

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. L, N° 1, 2010

Maracay - Aragua - Venezuela

BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL

Vol. L, N° 1, ENERO-JULIO, 2010

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

(antes Boletín de Malariología y Saneamiento Ambiental)

MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA SALUD

EUGENIA SADER C.
MINISTRA

DIRECCIÓN GENERAL
DE SALUD AMBIENTAL

LUIS MONTIEL
DIRECTOR

DIRECCIÓN GENERAL
DE CONTRALORÍA SANITARIA

DIVIS DEL CARMEN ANTUNEZ
DIRECTOR

SERVICIO AUTÓNOMO
INSTITUTO DE ALTOS ESTUDIOS
"DR. ARNOLDO GABALDON"

PEDRO ALCALÁ AFANADOR
DIRECTOR

Editores

José Vicente Scorza
M. Dora Feliciangeli

Diseño y Diagramación

Oswaldo Flores S. (IAES-MPPS)

Comité Editorial

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

Comité Honorario

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

Para envío de artículos: bmsave@yahoo.com

Para canje: publpeiaesp@yahoo.com

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

Revista indizada en **Latindex, Lilacs, Global Health, Tropical Diseases Bulletin, Helminthological Abstracts, Protozoological Abstracts, Review of Medical & Veterinary Entomology, Zoological Record** y pertenece a la colección **SciELO Venezuela**.

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

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

Boletín de Malariología y Salud Ambiental

Vol. L, N° 1

Maracay, Aragua, Venezuela

Enero-Julio, 2010

CONTENIDO

EDITORIAL

50 Años del Boletín de Malariología y Salud Ambiental

50 Years of the Boletín de Malariología y Salud Ambiental

M. Dora Feliciangeli 1

REVISIONES

Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas

A review of reservoirs of Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi (Chagas, 1909), the etiologic agent of Chagas Disease

Leidi Herrera 3

ARTÍCULOS ORIGINALES

Valoración comparativa de pruebas serodiagnósticas utilizadas para detectar enfermedad de Chagas en Venezuela

Comparative evaluation of serologic diagnostic tests used to detect Chagas disease in Venezuela

Néstor Añez, Maximiliano Romero, Gladys Crisante, Guillermo Bianchi & Henry Parada..... 17

Transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar de segunda generación

Congenital transmission of Trypanosoma cruzi in second generation Wistar rats

Elio A. Moreno, Martha Ramírez A., Maritza E. Alarcón, Ana Lugo de Yarbuh, Juana Villarreal, Sonia Araujo, Nora Mogollón, Anajulia González & Gloria Premoli.....29

Análisis cuantitativo del crecimiento y cambio morfométrico en poblaciones de *Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi* mantenidos en cultivos axénicos puros y mixtos

Quantitative approach to the analysis of the growth and morphometric change in populations of Leishmania chagasi and Trypanosoma cruzi maintained in pure and mixed axenic cultures

Carmen Duran, Dubrasvka Rodríguez-Bolívar, Antonio Roschman-Gonzalez, Mirian Strauss & Felix Tejero.....39

Estandarización de la prueba aglutinación directa empleando antígenos autóctonos para el diagnóstico de la leishmaniasis visceral en zonas endémicas de Venezuela <i>Standardization of direct agglutination test using native antigens for diagnosis of visceral leishmaniasis endemic areas of Venezuela</i>	
María Mercedes De Los Ríos Alicandú, Guillermo Terán-Ángel, Rosilved Silva-Basanta, & Maira Cabrera González	53
Incidencia de infecciones sintomáticas y asintomáticas por virus dengue en Maracay, Venezuela: 2006 - 2007 <i>Incidence of symptomatic and asymptomatic dengue virus infections in Maracay, Venezuela: 2006 - 2007</i>	
Carlos Espino, Guillermo Comach, Gloria Sierra, Diamelis Guzmán, Daría Elena Camacho, Maritza Cabello de Quintana, Anna Chiarello & Tadeusz Kochel	65
Diversidad enzimática de la fracción soluble de un aislado venezolano de adultos <i>Paragonimus</i> sp. <i>Enzymatic diversity of enzymes in the soluble fraction of adult worms from a Venezuelan isolate of Paragonimus sp.</i>	
Erika Gómez Martínez, Diana Ballen, Marcos Tulio Díaz, Zoraida Díaz Bello, Reinaldo Zavala-Jaspe, Belkisyole Alarcón de Noya, Oscar Noya & Italo M. Cesari	75
Infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> y polimorfismo del Citocromo B del ADN mitocondrial en <i>Triatoma maculata</i> de Anzoátegui y Portuguesa, Venezuela <i>Trypanosoma cruzi infection and cytochrome b polymorphism of mitochondrial dna in Triatoma maculata of Anzoátegui and Portuguesa states, Venezuela.</i>	
Nilsa González-Brítez, Antonio Morocoima, Clara Martínez & Hernán J. Carrasco	85
Caracterización ecológica de los anofelinos y otros culícidos en territorio indígena del Bajo Caura, Estado Bolívar, Venezuela <i>Ecological characterization of anophelines and culicines in indigenous territory of the Lower Caura River, Bolívar State, Venezuela</i>	
Yasmin Rubio-Palis, Jorge E. Moreno, Mariapia Bevilacqua, Domingo Medina, Ángela Martínez, Lya Cardenas, Hernán Guzmán & Julio González	95
Evaluación de la persistencia de una formulación comercial de <i>Bacillus sphaericus</i> en criaderos naturales de anofelinos vectores de malaria en estado Bolívar, Venezuela <i>Evaluation of the persistence of a comercial formulation of Bacillus sphaericus in malaria vectors anopheline larval habitats in Bolívar state, Venezuela</i>	
Jorge E. Moreno, Porfirio Acevedo, Ángela Martínez, Víctor Sanchez & Luis Petterson	109
Toxicidad por insecticida organofosforado en fumigadores de Campaña contra el Dengue, estado Aragua, Venezuela, año 2008 <i>Toxicity by organophosphate insecticide in fumigators of the campaign against the dengue, Aragua state, Venezuela, 2008</i>	
María José Gómez F. & José Luis Cáceres G.	119
Aspectos clínicos, epidemiológicos y de tratamiento de cinco casos de envenenamiento por erizos de mar en Adicora, península de Paraguaná, estado Falcón, Venezuela <i>Toxicity by organophosphate insecticide in fumigators of the campaign against the dengue, Aragua state, Venezuela, 2008</i>	
Dalmiro Cazorla, Jesús Loyo, Lusneida Lugo & María Acosta	127

NOTAS CIENTÍFICAS

Enfermedad de Chagas de transmisión oral: vinculación del caso índice con una microepidemia urbana en Venezuela <i>Orally transmitted Chagas disease: epidemiological connection of the index case with an urban outbreak in Venezuela</i> Belkisyolé Alarcón de Noya, Zoraida Díaz-Bello, Cecilia Colmenares, Raiza Ruiz-Guevara & Oscar Noya	135
<i>Aedes albopictus</i> (Skuse, 1894): current status and records of an important invasive mosquito species in Spain <i>Aedes albopictus (Skuse, 1894): situación actual y los registros de una especie de mosquito importante invasoras en España.</i> Rubén Bueno Marí & Ricardo Jiménez Peydró	139
Vigilancia Entomológica para Culicidos a través de larvitrapas en el Departamento del Atlántico (Colombia) 2004-2008 <i>Sentinel surveillance of mosquitoes (Culicidae) using larvitrapas in the department of Atlántico (Colombia) 2004-2008</i> Ronald Maestre-Serrano & Sergio Goenaga-Olaya	145
Registro de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sensu lato asociada a una cueva, refugio de fauna silvestre (Edo. Falcón, Península de Paraguaná, Venezuela) <i>Record of Lutzomyia longipalpis sensu lato associated with a cave, wildlife refuge (State Falcón, Peninsula Paraguaná Venezuela)</i> Vladimir Caraballo & Jazzmín Arrivillaga	153
REVISTA DE REVISTAS	157

Editorial



50 Años del Boletín de Malariología y Salud Ambiental

Han transcurrido 50 años desde la edición del Vol I, Nº 1 del *Boletín Informativo de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental* (1961). Su Editor fundador fue el Dr. Arnoldo Gabaldon, ilustre sanitarista, artífice de la erradicación de la malaria en una amplia extensión del territorio nacional, quien en 1938 ya había editado *Tijeretazos sobre Malaria* y en 1944 había fundado la **Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental** con sede en Maracay, donde se dictó el Primer Curso Internacional de Malaria, reconocido como el primer postgrado internacional en Venezuela.

Debido a cambios conceptuales y organizacionales, el *Boletín Informativo de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental* ha cambiado su denominación y a partir de 2003 está registrado como *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, revista científica del Servicio Autónomo **Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldon”** (IAES), nombre actual de la antigua Escuela de Malariología.

La revista conserva la misma portada por respeto y reconocimiento a la gran obra de su fundador y porque la inspiración y valores para la época, permanecen vigentes. Las tres estrellas representan las *ciencias físicas, las ciencias biológicas y las ciencias sociales*, cuyos conocimientos son necesarios para el alcance de los objetivos dirigidos al control de las enfermedades endémicas y al saneamiento ambiental.

Concebida inicialmente como una herramienta didáctica para enseñar y adiestrar al personal del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, en los

primeros años de su publicación refleja un esfuerzo importante para crear un equipo organizacional en el cual las virtudes señaladas a través de las seis puntas de las estrellas: *constancia, exactitud e interés en el trabajo, cooperación, estimación y lealtad al compañero*, eran y son imprescindibles. A través de la revista ese equipo se nutre de los conocimientos producidos en materia no solo a nivel nacional, sino también internacional, como lo señalan trabajos completos y resúmenes de artículos publicados en revistas extranjeras que, traducidos al castellano, estructuran la sección Revista de Revistas.

La importante producción científica del equipo de técnicos altamente especializados e investigadores se refleja en los artículos originales y la abundante información que se divulga durante décadas a través de las revisiones y temas de discusión sobre taxonomía, biología y ecología de parásitos, bacterias, vectores, ensayos de control y sobre saneamiento ambiental: salud rural, radiofísica sanitaria, el problema de los barrios insalubres y sus consecuencias sobre la salud, la vivienda y los aspectos sociales asociados a las enfermedades endémicas.

Con el devenir de los años el *Boletín* se fortalece para acoger y divulgar la producción científica de los miembros de la Sociedad Parasitológica Venezolana fundada en 1980 por el Dr. José Witremundo Torrealba, siendo nombrado 1er Presidente el Dr. Arnoldo Gabaldon.

En su mayoría son docentes investigadores de las Universidades nacionales que encuentran en esta revista un medio de comunicación de larga trayectoria

ya conocido a nivel internacional, como lo demuestra su presencia en instituciones como la London School of Hygiene and Tropical Medicine en Londres, FIOCRUZ en Brasil, el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí en La Habana, Cuba, entre otros, contribuyendo de esta manera a la divulgación de información de consulta obligatoria en las áreas de la Parasitología, Medicina Tropical, Entomología Médica, Epidemiología y Control, Ingeniería Sanitaria, Salud Ambiental, Educación Sanitaria y Ciencias Sociales.

Estas áreas del conocimiento continúan reflejando el contenido de la revista cuya misión se resume en dos objetivos: (i) conjugar la producción científica en ciencias básicas y aplicadas en apoyo a los Programas de Control de las enfermedades endémicas a cargo de la Dirección de Salud Ambiental del Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) y (ii) continuar siendo un instrumento de formación profesional y técnica del equipo de salud del MPPS que en los auditorios y salones de práctica del IAES y de las Universidades nacionales afianzan sus saberes y su compromiso con la salud de los venezolanos.

En años recientes, entre las enfermedades endémicas de mayor impacto, la malaria, la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis han salido de su confinamiento de las áreas rurales a las áreas urbanas, mientras que de las ciudades, el dengue ha ido invadiendo espacios aledaños. En consecuencia, han surgido nuevos y complejos escenarios epidemiológicos. Éstos urgen de nuevos aportes científicos para enfrentar los retos presentes.

El entendimiento de la cambiante dinámica de la transmisión, la identificación de factores de riesgo basada en sólidos análisis estadísticos, la innovación tecnológica usando productos autóctonos para proveer métodos de diagnóstico rápidos de alta especificidad y sensibilidad, más económicos y por lo tanto más asequibles para atender los individuos y comunidades afectados por estas enfermedades “desatendidas”, estudios entomológicos para el diseño de nuevas estrategias de control e investigación social para la incorporación de la participación de la comunidad a la vigilancia epidemiológica, siguen siendo por lo tanto temas sustanciales del *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 50 años después de su inicio.

La calidad científica y técnica de los aportes sobre estos temas, cada día más numerosos, no solo de investigadores nacionales sino también de investigadores iberoamericanos, el arbitraje riguroso y la inclusión del *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* en los índices internacionales (plataforma SciELO, Global Health, Latindex, Lilacs, Tropical Diseases Bulletin, Helminthological Abstracts, Protozoological Abstracts, Review of Medical and Veterinary Entomology, Zoological Record) garantizan la creciente visibilidad y proyección de la imagen de esta revista y del IAES a nivel internacional.

En este Vol L., No 1, el compromiso del Comité Editorial, del IAES y de la Sociedad Parasitológica Venezolana para con el *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* se reafirma al celebrar sus 50 años de publicación ininterrumpida.

M. Dora Feliciangeli
Editora

Revisiones



Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas

Leidi Herrera*

Las parasitosis, circunscritas a grupos animales, como la tripanosomiasis americana o Enfermedad de Chagas, son primariamente enzootias o zoonosis, en las cuales el hombre, como último eslabón de la escala zoológica, participa como un hospedador accidental dentro de la cadena de transmisión. Una de las grandes necesidades planteadas en el estudio de estas parasitosis, es el conocer los hospedadores en cada ecosistema y su rol como reservorios. En la presente revisión, se expondrán algunos puntos tratados por diferentes autores en relación a hospedadores mamíferos primarios o secundarios y su conceptualización. Se ha intentado resumir una lista de especies de mamíferos, naturalmente infectados por *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la Enfermedad de Chagas, con sus respectivas referencias originales.

Palabras clave: Reservorios, *Trypanosoma cruzi*, enfermedad de Chagas.

En memoria de la Dra. Trina Perrone, cuya temprana desaparición deja un vacío en la hemoparasitología veterinaria venezolana.

INTRODUCCIÓN

Las parasitosis están circunscritas a un hábitat y a sus componentes; así parásitos especialistas poseen un hábitat más restricto al igual que las asociaciones que establecen, mientras que los generalistas se encuentran en más de un tipo de hábitat estableciendo asociaciones múltiples.

Los hospedadores, vectores y/o reservorios, como componentes asociados al ciclo de transmisión de estas parasitosis, cumplen igualmente con esta dinámica. Las teorías de co-evolución de las asociaciones parasitarias establecen, que se puede conocer el curso de una parasitosis en el

tiempo evolutivo, si se conoce la evolución de sus hospedadores o de los ancestros de éstos (Webster *et al.*, 2007).

Se ha afirmado que asociaciones hospedador-parásito muy antiguas son “íntimas” y de larga duración y a veces definidas como de baja a moderada virulencia. En caso contrario, se estaría frente a un acontecimiento de parasitismo reciente en un hospedador reciente. Algunos contraejemplos indican que la asociación aún dentro de las mismas especies, para cada asociado, puede presentar particularidades. La incertidumbre estaría en saber si la co-evolución en el tiempo actúa en forma recíproca para hospedadores y parásitos, con un índice relativo de evolución para ambos. En general las parasitosis, circunscritas a grupos animales o sus ancestros, son enzootias o zoonosis, en las cuales el hombre último eslabón de la cadena zoológica, participa como un hospedador accidental dentro de la cadena de transmisión (Page, 1994).

Laboratorio de Biología de *Trypanosoma* de mamíferos. Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

*Autor de correspondencia: herrleidi@yahoo.com

Se hace necesario conocer a los hospedadores de un parásito y su rol en la naturaleza. En la presente revisión sobre Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, se expondrán los puntos tratados por diferentes autores en relación al hospedador mamífero reservorio y se intentará resumir la lista de especies citadas en la literatura.

Tripanosomiasis Americana o Mal de Chagas: de la Enzootia a la Zoonosis

Las enzootias, primariamente restringidas a los animales silvestres, se transforman en zoonosis con el manejo y colonización de áreas deshabitadas o poco impactadas, cuando hombres, animales domésticos y/o sinantrópicos se integran a la cadena de transmisión. Varios son los factores considerados como importantes en este proceso (Walsh *et al.*, 1993; Dias, 2000; Walter, 2003):

- Modos de producción económica de la población humana;
- El uso de la tierra como propiedad;
- La explotación de los recursos naturales;
- El proceso de urbanización y construcción de carreteras;
- El manejo de áreas de reservas de biodiversidad;
- Las actividades de deporte y placer en áreas naturales;
- El manejo social y/o individual de las parasitosis, una vez conocidas;
- Actitudes frente a las enfermedades;
- Condiciones de la vivienda humana y de los locales de confinamiento animal.

