. Similarly, the use of dry ice or liquid

nitrogen to preserve the samples is convenient only for collection trips of limited duration, because of the non-availability of liquid nitrogen or dry ice in rural areas of developing countries. Thus, the possible use of anhydrous isopropanol (Post *et al.*, 1993, *Biochem. Syst. Ecol.* **21**: 85-92) to preserve the samples in the field is an attractive possibility for facilitating the transportation of insects from distant and isolated localities to the laboratory. Here we report on an investigation into this procedure as applied to genetic studies of the mosquito *Anopheles darlingi*, the primary malaria vector in Venezuela. This insect is mainly localized in the southern states of Bolívar and Amazon. Since these localities are very far away (approximately 900 km) from our laboratory, we decided to collect and preserve wild-caught *An. darlingi* in 100% isopropanol (HPLC solvent) for transportation to the laboratory.

Mosquitoes from the areas of Puerto Fortín, Corobal, El Banco and El Piñal of Bolívar State were trapped alive using a mouth aspirator, transferred to a container, and killed by freezing. Some of the

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Sede Aragua. Dirección Postal: Apartado 2351, Maracay, Aragua.

² Dirección de Salud Ambiental y Contraloría Sanitaria, Ministerio de Salud y Desarrollo Social, Maracay, Aragua, Venezuela.

³ Department of Microbiology, Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA.

*Autor de Correspondencia: flormhq@gmail.com

mosquitoes were immediately placed in 1.5-mL microcentrifuge tubes containing approximately 1 mL of isopropanol, transported to the laboratory at ambient temperature (25-30°C), and finally stored at -80°C. The rest of the mosquitoes were placed in cryotubes (1.5 mL each) and brought to the laboratory in liquid nitrogen or dry ice. For isolation of DNA, an individual mosquito was macerated with a plastic pestle in a pH 8.0 buffer containing 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS. The DNA was then extracted using a phenol/chloroform method according to standard procedures modified by Rivero *et al.* (2004, *Intl. J. Trop. Insect Sci.* **24**: 266-269), resuspended in 60 μ L of sterilized water and stored at -80°C. The DNA was then separated on 1% agarose gels by electrophoresis and visualized by staining in an ethidium bromide solution.

The majority of the DNA samples obtained from *An. darlingi* stored in isopropanol were degraded (Fig. 1). As high relative humidity (RH), characteristic of the Bolivar State, may cause DNA degradation, we decided to investigate the role of variable RH

Fig. 1. Quality of *Anopheles darlingi* DNA preserved in isopropanol and collected from different localities of Bolivar State. Ethidium-bromide-stained agarose gel of 1 μ g of DNA from *An. darlingi* adult mosquitoes. The electrophoresis was performed with 16 different mosquito samples. Lanes 1-4 are samples from Puerto Fortin, Lanes 5-8 are samples from Corobal, Lanes 9-12 are samples from El Banco, Lanes 13-16 are samples from El Piñal. Lane M corresponds to base pairs markers (Lambda DNA Hind III markers from Promega) with the markers (bp) as indicated.