La Tripanosomiasis americana, como enzootia silvestre, se extiende desde la latitud 42° N (Carolina del Norte y Maryland, EUA.) hasta el paralelo 49° S (zonas meridionales de Argentina y Chile), incluyendo las islas del Caribe (Dias, 2000).

Cuando esta tripanosomiasis afecta al ser humano, produce generalmente una patología descrita como Enfermedad de Chagas, cuya distribución coincide con regiones de Norte, Centro y Suramérica donde los vectores se han domiciliado, en las cuales están afectadas actualmente 15-16 millones de personas. Esta enfermedad es considerada la tercera parasitosis más importante de las Américas después de la malaria y de la bilharzia (Coura & Dias, 2009; Schofield & Dias, 1998).

Trypanosoma (*Schizotrypanum*) *cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), agente causal

de esta parasitosis, es un hemoflagelado heteroxénico que desarrolla su ciclo de vida en ocho órdenes de mamíferos y en más de 140 especies de insectos estrictamente hematófagos (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), la mayoría de los cuales actúan como vectores, siendo *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius* los géneros de mayor importancia epidemiológica (Barretto, 1979; Dias, 2000).

La determinación total del genoma de *T. cruzi*, como iniciativa multidisciplinaria mundial, permitió revelar la naturaleza diploide de este parásito, con un 50% de secuencias repetidas (en gran parte transposones y genes codificantes para moléculas de superficie) y un tamaño y diversidad los cuales revelarían un potencial de interacciones y procesos regulatorios hasta ahora desconocidos. Este hallazgo resultó ser una herramienta de sumo valor para el estudio de diversos aspectos de la enfermedad de Chagas, poniendo a disposición una gran cantidad de información sobre los genes del parásito, lo cual pudiese servir para derivar antígenos, o bien conocer el eclecticismo del parásito en su asociación con hospedadores vertebrados e invertebrados, entre otras cosas. (Levin, 1999; El-Sayed *et al.*, 2005).

La naturaleza clonal de *T. cruzi*, ha permitido la utilización de marcadores bioquímicos y moleculares para agrupar fenotipos y genotipos del parásito que pueden mostrar diversidad biológica, bioquímica y molecular, sean distribuidos o no en una misma área geográfica (Anonymous, 1999; Gaunt & Miles, 2000; Lisboa *et al.*, 2004; Yeo *et al.*, 2005; Zingales *et al.*, 2009), a saber:

- *T. cruzi* I (Tc I, Z1, DTU I), subpoblación homogénea, considerada más antigua, asociado primariamente a ambientes silvestres y sinantrópicos, especialmente a mamíferos didélfidos. Es el grupo de mayor frecuencia desde la cuenca amazónica hacia el norte de Suramérica y Centro América, aun en ambientes domésticos;
- *T. cruzi* II (Tc II, Z2, DTU IIb), subpoblación más heterogénea a la cual se le han atribuido hasta cinco variantes genéticamente segregadas; siendo la subpoblación de parásitos de gran abundancia en el Cono Sur. Se le ha asociado primariamente a desdentados en su aparición más antigua en el Continente Americano (65 millones de años) y más recientemente a roedores caviomorfos y primates. Se presenta frecuentemente en el ciclo doméstico, aun

cuando hay registros de su presencia en reservas de primates poco intervenidas.

- *T. cruzi* III (Z3, Z1 ASATd, Z3-A, DTU IIC), subpoblación asociada tradicionalmente a la transmisión enzoótica, es considerada el tercer clado ancestral. Se le ha encontrado en mamíferos terrestres y cavadores, aun cuando algunos casos humanos han sido atribuidos a este genotipo. A pesar de que su origen en la separación de subpoblaciones no está del todo dilucidado, se le ha atribuido su aparición a eventos de hibridación.
- *T. cruzi* IV (Z3, Z3-B, DTU IIa): Subpoblación también asociada a enzootias, con registros en canidos silvestres y ocasionalmente en casos humanos. Su origen se le ha atribuido a eventos de hibridación.
- *T. cruzi* V (Cepa Boliviana Z2, rDNA ½, clonot 39, DTU IIId): Subpoblación asociada a ciclos de transmisión domésticos con un origen quizás en la hibridación de subpoblaciones domésticas y silvestres. Presentes en casos humanos y en los triatomíneos de mayor abundancia del Cono Sur.
- *T. cruzi* VI (Cepa Paraguaya Z2, Zymodema B, DTU IIe): Subpoblaciones asociadas a casos humanos y al igual que Tc V, frecuentemente asociada a triatomíneos domiciliados del cono Sur. Su origen se atribuye al menos a dos procesos de hibridación.

La relación filogenética de estos clados es continuamente materia de debate (Araújo *et al.*, 2002; Mendonça *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2002; Brandão & Fernández, 2006).

Algunos estudios han hecho énfasis en que la variación genómica de *T. cruzi*, pudiese condicionar la interacción del parásito con sus hospedadores vertebrados a nivel de la enzootia y de la zoonosis. Por otra parte, en algunos casos, se ha estudiado si los vertebrados donde circula el parásito, pudiesen actuar como filtros biológicos de sus subpoblaciones (Jansen *et al.*, 1991; Vago *et al.*, 2000; Andrade *et al.*, 2002; Herrera *et al.*, 2004; 2005; Yeo *et al.*, 2005).

Sin embargo en la naturaleza se han dado eventos de infección que indican la relatividad de esta asociación estricta entre genotipo del parásito y un grupo reservorio determinado; algunos ejemplos se han dado para Tc II, tradicionalmente asociado a ciclos domésticos e infecciones humanas, el cual ha sido descrito en reservorios estrictamente silvestres

como *Procyon lotor* (Procyonidae–Carnivora), *Trichomys apereoides* (Echimyidae–Rodentia); *Philander frenata*; *D. albiventris* (Didelphidomorphia) y *Leontopithecus rosalia* (Primata), (Pietrzak & Pung, 1998; Pinho *et al.*, 2000; Lisboa *et al.*, 2004; Herrera *et al.*, 2005, Yeo *et al.*, 2005).

La tripanosomiasis americana como parasitosis nidal, está condicionada por factores como clima, relieve, suelo, flora y fauna y puede ser revelada por la presencia de factores enzoóticos que actuarían como bioindicadores potenciales de la parasitosis, mucho antes de que el hombre entre en la cadena de transmisión (Pifano, 1960; Pavlovsky, 1966; Teixeira *et al.*, 2001).

Cuando la enfermedad de Chagas se define, esta se encuentra mayormente asociada a zonas rurales empobrecidas, donde el tipo y uso de la vivienda humana, pueda favorecer la entrada y el riesgo potencial de colonización de los triatomíneos, con la necesaria disponibilidad de sangre humana y de animales domésticos y sinantrópicos (Pifano, 1986; Lorenzo *et al.*, 2000).

La presencia de ADN de *T. cruzi*, en momias del Pacífico (7050 A.C. hasta 1500 D.C., última, época de la conquista española) y los análisis paleoepidemiológicos, han llevado a especular que, una constante para la aparición de la enfermedad desde la época pre-colombina hasta nuestros días, es la incorporación de elementos de ecotopos naturales tales como mamíferos, vectores y elementos de sus hábitats silvestres en los refugios humanos, favoreciéndose ambientes propicios y alterándose los focos enzoóticos. Estudios realizados sobre coprolitos obtenidos de momias de cazadores y recolectores en las regiones desérticas de Chiguagua, México y en Minas Gerais-Brazil, hacen suponer que mamíferos infectados con *T. cruzi* y quizás triatomíneos, pudieron formar parte de la dieta de estos grupos humanos originarios. Estos hallazgos y la recientemente descubierta capacidad del parásito de colonizar tejido condrial y óseo constituyen elementos para el estudio de la paleo historia natural de parasitosis y de especies imputables como reservorios, pudiéndose trazar una ruta hipotética de evolución en América (Reinhard *et al.*, 2003, Aufderheide *et al.*, 2004; Morocoima *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2008).

En su forma primaria esta parasitosis circula en mamíferos silvestres, representantes de los primeros grupos que colonizaron el continente americano tales

como marsupiales, desdentados, primates y roedores caviomorfos. Cuando el hombre entra en el medio natural, altera la ecología de vectores y reservorios, modificando la estructura del foco y dispersándolo hasta el hábitat humano (Zeledón, 1974; Deane *et al.*, 1986; Briones *et al.*, 1999).

Con la deriva continental y la división de la Pangea, quedaron separados los tripanosomas estercorarios de los salivarios y, de estos últimos hace 475 millones de años, el ancestro de *T. cruzi*. Se cree que este parásito surgió entre 280 y 150 millones de años en América y su primer contacto con el hombre ocurrió apenas 15000 años atrás. Posiblemente, entre 88 y 37 millones de años se separaron TcI y TcII, como genotipos. Esto ha llevado a sostener que TcI sería autóctono de América del Sur, co-evolucionando dentro de primates y roedores caviomorfos, antes de la entrada de TcII, hace 5 millones de años, con el comienzo del gran intercambio de mamíferos a través del salto de pequeñas islas, hasta formarse el istmo de Panamá aproximadamente 3 millones de años atrás (Valencio, 1987; Briones *et al.*, 1999; Stevens & Gibson, 1999).

Recientes estudios sobre ecosistemas muy antiguos como la “caatinga brasilera” han llevado a establecer que las dos subpoblaciones principales de *T. cruzi* (TcI y Tc II) pueden infectar, al menos experimentalmente, a grupos mamíferos muy antiguos, discutiéndose que más que un efecto seleccionador de genotipos del parásito por especies de mamíferos particulares, lo que pareciera estar ocurriendo es un fenómeno de segregación por barreras ecológicas (Herrera *et al.*, 2004; 2005).

Trypanosoma cruzi como especie, responde a los parámetros establecidos por Barretto (1979), de tal forma que tripanosomas que infectan a grupos de mamíferos no humanos, y morfológicamente compatible con *T. cruzi*, generalmente son aceptados como tal, siendo lo más adecuado proponerlos como *T. cruzi*-like hasta comprobar, mediante ensayos parasitológicos, bioquímicos y moleculares que poseen las propiedades inherentes a la especie, o bien que se corresponden con los datos disponibles de las secuencias genéticas del parásito.

La mayoría de los países latinoamericanos han puesto en marcha iniciativas de control de la enfermedad de Chagas basadas en el seguimiento de

vectores domiciliados y de la presencia del parásito en los bancos de sangre (European Community-Latin American Network for research on the biology and control of Triatomine, 2004). Sin embargo, la recolonización de la vivienda por otras especies de triatominos silvestres o en proceso de domiciliación, no ha sido considerada abiertamente en estas iniciativas (Herrera *et al.*, 2003).

De igual manera, pocas han sido las acciones centradas en el estudio de los reservorios, fuente originaria de la enzootia a lo largo del continente americano.

Principales Especies de Mamíferos Reservorios de T. cruzi

Un total de 180 especies de mamíferos pertenecientes a los siguientes ordenes: Didelphidomorphia, Lagomorpha, Chiroptera, Rodentia, Pilosa, Cingulata, Carnivora, Primata, Perisodactyla, se han encontrado naturalmente infectados por *T. cruzi*, incluyendo al hombre, el cual además de padecer de la enfermedad actúa como reservorio.

Otros grupos de vertebrados como aves, anfibios, reptiles y peces son refractarios a este hemoflagelado por incompatibilidad antigénica, ausencia de reconocimiento y señalización celular, así como niveles inadecuados de temperatura sistémica. Sin embargo algunos ensayos en reptiles han revelado la posibilidad de una infección inicial, la cual se auto limita hasta la eliminación del curso de la parasitosis en estos vertebrados. A ello se une que tanto reptiles como aves constituyen la fuente sanguínea primaria, en algunos ecosistemas, para los triatominos vectores de *T. cruzi*, lo cual abre la frontera de procesos evolutivos no considerados hasta ahora (Hoare, 1972; Urdaneta-Morales & Mc Lure, 1981; Noireau *et al.*, 2009).

En la Tabla I se resume un registro parcial de diferentes especies de mamíferos naturalmente infectados con *T. cruzi*, sus nombres comunes y las fuentes bibliográficas que lo citan.

El Papel del Reservorio, con énfasis en la enfermedad de Chagas

Clásicamente se ha considerado como reservorio de un parásito a aquel hospedador que posee,

Tabla I. Ordenes y especies de mamíferos registradas como reservorios de *Trypanosoma cruzi* con sus respectivas fuentes bibliográficas.

ORDEN	NOMBRE COMÚN	REFERENCIA
Carnivora		
<i>Cerdocyon thous azarae</i>	Zorro	Albuquerque & Barretto, 1968a; Barretto & Ribeiro, 1979
<i>Conepatus chinga</i>	Zorro hediondo, Cangamba, Mapurite	Barretto & Ribeiro, 1979
<i>Canis familiaris</i>	Perro doméstico	Mott <i>et al.</i> , 1978; Torrealba <i>et al.</i> , 1985
<i>Dusicyon griseus</i>	Zorro gris	Barretto & Ribeiro, 1979
<i>Eyra barbara</i>	Comadreja, Huron, Tolomuco, Manco	Hoare, 1972
<i>Felis catus</i>	Gato doméstico	Mott <i>et al.</i> , 1978; Torrealba <i>et al.</i> , 1985
<i>Galictis vittata</i>	Hurón, Furão.	Barretto & Albuquerque, 1971
<i>Herpailurus yagouaroundi</i>	Cunaguaro	Barretto & Ribeiro, 1979
<i>Mephitis mephitis</i>	Zorrillo rayado	Hoare, 1972
<i>Nasua Nasua</i>	Pizote, Coati, Achuni	Lainson, 1965; Herrera <i>et al.</i> , 2008
<i>Potos flavus</i>	Cuchi-Cuchi, Kinkajou	Barretto & Ribeiro, 1979
<i>Procyon cancrivorus</i>	Zorro cangrejero	Barretto & Ribeiro, 1979
<i>Procyon lotor</i>	Mapache, mapachín, Racoón, Gato manglatero	Hoare, 1972
<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	Zorro Gris	Hoare, 1972, Noireau <i>et al.</i> , 2009
Chiroptera		
<i>Antrozous pallidus pacificus</i>	Murciélago pálido	Wood & Wood, 1941
<i>Artibeus jamaicensis luturatus</i>	Murciélago frugívoro de Jamaica Murciélago frutero grande	Torrealba <i>et al.</i> , 1985
<i>Epitesicus brasiliensis</i>	Murciélago pardo	Funayama & Barreto, 1973
<i>Glossophaga soricina</i>	Murciélago lengua larga	Siqueira-Batista <i>et al.</i> , 2007
<i>Lonchophylla mordax</i>	Murciélago nectífero	Siqueira-Batista <i>et al.</i> , 2007
<i>Mycronycteris megalotis</i>	Murciélago orejudo	Siqueira-Batista <i>et al.</i> , 2007
<i>Molossus ater</i>	Murciélago	Siqueira-Batista <i>et al.</i> , 2007
<i>Molossus major</i>	Murciélago	Siqueira-Batista <i>et al.</i> , 2007
<i>Molossus molossus</i>	Murciélago mastín común	Torrealba <i>et al.</i> , 1985; Añez <i>et al.</i> , 2009
<i>Noctilio labialis</i>	Murciélago blanco	Barretto <i>et al.</i> , 1974;
<i>Phyllostomus hastatus</i>	Murciélago nariz de lanza mayor	Nogueira Nascentes, 2008; Lisboa <i>et al.</i> , 2008
<i>Phyllostomus alongatus</i>	Murciélago nariz de lanza menor	Siqueira-Batista <i>et al.</i> , 2007
<i>Saccopteryx bilineata</i>	Murciélago negro de listas	Siqueira-Batista <i>et al.</i> , 2007
Cingulata		
<i>Dasypus kapleri</i>	Armadillos, Cachicamos	Hoare, 1972; Guerrero, 1985
<i>Dasypus novemcinctus</i>	Armadillo, Cachicamo de nueve bandas	Chagas, 1912; Hoare, 1972
<i>Cabassous unicinctus</i>	Armadillo de cola desnuda de oriente, Cuspa?	Hoare, 1972

Continúa en la siguiente página...

Viene de la página anterior...