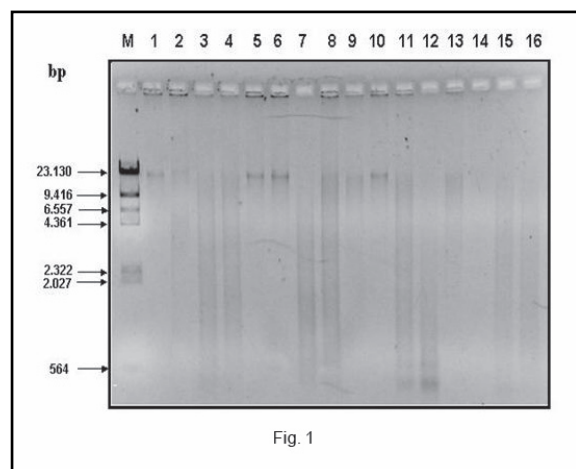


Fig. 1

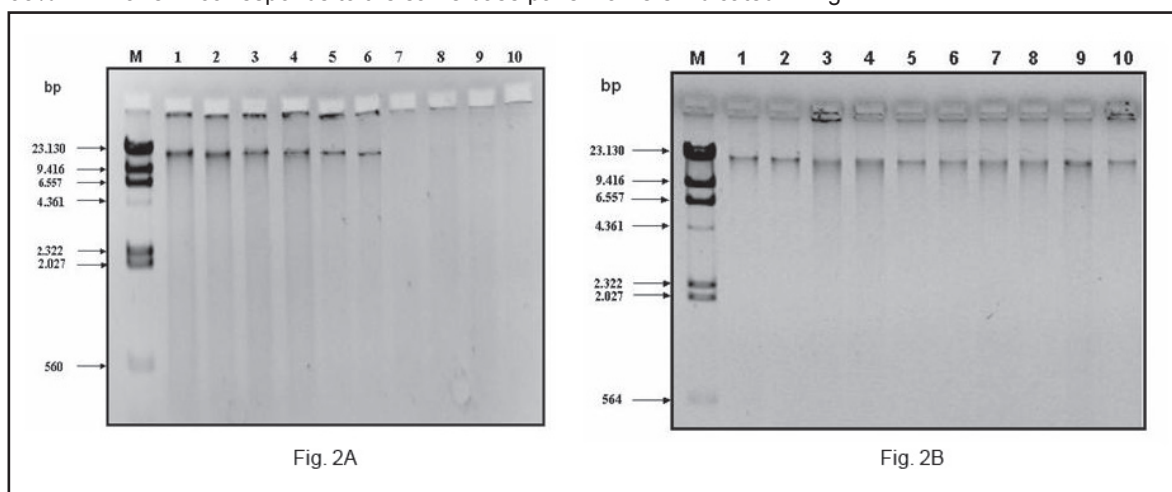
in the observed degradation of the insect DNA. For this study, mosquitoes were trapped and killed as described above and then exposed to RH in the field at two different intervals (0 and 30 min) prior to placing them in isopropanol. For comparison, a duplicate set of mosquitoes that were similarly exposed to RH were placed in cryotubes for transportation in liquid nitrogen or dry ice and subsequently stored at -80°C in the laboratory. As can be seen (Fig. 2A), a RH greater than 91% affects the quality of the DNA extracted from samples preserved in isopropanol (lanes 7-10) even at 0 time, when the mosquitoes are freshly killed (lanes 7 and 9). In contrast (Fig. 2B), DNA isolated from samples kept in liquid nitrogen maintained its integrity at levels of RH up to 95% at both intervals (lanes 7-10). The isopropanol's effects on DNA structure were present even at lower RH. Figure 2A (lanes 1-6) shows a small degradation smear below the major band of DNA. Dean & Ballard (2001, *Entomologia Experimentalis et Applicata.* **98**: 279-283) also observed that DNA yields extracted from *Drosophila simulans* specimens exposed to alcohol were poor. They argued that the hygroscopic nature of alcohol set up a moist environment to facilitate the action of DNA-damaging nucleases on insect cells.

The quality of the DNA from samples either preserved in liquid nitrogen at 95% RH or collected in isopropanol at lower RH was confirmed by PCR-amplification of specific DNA fragments. In both cases, the amplicons obtained were similar in quantity and quality (data not shown).

The catalytic activity of some endonucleases is strictly dependent on divalent cation-water cluster (Cowan, 1998, *Inorg. Chim. Acta.* **275-276**: 24-27; Miller *et al.*, 1999, *J. Mol. Biol.* **288**: 975-987; Truglio *et al.*, 2005, *EMBO J.* **24**: 885-894; Chen *et al.*, 2007, *Biopolymers.* **85**: 241-252). In some cases amino acid residues of the active site of the enzyme and several water molecules are located around the metal atom forming part of a coordinated octahedron-like complex (Miller *et al.*, 1999, *J. Mol. Biol.* **288**: 975-987; Truglio *et al.*, 2005, *EMBO J.* **24**: 885-894).

Our results are consistent with the hypothesis that the catalytic activity of one (or more) *An. darlingi* endonuclease is dependent upon a metal ion-water cluster interacting with the active site of the enzyme. According to this idea, water introduced into anhydrous isopropanol at 91% RH promotes the activation of a

Fig. 2: Comparison of *An. darlingi* DNA from mosquitoes preserved in isopropanol or liquid N2 as a function of the RH. Ethidium-bromide-stained agarose gel of DNA from *An. darlingi* adult mosquitoes. The electrophoresis was performed with different mosquitoes from Corobal. (A) Samples preserved in isopropanol were collected, exposed at the ambient RH for 0 and 30 min and placed in isopropanol as described in the text. The first and second lanes of each experiment represent the 0 and 30 min respectively. Lanes 1-2 at 87% RH, lanes 3-4 at 89% RH, lanes 5-6 at 91% RH, lanes 7-8 at 93% RH, lanes 9-10 at 95% RH. (B) Samples preserved in liquid N2 were collected, exposed at the ambient RH for 0 and 30 min and placed in liquid N2 as described in the text. Lanes 1-2 at 87% RH, lanes 3-4 at 89% RH, lanes 5-6 at 91% RH, lanes 7-8 at 93% RH, lanes 9-10 at 95% RH. Lane M corresponds to the same base pairs markers indicated in Fig. 1.



mosquito endonuclease that now is able to cleave DNA in ambient conditions.

The preservation of mosquitoes in isopropanol in the field clearly offers several advantages: it is simple, inexpensive, and facilitates easy transportation to the laboratory. However, this study strongly suggests that this method (using a highly pure isopropanol) is convenient only in regions where the RH does not exceed a value of 91%. In these cases, the traditional methods of preservation (liquid nitrogen or dry ice) should be used since they guarantee the stability of the samples for prolonged period of time so that the resulting isolated DNA from the insects is suitable for PCR-based techniques.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr. Heriberto Correia and Lic. Rafael Medina for helpful discussions and to Victor Sánchez and Hernán Guzmán for collecting the samples. This research was supported in part by the Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Investigación, by the Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico-Universidad de Carabobo and by the Proyecto Control de Enfermedades Endémicas-Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldón”.

Degradación de ADN de *Anopheles darlingi* colectados a una humedad relativa alta y preservados en isopropanol

RESUMEN

Mosquitos *Anopheles darlingi*, expuestos a humedades relativas diferentes en campo, fueron transportados al laboratorio utilizando dos métodos distintos: isopropanol al 100% a temperatura ambiente o congelados en nitrógeno líquido o hielo seco. El ADN aislado de las muestras colectadas a humedades relativas mayores que 91% y preservadas en isopropanol se degradó; mientras que el ADN aislado de insectos colectados a humedades relativas hasta 95% y transportados congelados, mantuvieron su integridad.

Palabras claves: integridad de ADN, *Anopheles darlingi*, transporte de mosquitos, preservación de mosquitos.

Recibido el 01/02/2007
Aceptado el 12/03/2007

Revista de revistas

□ POVOA M. M., SOUSA R. T. L., LACERDA R. N. L., SANTA ROSA E., GALIZA D., SOUZA J. R., WIRTZ R.A., SCHLICHTING C. D. & CONN J. E. (2006). **The importance of *Anopheles albitarsis* E. and *An. darlingi* in human malaria transmission in Boa Vista, state of Roraima, Brazil.** (Importancia de *Anopheles albitarsis* E. y *An. darlingi* in la transmission de malaria humana en Boa Vista, estado de Roraima, Brasil). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **101**: 163-168.

Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará, Brasil.
jconn@wadsworth.org

En varios distritos de Boa Vista, estado de Roraima, Brasil, se ha encontrado que el vector principal de los parásitos maláricos es *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* E., el cual fue significativamente ($P < 0.001$) más abundante que *An. darlingi* durante el período 2001-2002. Otras especies colectadas fueron *An. (Nys.) braziliensis*, *An. (Ano.) peryassui*, *An. (Nys.) nuneztovari*, *An. (Nys.) oswaldoi* s.l. y *An. (Nys.) triannulatus*. Mediante el ensayo de ELISA se determinó que *An. darlingi* tenía la tasa de infección total más alta (2.1%) comparada con *An. albitarsis* E. (1.2%). Sin embargo, una proporción marginalmente mayor estaba infectada con *Plasmodium vivax* comparado con *An. darlingi*, y el índice de picada de *An. albitarsis* E. también fue mucho mayor. Estos resultados sugieren la importancia de *An. albitarsis* E. en la transmisión de malaria en la ecoregión de sabana en el norte de la Amazonía brasilera, y reconfirma la importancia de *An. darlingi* aún en bajas densidades.

□ HERNÁNDEZ D., ROJAS E., SCORZA J.V. & JORQUERA A. (2006). **Infectividad del perro (*Canis familiaris*) para *Lutzomyia youngi* en Trujillo, Venezuela.** [Dog (*Canis familiaris*) infectivity to

Lutzomyia youngi in Trujillo, Venezuela]. *Biomedica*. **26 (Suppl 1)**: 242-248.

Instituto Experimental "José Witremundo Torrealba", Núcleo Universitario Rafael Rangel, Universidad de Los Andes, Trujillo, Venezuela; Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, Barcelona, Venezuela.

Introducción. En Trujillo, Venezuela, la prevalencia de Leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) es de 38 por 100.000 habitantes. **Objetivo.** En una localidad periurbana, rural, de la ciudad capital, estudiamos a los perros caseros (*Canis familiaris*) para investigar mediante la técnica de xenodiagnóstico la eventual capacidad para infectar a *Lutzomyia youngi*, especie flebotomina con actividad vectorial intradomiciliaria comprobada y abundante en el área de estudio. **Materiales y métodos.** Los perros con lesiones sugestivas de LTA, parasitológicamente diagnosticados, fueron seleccionados para el xenodiagnóstico permitiendo a flebótomos silvestres de una zona libre de LTA alimentarse ad libitum sobre toda la superficie corporal de cada animal, y evidenciar, en disecciones efectuadas a los 5 días post-ingesta, la posible presencia de flagelados en sus tractos digestivos, en cuyo caso, fueron evaluados por la técnica PCR-Multiplex para determinar la identidad del parásito. **Resultados.** Un total de 455 flebótomos se ingurgitaron sobre dos perros en tres evaluaciones distintas; en una única ocasión, se observaron promastigotes en 4 (0,88%) insectos, cuya identificación molecular reveló pertenecían al subgénero *Viannia*. **Conclusión.** El perro casero constituye un potencial factor de riesgo intradomiciliario en el ciclo de la LTA.

□ WIDE A, CAPALDO J, ZERPA N, PABON R, NODA A, NOYA B, GONZÁLEZ J, NOYA O. (2006). **Sharing of antigens between *Plasmodium***

***falciparum* and *Anopheles albimanus*.** (Antígenos compartidos entre *Plasmodium falciparum* and *Anopheles albimanus*). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **48**: 327-32.