Didelphidomorpha		
<i>Didelphis albiventris</i>	Rabipelado, Faro, Churro,	Deane <i>et al.</i> , 1986; Pifano, 1986;
<i>Didelphis marsupialis</i>	Gamba, Zarigüeya, Tlacuache	Herrera & Urdaneta-Morales, 1991
<i>Gracilinanus agilis</i> (Syn <i>Marmosa agilis</i>)	Comadreja aguil	Correa & Barretto, 1964; Guerrero, 1985; Xavier <i>et al.</i> , 2007
<i>Lutreolina crasicaudata</i>	Marmosita	Barretto & Siqueira, 1962; Hoare, 1972
<i>Marmosa cinerea</i>		Siqueira-Batista <i>et al.</i> , 2007
<i>Metachirus nudicaudatus</i>	Chuca mantequera, Raposa de cuatro ojos	Deane, 1958; Salazar-Schettino, 1977
<i>Monodelphis domestica</i>	Zarigüeya de cola corta, colicortos gris o domestico	Xavier <i>et al.</i> , 2007
<i>Philander oposum</i>	Comadreja de cuatro ojos	Dedet <i>et al.</i> , 1985; Pinho <i>et al.</i> , 2000
Lagomorpha		
<i>Sylvilagus floridanus</i>	Conejo de Monte	Torrealba <i>et al.</i> , 1985
Perisodactyla		
<i>Bos taurus</i>	Toro	Salazar-Schettino, 1977
<i>Sus scrofa</i>	Cochino, marrano, Chanco	Salazar-Schettino, 1977
<i>Tayassu tajasu</i>	Baquiرو cinchado, Huangana, Baquiرو de collar	Herrera <i>et al.</i> (b), 2008
<i>Tayassu pecari</i>	Baquiرو de cachete blanco, Huangana, Chacharo	Herrera <i>et al.</i> (b), 2008
Pilosa		
<i>Bradipus tridactylus</i>	Perezoso, Perezoso de tres dedos	Torrealba <i>et al.</i> , 1985; Hoare, 1972
<i>Cyclopes didactylus</i>		
<i>Mirmecophaga tridactyla</i>	Oso hormiguero gigante o Jurumi	Hoare, 1972
<i>Tamandua tetradactyla</i>	Oso hormiguero	Hoare, 1972; Guerrero, 1985
Primata		
<i>Alouatta caraya</i>	Mono caraya, manechi, mono aullador	Guerrero, 1985; Zicardi <i>et al.</i> , 2002
<i>Aotus trivirgatus</i>	Mono nocturno, Musmuqui	Barretto & Ribeiro, 1979
<i>Ateles belzebuth</i>	Mono araña, Ateles peludo	Barretto & Ribeiro, 1979; Marinkelle, 1966
<i>Callitrix penicillata</i>	Mono tití de pinces negros	Barretto & Ribeiro, 1979
<i>Cebus apella</i> , <i>Cebus olivaceus</i>	Mono capuchino, mono carablanca, Machin	Torrealba <i>et al.</i> , 1985; Bar <i>et al.</i> , 1999
<i>Leontopithecus rosalia</i>	Mono León Dorado	Lisboa <i>et al.</i> , 2000
<i>Macaca mulatta</i>	Mono reshus	Kasa <i>et al.</i> , 1987; Kunz <i>et al.</i> , 2002
<i>Saimiri sciureus</i>	Mono ardilla americano	Hoare, 1972; Bar <i>et al.</i> , 1999
<i>Saguinus midas niger</i>	Mono sagui, Tamarin cabeza negra	Siqueira-Batista <i>et al.</i> , 2007
Rodentia		
<i>Akodon</i> sp.	Ratón campreste	Ribeiro & Barretto, 1975 Rodríguez-Roque & Correa-Vaz, 2007
<i>Bolomys lasiurus</i>	Ratón de rabo peludo	Rodríguez-Roque & Correa-Vaz, 2007
<i>Calomys expulsus</i>	Ratón Vesper del desierto	Melo & Texeira, 1977; Rodríguez-Roque & Correa-Vaz, 2007
<i>Cavia</i> sp.	Cuy, Acure	Rodríguez-Roque & Correa-Vaz, 2007

Continúa en la siguiente página...

Viene de la página anterior...

<i>Clyomys laticeps</i>	Rata espinosa de cabeza marrón	Rodríguez-Roque & Correa-Vaz, 2007
<i>Dasyprocta aguti</i>	Picure, cutia	Noireau <i>et al.</i> , 2009
<i>Echymis chrysurus</i>	Rata arborícola	Rodríguez-Roque & Correa-Vaz, 2007
<i>Galea spixii</i>	Acure amarillo diente grande, Prea	Xavier <i>et al.</i> , 2007
<i>Kerodon rupestris</i>	Moco, acure de las rocas	Rodríguez-Roque & Correa-Vaz, 2007
<i>Nectomys squamipes</i>	Rata de agua	Albuquerque & Barretto, 1968b; Ribeiro & Barretto 1968), Rodríguez-Roque & Corea-Vaz, 2007
<i>Neotoma micropus micropus</i>	Rata de bosque, rata de monte, rata de campo	Packchanian, 1942
<i>Oecomys mamorae</i>	Ratón arrocero arborícola	Rodríguez-Roque & Correa-Vaz, 2007
<i>Octodontomys sp.</i>	Rata viscacha, rata cola de cepillo	Rodríguez-Roque & Correa-Vaz, 2007
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	Ratón arrocero pigmeo	Rodríguez-Roque & Correa-Vaz, 2007
<i>Proechimys semispinosus</i>	Rata espinosa de Tomes	Barretto & Ribeiro, 1979
<i>Rattus norvegicus</i>	Rata de Noruega	Salazar-Schettino, 1977
<i>Rattus rattus</i>	Rata casera o Rata negra	Torrealba <i>et al.</i> , 1985; Herrera & Urdaneta-Morales, 1997
<i>Rhipidomys macrurus</i>	Rata trepadora	Xavier <i>et al.</i> , 2007
<i>Sigmodon hispidus</i>	Rata algodónera, rata café	Salazar-Schettino, 1977
<i>Trichomys apereoides</i> <i>Trichomys laurentis</i>	Rata rabuda	Herrera <i>et al.</i> , 2004; Xavier <i>et al.</i> , 2007
<i>Tylomys mirae</i>	Rata trepadora de Mira	Rodríguez-Roque A. & Correa-Vaz, 2007

al menos, las siguientes propiedades según Ashford (1996) y Haydon *et al.* (2002):

- mantiene a las poblaciones de los parásitos por largo tiempo en cada ecosistema,
- presenta una carga parasitaria que garantiza su transmisibilidad
- se encuentra en una densidad poblacional apropiada (20% o más de la masto fauna estudiada para la zoonosis) que facilita el encuentro hospedador-vector, hospedador-ambiente, hospedador-hospedador según el tipo de transmisión

Otro aspecto a considerar es que las especies de hospedadores, actúan como reservorios en función del fenómeno de especificidad hospedadora, aspecto este que viene condicionado por la información genética de ambos asociados (hospedador y parásito) y el nicho que ocupan en los ecosistemas lo cual hace posible la simpatría obligatoria o facultativa y consecuentemente condiciona el encuentro hospedador-parásito y el éxito adaptativo de la infección (Mas Coma, 2008).

Cada especie animal puede ejercer una presión selectiva estricta y particular sobre las subpoblaciones

del parásito, lo cual está influenciado adicionalmente por factores como origen de las cepa, tamaño del inóculo natural sobre el animal, estado nutricional y de salud de los hospedadores en la naturaleza (poliparasitismo), tiempo en que el animal se mantiene infectado o con parasitemia circulante para la transmisión, periodo de incubación en los animales (periodo de inactividad en la transmisión o de consideración de falsos negativos), virulencia y ruta de transmisión.

El papel de los reservorios en vías alternativas de transmisión, está siendo cada vez mas considerado desde que se ha conocido que mamíferos tan antiguos como los didélfidos actúan como reservorios y vectores a la vez. Más específicamente, se ha planteado que la ruptura de nidos de amastigotes de *T. cruzi* en tejidos profundos de glándulas anales en los didélfidos, facilitaría la invasión luminal y la transmisión por contaminación con estos fluidos, de otros mamíferos o inclusive de humanos que entren en contacto en ambientes enzoóticos, y contaminen sus miembros como extremidades (manos), mucosas, utensilios y alimentos (Deane *et al.*, 1986; Urdaneta-Morales & Nironi, 1996; Herrera & Urdaneta-Morales, 2000).

Sub-poblaciones diferentes de una misma especie hospedadora pueden presentar diferentes papeles como reservorios condicionado por diferencias a pequeña escala geográfica o de micro nichos. De esta forma los parásitos en sus reservorios además de ser vistos como agentes potencialmente patógenos, son marcadores ecológicos o bioindicadores del ambiente de sus hospedadores.

Algunas consideraciones que deben ser tomadas en cuenta al hablar de reservorios, son:

- El reservorio puede ser considerado como un sistema complejo viviente, susceptible a la infección por el parásito, condicionado a factores ambientales y cuyo papel en la transmisión es dinámico. (Noireau *et al.*, 2009)
- Cada especie animal puede seleccionar varias subpoblaciones del parásito, fenómeno condicionado por el origen de la cepa, virulencia, vía y tamaño del inóculo, condición in situ de los hospedadores en la naturaleza.
- La densidad poblacional de la especie imputada como reservorio es un factor relevante.
- Hablar de periodo de incubación en los animales silvestres es hablar de lo que se ha modelado en laboratorio. Sin embargo, es de utilidad para una especie considerada como reservorio, pues permite conocer aun cuando sea experimentalmente, el periodo pre patente o patente de la parasitosis, lo cual indicaría que tan temprano estaría siendo incorporada al evento de transmisión.
- Se debe cuidar el descartar a una especie como reservorio por no haberse revelado la infección por cualquiera de los métodos directos o indirectos más actuales, ya que ocasionalmente en fauna silvestre pudiesen presentarse patrones no convencionales en las manifestaciones del parasitismo.
- Prácticas de cría, explotación y manejo de especies mamíferos, potencialmente reservorios, influirían en la aparición de brotes epidémicos de parasitosis como la tripanosomiasis americana.
- Prácticas de control de especies mamíferos y de vectores consideradas plagas influirían sobre la distribución de esta y otras parasitosis.

AGRADECIMIENTOS

La autora agradece al Dr. Servio Urdaneta-Morales y a los árbitros anónimos por la revisión técnica del manuscrito y por las valiosas recomendaciones para la elaboración del mismo. Los trabajos más recientes

presentados en este resumen, bajo la responsabilidad de la autora, han sido financiados por los proyectos: CDCH- PG 03005609-2004. FONACIT: N° G 2005000406.

A review of reservoirs of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* (Chagas, 1909), the etiologic agent of Chagas Disease

SUMMARY

Animal parasitoses, such as American trypanosomiasis or Chagas Disease, are principally enzootic diseases or zoonoses, in which humans, as the last step in the zoological chain, participate as accidental hosts in the transmission cycle. One of the great needs within the study of these parasitoses is to identify the hosts in each ecosystem where the disease is prevalent and determine their role as reservoirs. In this review, some of the issues and concepts covered by different authors in relation to primary and secondary mammalian hosts are discussed. A list of mammalian species that are naturally infected by *Trypanosoma cruzi*, the causal agent of Chagas disease, together with the original bibliographical references has been included.

Key Words: Reservoirs, *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease.

REFERENCIAS

- Albuquerque R. & Barretto M. (1968a). Studies on wild reservoirs and vectors of "*Trypanosoma cruzi*." XXX: natural infection of the bush dog, "*Cercopithecus thous azarae*" (Wied, 1824) by "*T. cruzi*". *Rev. Bras. Biol.* **28**: 457-468.
- Albuquerque R. & Barretto M. (1968b). Studies of wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. XXVI. Natural infection of the water rat, *Nectomys squamipes squamipes* (Brants, 1827) with *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **10**: 229-237.
- Andrade L., Machado C., Chiari E., Pena S. & Macedo A. (2002). *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp. Parasitol.* **100**: 269-275.

- Anonymous. (1999). Recommendations from a Satellite Meeting. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **94 (Suppl. 1):** 429-432.
- Añez N., Crisante G. & Soriano P. (2009). *Trypanosoma cruzi* congenital transmission in wild bats. *Acta Trop.* **109:** 78-80
- Araújo C., Mello C. & Jansen A. (2002). *Trypanosoma cruzi* I and *Trypanosoma cruzi* II: recognition of sugar structures by *Arachis hypogaea* (peanut agglutinin) lectin. *J. Parasitol.* **88:** 582-586.
- Ashford R. (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol.* **14:** 523-532.
- Aufderheide A., Salo W., Madden M., Streitz J., Buikstra J., Guhl F., Arriaza B., et al. (2004). A 9,000-years record of Chagas disease. *PNAS.* **101:** 2034-2039.
- Bar M., Alvarez B., Oscherov E., Pieri Damborsky M. & Jorg M. (1999). Contribution to knowledge of reservoirs of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) in Corrientes Province, Argentina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **32:** 271-276.
- Barretto M. & Albuquerque R. (1971). Studies on reservoirs and wild vectors of *Trypanosoma cruzi*. XLVII. Natural infection of the mustelid, *Galictis vittata braziliensis* (Thunberg, 1820) by *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop.* São Paulo. **13:** 346-351.
- Barretto M. (1979). Epidemiologia. 89-115. En: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Eds. Brener Z., Andrade, Z. & Barral-Netto M. 2ª Ed. Publicaciones Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.
- Barretto M. & Ribeiro R. (1979). Reservatórios silvestres do *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas 1909. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* **39:** 25-36.
- Barretto M., Ribeiro R. & Ferrioli Filho F. (1974). Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LVII – Infecção natural do *Phyllostomus hastatus hastatus* (Tallas, 1767) pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Bras. Biol.* **34:** 615-622.
- Barretto M. & de Siqueira A. (1962). Natural infection of *Lutreolina crassicaudata crassicaudata* by *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **4:** 358-361.
- Brandão A. & Fernandes O. (2006). *Trypanosoma cruzi*: mutations in the 3' untranslated region of calmodulin gene are specific for lineages *T. cruzi* I, *T. cruzi* II, and the Zymodeme III isolates. *Exp. Parasitol.* **112:** 247-252.
- Briones M., Souto R., Stolf B. & Zingales B. (1999). The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol. Biochem. Parasitol.* **104:** 219-232.
- Chagas C. (1912). Sobre um Trypanosoma do tatu, *Tatusia novemcincta*, transmitido pelo *Triatoma geniculata* Latr (1811). Possibilidade de ser o tatu um depositário do *Trypanosoma cruzi* no mundo exterior. Nota prévia. *Braz. Med.* **26:** 305-306.
- Correa F. & Barretto M. (1964). Study of wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. 3. Natural infection of the marsupial *Marmosa agilis agilis* by a trypanosome similar to *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **28:** 157-166.
- Coura J.R. & Dias J.C. (2009). Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **104 (Suppl 1):** 31-40.
- Deane L. (1958). New host of trypanosomes of the types cruzi and rangeli found in the state of Para: the marsupial *Metachirops opossum opossum*. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.* **10:** 531-541.
- Deane M., Lenzi H. & Jansen A. (1986). Double development cycle of *Trypanosoma cruzi* in the opossum. *Parasitol. Today.* **2:** 146-147.
- Dedet J., Chippaux J., Goyot P., Pajot F., Tibayrenc M., Geoffroy B., Gosselin H. & Jacquet-Violet P. (1985). Natural hosts of *Trypanosoma cruzi* in French Guiana. High endemicity of zymodeme 1 in wild marsupials. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **60:** 111-117.
- Dias J. C. (2000). Epidemiologia. pp. 48-74. En: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Eds Brener Z., Andrade Z. & Barral-Netto M. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.