Cátedra de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Escuela de Medicina Luiz Razetti, Universidad Central de Venezuela; Fundación Instituto de Estudios Avanzados; Laboratorio para Estudios sobre Malaria, Instituto de Altos Estudios en Salud Pública "Dr. Arnoldo Gabaldon" e Instituto Nacional de Higiene. Ministerio de Salud, Caracas, Venezuela. albina_wide@yahoo.com

Epítopes de antígenos compartidos entre *Plasmodium falciparum* y *Anopheles albimanus* fueron identificados. Diferentes grupos de conejos fueron inmunizados con: extracto crudo de mosquito hembra de *An. albimanus* (EAaH), glóbulos rojos infectados con *P. falciparum* (EPfs) y la vacuna antimalárica sintética SPf66. Los anticuerpos policlonales producidos en conejos fueron evaluados por ELISA, inmunoensayo simultáneo de múltiples antígenos (MABA) e Immunoblotting. Todos los extractos resultaron inmunogénicos cuando se evaluaron por ELISA, MABA e Immunoblotting. Diez moléculas fueron identificadas en los antígenos de mosquitos hembras y diez en los de *P. falciparum* por los sueros autólogos. El patrón electroforético por SDS-EGPA fue diferente para los tres antígenos evaluados. La reactividad cruzada de moléculas entre *An. albimanus* y *P. falciparum* fue demostrada por ELISA, MABA e Immunoblotting. Anticuerpos anti-*P. falciparum* y anti-SPf66 reconocieron diez y cinco componentes respectivamente en el extracto crudo de anofelinos (EAaH). Asimismo, sueros inmunes contra *An. albimanus* hembra identificaron cuatro moléculas en el extracto del antígeno de *P. falciparum*. Hasta el presente, este es el primer estudio en el que se demuestra la presencia de antígenos compartidos entre anofelinos y los parásitos de malaria. Este hallazgo podría ser de relevancia para el diagnóstico, vacunas e interpretación de la fisiopatología de la respuesta inmunitaria en malaria.

□ SERRANO-MARTÍN X., PAYARES G. & MENDOZA-LEÓN A. (2006). **Glibenclamida, a blocker of K⁺(ATP) channels, shows antileishmanial activity in experimental murine cutaneous leishmaniasis.** (Glibenclamida, un bloqueador de canales de k⁺ dependiente de ATP, muestra actividad leishmanicida sobre *Leishmaniasis* cutánea experimental en murino). *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 4214-4216.

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Parásitos, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Apartado 47577, Caracas 1041A, Venezuela.

Glibenclamida reduce el crecimiento de la lesión en ratones BALB/c infectados con *Leishmania* (*Leishmania*) mexicana, el efecto fue dosis dependiente, y la dosis mas alta fue más efectiva que glucantime. Resistencia cruzada a glucantime se encontró en animales infectados con una línea resistente a glibenclamida, pero la terapia combinada reduce la progresión de la lesión aún en la cepa resistente a glibenclamida.

□ MAGRIS M., RUBIO-PALIS Y., ALEXANDER N., RUÍZ B., GALVÁN N., FRIAS D., BLANCO M. & LINES J. (2007). **Community-randomized trial of lambdacyhalothrin-treated hammock nets for malaria control in Yanomami communities in the Amazon region of Venezuela.** (Ensayo comunitario y aleatorizado con mosquiteros para hamaca tratados con lambdacyhalotrina para el control de la malaria, en comunidades Yanomami en la región amazónica de Venezuela). *Trop. Med. Int. Health*, **12**: 392-403.

CAICET, Ministerio de Salud. Puerto Ayacucho, Venezuela. magris@reacciun.ve

Se condujo un ensayo comunitario, aleatorizado y controlado, en un área con transmisión de malaria moderada en la región amazónica del sur de Venezuela y hogar del grupo étnico indígena Yanomami. El objetivo era comparar las tasas de incidencia de malaria en los poblados utilizando mosquiteros para hamacas impregnados con lambdacyhalotrina (MHIL) o con mosquiteros para hamaca sin tratar (placebo) (MHIP). Se mantuvo una vigilancia intensiva en ambos brazos del estudio para la detección temprana de casos, administrándose rápidamente tratamiento. Los datos de base se recolectaron antes de la intervención y se siguió durante dos años a una población de aproximadamente 924 Yanomami. A pesar de la reciente introducción de mosquiteros en los poblados Yanomami, y de las condiciones naturales adversas en el área, los mosquiteros fueron aceptados con entusiasmo por la población de estudio, siendo utilizados de forma concienzuda y bien cuidados. Las tasas de incidencia de malaria por mil habitantes fue de 114.6 en el grupo MHIL y de 186.8 en el grupo MHIP. Las razones de tasas ajustadas indicaron que los MHIL provenían 56% (IRR: 0.44, 95% IC: 52-59%) de los nuevos

casos de malaria. Los MHIL reducían la prevalencia de parasitemia en 83% (RR: 0.17, 95% IC: 47-100%), de acuerdo a un corte transversal realizado durante la época de alta transmisión. La prevalencia de esplenomegalia y anemia era muy baja al inicio del estudio para detectar cualquier reducción debido al uso de los MHIL. La principal conclusión del estudio es que los MHIL pueden reducir la incidencia de malaria en el área y que se trata del método más factible para el control de malaria en un área selvática donde los poblados indígenas están dispersos en un amplio territorio. Este es el primer ensayo epidemiológico realizado a nivel comunitario que demuestre que los MHIL son altamente efectivos contra la malaria transmitida por *Anopheles darlingi*.

□ SANCHEZ-MARTIN M. J., FELICIANGELI M. D., CAMPBELL-LENDRUM D. & R. DAVIES C. (2006). **Could the Chagas disease elimination programme in Venezuela be compromised by reinvasion of houses by sylvatic *Rhodnius prolixus* bug populations?** (Podría el programa de eliminación de la Enfermedad de Chagas ser obstaculizado por la reinvasión de las viviendas por poblaciones selváticas de *Rhodnius prolixus*?). *Trop. Med. Int. Health.* **11**: 1585-1593.