- El-Sayed N. M., Myler P., Bartholomeu D. C., Nilsson D., Aggarwal G., Tran A., *et al.* (2005). The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science*. **309**: 409 - 415.
- European Community-Latin American Network for research on the biology and control of Triatomine, 2004.
- Funayama G. & Barreto M. (1973). Studies of wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. LIV. Natural bat infection, *Epitesicus brasiliensis brasiliensis* (Desmarest, 1819) by *T. cruzi*. *Rev. Bras. Biol.* **33**: 439-444.
- Gaunt M. & Miles M. (2000). The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **95**: 557-565.
- Guerrero R. (1985). Parásitología. pp. 35-91. En: *El Estudio de los Mamíferos Silvestres de Venezuela. Evaluación y Perspectivas*. Asociación Venezolana para el Estudio de los Mamíferos, Caracas - Venezuela.
- Haydon D., Cleaveland S., Taylor L. & Laurenson M. (2002). Identifying reservoirs of infection. A conceptual and practical challenge. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 1468-1473.
- Herrera L. & Urdaneta-Morales S. (1992). *Didelphis marsupialis*: A primary reservoir of *Trypanosoma cruzi* in urban areas of Caracas, Venezuela. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **86**: 607-612.
- Herrera L. & Urdaneta-Morales S. (1997). Synanthropic rodent reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in the valley of Caracas, Venezuela. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **39**: 279-282.
- Herrera L. & Urdaneta-Morales S. (2000) Avances en la caracterización de biotopos de *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* aislado de urbanizaciones y parques recreacionales del valle de Caracas (Venezuela). *Act. Biol. Venez.* **20**: 45-51.
- Herrera L., Pinho A., Viegas C., Lorosa E., Xavier S., Emperaire L., Mangia R., Carrasco H., Fernandes O. & Jansen A. M. (2003). *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in João Costa, Piauí, Brazil, an endemic area of Chagas disease. *Acta Parasitol.* **48**: 294-300.
- Herrera L., Xavier S., Viegas C., Martinez C., Cotias P., Carrasco H., Urdaneta-Morales S. & Jansen A. M. (2004). *Trypanosoma cruzi* in a caviomorph rodent: parasitological and pathological features of the experimental infection of *Thrichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). *Exp. Parasitol.* **107**: 78-88.
- Herrera L., D'Andrea P., Xavier S., Mangia R., Fernandes O. & Jansen A. M. (2005). *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park 'Serra da Capivara' and its surroundings (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **99**: 379 - 388.
- Herrera H., Lisboa C., Pinho A., Olifiers N., Bianchi R., Rocha F., Mourão G. & Jansen A. M. (2008 a). The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **102**: 1133-1139.
- Herrera H., Abreu U., Keuroghlian A., Freitas T. & Jansen A. M. (2008b). The role played by sympatric collared peccary (*Tayassu tajacu*), white-lipped peccary (*Tayassu pecari*), and feral pig (*Sus scrofa*) as maintenance hosts for *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma cruzi* in a sylvatic area of Brazil. *Parasitol. Res.* **103**: 619-624.
- Hoare C. (1972). *The Trypanosomes of Mammals*. A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publication, Oxford, U.K.
- Jansen A., León L., Machado G., da Silva A.M., Souza-Leão S. & Deane M. (1991). *Trypanosoma cruzi* in the opossum *Didelphis marsupialis*: Parasitological and serological follow-up of the acute infection. *Exp. Parasitol.* **73**: 249-259.
- Kasa T., Lathrop G., Dupuy H., Bonney C. & Toft J. (1977). An endemic focus of *Trypanosoma cruzi* infection in a subhuman primate research colony. *J. Am. Vet. Assoc.* **171**: 850-854.
- Kunz E., Mätz-Rensing K., Stolte N., Hamilton P. & Kaup F. (2002). Reactivation of a *Trypanosoma cruzi* Infection in a *Rhesus* monkey (*Macaca*

- mulatta*) experimentally infected with SIV. *Ve. Pathol.* **39**: 721-725.
- Lainson R. (1965). Parasitological studies in British Honduras. I. A parasite resembling *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in the Coati, *Nasua narica* (Carnivora, Procyonidae), and a note on *Trypanosoma legeri* from the ant-eater, *Tamandua tetradactyla* (Edentata). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **59**: 37-42.
- Levin, M. (1999). Contribución del proyecto genoma de *Trypanosoma cruzi* a la comprensión de la patogénesis de la cardiomiopatía chagásica crónica Medicina (Buenos Aires). **59 (Supl.II)**: 18-24.
- Lima V., Iniguez A., Otsuki K., Ferreira L., Araújo A., Vicente P. & Jansen A. M. (2008). Chagas Disease in Ancient Hunter-Gatherer Population, Brazil. *J. Infect. Dis.* **14**: 1001-1002.
- Lisboa C., Dietz J., Baker A., Russel N. & Jansen A. M. (2000). *Trypanosoma cruzi* infection in *Leontopithecus rosalia* at the Reserva Biológica de Poço das Antas, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **95**: 445-452.
- Lisboa C., Mangia R., Rubião E., Lima N., Xavier S., Picinatti A., Ferreira L., Fernandes O. & Jansen A. M. (2004). *Trypanosoma cruzi* transmission in a captive primate unit, Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop.* **90**: 97-106.
- Lisboa C., Pinho A., Herrera H., Gerhardt, M., Cupolillo E. & Jansen AM. (2008) *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. *Vet. Parasitol.* **156**: 314-318.
- Lorenzo M., Guarneri A., Pires H., Diotaiuti L. & Lazzari C. (2000). Aspectos microclimáticos del hábitat de *Triatoma brasiliensis*. *Cad. Saúde Pública.* **16**: 69-74.
- Mello D. & Texeira M. (1977). Nota sobre a infecção natural de *Calomys expulsus*, Lund, 1841 (Cricetidae-Rodentia) pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Saúde Pública.* **4**: 561-564.
- Marinkelle C.J. (1966). Observations on human, monkey and bat trypanosomes and their vectors in Colombia. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **60**: 109-116.
- Mas Coma S. (2008). *Importancia de la Evolución en la parasitología y el interés de utilizar una aproximación evolutiva en los estudios parasitológicos*. Documento en línea, disponible en http://www.sesbe.org/documentos_sesbe [consultado: 2009, septiembre, 2]
- Mendonça M., Nehme N., Santos S., Cupolillo E., Vargas N., Junqueira A., Naiff R., et al. (2002). Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitology.* **124**: 177-184.
- Morocoima A., Rodríguez M. Herrera L. & Urdaneta-Morales S. (2006). *Trypanosoma cruzi*: experimental parasitism of bone and cartilage. *Parasitol. Res.* **99**: 663-668.
- Mott K., Mota E., Sherlock I., Hoff R., Muniz T., Oliveira T. & Draper C. (1978). *Trypanosoma cruzi* infection in dogs and cats and household seroreactivity to *T. cruzi* in a rural community in northeast Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**: 1123-1127.
- Nogueira Nascentes G., Ferreira Meira W., Lages-Silva E. & Ramírez L. (2008). Ausência de proteção cruzada experimental induzida por uma cepa *Trypanosoma cruzi*-like isolada de morcego. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **41**: 152-157.
- Noireau F., Diosque P. & Jansen A. M. (2009). *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet. Res.* **40**: 26.
- Packchanian A. (1942). Reservoir Hosts of Chagas' Disease in the State of Texas. *Am. J. Trop. Med.* **s1-22**: 623-631.
- Page R. (1994). Parallel phylogenies: reconstructing the history of host-parasite assemblages. *Cladistics.* **10**: 155-173.
- Pavlovsky (1966). *Natural nidity of transmissible diseases, with special reference to the landscape epidemiology of zoonothroponoses*. University of Illinois Press, Urbana & London. USA & UK.
- Pietrzak S. & Pung O. (1998). Trypanosomiasis in raccoons from Georgia. *J. Wild. Dis.* **34**: 132-136.

- Pifano F. (1960). Algunos aspectos de la Enfermedad de Chagas en Venezuela. *Arch. Venez. Med. Trop. Parasit. Med.* **3**: 73-99.
- Pifano F. (1986). El potencial enzootico silvestre del complejo *Trypanosoma cruzi* - *Didelphis marsupialis* - *Panstrongylus geniculatus* y sus incursiones a la vivienda humana del valle de Caracas, Venezuela. *Bol. Acad. Ciencias Fis. Mat. Nat. (Caracas)*. **46**: 9-37.
- Pinho A., Cupolillo E., Mangia R., Fernandes O. & Jansen A. M. (2000). *Trypanosoma cruzi* in the sylvatic environment: distinct transmission cycles involving two sympatric marsupials. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **94**: 509-514.
- Reinhard A., Fink T. & Skiles J. (2003). A case of megacolon in Rio Grande valley as a possible case of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **98 (Suppl. I)**: 165-172.
- Ribeiro R. & Barretto M. (1968). Estudos sobre reservorios e vetores silvestres de *Trypanosoma cruzi* XXVI, Infecção natural do rato d'agua *Nectomys squamipes squamipes* (Brants, 1827) pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* **10**: 229-237.
- Ribeiro R. & Barretto M. (1975). Silvane reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. Natural infection of the rat, *Akodon lasiotis* (Lung, 1841) by *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* **17**: 247-52.
- Rodriguez-Roque A. & Correa-Vaz V. (2007). *Doença de Chagas: Ecologia, Roedores*. Documento en Línea. disponible en <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=31> [Consultado 2010, Enero 16].
- Salazar-Schettino P., Bucio M., Cabrera M. & Bautista J. (1997). First case of natural infection in pigs. Review of *Trypanosoma cruzi* reservoirs in Mexico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **92**: 499-502.
- Santos S., Cupolillo E., Junqueira A., Coura J., Jansen A., Sturm N., Campbell D. & Fernandes O. (2002). The genetic diversity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates and the phylogenetic positioning of zymodeme 3, based on the internal transcribed spacer of the ribosomal gene. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **96**: 755-764.
- Schofield C. & Dias J. (1998). The Southern Cone initiative against Chagas disease. *Adv. Parasitol.* **42**: 1-27.
- Siqueira-Batista R., Gomes A. P., Rubião E. C. N. & Gonçalves M. L. C. (2007). Infecção por *Trypanosoma cruzi* na Amazônia. En: R. Siqueira-Batista, A. P. Gomes, A. D. Corrêa, M. Geller (Eds). *Moléstia de Chagas*. 2ª ed. Rio de Janeiro, Brasil.
- Stevens J. & Gibson W. (1999) The molecular evolution of trypanosomes. *Parasitol. Today.* **15**: 432-437.
- Teixeira A., Monteiro P., Rebelo J., Argañaraz E., Vieira D., Lauria-Pires L., Nascimento R., 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., Tonn R. & Carcavallo R. (1985). Venezuela. En: *Factores Biológicos y Ecológicos en la Enfermedad de Chagas*. Eds. Carcavallo R., Rabinovich J. & Tonn R. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Buenos Aires, Argentina.
- Urdaneta-Morales S. & McLure I. (1981). Experimental infections in Venezuelan lizards by *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* **38**: 99-105.
- Urdaneta-Morales S. & Nironi I. (1996). *Trypanosoma cruzi* in the anal glands of urban opossums. Isolation and experimental infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **91**: 399-403.
- Vago A., Andrade L., Leite A., d'Avila reis D., Macedo A., Adad S., Tostes J., Moreira M., Filho G. & Pena S. (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am. J. Pathol.* **156**: 1805-1809.
- Valencio D. (1987) New evidence about the age of the land bridge between south and North America. *J. Geodyn.* **7**: 59-67.

- Walsh J., Molineux D. & Birley M. (1993). Deforestation: effects on vector-borne disease. *Parasitology*. **106**: 55-75.
- Walter A. (2003). Human activities and American trypanosomiasis. Review of the literature. *Parasite*. **10**: 191-204.
- Webster J., Shrivastava J., Johnson P. & Blair L. (2007). Is host-schistosome coevolution going anywhere? *BMC Evol. Biol.* **7**: 91.
- Wood F. & Wood S. (1941). Present Knowledge of the distribution of *Trypanosoma cruzi* in reservoir animals and vectors. *Am. J. Trop. Med.* **S1-21**: 335-345
- Xavier S. C., Vanderson V., D'andrea P, Herrera L., Emperaire L., Alves J., Fernandes O., *et al.* (2007). Mapping of the distribution of *Trypanosoma cruzi* infection among small Wild mammals in a conservation unit and its surroundings (northeast-Brazil). *Parasitol. Int.* **56**:119-128.
- Yeo M., Acosta N., Llewellyn M., Sanchez H., Adamson S., Miles G., Lopez E., *et al.* (2005). Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int. J. Parasitol.* **35**: 225-33.
- Zeledón R. (1974). Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas' disease. pp.51-85. En: Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease, Ciba Found Symp 20, Elsevier, New York, U.S.A.
- Ziccardi M., Lourenço de Oliveira R., Lainson R., Brigido M. & Muniz J. (2000). Trypanosomes of non-human primates from the national centre of primates, Ananindeua, State of Pará, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **95**: 157-159.
- Zingales B., Andrade S. G., Briones M. R., Campbell D. A., Chiari E., Fernandes O., Guhl F., *et al.* (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **104**: 1051-1054.

Recibido el 04/09/2009
Aceptado el 21/02/2010

Artículos Originales

Valoración comparativa de pruebas serodiagnósticas utilizadas para detectar enfermedad de Chagas en Venezuela

Néstor Añez^{1*}, Maximiliano Romero¹, Gladys Crisante¹, Guillermo Bianchi² & Henry Parada³

Se presenta la valoración comparativa de 8 técnicas de uso común en el despistaje serológico de la enfermedad de Chagas utilizando muestras de pacientes de diversas procedencias del occidente de Venezuela. En el estudio fueron utilizados métodos serológicos convencionales (TAD, IFI, ELISA) y pruebas de diagnóstico comercialmente expendidas en el país (Pharmatest[®], Chagatest ELISA[®], Chagatest ELISA *Recombinante* V.3.0[®], Test ELISA para Chagas III[®] y Chagas Stat PakTM Assay[®]). La comparación de los resultados no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de sensibilidad y especificidad de las técnicas evaluadas ($P>0.05$). Se sugiere, para la obtención de un diagnóstico preciso, la implementación de pruebas de rutina y pruebas confirmatorias. El análisis de la relación costo-beneficio reflejó diferencias entre las técnicas evaluadas, sugiriendo su uso de acuerdo a las condiciones de servicio presentes en cada centro diagnóstico, para lo cual se proponen pruebas candidatas para la rutina y la confirmación diagnóstica. Se demuestra la disminución progresiva de reactividad, con el consecuente incremento de resultados erróneos, en una prueba comercial sometida a sucesivos cambios de temperatura en el tiempo.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, diagnóstico, pruebas serológicas, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, se estima afecta en la actualidad cerca de 8 a 10 millones de personas, siendo uno de los principales problemas de salud pública que confrontan los pobladores de países latinoamericanos (OMS/TDR, 2007). En general, el diagnóstico para la detección de la dolencia se basa en el análisis de variables diversas, entre las cuales destacan la presunción

clínica, los datos epidemiológicos y los resultados de laboratorio, incluyendo pruebas parasitológicas, serológicas, bioquímicas y/o moleculares (López *et al.*, 2000). En relación con el diagnóstico serológico existe consenso en recomendar, al menos, dos técnicas con la finalidad de tener un alto grado de confiabilidad en el despistaje de la dolencia, sugiriéndose una tercera prueba confirmatoria en caso de conflicto de diagnóstico entre ellas (OMS, 2002). Las técnicas más comúnmente utilizadas incluyen, entre otros, procesos de hemaglutinación (HAI), fluorescencia (IFI), Aglutinación (TAD) y ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). Aunado a éstos, recientemente se han desarrollado poderosas herramientas moleculares como la prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y otras metodologías serológicas (TESA-blot), las cuales han contribuido a la obtención de un despistaje más certero de la enfermedad de Chagas

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

² Escuela de Estadística, Facultad de Ciencias Económicas y Sociales, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

³ Unidad de Cardiología, Hospital "Luis Razetti", Barinas, Venezuela.

*Autor de correspondencia: nanes@ula.ve

(Gomes *et al.*, 1999; López *et al.*, 2000; Bulcao & Yasuda, 2003; Umezawa *et al.*, 1996).

En Venezuela, el sero-diagnóstico de la enfermedad de Chagas es comúnmente realizado en centros públicos y privados utilizándose principalmente pruebas expandidas comercialmente por varios laboratorios nacionales y extranjeros, la mayoría de los cuales están basados en ensayos inmunoenzimáticos cualitativos (Vielma, 2005). En este respecto, algunos investigadores han informado sobre resultados inconsistentes registrados en pacientes diagnosticados en estos centros, cuando se comparan con los obtenidos en laboratorios especializados en el estudio de la enfermedad de Chagas (Díaz-Bello *et al.*, 2008). Esta información parece corroborarse en nuestro laboratorio donde se ha detectado que diagnósticos provenientes de laboratorios privados, arrojan falsos positivos cuando se cotejan con pruebas específicas.

En el presente estudio se evalúan simultáneamente métodos serológicos usados de forma rutinaria en el despistaje de la enfermedad de Chagas en Venezuela, con la finalidad de detectar técnicas confiables para el diagnóstico preciso en muestras de pacientes de áreas endémicas las cuales, a su vez, resulten de utilidad general y corrijan la inconsistencia diagnóstica registrada en algunos centros.

MATERIALES Y METODOS

Muestreo y grupos de estudio

Un total de 48 muestras de sueros fueron seleccionadas mediante un muestreo aleatorio simple de un contingente de 200 pacientes de diferente procedencia y condición clínica, diagnosticados previo al estudio. Este número de muestras garantiza que pueda estimarse la sensibilidad y especificidad de las pruebas con un error tolerable $< 0,125$, asumiendo un $\alpha=0,05$ (Cochran, 1985). Las muestras fueron divididas en cuatro grupos y empleadas para el cotejo de pruebas serológicas usadas en el despistaje de la enfermedad de Chagas. El grupo I (PCC1-PCC21) estuvo conformado por muestras de sueros escogidos de pacientes (12 mujeres y 9 hombres; 48+16 años) controlados en la unidad de cardiología del Hospital "Luis Razetti", estado Barinas-Venezuela, siendo la mayoría de ellos pacientes chagásicos y algunos (4) con cardiopatía de otra etiología. El grupo II (PChRE) estuvo conformado por 10 muestras de

sueros seleccionadas del total de pacientes chagásicos crónicos diagnosticados parasitológica, serológica y/o molecularmente en el Laboratorio de Investigaciones Parasitológicas "J. F. Torrealba", Mérida-Venezuela, provenientes de diversas localidades endémicas de los estados Barinas, Trujillo y Mérida (Venezuela). Los pacientes (7 mujeres y 3 hombres) registraron una edad promedio de 31+22 años y habían sido monitoreados serológicamente desde cuando presentaron la fase aguda de la enfermedad de Chagas. Del total correspondiente a este grupo 8 recibieron tratamiento durante la fase aguda. El grupo III (PBSSP) constituido por 6 muestras de sueros de pacientes seropositivos a *T. cruzi* fueron previamente diagnosticados por pruebas serológicas comerciales en el banco de sangre del Hospital "Luis Razetti" del estado Barinas. El grupo IV (PBSSN) considerado como control negativo, estuvo conformado por 11 muestras de sueros de individuos seronegativos a *T. cruzi* previamente diagnosticados en el banco de sangre del Hospital "Luis Razetti" del estado Barinas y procedentes de diversas localidades de este estado donde la enfermedad de Chagas es endémica. Para los grupos III y IV no fueron obtenidos los datos de distribución por edad o géneros de los pacientes y fueron manejados mediante códigos utilizados en la institución donante, ignorándose su condición hasta el final del estudio. Detalles sobre los componentes de cada grupo valorado serológicamente, incluyendo su condición clínica, se presentan en la Tabla I.

El protocolo de estudio fue previamente aprobado por la comisión de ciencias médicas profesionales del Consejo de Desarrollo Científico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela y el comité de bioética y biomedicina del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología, Caracas, Venezuela. En cada oportunidad todo paciente muestreado por los autores les fue solicitada la firma de un consentimiento previa información, requerimiento exigido por el comité de bioética del FONACIT, el cual reposa en nuestro laboratorio.

Selección y procedimientos de pruebas serológicas evaluadas

Los métodos serológicos convencionales utilizados para detectar anticuerpos circulantes anti-*T. cruzi* incluyeron las pruebas de aglutinación directa (TAD), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA), siguiendo procedimientos

Tabla I. Composición de grupos de pacientes valorados serológicamente para el despistaje de la enfermedad de Chagas.

Código	Serología con métodos convencional				Serología con Kits comerciales					Condición clínica
	TAD	IFI	ELISA	Pharmatest	Chagatest ELISA	Chagatest ELISA Recombinante V.3.0	Test ELISA para Chagas III	Stat Pak Assay		
PCC1	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	MChc	
PCC2	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	MChc	
PCC3	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	MChc	
PCC4	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	MChc	
PCC5	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	MChc	
PCC6	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	MChc	
PCC7	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	MChc	
PCC8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	MOE	
PCC9	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	MOE	
PCC10	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	MChc	
PCC11	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	MChc	
PCC12	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	MChc	
PCC13	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	MChc	
PCC14	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	MChc	
PCC15	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	MChc	
PCC16	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	MOE	
PCC17	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	MChc	
PCC18	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	MChc	
PCC19	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	MChc	
PCC20	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	MChc	
PCC21	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	MOE	
PChRE1	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	MChc	
PChRE2	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	MChc	
PChRE3	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	MChc	
PChRE4	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	MChc	
PChRE5	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	MChc	
PChRE6	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	MChc	
PChRE7	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	MChc	
PChRE8	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	MChc	
PChRE9	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	MChc*	
PChRE10	Pos	Pos	Pos	Neg	Nd	Pos	Neg	Neg	MChc*	
PBSSP1	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	AII	
PBSSP2	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	AII	
PBSSP3	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	AII	
PBSSP4	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	AII	
PBSSP5	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	AII	
PBSSP6	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	AII	
PBSSN1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Control	
PBSSN2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Control	
PBSSN3	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Control	
PBSSN4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Control	
PBSSN5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Control	
PBSSN6	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Control	
PBSSN7	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Control	
PBSSN8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Control	
PBSSN9	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Control	
PBSSN10	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Control	
PBSSN11	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Control	
Total	48	48	48	48	47	48	48	48		

MChc: Miocarditis chagásica crónica; *: Paciente no tratado; AII: Asintomático con infección inaparente (según Añez *et al.*, 2001); MOE: Miocarditis otra etiología.

previamente publicados (Vattuone & Yanovsky, 1971; Camargo, 1966; Voller *et al.*, 1975). Las condiciones y procedimientos de estos métodos han sido indicados en previas publicaciones (Añez *et al.*, 1999a,b; 2001). Las pruebas serológicas denominadas comerciales incluyeron los tests inmunoenzimáticos Pharmatest® (Laboratorios Pharmatest, Miranda-Venezuela); Chagatest ELISA® (Laboratorios Wiener, Rosario-Argentina); Chagatest ELISA *Recombinante V.3.0*® (Laboratorios Wiener, Rosario-Argentina); Test ELISA para Chagas III® (Laboratorios BiosChile, Santiago-Chile); y el ensayo inmunocromatográfico comercial Chagas stat-pak assay® (Laboratorios Chembio, New York-USA). Cada prueba fue ejecutada e interpretada según indicaciones del fabricante.

Criterio diagnóstico

Las muestras evaluadas por metodologías convencionales fueron consideradas sero-positivas cuando mostraron títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi* > 1:64 para TAD e IFI y absorbancia óptica > 0.4 para ELISA. Los pacientes fueron declarados positivos a la infección por *T. cruzi* cuando mostraron reactividad en, al menos, 2 de los 3 métodos serológicos convencionales utilizados. Se consideraron sero-positivos a *T. cruzi* por los tests inmunoenzimáticos comercial Pharmatest®, Chagatest ELISA®, Chagatest ELISA *Recombinante V.3.0*® y Test ELISA para Chagas III®, las muestras con absorbancias mayores del 10% del punto de corte, determinado según indicaciones del fabricante. Por su parte, utilizando el kit inmunocromatográfico comercial Chagas Stat Pak Assay® (Chembio) fueron declarados sero-positivos a *T. cruzi* muestras que revelaran una banda rosapúrpura en el área “test” y en el área “control” de la tira empleada indicada en el estuche del kit.

Análisis estadístico

Los parámetros correspondientes a la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), razón de verosimilitud positiva (RVP) y razón de verosimilitud negativa (RVN) fueron estimados a partir de las ecuaciones convencionales descritas por Altman & Bland (1994). Los intervalos del 95% de confianza de los estimadores de la sensibilidad y la especificidad fueron determinados con ecuaciones correspondientes a intervalos de proporciones según Wayne (2002). Por su parte, para la estimación de los intervalos de

confianza de VPP, VPN, RVP y RVN, fue utilizado un Bootstrap con 10.000 interacciones siguiendo a Bradley (1987).

Registro de reactividad de un antígeno comercial

Con la finalidad de detectar el efecto de cambios de temperaturas en el tiempo sobre un antígeno utilizado en el despistaje serológico de la enfermedad de Chagas, la prueba serológica comercial Test ELISA para Chagas III® (BiosChile) fue sometida a sucesivos cambios de 8°C a 22°C cada 20 días, durante un lapso de 90 días. El efecto de los cambios fue evaluado en muestras de pacientes previamente diagnosticados como positivos o negativos a *T. cruzi*, ejecutándose la prueba cada vez que el antígeno era llevado a 22°C. El procedimiento fue realizado siguiendo de forma estricta las indicaciones de ejecución e interpretación de resultados especificada por el fabricante como se indicó anteriormente.

RESULTADOS

Detección de seropositividad a Trypanosoma cruzi en pacientes valorados utilizando diferentes métodos diagnósticos

Un total de 8 pruebas serológicas comúnmente utilizadas en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en Venezuela fueron evaluadas en el presente estudio en tres grupos de pacientes chagásicos y su correspondiente control negativo. En las muestras de pacientes chagásicos controlados en una unidad cardiológica (grupo I) la seropositividad detectada osciló desde 67% con la prueba de TAD hasta 81% con las pruebas Pharmatest, Chagatest ELISA, Chagatest ELISA *Recombinante V.3.0*® y Chagas Stat-Pak® (Tabla II). Muestras de pacientes chagásicos controlados en un laboratorio especializado (Grupo II) revelaron valores de sero-positividad entre 60% con las pruebas TAD y Chagas Stat-Pak y el 100% en aquellas procesadas con las técnicas IFI y ELISA convencionales (Tabla II). En los sueros procedentes de banco de sangre (Grupo III) fue detectada una alta sero-positividad con el método Chagatest ELISA® (100%), el mismo utilizado en ese centro, y con la técnica de ELISA convencional (83%). El resto de las pruebas arrojaron valores relativamente bajos (Tabla II). El grupo control negativo (IV) arrojó los resultados esperados. En la Tabla II se dan detalles sobre los resultados obtenidos.

Tabla II. Seropositividad detectada en grupos de pacientes valorados con pruebas comúnmente utilizadas en el despistaje de la enfermedad de Chagas.

Grupo	N° */ (%) de muestras de pacientes seropositivos							
	TAD	IFI	ELISA	Pharmatest	Chagatest ELISA	Chagatest ELISA Recombinante V.3.0	Test ELISA para Chagas III	Chagas Stat-Pak
I	14/21 (67)	16/21 (76)	16/21 (76)	17/21 (81)	17/21 (81)	17/21 (81)	16/21 (76)	17/21 (81)
II	6/10 (60)	10/10 (100)	10/10 (100)	7/10 (70)	6/9 (67)	8/10 (80)	7/10 (70)	6/10 (60)
III	3/6 (50)	4/6 (67)	5/6 (83)	3/6 (50)	6/6 (100)	3/6 (50)	3/6 (50)	3/6 (50)
IV	0/11 (0)	1/11 (9)	0/11 (0)	0/11 (0)	0/11 (0)	0/11 (0)	0/11 (0)	0/11 (0)

*Numerador: Pruebas positivas. Denominador: Pruebas realizadas

Valoración comparativa entre métodos de diagnóstico serológico en pacientes chagásicos

La evaluación comparativa de la sensibilidad detectada entre los diferentes métodos serológicos convencionales ensayados en el presente trabajo, reveló valores de 77% para la prueba TAD y 100% para las pruebas IFI y ELISA y sobre el 85% en los restantes tests comerciales utilizados. La comparación estadística de la sensibilidad entre los métodos ensayados no arrojó diferencias significativas ($P>0.05$). En relación con la variable especificidad, valores similares fueron detectados en los diferentes métodos comparados con un rango que osciló entre 68% para Chagatest ELISA y 86% para TAD. Similar a lo observado en la variable sensibilidad, los valores de especificidad tampoco

arrojaron diferencias estadísticamente significativas entre las pruebas ($P>0.05$). Detalles particulares sobre cada método se muestran en la Tabla III.

La estimación de los valores predictivos positivos (VPP) permitió, en general, detectar cifras superiores al 85% en la mayoría de los métodos serológicos, lo cual sugiere que las pruebas utilizadas tienen estadísticamente alta probabilidad de detectar las muestras seropositivas. Esta similitud se mantiene cuando se comparan los valores de razón de verosimilitud positiva (RVP), es decir, cuantas veces más probable es la detección de un seropositivo. En este caso los mayores valores obtenidos oscilaron entre 4,40 (IFI, ELISA) y 5,64 (TAD), resultando el método menos confiable el Chagatest ELISA® el cual arrojó un valor de RVP de 2,77. Detalles sobre la

Tabla III. Evaluación estadística comparativa de pruebas serológicas empleadas en el despistaje de la enfermedad de Chagas en el occidente de Venezuela.

Parámetro	TAD	IFI	ELISA	Pharmatest	Chagatest ELISA	Chagatest ELISA Recombinante V3.0	Test ELISA para Chagas III	Chagas Stat -Pak
Sensibilidad	0,77	1,00	1,00	0,88	0,88	0,92	0,85	0,85
Especificidad	0,86	0,77	0,77	0,82	0,68	0,82	0,82	0,82
Valor Predictivo Positivo	0,87	0,84	0,84	0,85	0,76	0,86	0,85	0,85
Valor Predictivo Negativo	0,76	1,00	1,00	0,86	0,83	0,90	0,82	0,82
Razón de Verosimilitud Positiva	5,64	4,40	4,40	4,87	2,77	5,08	4,65	4,65
Razón de Verosimilitud Negativa	0,27	0,00	0,00	0,14	0,18	0,09	0,19	0,19

comparación estadística de variables entre los métodos son presentados en la Tabla III.

Relación costo-beneficio de las técnicas serológicas evaluadas

Siguiendo parámetros similares a los señalados por Bulcao & Yasuda (2003) en el presente trabajo se detectó que los menores requerimientos en equipo, recurso humano especializado e infraestructura fueron precisados para la prueba de TAD y el kit de diagnóstico inmunocromatográfico comercial Chagas Stat Pak Assay®. En relación con el tiempo de ejecución, los métodos más rápidos fueron el kit inmunocromatográfico (Chagas Stat Pak Assay®) e inmunoenzimáticos comerciales con un rango de 15 minutos a 2 horas, mientras que los más consumidores de tiempo fueron las técnicas serológicas convencionales (TAD, IFI y ELISA). Al considerar el costo por prueba, los métodos más costosos resultaron los kits de diagnóstico serológico comerciales Chagatest ELISA *Recombinante V.3.0*® y Chagas Stat Pak Assay®, con estimados entre Bs.F. 38,5 (USA \$ 17,90) y Bs.F. 40 (USA \$ 18,6) por muestra respectivamente. Las pruebas más económicas fueron las técnicas serológicas convencionales (TAD, IFI, ELISA) y los kits de diagnóstico serológico comerciales Pharmatest®, Chagatest ELISA® y Test ELISA para Chagas III®. Los costos incluyeron estimaciones de gastos operativos, equipos y reactivos para finales del año 2009. Detalles sobre la relación costo-beneficio se muestran en la Tabla IV.

Pérdida de reactividad en pruebas diagnósticas

El efecto de sucesivos cambios de temperatura en el tiempo sobre los resultados obtenidos con un kit serológico comercial (Test ELISA para Chagas III®-BiosChile) fue evaluado en 99 muestras de sueros de individuos previamente diagnosticados por otros métodos como seropositivos o seronegativos a *T. cruzi*. Los resultados revelaron que los rangos de densidades ópticas entre muestras de pacientes seropositivos o seronegativos a *T. cruzi*, fueron disminuyendo progresivamente en el tiempo. Este hecho reveló el acercamiento de los valores de seropositivos y los seronegativos, incrementando el número de muestras con un resultado impreciso, determinado por valores cercanos al 10% del punto de corte recomendado, según especificaciones de los fabricantes del test. Detalles sobre el resultado comparativo en el tiempo se muestran en la Fig. 1, en la cual se nota que la reactividad del antígeno se mantiene por alrededor de 30 días cuando se somete a cambios de temperatura entre 8°C y 22°C.

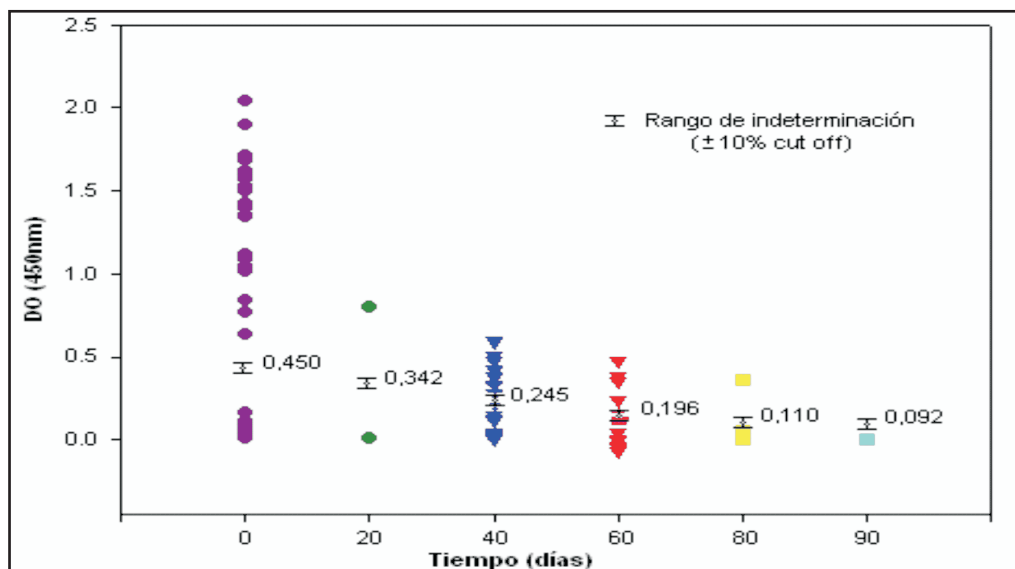
DISCUSION

En el presente trabajo todos los métodos seleccionados para la detección de seropositividad a *T. cruzi* en muestras de pacientes escogidos aleatoriamente fueron capaces de detectar tal condición, cumpliendo con los requisitos aquí establecidos. Este propósito se refleja en el análisis de los resultados obtenidos, el cual reveló valores de sensibilidad y especificidad

Tabla IV. Relación costo-beneficio de métodos serológicos usados en el despistaje de la enfermedad de Chagas en Venezuela.