Department of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK; Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela. msanchezmartin@yahoo.com

La iniciativa del Pacto Andino (1997) comprometió los países Andinos a la eliminación de la transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas para el año 2010 por medio de rociamientos con insecticidas residuales a gran escala. En Venezuela este propósito podría ser obstaculizado por la reinvasión de las viviendas por parte de las poblaciones del principal vector *Rhodnius prolixus* que habitan en las palmas. Para comprobar esta hipótesis se realizó un análisis multivariado de regresión logística de factores de riesgo de reinfestación y colonización en 552 casas y 1068 anexos peridomésticos en el estado Barinas. Después de ajustar para otros factores de riesgo, incluyendo los techos de palmas, la infestación y colonización de los anexos (y en cierto grado, de las casas) por parte de *R. prolixus*, resultaron asociadas significativamente con la proximidad a altas densidades de las palmas *Attalea butyracea*. La infestación y la colonización de las casas también estuvieron positivamente asociadas a la densidad de triatominos en los anexos peridomésticos, a la

presencia de chiqueros y de nidos de aves de corral. Por lo tanto las poblaciones de *R. prolixus* en anexos rociados precariamente podrían ser también una fuente importante de las reinfestaciones domésticas. El vector secundario *Triatoma maculata* estuvo principalmente asociado a la presencia de nidos de aves de corral dentro y fuera de las casas.

□ MAGRIS M., RUBIO-PALIS Y., MENARES C. & VILLEGAS L. (2007). **Vector bionomics and malaria transmission in the Upper Orinoco River, Southern Venezuela.** (Bionomía de vectores y transmisión de malaria en el Río Alto Orinoco, sur de Venezuela). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **102**: 303-311.

CAICET, Ministerio de Salud. Puerto Ayacucho, Venezuela. rubiopalis@yahoo.com

Se realizó un estudio epidemiológico y entomológico longitudinal en Ocamo, río Alto Orinoco entre Enero 1994 y Febrero 1995 a fin de entender la dinámica de la transmisión de malaria en esta área. La transmisión de malaria ocurre durante todo el año con un pico en Junio durante la época de lluvias. El Índice Parasitario Anual fue de 1279 por 1000 habitantes en riesgo. La infecciones debidas a *P. falciparum* alcanzaron el 64% de todas las infecciones, *P. vivax* 28% y *P. malariae* 4%. Se diagnosticaron infecciones mixtas *P. falciparum/P. vivax* en 15 personas, representando 4% del total de casos. En niños menores de 10 años se reportaron 58% de casos; el riesgo de contraer malaria en este grupo etario era 77% mayor que en aquellas personas en el grupo de mayores de 50 años. *Anopheles darlingi* fue la especie de anofelino predominante con un pico de actividad hematofágica entre media noche y el amanecer. La correlación entre la incidencia de malaria mensual y el número de *An. darlingi* capturado resultó significativa. No se encontró relación significativa entre el número promedio mensual capturado de *An. darlingi* y la precipitación, ni entre la incidencia y la precipitación. Se analizaron un total de 7295 anofelinos mediante ELISA para detección de proteína circunsporozoito (CS) de *Plasmodium*. Sólo 55 *An. darlingi* resultaron positivos a proteína CS de *P. falciparum* (0.42%), *P. malariae* (0.25%) and *P. vivax*-247 (0.1%). La tasa entomológica de inoculación total fue de 129 picadas positivas/persona/año. Este estudio fue el primer estudio longitudinal entomológico y epidemiológico realizado en esta área y sentó las bases para la intervención posterior con mosquiteros tratados con insecticidas.

□ DE ALMEIDA M.A., FERREIRA M.B., PLANCHART S., TERASHIMA A., MACO V., MARCOS L., GOTUZZO E., SÁNCHEZ E., NÁQUIRA C., SCORZA J.V., INCANI RN. (2007). **Preliminary antigenic characterisation of an adult worm vomit preparation of *Fasciola hepatica* by infected human sera.** (Caracterización antigénica preliminar de un preparado de vómito de verme adulto de *Fasciola hepatica* por sueros humanos infectados). *Rev. Inst. Med. Trop São Paulo.* **49:** 31-5.

Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela; Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú; Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú; Centro de Investigaciones "José Witremundo Torrealba", Universidad de los Andes, Trujillo, Venezuela.

La fascioliasis es una enfermedad emergente/re-emergente transmitida por vectores con una muy conocida amplia distribución. Existen aproximadamente 17 millones de personas infectadas en todo el mundo, siendo la región andina el área más afectada. Se hace necesario desarrollar herramientas diagnósticas sensibles y específicas para tratar rápidamente a los pacientes y así evitar complicaciones. En este trabajo evaluamos la respuesta inmune de seres humanos infectados comparando dos preparados antigénicos: extracto soluble total (FhTSE) y vómito (FhAWV) del verme adulto a fin de identificar las fracciones antigénicas específicas para *Fasciola hepatica*. Ambas preparaciones fueron procesadas por SDS-PAGE y Western blot con los sueros de humanos portadores de fascioliasis (F), otras parasitosis e individuos sanos. En el inmunoblot de FhTSE, los sueros F reconocieron 16 bandas con PM entre 8 y 110 kDa, de las cuales las de 8, 9, 10, 38, 45 y 57 kDa fueron específicas. En la preparación de FhAWV, los sueros F reconocieron 9 bandas con PM entre 8 y 85 kDa, de las cuales las de 8, 12, 15 y 24 kDa resultaron específicas. Algunas bandas con reacción cruzada fueron evidentes con los sueros de pacientes con otras parasitosis, más frecuente con el FhTSE. Las bandas dentro de los PM mencionados, particularmente la de 8 kDa, mostraron ser específicas por otros autores y merecen una caracterización adicional para su uso potencial en el diagnóstico inmunológico.