Métodos	Costo estimado/ prueba		Requerimientos			
	Bs.F.	(USA \$)	Equipo	Recurso humano especializado	Infraestructura requerida	Tiempo estimado para obtener resultado
TAD	30,0	(13,9)	Bajo	Moderado	Bajo	24 horas
IFI	31,0	(14,4)	Moderado	Alto	Moderado	6 horas
ELISA	32,0	(14,8)	Moderado	Moderado	Moderado	8 horas
Pharmatest	32,2	(14,9)	Moderado	Moderado	Moderado	2 horas
Chagatest ELISA	32,8	(15,3)	Moderado	Moderado	Moderado	2 horas
Chagatest ELISA <i>Recombinante V.3.0</i>	38,5	(17,9)	Moderado	Moderado	Moderado	2 horas
Test ELISA para Chagas III	32,8	(15,3)	Moderado	Moderado	Moderado	2 horas
Chagas Stat-Pak Assay	40,0	(18,6)	Bajo	Bajo	Bajo	15 minutos

Fig.1. Efectos de sucesivos cambios de temperatura sobre la reactividad de una prueba de diagnóstico serológico.



cercanas al 100% en casi todas las técnicas evaluadas. Asimismo, el análisis estadístico comparativo no reveló diferencias significativas entre ellas, lo cual pareciera indicar que cualquiera de las técnicas podrían ser de utilidad para llevar a cabo el diagnóstico serológico en individuos sospechosos de padecer infección por *T. cruzi*. Por otra parte, este hecho pareciera simplificar la escogencia para implementar la ejecución de más de un método para realizar un diagnóstico serológico de certeza en la enfermedad de Chagas. En este caso, la primera prueba a ser implementada, la cual puede considerarse como prueba de rutina, debería caracterizarse por poseer alta sensibilidad permitiendo detectar los casos sospechosos de infección. Esta propuesta coincide con una similar de previos autores (Enciso *et al.*, 2004., Avila *et al.*, 1993) y corrobora la opinión de otros quienes sostienen que la misma podría resultar particularmente importante en bancos de sangre, evitando transmisiones de *T. cruzi* por la vía transfusional (Krauts *et al.*, 1995., Affrachino *et al.*, 1989). La segunda prueba a ser implementada o prueba confirmatoria debería garantizar una alta especificidad, permitiendo discriminar entre reacciones cruzadas ocurridas con otras infecciones, evitando así alarmas innecesarias a causa de un falso resultado positivo. Si existiera discordancia entre ambas pruebas, debería ejecutarse una tercera técnica diagnóstica, tal como ha sido sugerido para estudios epidemiológicos en áreas de Colombia y Venezuela donde la enfermedad

de Chagas es endémica (Guhl *et al.*, 2002; Añez *et al.*, 1999a).

Siguiendo las sugerencias anteriormente mencionadas, y basados en el análisis de los resultados obtenidos en este estudio, los métodos serológicos convencionales IFI y ELISA, los cuales arrojaron un 100% de sensibilidad, así como 3 de los kits de diagnóstico serológico comerciales (Pharmatest®, Chagatest ELISA® y Chagatest ELISA Recombinante V.3.0®) con valores de sensibilidad entre 88% y 92%, pudieran proponerse como pruebas de rutina, mientras que las pruebas comerciales (Pharmatest, Chagatest ELISA Recombinante V.3.0®, test ELISA para Chagas III y Chagas Stat Pak Assay®) además de la prueba convencional TAD, las cuales arrojaron especificidad de 82% y 86% respectivamente, podrían ser utilizadas como métodos confirmatorios para el diagnóstico serológico. Esta propuesta pareciera corresponderse en parte, con la práctica rutinaria de diagnóstico serológico en Venezuela, considerando que los kits serológicos comerciales Pharmatest® y Chagatest ELISA® se encuentran entre las pruebas más usadas para realizar el despistaje de la enfermedad de Chagas en el país (Vielma, 2005). No obstante esto, fue la prueba Chagatest ELISA la que arrojó el menor valor de RVP en el análisis estadístico realizado. Esto indica que la mencionada técnica presenta una mayor probabilidad de generar resultados erróneos. En

consecuencia, se recomienda que en centros donde se emplee esta prueba, debería haber un estricto control de calidad antes de emitir algún resultado diagnóstico de pacientes que resulten seropositivos, lo cual podría lograrse implementando la ejecución de alguna de las pruebas confirmatorias sugeridas aquí (Pharmatest, Chagatest ELISA *Recombinante V.3.0*®, Test ELISA para Chagas III, Chagas Stat Pak Assay® y TAD).

El análisis comparativo de la relación costo-beneficio entre las pruebas ensayadas, indicó que los métodos con menores requerimientos en equipos, personal e infraestructura fueron la técnica de aglutinación directa (TAD) y el kit de diagnóstico inmunocromatográfico comercial Chagas Stat Pak Assay®. Considerando los bajos requerimientos de la técnica de aglutinación directa (TAD) sumado a su relativamente alta sensibilidad y a su alta especificidad y bajo costo, podría sugerirse su uso potencial como prueba de rutina a ser implementada en áreas rurales donde no se cuenta con infraestructura adecuada ni equipos requeridos para ejecutar los complejos protocolos de la mayoría de las técnicas empleadas en el despistaje de la enfermedad de Chagas, lo cual coincide con previas recomendaciones (Roddy *et al.*, 2008; Wendel & Gonzaga, 1993). Además de esto, el kit de diagnóstico inmunocromatográfico comercial Chagas Stat Pak Assay® resultaría, a pesar de su relativamente alto costo unitario, ideal en centros públicos y privados, rurales y urbanos del país por su eficiencia como prueba de alta especificidad y bajos requerimientos, ofreciendo ventajas para ser utilizada en estudios poblacionales de levantamientos epidemiológicos, dada la facilidad para obtener resultados in situ en pocos minutos, sin requerir personal especializado (Luquetti *et al.*, 2003; Ponce *et al.*, 2005).

A pesar de los requerimientos, las técnicas basadas en ELISA presentan la posibilidad de automatización simplificando su ejecución y permitiendo el procesamiento de un gran número de muestras en cortos periodos de tiempo (Wendel & Gonzaga, 1993; Knecher *et al.*, 1994; Guhl *et al.*, 2002). Adicionalmente, estas técnicas en formato cuantitativo podrían eliminar la subjetividad característica de la mayoría de las pruebas serológicas (Zicker *et al.*, 1991). Por estas razones, y dada su alta sensibilidad, las técnicas basadas en ELISA resultan particularmente útiles como pruebas de rutina en centros públicos y privados del país, en especial en aquellos donde se requiera el procesamiento de un gran número de muestras diarias, como ocurre en

bancos de sangre de centros hospitalarios, opinión esta compartida con previos autores (Winkler *et al.*, 1995; Guhl *et al.*, 2002).

La prueba diagnóstica con mayores requerimientos en equipos, personal e infraestructura fue la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Aún así, algunos autores señalan que esta técnica es tradicionalmente usada dada su alta sensibilidad (Oelemann *et al.*, 1998; Malan *et al.*, 2006) lo cual se corrobora en el presente estudio. Sin embargo, su uso se ha restringido a laboratorios debidamente equipados con microscopios de fluorescencia, requiriéndose para su ejecución de técnicos capacitados, ya que la interpretación de los resultados por personal inexperto puede llegar a ser cuestionable (Malan *et al.*, 2006; Andrade *et al.*, 1989). Por estas razones, la técnica de IFI se recomienda sólo como prueba de rutina en centros especializados, para los casos en los que se requiera determinar la fase de la infección chagásica en individuos en los que se deba tomar la decisión de aplicar algún tratamiento tripanocida (Camargo *et al.*, 1986; Luquetti & Rassi, 2000; Añez *et al.*, 2001).

Otro aspecto valorado en el presente trabajo fue la demostración de la pérdida de reactividad de un test comercial (Test ELISA para Chagas III®-BiosChile) luego de haber sido sometido a sucesivos cambios de temperatura por cortos periodos de tiempo. Como resultado fue detectado un progresivo estrechamiento entre las densidades ópticas de los sueros de pacientes seropositivos y seronegativos con el consecuente aumento de diagnósticos erróneos o inconsistentes. La razón de la escasa o nula reactividad pudiera deberse a la pérdida de estabilidad y la consecuente degradación del antígeno como consecuencia de los shock térmicos recibidos en el tiempo, argumento este compartido con De Lima *et al.* (2001) en sistemas inmunodiagnósticos aún tratados con inhibidores de proteasas. Estos hallazgos plantean la necesidad de que cada prueba empleada en el despistaje de la enfermedad de Chagas en centros públicos y/o privados sea ejecutada en su totalidad en un tiempo breve, con la finalidad de garantizar un resultado confiable en la detección de la infección chagásica.

En conclusión, tomando en consideración los aspectos analizados en el presente estudio, podría proponerse una combinación de pruebas candidatas a ser utilizadas como técnicas de rutina y/o métodos confirmatorios de acuerdo a las condiciones presentes

en cada centro diagnóstico. Así para centros localizados en poblaciones rurales con escaso equipamiento e infraestructura y carentes de personal formado, se sugiere la utilización de técnicas sencillas en su ejecución y que a la vez tengan alta sensibilidad/especificidad, bajo costo y reflejen resultados en corto tiempo. En este caso alguna de las pruebas comerciales como Pharmatest®, Chagatest ELISA *Recombinante V.3.0*® o la prueba convencional TAD, pudieran ser seleccionadas como método diagnóstico de rutina, combinándola con una prueba de alta especificidad y corto tiempo de ejecución como el método Chagas stat-pak® como prueba confirmatoria. Otra opción mas económica pudiera ser la combinación de una de las mencionadas pruebas comerciales como rutina y la TAD convencional como confirmatoria dada su alta especificidad. Por otra parte, para centros bien equipados donde se procesa un gran número de muestras las pruebas formato ELISA podrían considerarse como rutinarias, pudiéndose confirmar con el test Chagas stat-pak® o con IFI o ELISA convencional, dependiendo del nivel de equipamiento. Finalmente, para estudios poblacionales y evaluaciones epidemiológicas in situ, se sugiere la utilización del test Chagas stat-pak® assay de Chembio, el cual además de registrar resultados inmediatos, arroja alta especificidad (82%) y alto valor predictivo positivo (85%) y alta razón de verosimilitud positiva (4,65) estadísticos que la definen como prueba excelente para detección de prevalencia nacional.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por los proyectos FONACIT G-2005000370 (NA), G-2005000387 (ON) y G-2006000457 (NA). Los autores agradecen al Dr. Rafael Rangel-Aldao su diligente ayuda en conseguir la donación de la prueba Chagas Stat Pak Assay®. Nuestro agradecimiento al personal del Banco de Sangre del Hospital "Luis Razetti", Barinas, por su colaboración, a la coordinación de salud del estado Barinas por la donación del Pharmatest y a los pacientes chagásicos por su comprensión.

Comparative evaluation of serologic diagnostic tests used to detect Chagas disease in Venezuela

SUMMARY

The comparative evaluation of conventional serologic methods (DAT, IFAT, ELISA) and commercial

tests (Pharmatest®, Chagatest ELISA®, Chagatest ELISA *Recombinant V.3.0*®, Test ELISA for Chagas III®, Chagas stat pak™ assay®) commonly used to detect Chagas disease is presented. Sera samples were taken from chagasic patients and controls from different rural localities of western Venezuela. Statistical comparison of the sensitivity and specificity level, revealed no-significant differences among methods ($P > 0.05$). To warrant a secure sero-diagnosis the implementation of a routine and a confirmatory test is suggested. The cost-benefit analysis showed significant differences among methods, suggesting its use according to the condition of each diagnostic center. Considering the results obtained in the present study a combination of candidate tests is proposed to be used either as a routine or confirmatory method according to the circumstances. The effect of thermo-shock on the loss of reactivity of a commercial test is demonstrated.

Key words: Chagas disease, diagnostic, serologic tests, Venezuela.

REFERENCIAS

- Affrachino J. L., Ibañez C. F., Luquetti A. O., Rassi A., Reyes M. B., Macina R. A., Aslund L., Petterson U. & Frasc A. C. (1989). Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* **34**: 221-228.
- Altman D. G. & Bland M. (1994). Statistic Notes: Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity. *B. M. J.* **308**: 1552.
- Andrade A. L., Martelli C. M., Pinheiro E. D., Santana C. L., Borges E. P. & Zicker F. (1989). Rastreamento sorológico para doenças infecciosas em banco de sangue como indicador de morbidade populacional. *Rev. Saud. Públ. São Paulo.* **23**: 20-25.
- Añez N., Carrasco H., Parada H., Crisante G., Rojas A., Gonzalez N., Ramirez J. L., Guevara P., Rivero, C., Borges R. & Scorza J. V. (1999^a). Acute Chagas' disease in western Venezuela: a clinical, seroparasitologic, and epidemiologic study. *Am. J. Med. Hyg.* **60**: 215-222.
- Añez N., Carrasco H., Parada H., Crisante G., Rojas A., Fuenmayor C., Gonzalez N., Percoco G.,

- Borges R., Guevara P. & Ramirez J. L. (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., Yepez Y., Borges R., Guevara P. & Ramirez J. L. (2001). Detection and significance of inapparent infections in Chagas disease in western Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**: 227-232.
- Avila H. A., Pereira J. B., Theimann O., Paiva E., Degrave W., Morel C. M. & Simpson L. (1993). Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: Comparison with serology and xenodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2421-2426.
- Bradley, E. (1987). Better Bootstrap Confidence Intervals. *J. Am. Stat. Assoc.* **82**: 171-185.
- Bulcao A. A. & Yasuda S. A. (2003). Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura a reação em cadeia da polimerasa. *Rev. Saúde. Pública.* **37**: 107-115.
- Camargo M. E. (1966). Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of Chagas disease. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo.* **8**: 227-234.
- Camargo M. E., Segura E. L., Kagan I. G., Souza J. M., Carvalheiro J. R., Yanovsky J. F. & Guimarães M. C. (1986). Collaboration on the standardization of Chagas disease in the Americas: an appraisal. *PAHO Bull.* **20**: 233-244.
- Cochran, W. G. (1985). *Técnicas de muestreo*. CECSA, México.
- De Lima A. R., Fariás M. N., Tortolero E., Navarro M. C. & Contreras V. T. (2001). Purificación parcial y empleo de fracciones glicosídicas de *Trypanosoma cruzi* en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Acta Cient. Venezol.* **52**: 235-247.
- Díaz-Bello Z., Zavala R., Díaz M., Mauriello L., Maekelt A. & Alarcón B. (2008). Diagnóstico confirmatorio de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en donantes referidos de bancos de sangre en Venezuela. *Invest. Clín.* **49**: 141-150.
- Enciso C., Montolla M., Santacruz M. M., Nicholls R. S., Rodriguez A., Marcano M. & Puerta C. (2004). Comparación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta, un inmunoensayo enzimático y la prueba comercial Chagatek para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*. *Biomédica.* **24**: 104-108.
- Gomes M. L., Galvao L. M., Macedo A. M. & Peña S. D. (1999). Chagas' disease diagnosis: Comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 205-210.
- Guhl F., Jaramillo C., Carranza J. C. & Vallejo G. A. (2002). Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Arch. Med. Research.* **33**: 362-370.
- Knecher L. M., Rojkin L. F., Capriotti G. A. & Lorenzo L. E. (1994). Chagas' disease screening in blood bank employing enzyme immunoassay. *Int. J. Parasitol.* **24**: 207-211.
- Krauts G. M., Galvao L. M., Cancado J. R., Guevara-Espinosa A., Ouaisi A. & Krettli A. U. (1995). Use of a 24-Kilodalton *Trypanosoma cruzi* recombinant protein to monitor cure of human Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2086-2090.
- López F. J., Flores H. R. & Ramos C. (2000). Diagnosis of Chagas' disease. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **42**: 121-129.
- Luquetti O. & Rassi A. (2000). Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. P. 344-378. En: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Eds.: Z. Brener, Andrade, Z. A., & Barral-Neto, M. 2nd ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.
- Luquetti A. O., Ponce C., Ponce E., Esfandiari J., Schijman A., Revollo S., et al. (2003). Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas Stat-Pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Diagnos. Microbiol. Infectio. Dis.* **46**: 265-271.

- Malan A., Avelar E., Litwin S. E., Hill H. R. & Litwin C. M. (2006). Serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi*: evaluation of three enzyme immunoassays and an indirect immunofluorescent assay. *J. Med. Microbiol.* **55**: 171-178.
- Oelemann W. M., Teixeira M. D., Verissimo G. C., Borges-Pereira J., De Castro J. A., Coura J. R. & Peralta J. M. (1998). Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2423-2427.
- OMS (2002). *Control of Chagas disease*. Technical report series. Report 905. WHO expert Committee, Geneva, Switzerland.
- OMS/TDR (2007). *Reporte del Grupo de Trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas*. Eds.: Guhl F. & Lazdins-Helds J. 17-20 de Abril 2005, actualizado en Julio 2007.
- Ponce C., Ponce E., Vinelli E., Montoya A., de Aguilar V., Gonzalez A., et al. (2005). Validation of a rapid and reliable test for diagnosis of Chagas' disease in blood donors and patients in Central America. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 5065-5068.
- Roddy P., Goiri J., Flevaud L., Palma P. P., Morote S., Lima N., et al. (2008). Field evaluation of a rapid immunochromatographic assay for detection of *Trypanosoma cruzi* infection by use of whole blood. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 2022-2027.
- Umezawa E., Nascimento M. S., Kesper N., Coura J. R., Borges-Pereira J., Junqueira A. C. & Camargo M. E. (1996). Immunoblot assay using excreted-secret antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas disease. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2143-2147.
- Vattuone N. H. & Yanovsky J. F. (1971). Agglutination activity of enzyme treated epimastigotes. *Exp. Parasitol.* **30**: 349-355.
- Vielma J. R. (2005). *Diagnóstico de la enfermedad de Chagas utilizando como antígeno la proteína recombinante de 24kDa (Pgr24)*. Tesis doctoral Postgrado interdisciplinario en biología celular. Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.
- Voller A., Draper C., Bidwell D. & Bartleti A. (1975). Microplate enzyme-linked-immunosorbent assay for Chagas disease. *The Lancet.* **1**: 426-428.
- Wendel S. & Gonzaga A. L. (1993). Chagas' disease and blood transfusion: A new World problem?. *Vox Sang.* **64**: 1-12.
- Wayne D. W. (2002). *Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud*. Ed. Limusa Wiley, Mexico
- Winkler M. A., Bracear R. J., Hall H. J., Schur J. D. & Pan A. A. (1995). Detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in the southwestern and western United States. II. Evaluation of supplemental enzyme immunoassay and seroreactivity. *Transfusion.* **35**: 219-225.
- Zicker F., Smith P. G., Luquetti A. O. & Oliveira O. S. (1991). Detección de infectados con *Trypanosoma cruzi* mediante inmunofluorescencia, ELISA y hemoaglutinación en sueros y eluidos de sangre seca. *Bol. Sanit. Panam.* **110**: 489-498.

Recibido el 04/09/2009
Aceptado el 28/06/2010

Transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar de segunda generación

Elio A. Moreno¹, Martha Ramírez A¹, Maritza E. Alarcón¹, Ana Lugo de Yarbuh¹, Juana Villarreal¹, Sonia Araujo¹, Nora Mogollón¹, Anajulia González² & Gloria Premoli²

Se presentan los resultados de un estudio experimental sobre la transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi* en crías de ratas albinas (*Rattus norvegicus*), cepa Wistar de segunda generación. El curso de la infección chagásica fue evaluado en las ratas infectadas inicialmente (R1I) inyectadas con las formas metacíclicas del parásito, en las crías de la primera (C1^aG) y segunda generación (C2^aG), mediante pruebas de diagnóstico seroparasitológicas y molecular (PCR). En las R1I se demostró infección aguda caracterizada por parasitemias patentes entre los 12 y 45 días post-inoculación (pi), e incremento en la respuesta inmune humoral con títulos desde 1:64 y 1:2048; en la fase crónica se evidenció ausencia de parasitemias y mantenimiento de una moderada respuesta humoral en el 100% de las madres. Las C1^aG no presentaron tripomastigotes en la sangre circulante, la prueba de IFI, reveló seropositividad apreciable en el 75% de los sueros. En las C2^aG, los exámenes directos de sangre y el hemocultivo, resultaron negativos; los xenodiagnósticos mostraron un 18,2% de positividad. Las pruebas serológicas empleadas (IFI y ELISA) detectaron un 31,8% y 34,1% anticuerpos circulantes anti-*T. cruzi*. La PCR aplicada a los sueros, presentó un bajo porcentaje de muestras positivas (6,8%) y en los tejidos (corazón y músculo esquelético) se observó una alta positividad de 54,5% y 45,4%, respectivamente. La presencia de formas flageladas en la sangre, la persistencia de la serología positiva por anticuerpos humorales transferidos vía materna y la permanencia de restos de ADN de *T. cruzi* en sueros y tejidos en un número importante de crías, confirma la infección congénita a su progenie, en segunda generación. Estos resultados son de gran importancia para una mejor comprensión de la epidemiología de la enfermedad de Chagas congénita.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, Transmisión congénita, ratas Wistar, segunda generación.

INTRODUCCIÓN

La transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* de la madre al hijo ha sido reportada en diferentes países de Latinoamérica. En Venezuela se describe el primer caso de transmisión transplacentaria en un niño de dos días de nacido, hijo de una madre con xenodiagnóstico positivo (Dao, 1949). Posteriormente, otros investigadores refieren nuevos casos de transmisión congénita con descripción de los aspectos clínicos y patológicos de fetos, neonatos y de lesiones placentarias (Gavaller, 1953; Pifano, 1960; Figallo,

1962). Recientemente, Feliciangeli *et al.* (2007) estudiando los factores de riesgo de la infección humana por *T. cruzi* en el estado Barinas, encontraron 4 (0,12%) niños seropositivos en una población de 3.296 examinados. La madre de uno de ellos también resultó seropositiva, lo que sugiere la transmisión congénita como factor de riesgo de la enfermedad de Chagas en esta área endémica.

En Sudamérica, los índices de transmisión congénita de la infección chagásica varían desde 0,1% en regiones de Brasil y Argentina hasta 7% o más en algunas áreas de Bolivia, Chile y Paraguay (WHO, 2002). Hoy día la transmisión congénita significa una importante vía de transmisión generadora de morbilidad y mortalidad a través de las formas aguda (Freilij & Biancardi, 2007) y crónica de la infección (Rassi *et al.* 2004). Por otro lado, en áreas libres de

¹ Laboratorio de Parasitología Experimental LAPEX), Facultad de Ciencia. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

² Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología: Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

*Autor de correspondencia: emorenob@ula.ve

transmisión vectorial de *T. cruzi*, se han detectado casos de transmisión congénita en segunda generación, como una nueva forma de transmisión (Schenone *et al.*, 1987; 2001; Sánchez *et al.*, 2005).

La transmisión congénita de *T. cruzi* puede ocurrir en cualquier fase de la infección materna, aunque el riesgo es mayor en la fase aguda debido a la presencia de parásitos circulantes (Bittencourt, 1992). La fisiopatología de la infección congénita no es muy bien conocida, sin embargo, se ha sugerido que madres infectadas transmiten las formas sanguíneas del parásito al feto por vía hematogénica luego de su pasaje por mecanismos activos a través de la placenta. En las células de Hofbauer los tripomastigotes se transformarían en amastigotes, los cuales se multiplicarían activamente hasta romper las células y liberar los tripomastigotes, estas formas flageladas pueden atravesar el trofoblasto produciendo la infección del feto. Este pasaje probablemente se debe a una placentitis provocada por la multiplicación del parásito y/o por penetración activa de los parásitos hacia la circulación fetal (Bittencourt, 1992). En estos casos, las placentas infectadas muestran un importante aumento de peso, de aspecto amarillentas y edematosas, similar al observado en los casos de sífilis, toxoplasmosis y eritroblastosis fetal (Muñoz, 1998).

La transmisión congénita de *T. cruzi* ha sido demostrada en animales infectados natural y experimentalmente con diferentes cepas del parásito, tales como roedores (ratones, ratas y cobayos) (Mayer & Rocha-Lima, 1914; Carlier *et al.*, 1992; Davila *et al.*, 1994; Carrarão-Abrahão, 2000; Abdelkarim *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2003; 2006;), caninos (Souza-Campos, 1932), monos (Sullivan *et al.*, 1994) y murciélagos (Añez *et al.* 2009). Moreno *et al.* (2005; 2006) estudiando ratas Wistar crónicamente infectadas con *T. cruzi* gestantes, encontraron nidos de amastigotes a nivel de la musculatura cardíaca, esquelética, útero y en las células del estroma placentario, asociados a una discreta miocarditis, miositis y vellositis con características de cronicidad. Señalan los autores que la persistencia de parásitos a nivel del miometrio y de la placenta, sugiere la posibilidad de infección al feto durante su desarrollo intrauterino.

Investigaciones recientes han mostrado el valor de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como herramienta molecular para la detección de restos de ADN de *T. cruzi*, en casos humanos con infección

chagásica congénita (Winker *et al.*, 1994; Virreira *et al.*, 2003; 2006; 2007; Burgos *et al.*, 2007; Brutus *et al.*, 2008; Diez *et al.*, 2008; Corrales *et al.*, 2009). En este trabajo, utilizando métodos seroparasitológicos tradicionales y la nueva tecnología molecular (PCR), nos proponemos a investigar si la transmisión congénita de *T. cruzi* ocurre en crías de ratas Wistar de segunda generación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos

Utilizamos parásitos del aislado de *T. cruzi* I/PAN/Ve/00/Planalto, obtenidos a partir de un triatomino (*Panstrongylus geniculatus*), capturado en la ciudad de Caracas y caracterizado molecularmente como perteneciente al linaje I. Los parásitos fueron mantenidos mediante pasajes sucesivos en el medio cultivo NNN, ratones NMRI y triatominos (*Rhodnius prolixus*) criados en el laboratorio.

Inoculación de las ratas

Un total de 10 ratas hembras de 2 meses de nacidas obtenidas del Bioterio de Cría de la Universidad de Los Andes (BIOULA), ligeramente anestesiadas, fueron inicialmente inyectadas por vía intradérmica (ID) en la cara interna del miembro posterior derecho con un inóculo aproximado de 1×10^4 tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi*. Las ratas infectadas fueron mantenidas en el Bioterio experimental con alimento comercial ratarina® y agua *ad libitum*. El curso de la infección, fue seguido en cada animal a través de las muestras de sangre obtenidas del plexo ocular a los 12, 17, 24, 30, 45 y 60 días postinoculación (pi). Una parte fue utilizada para investigar parasitemias patentes, siguiendo el procedimiento de Brener (1962) y la otra, fue centrifugada a 3000 rpm y los sueros obtenidos se emplearon en la detección de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi*, mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) utilizando como conjugado anti-rata IgG producido en cabra (FITC-isotiosanato de fluoresceína (Sigma, Co) (Camargo, 1966).

En 8 RII, el curso de la infección fue evaluado a los 120 días pi. Las ratas chagásica en estado estacional de estrus y/o proestrus de su ciclo estral (Marcondes *et al.*, 2002), fueron apareadas con machos en una relación 2/1 por jaula. Un vez que las ratas mostraron signos de preñez, se colocaron

individualmente en jaulas con alimento comercial (ratarina[®], Protinal) y agua *ad libitum*, hasta el término de su gestación. Después del parto, las crías fueron amamantadas por sus madres hasta el destete, a los 30 días de nacidas.

Del total de crías de la primera generación (C1^aG), se separaron aleatoriamente 8 ratas juveniles hembras, las cuales fueron mantenidas en jaulas separadas en el Bioterio experimental con alimento comercial y agua *ad libitum*. Antes del apareamiento con machos sanos, la infección chagásica fue evaluada mediante pruebas seroparasitológicas tradicionales. Al término de la gestación, las ratas parieron normalmente y las crías de segunda generación (C2^aG) fueron mantenidas con sus madres hasta el destete.

Evaluación de la transmisión congénita de T. cruzi en las C2^aG

Se investigó la presencia de parasitemias patentes a los 15, 30 y 45 días de nacidas, mediante el examen directo de 5 µL de sangre recién extraída de la cola de cada una de las crías. Después de los 45 días, las parasitemias ocultas o subpatentes fueron evaluadas por métodos parasitológicos indirectos tales como el hemocultivo y el xenodiagnóstico. En la preparación de los hemocultivos se utilizaron 0,3 mL de sangre orbital obtenida estérilmente que fue agregada a los tubos con el medio de cultivo NNN, adicionados con solución salina como fase líquida y suplementados con penicilina y estreptomycin. Los tubos se colocaron en estufa a 27°C y fueron revisados a los 20 y 30 días de incubación, a fin de constatar la presencia de formas flageladas del parásito.

Los xenodiagnósticos fueron realizados utilizando 5 ninfas de IV estadio de *R. prolixus* obtenidas del Insectario de cría "Dr. Herman Lent" del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes. Los triatomíneos fueron alimentados durante 30 minutos sobre cada una de las crías juveniles. Después de la ingesta sanguínea, las ninfas fueron colocadas en frascos de compota con trozos de papel previamente acondicionados para su desplazamiento y mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa en el insectario experimental. A los 30 días post-ingestión, las ninfas nuevamente se alimentaron sobre ratones sanos y 30 días después de la última ingesta sanguínea, el contenido intestinal de cada uno de los triatomíneos

fue recolectado, mezclado y homogenizado con solución fisiológica para examinarlas al microscopio de luz con mediano aumento (400X), a fin de constatar la presencia del protozoario dentro del vector.

Obtención y procesamiento de la sangre y tejidos

De cada una de las crías, se obtuvo aproximadamente 2 mL de sangre por ruptura con capilares heparinizados del plexo retro-orbital del ojo derecho. La sangre recogida en tubos eppendorf se dejó reposar a temperatura ambiente por 1 hora (h) y el suero fue separado por centrifugación a 2500 rpm durante 20 minutos (min). El suero obtenido, fue repartido en 3 viales estériles y almacenados a -20 °C, hasta su uso.

Todas las crías fueron sacrificadas para extraer el corazón completo que fue cortado frontalmente en dos partes y fragmentos de músculo esquelético poplíteo del miembro posterior derecho. Los órganos se fijaron en formalina neutra al 10% durante 48 h e incluidos en Paraplast (Monoject, St. Louis, MO, USA). Los cortes de corazón y músculo esquelético de 6 µm de espesor, fueron realizados en un microtomo American Optical spencer "820".

Estimación de anticuerpos (Ac) específicos anti-T. cruzi

La presencia de Ac anti-*T. cruzi* fue evidenciada cuantitativamente por las técnicas de IFI y por el Ensayo Inmunoenzimático (ELISA), utilizando como anticuerpo secundario anti- rata (IgG y IgM) conjugado con peroxidasa producida en conejo (Sigma) (Voller *et al.*, 1975).

Extracción de ADN de T. cruzi en sueros

Los sueros obtenidos de cada una de las crías, fue centrifugado a 3000 rpm durante 10 min a 5 °C, para su concentración. De los concentrados proteicos, se tomaron 10 µL de cada uno, se mezclaron con 8 µL de agua megapura y 2 µL de proteinasa K (20mg/mL). El sedimento final fue incubado durante 3 h a 37 °C y posteriormente se le añadieron 5 µL de Quelex 100 (20% en agua pura ajustado a pH 8,5 con NaOH); fue tratada a 95°C durante 10 min y centrifugada a 3000 rpm por 5 min. El sobrenadante obtenido fue utilizado en la ejecución de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Rolfs *et al.* 1992).

Extracción de ADN de *T. cruzi* en tejidos

Las secciones de corazón y músculo esquelético fueron desparafinadas, utilizando xilol durante 20 min a 52 °C por 2 veces; 2 lavados con etanol al 100% y tratadas con sodium dodecyl sulfate (SDS) a 0,5% y proteinasa K (20 mg/mL), se incubaron a 56 °C durante toda la noche. Después de la inactivación de la proteinasa K, el ADN fue extraído usando la técnica de extracción con fenol:cloroformo y precipitación con etanol absoluto (González *et al.* 1994).

Detección del parásito por PCR

Durante la ejecución de la técnica se amplificó un producto de 126pb de la región del espaciador intergénico del ARN ribosomal del parásito: TCPM2: 5'-GGG AGA GGT TCC AGA TGT-3' y TCPM4: 5'-GTC GGA GCA GGG ACA GCA-3' (Bio-Synthesis. Inc. USA). La prueba fue realizada en un volumen de 25 µL que contenía 250-300 ng de ADN de las muestras, 0,2 µM de cada primer, 0,2 mM de cada dNTP (Promega, Madison, WI, USA), 1U de Go Taq DNA polimerasa, 1X de buffer de PCR y 2,5 mM MgCl₂. Se utilizó un termociclador (MJ Research, BioRad, USA), llevando a cabo los siguientes parámetros: 5 min a 94 °C seguido de 10 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 53 °C, 1 min a 72 °C y otros 25 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 53 °C y 1 min a 72 °C. Los productos amplificados fueron analizados en un gel de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un analizador digital de geles (UVP, USA).

RESULTADOS.

Evaluación de la infección en las RII

Durante el curso de la infección chagásica, se observó la presencia de parasitemias patentes en el 100% de las RII, entre los 12 y 45 días pi, registrándose los máximos niveles parasitémicos a los 24 y 30 días pi, con promedios de $17,5 \pm 3$ y 9 ± 2 trip/mm³ de sangre. La mortalidad registrada durante la fase aguda de la infección, fue del 20% (2/10).

La presencia de anticuerpos polivalentes anti-*T. cruzi* detectados con la reacción de IFI, fue evidente a partir de los 12 días pi, observándose un aumento progresivo de los títulos que oscilaron entre 1:64 y 1:2048 respectivamente.

Evaluación de la infección en la C1^aG

Los exámenes parasicológicos directos efectuados a las C1^aG, no mostraron parasitemias patentes ni mortalidad. Los exámenes inmunológicos realizados con la técnica de IFI, reveló seropositividad en el 75% de las crías, con títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi* que oscilaron entre 1:32 y 1:128.