□ ZERPA O., ULRICH M., BLANCO B., POLEGRE M., AVILAA., MATOS N., MENDOZA I., PRATLONG F., RAVEL C. & CONVIT J. (2007). **Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses.** (La leishmaniasis cutánea difusa responde

a miltefosina, pero con posterior recaída). *Br. J. Dermatol.* **156:** 1328-1335.

Instituto de Biomedicina, Ministerio de Salud, Universidad Central de Venezuela, Esq. San Nicolás, San José, Caracas, Venezuela. ozerpa@movistar.net.ve

Introducción: La leishmaniasis cutánea difusa (LCD), aunque rara, es altamente incapacitante. Hasta el momento no hay tratamiento exitoso para esta infección protozoaria progresiva, la cual está asociada a la ausencia de inmunidad específica mediada por células (IMC) a *Leishmania*. La enfermedad comparte características con la leishmaniasis visceral (LV), incluyendo inactividad específica mediada por células de IMC durante la enfermedad activa y una pesada carga parasitaria, pero la LV responde bien al tratamiento. La miltefosina es la primera droga administrada oralmente que ha mostrado eficacia en el tratamiento de la LV; ésta no ha sido adecuadamente evaluada para el tratamiento de la LCD. **Objetivos.** Evaluar la eficacia de la miltefosina en el tratamiento de la LCD, utilizando criterios clínicos, parasitológicos, histopatológicos e inmunológicos. **Métodos.** Dieciséis pacientes con LCD fueron tratados con miltefosina, 2,0-2,5 mg /kg (-1) diariamente, por periodos variables de tiempo (75-218 días). Los pacientes fueron hospitalizados durante el primer mes y evaluados cada 2 semanas hasta finalizar el tratamiento con laboratorio de rutina, química, porcentaje de mejora clínica, presencia de parásitos en piel, crecimiento de parásitos en medios de cultivos, características histopatológicas de los granulomas, efectos colaterales adversos y reactividad a la prueba de leishmanina. Ulteriores ciclos de tratamiento fueron administrados en algunos de estos pacientes, particularmente cuando la suspensión del tratamiento fue seguida de recaídas. **Resultados.** A partir de 15 días después del inicio del tratamiento, los pacientes mostraron una dramática mejora clínica y reducción de la carga parasitaria mientras se mantuvo el tratamiento. Para el día 45, 15 pacientes mostraron 80-90% de mejora clínica. No obstante, la suspensión del tratamiento fue seguida del desarrollo de nuevas lesiones en todos, excepto un paciente. Se observó que la inoculación en hamsters fue la técnica más sensible para detectar la persistencia de los parásitos. Los efectos adversos fueron muy discretos. **Conclusiones.** La miltefosina produce una respuesta clínica y parasitológica dramática en pacientes con LCD y la mejora continua durante la administración de la droga, pero, con una sola excepción, todos los pacientes presentaron nuevas lesiones después de la suspensión del tratamiento. No hubo evidencia histológica o antigénica por la prueba de leishmanina que sugiriera el desarrollo de IMC durante el tratamiento, lo cual puede ser un criterio indispensable para la evaluación de drogas potencialmente efectivas para LCD.

Noticias

❑ XVIII CONGRESO DE LA FEDERACIÓN LATINOAMERICANA DE PARASITOLOGÍA (FLAP)

(Hotel Hilton, Porlamar, Isla de Margarita, Venezuela, 21-25 de Octubre 2007)

www.flap2007.com

La Federación Latinoamericana de Parasitología (FLAP) se fundó el 6 de Septiembre de 1963 por decisión unánime de los representantes de todas las delegaciones Latinoamericanas asistentes a los VII Congresos Internacionales de Medicina Tropical y Malaria celebrados en Río de Janeiro, Brasil.

Son objetivos de la FLAP:

1. Aproximar a todos los estudiosos de la Parasitología en Latinoamérica;
2. Fomentar y contribuir al estudio, progreso e intercambio de conocimientos de la especialidad en América Latina;
3. Mantener contacto activo con todos los organismos interesados en parasitología y toda especialidad que se relacione con ella;
4. Propugnar el concepto de la especialidad y su inclusión en el Currículum Universitario en los países donde todavía no hubiera sido hecha;
5. Afiliarse a la Federación Mundial de Parasitólogos.
6. La FLAP no tiene por finalidad obtener beneficio lucrativo alguno.

La FLAP celebra cada dos años un Congreso que reúne sus miembros, investigadores latinoamericanos, e invitados de otros países,

especialistas en las diferentes disciplinas que convergen en el estudio de las parasitosis humanas y animales, para la presentación y discusión de los adelantos en los conocimientos sobre diferentes tópicos que contribuyen a su entendimiento, prevención y control.

Tópicos:

Bioquímica, Proteómica, Genómica, Inmunoparasitología, Biología Celular, Biología Molecular, Inmunología, Diagnóstico, Clínica Patológica, Quimioterapia, Vacunas, Relación Parásito-Vector, Epidemiología, Parásitos – Embarazos e Infecciones congénitas, Parasitología pediátrica, Dermatología Parasitaria, Sistemas de Información geográfica, Ecología y Control de los vectores, Aspectos Sociales de las enfermedades parasitarias y la Enseñanza de la Parasitología son los tópicos generales que más de 80 invitados, nacionales e internacionales, expondrán y discutirán en este evento a través de Conferencias y Mesas Redondas.

La presentación e interacción con los autores de Carteles con una importante participación de jóvenes investigadores, enriquecerá el Congreso brindando información sobre resultados recientes en las diferentes líneas de investigación que se llevan a cabo en Centros, Institutos y Universidades Latinoamericanas.

Organismos Patrocinantes:

- Sociedad Venezolana de Parasitología
- Federación Latinoamericana de Parasitología

Comité Organizador:

Presidente: Dr. Oscar Noya,
IMT-UCV-Caracas, noyao0@yahoo.com
Alicia Jorquera / UDO

Armando Reyna Bello / UNEFM
Belkisyolé Alarcón de Noya / IMT-UCV
Carlos Ayesta / UCV
Elizabeth Valdivieso / UCV
Isabel Hagel / IB-UCV
José Bubis / USB
José Luis Ramírez / UCV
José Vicente Toro / MPPS
Leidi Herrera / IZT-USB
Martín Sánchez / IB-UCV
Olinda Delgado / IMT-UCV
Palmira Guevara / IBE-UCV
Pedro María Aso / USB
Sandra Losada / IMT-UCV
Trina Perrone / IVIC
Zelandia Fermín / USB

Contacto en ULA- Mérida
Prof. Néstor Añez
nanes@ula.ve

Envío de resúmenes:

Fecha límite para la recepción de Resúmenes:
Lunes 30 de Julio de 2007

Información e Inscripciones:

<http://www.congrex.com.ve>

VIII CONGRESO CENTROAMERICANO Y DEL CARIBE DE PARASITOLOGÍA Y MEDICINA TROPICAL

VII CONGRESO CUBANO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

IV CONGRESO NACIONAL DE MEDICINA TROPICAL

CONGRESO 70 ANIVERSARIO DEL IPK

(Instituto Pedro Kouri, La Habana, Cuba, 4-7 Diciembre 2007)

<http://www.ipk.sld.cu/eventosipk/cong2007/index.htm>

Tópicos:

Enfermedades emergentes y reemergentes, Diagnóstico, Epidemiología, Biología celular, Inmunología, Patogénesis, Genómica y Proteómica, Quimioterapia, Mecanismos de acción y resistencia a drogas, Combinación de estrategias para combatir la resistencia, Nuevas drogas, Vacunas, Ensayos clínicos, Desarrollo de vacunas, Modelos animales, Participación comunitaria, Promoción y prevención

de salud, Investigaciones sociales, Control de vectores transmisores de enfermedades, Genética de la resistencia a insecticidas, Entomología molecular, Control sanitario internacional, Enfermedades zoonóticas; Bioseguridad, Formación de recursos humanos, Sistemas integrados de calidad, Sistemas de información geográfica, Evaluaciones económicas de programas.

Organismos Patrocinantes:

- Ministerio de Salud Pública de Cuba (MINSAP)
- Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK)
- Sociedad Centroamericana y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical
- Consejo Nacional de Sociedades Científicas del MINSAP
- Sociedad Cubana de Microbiología y Parasitología
- Sociedad Cubana de Higiene y Epidemiología

Comité Organizador:

Presidente: Prof. Gustavo Kourí, IPK
Dr. Rafael Jiménez B.
Dra. Lázara Rojas Rivero,
Lic. Alicia Reyes Jiménez,
Dr. Rolando Tápanes Peraza,
Dra. Dora Ginorio
Lic. Armando Martínez Cambray,
Dr. Fidel A. Núñez Fernández.

Envío de resúmenes:

Fecha límite para la recepción de Resúmenes:
Lunes 15 de Noviembre 2007.

Para mayor información contactar:

Dr. Lazara Rojas
Directora de la División de Parasitología
Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK)
Tel: (537) 202-0650
Fax: (537) 204-6051
e-mail: LRojas@ipk.sld.cu

Dra. Dora Ginorio
e-mail: dginorio@ipk.sld.cu

Lic. Armando Martínez Cambray
e-mail: armando@ipk.sld.cu

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, Resultados, Discusión, 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 .
Ej. **Scorza *et al.* (1999)** demostraron que.....

La presentación de las referencias bibliográficas, se hará en orden alfabético y de acuerdo a las siguientes normas: Si se trata de 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.

Si el trabajo es publicado en un Suplemento debe citarse. Cuando se trata de seis ó más autores, figurarán los apellidos e iniciales de los primeros 6 y se añadirá la expresión *et al.*

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.

Si se trata de 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.

Si se trata del 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:

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.

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.).

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 (bmsave@yahoo.com) o por correo aéreo o terrestre en sobre contenido 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,
antiguo Edificio de Malariología, Av. Bermúdez Sur,
Maracay, Edo. Aragua -Venezuela.
Teléfonos: (58-0243) 2325633 / 2320833 / 2322645.
Fax: (58-0243) 2325633
E-mail: bmsave@yahoo.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....

Bibliographical references will be listed in alphabetical order in the following manner:

If the work is a 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.* **35**: 1-6.

If the work is a supplement and when there are 6 or more authors, list the names and initials of the first 6 and add *et al.*

Example:

Bonfante G. R., Urdaneta L., Alvarado J., Anzola N. H., Torrealba J., Saldiva 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.

If the work is a 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*. 2nd edición. Ed. Sobre Visión CA, Caracas, Venezuela.

If the work is a 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. In: *Inflammation Biochemistry and Drug Interaction*. Eds. Bertelli A. & Houck J.C. 2nd ed. Excerta Med., London, U.K.

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 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 (bmsave@yahoo.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,
Antiguo Edificio de Malariología, Av. Bermúdez Sur,
Maracay, Ed. Aragua – Venezuela.
Telephone: (58-0243) 2325633 / 2322645.
Fax: (58-0243) 2325633
E-mail: bmsave@yahoo.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 be seek to avoid possible conflicts of interest that could disqualify referees from evaluating a particular manuscript.

These specialists will evaluate the scientific quality of the manuscript and will submit their reasoned opinions, recommending, or not recommending, acceptance of the article for publication. The work with the observations and suggestions of the referees will be returned to the corresponding author who will send a new version with a detailed explanation of the changes made, accepting the recommendations or not and presenting the reasons for not accepting them.

The Editorial Committee has the final decision concerning the publication of the article once they have verified compliance with indicated conditions and have analyzed the response of the authors.

All decisions will be sent by letter to the corresponding author as quickly as possible.

After the review, manuscripts will be subject to an editorial process which may include, in the event it is necessary, its condensation and the deletion or addition of charts, illustrations and annexes. The edited version (galley proof) will be sent to the principal author for his review and approval and his reply to any additional questions from the editor.

The Bulletin of Malariology and Environmental Health reserves the legal rights to the manuscripts approved for its publication as well as the right to make adjustments or changes which will insure the quality of the publication. However, it is not responsible for the ideas or opinions expressed in the work. The originals will not be returned under any circumstances.

The editors, the Editorial Committee and the referees formally state they are not authorized to use for private or personal ends information obtained through review of the manuscripts. In the same way they will respect the right of confidentiality of the reviewers and editors.

Once the work is published, the corresponding author will receive by e-mail a PDF version.

BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL

(ISSN-1690-4648)

(antes: Boletín de Malariología y Saneamiento Ambiental)

El Boletín de Malariología y Salud Ambiental es una revista científica que publica artículos sobre diferentes aspectos de la Medicina Tropical (incluyendo patología, estudios clínicos, experimentales y terapéuticos, estudios sociales, epidemiología y control), Parasitología (protozoología, helmintología, entomología, malacología, bioquímica, inmunología, biología molecular, genética), Ingeniería Sanitaria y Salud Ambiental.

Es objetivo de la revista publicar nuevos conocimientos y metodologías para el entendimiento de la dinámica de la transmisión de enfermedades infecciosas virales y parasitarias y sus vectores, dentro de su contexto eco- y socio-epidemiológico, en apoyo y para el diseño y manejo oportuno de los programas de prevención y control y la salud ambiental.

El Boletín de Malariología y Salud Ambiental es una publicación periódica semestral con un (1) volumen y dos(2) números (Julio y Diciembre) por año, distribuida nacional e internacionalmente en formato impreso y en formato electrónico a través de la siguiente dirección de Internet: <http://www.iaesp.edu.ve>

El Boletín está estructurado en nueve Secciones

- I.- **Artículos Originales.** Aportes inéditos en las áreas antes mencionadas de Medicina Tropical, Parasitología, Ingeniería Sanitaria, Salud Ambiental.
 - II.- **Revisiones** sobre los temas de competencia del Boletín.
 - III.- **Notas Científicas y/o Tecnológicas.** Comunicaciones cortas sobre hallazgos y/o resultados preliminares, nuevas técnicas y metodologías.
 - IV.- **Reportes Epidemiológicos.** Actualización de los datos epidemiológicos sobre distribución geográfica y demográfica, prevalencia e incidencia.
 - V.- **Revista de revistas.** Resúmenes de artículos publicados en otras revistas o de Trabajos Especiales de Grado.
 - VI.- **Forum.** Discusión acerca de controversias sobre análisis de situaciones, programas, proyectos o intervenciones de salud.
 - VII.- **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.
 - VIII.- **Cartas al Editor.** Comunicaciones dirigidas a la redacción relacionadas con tópicos de interés para difusión en el Boletín de Malariología.
 - IX.- **Noticias.** Información sobre reuniones científicas nacionales e internacionales, Congresos, Simposios, Talleres y otros eventos relevantes.
-



Servicio Autónomo
Instituto de Altos Estudios
"Dr. Arnoldo Gabaldon"



Gobierno **Bolivariano**
de Venezuela

Ministerio del Poder Popular
para la **Salud**