Estimación parasitológica y serológica en la C2^aG

Los exámenes parasitológicos realizados en las muestras de sangre de cada una de las 44 crías juveniles, no mostraron parasitemias patentes. En los hemocultivos examinados a los 20 y 30 días, no se observaron formas flageladas de *T. cruzi*. Los xenodiagnósticos efectuados con ninfas de *R. prolixus*, revelaron una positividad en 8/44 (18,2%) crías. Las 8 crías que resultaron positivas, provenían de dos madres de la primera generación (Tabla I).

La reacción de la IFI, reveló reactividad positiva en el 31,8% (14/44) de los sueros de crías, con títulos de Ac anti-*T. cruzi* que oscilaron entre 1:32 y 1:128. Los sueros tratados con la técnica de ELISA, mostraron una seropositividad del 34,1% (15/44), con un cut-off de 0,140 de DO (Tabla I).

Detección de restos de ADN

La técnica de PCR aplicada a los 44 sueros obtenidos de las crías juveniles, determinó amplificados de restos de ADN de *T. cruzi* en 6,8% (3/44) de los sueros tratados (Tabla I). La PCR aplicada en las muestras de corazones y músculo esquelético de las crías, mostró porcentajes variables de amplificados de ADN del parásito de 54,5% (24/44) y 45,4% (20/44) respectivamente (Tabla I) (Fig. 1).

DISCUSIÓN

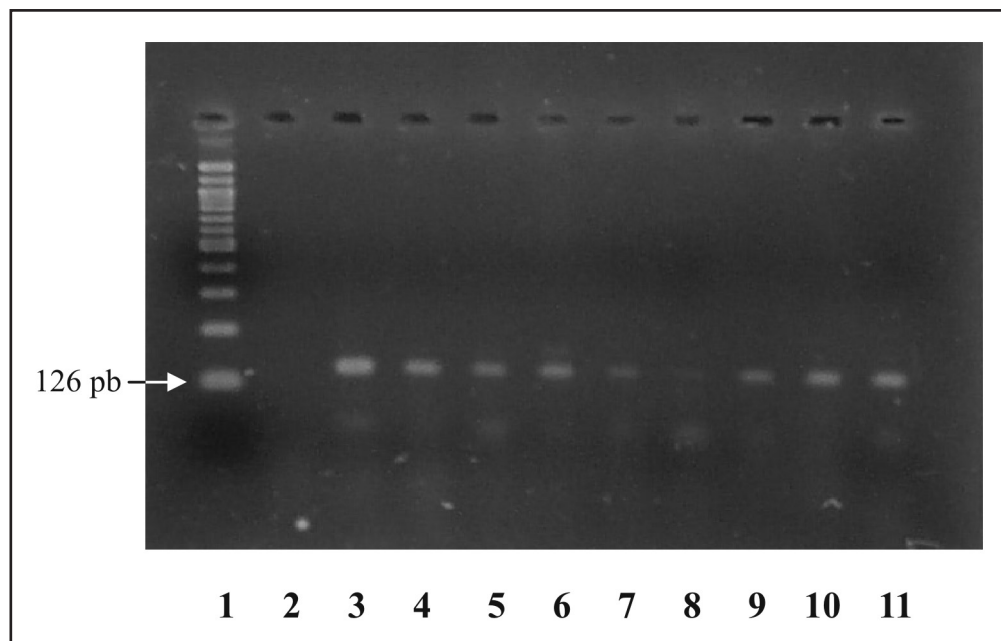
La transmisión vectorial sigue siendo en algunos países de América Latina el principal mecanismo de transmisión de *T. cruzi*, pero en los países donde se ha interrumpido esta forma de transmisión, la transmisión congénita adquiere más importancia, ya que este sería el principal factor, conjuntamente con la transmisión sanguínea de nuevas infecciones por *T. cruzi* (OPS, 2004). Este mecanismo de transmisión congénita de *T. cruzi* ha sido evidenciado en el modelo experimental rata Wistar, a un número reducido

Tabla I. Resultados de la pruebas diagnósticas aplicadas a las crías de ratas Wistar de segunda generación.

Rata N°	N° de crías	Pruebas diagnósticas aplicadas								
		Ex. Directo	Parasitológicas			Serológicas		molecular (PCR)		
			Hemocultivo	Xendiagnósticos	IFI	ELISA	sueros	C	ME	
1	3	-	-	-	1c+	1c+	-	3c+	3c+	
2	2	-	-	-	1c+	1c+	-	2c+	2c+	
3	2	-	-	-	1c+	2c+	-	2c+	2c+	
4	3	-	-	-	-	-	-	3c+	1c+	
5	8	-	-	3c+	3c+	3c+	1c+	5c+	3c+	
6	8	-	-	5c+	8c+	8c+	2c+	7c+	7c+	
7	10	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	8	-	-	-	-	-	-	2c+	2c+	
Total	8	44	0	0	8/44	14/44	15/44	3/44	24/44	20/44
%					18,2	31,8	34,1	6,8	54,5	45,4

IFI: Inmunofluorescencia indirecta; ELISA: Ensayo inmunoenzimático; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; c: cría; ME: Músculo esquelético; C: Corazón

Fig. 1. Detección de restos de ADN de *T. cruzi* por PCR en muestras de tejidos de crías de ratas Wistar de segunda generación. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con amplificados de 126 pb. Descripción: 1. Marcador de peso molecular; 2. Control negativo; 3. Control positivo; 4. Corazón de la cría 1; 5. Corazón de la cría 3; 6. Músculo esquelético de la cría 3; 7. Músculo esquelético de la cría 1; 8. Músculo esquelético de la cría 2; 9. Corazón de la cría 2; 10. Músculo esquelético de la cría 4; 11. Corazón de la cría 4.



de crías de la 1ªG (Moreno *et al.*, 2003). En este trabajo, utilizando el mismo modelo experimental, comprobamos por el método parasitológico tradicional como el xenodiagnóstico, la presencia del parásito dentro del vector; y por la PCR en sueros y tejidos, la persistencia de resto de ADN de *T. cruzi*, en las crías de segunda generación. Los xenodiagnósticos aplicados a las C2ªG, permitieron amplificar el número de parásitos que se encontraban presentes en la sangre, debido a la fácil multiplicación del parásito en el tubo digestivo del vector natural. La sensibilidad del método permitió detectar un moderado porcentaje de positividad (18,2 %) en las C2ªG. Las crías que desarrollaron formas flageladas de *T. cruzi*, provenían de dos madres de la 1ªG que no habían sido infectadas artificialmente, lo que sugiere que su infección chagásica fue adquirida por vía congénita. Este hallazgo es similar a los publicados en casos humanos por Schenone *et al.* (1987) en Chile, quienes describieron un primer caso de enfermedad de Chagas congénita de segunda generación; posteriormente, describieron dos nuevos casos de transmisión congénita en hijos de mujeres con xenodiagnósticos positivos, nacidos en la ciudad de Santiago y sin antecedentes de haber vivido en áreas endémicas para la enfermedad de Chagas (Schenone *et al.*, 2001). En Salta, Argentina, Sánchez *et al.* (2005) reportaron nuevos casos de transmisión congénita en segunda generación en 13 niños infectados con *T. cruzi* de un total de 26 niños estudiados, provenientes de 4 de 6 madres con infección chagásica. Por otro lado, Freilij & Biancardi (2007), señalaron haber asistido niños en el Hospital Ricardo Gutiérrez de Buenos Aires, cuyas madres también habían adquirido la infección por vía transplacentaria, conocido como Chagas congénito de segunda generación.

La respuesta humoral en ratas Wistar, experimentalmente infectadas con *T. cruzi*, ha sido evidenciada por diferentes investigadores (Kolodny, 1939; Moreno *et al.*, 2003; 2005; 2006). La presencia de Ac anti-*T. cruzi* en los sueros de las crías, fue confirmada utilizando dos técnicas serológicas de principios diferentes (IFI y ELISA), como es recomendado por la WHO (1991). Estos Ac anti-*T. cruzi*, así como los Ac de origen materno son transmitidos vía transplacentaria y/o a través del amamantamiento a una gran parte de las crías (Medina-Lopes & Macedo, 1983), los cuales, son los responsables en la instauración de un estado de resistencia, confiriéndole a las crías una cierta inmunidad contra nuevas infecciones por *T. cruzi*

(Kolodny, 1939; Miles, 1972; Marques de Araujo & Chiari, 1996; Mogollón, 2008).

Se ha señalado que la PCR es una técnica de gran sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, en tejidos y en sangre total de pacientes chagásicos (Junqueira *et al.* 1996). Esta prueba diagnóstica ha sido exitosa durante la fase aguda de infección chagásica debido a las altas parasitemias. Mientras que en la fase crónica de la enfermedad la técnica ha funcionado con un 100 % de especificidad. Sin embargo, la sensibilidad ha presentado resultados variables y se requieren elevados volúmenes de sangre, debido a los niveles subpatentes de parasitemias presentes en los pacientes (Burgos *et al.*, 1994). Avila *et al.* (1993) al comparar la PCR con las técnicas parasitológicas convencionales, demostraron que la amplificación del ADN del kinetoplasto de *T. cruzi*, podría reemplazar al xenodiagnóstico y a las pruebas serológicas para la evaluación de pacientes en la fase crónica de la enfermedad de Chagas. Mediante la aplicación de la PCR en un área rural de transmisión activa para la enfermedad de Chagas en Bolivia, Wincker *et al.* (1994) demostraron que 92,9% de los niños serológicamente positivos, presentaban parásitos en la sangre circulante, y dos niños con serología negativa, fueron confirmados con la PCR como casos positivos. Recientemente, Diez *et al.* (2008) en un estudio comparativo entre la PCR y el microhematocrito como método de concentración, basado en la identificación de formas sanguícolas y/o seroconversión después de 9 meses de edad, mostraron un 2,5% (3/121) de neonatos que fueron diagnosticados como infectados cuando utilizaron el microhematocrito, mientras 9,9% (12/121) de ellos fueron positivos con la PCR. Al comparar el análisis entre ambos métodos parasitológicos, la prueba de PCR mostró una mayor sensibilidad respecto al microhematocrito ($P < 0,0008$).

Estudios experimentales sobre la transmisión congénita de *T. cruzi*, efectuados en ratas Wistar, demostraron por medio de la PCR la presencia de restos de ADN del parásito en muestras de sueros de las crías nacidas de madres chagásicas (Ruiz, 2007). En este trabajo, aplicando esta técnica molecular a los sueros obtenidos de las C2ªG, se detectaron amplificados de ADN de *T. cruzi* en un bajo porcentaje de los sueros tratados (6,8 %), resultados que confirman la presencia del parásito en un número reducido de crías. No obstante, a pesar de que la PCR es una prueba más sensible que el xenodiagnóstico, la positividad

obtenida con esta técnica en los sueros fue mucho menor. Una explicación por el bajo número de reacciones positivas, podría ser atribuida a la presencia de muy pocos parásitos en la sangre de las crías y estos fueron escasamente detectados por la PCR, y la otra explicación estaría relacionada con la composición del suero sanguíneo, el cual es una solución acuosa de composición compleja que contiene un 91% de agua, proteínas y algunos rastros de otros materiales como electrolitos y hormonas, donde la porción de ADN esta reducida a trazas procedentes de células sanguíneas y parásitos que han sido destruidos (Brito *et al.*, 2001; Abbas & Lichtman, 2004).

La PCR aplicada a los tejidos fue más efectiva, demostrando la presencia de restos de ADN de *T. cruzi* en el músculo cardíaco (54,5%) y en la musculatura esquelética (45,4%). Estos altos porcentajes de positividad confirman la presencia del parásito en estos tejidos. Estos hallazgos concuerdan con los resultados publicados por Mejía & Triana (2005) quienes estudiando por LSSP-PCR la variabilidad genética de *T. cruzi* en sangre y órganos de ratones, encontraron en el corazón el mayor número de resultados positivos lo que indicaba la presencia de parásitos en este órgano. Ambos resultados apoyan el uso de pruebas de diagnóstico molecular para el estudio de la epidemiología de la enfermedad de Chagas.

En la literatura se ha señalado que esta metodología de alto impacto no permite discriminar la fase de la infección en la que se encuentra el individuo enfermo, por esta razón, siempre es recomendable utilizar otros métodos de diagnóstico convencionales que permitan diferenciar entre una infección reciente y otra tardía.

Finalmente, es importante seguir investigando los factores que pueden incidir en las variaciones observadas en la transmisión congénita del parásito en generaciones sucesivas, tales como: el hospedador vertebrado, el linaje genético del aislado de *T. cruzi*, la patogenicidad de los parásitos empleados, la forma y número de parásito inoculado así como la vía de inoculación; conociendo estos factores vamos a tener un mayor conocimiento sobre el mecanismos de transmisión congénita de *T. cruzi*.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico por el financiamiento del Proyecto C-1368-06-03-B.

Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in second generation Wistar rats.

SUMMARY

The results of the experimental study concerning the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in second generation strain Wistar albino rats are presented. The course of the Chagas infection was evaluated in rats initially infected with the metacyclic forms of the parasite (RII) in first (C1stG) and second (C2ndG) generation offspring using parasitological, serological and molecular (PCR) diagnostic tests. In the RII, an acute infection characterized by patent parasitemias between 12 and 45 days post-inoculation and an increase in the humoral immune response with titers of 1:64 and 1:2048 in the chronic phase demonstrated the absence of parasitemia and maintenance of a moderate humoral response in 100% of the mothers. The C1stG did not show tripomastigotes in the blood circulation and the IIF test showed considerable seropositive in 75% of the sera. In C2ndG, direct blood and hemoculture exams performed were negative, while 18.2% of the xenodiagnosis were positive. The serological tests used (IIF and ELISA) detected 31.8% and 34.1% anti-*T. cruzi* circulating antibodies. The PCR applied to the serum presented a low percentage of positive (6.8%) samples and in tissues (heart and skeletal muscle) high positives of 54.5% and 45.4% respectively were observed. The presence of flagellated forms in the blood, the persistence of serological positive for humoral antibodies transferred by the mother and the permanence of remaining DNA of the *T. cruzi* in serum and tissues in a significant number of offspring confirm the congenital infection to their offspring in the second generation. These results are of great importance for the better understanding of the epidemiology of Chagas disease.

Key Words: *Trypanosoma cruzi*, congenital transmission, Wistar rats, second generation, polymerase chain reaction.

REFERENCIAS

- Abbas A. & Lichtman A. (2004). *Inmunología celular y molecular*. Saunder- Elsevier. 5ta Ed. España.
- Abdelkarim M., Lambot M. A., Stewart I. J., Detournay J. C. N., Carlier Y. & Truyens C.

- (2002). Acute *Trypanosoma cruzi* infection in mouse induces infertility or placental parasite invasion and eschismic necrosis associated with massive fetal loss. *Am. J. Pathol.* **161**: 673 - 680.
- Añez N., Crisante G. & Soriano P. (2009). *Trypanosoma cruzi* congenital transmisión in wild bats. *Acta Tropica.* **109**: 78 - 80.
- Avila H. A., Pereira J. V., Thiemann O., De Paiva E., De Grave W., Morel C. M. & Simpson L. (1993). Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2421- 2426.
- Bittencourt A. L. (1992). Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo.* **34**: 403 - 408.
- Burgos J. M., Altcheh J., Bisio M., Duffy T., Valadares H. M., Seidenstein M. E., et al. (2007). Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas' disease. *Int. J. Parasitol.* **37**: 1319-27.
- Brener Z. (1962). Observações sobre a imunidade a superinfecções em camundongos experimentalmente inoculados con *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratamento. *Ver. Inst. Méd. Trop. São Paulo.* **4**: 119 - 123.
- Britto C., Silveira C., Cardoso M.A., Marques P., Luquetti A., Macedo V. & Fernandes O. (2001). Parasite Persistence in Treated Chagasic Patients Revealed by Xenodiagnosis and Polymerase Chain Reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **96**: 1 - 4.
- Brutus L., Schneider D., Postigo J., Romero M., Santalla J. & Chippaux J. P. (2008). Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects in an area without vectorial transmission, Bermejo, Bolivia. *Acta Tropica.* **106**: 195 - 199.
- Camargo M. E. (1966). Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american trypanosomiasis, technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **8**: 227 - 234.
- Carlier Y., Rivera M., Truyens C., Ontivero M., Flament J., Van Marck E., et al. (1992). Chagas' disease: decreased resistance to *Trypanosoma cruzi* acquired infection in offspring of infected mice. *Am. J. Trop. Méd. Hyg.* **46**: 116 - 122.
- Carrarão-Abrahão A. A., Lopes R. A., Salas M. A., Ribeiro R. D., Prado Jr. J. C., Albuquerque S. & Garcia T. A. R. (2000). Placental alterations of swiss mice infected with RAL strain of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **95(Suppl. II)**: 122.
- Corrales R. M., Mora M. C., Negrette O. S., Diosque P., Lacunza D., Virreira M., et al. (2009). Congenital Chagas' disease involves *Trypanosoma cruzi* sub-lineage IId in the northwestern province of Salta, Argentina. *Infect. Genet. Evol.* **9**: 278 - 282.
- Dao L. (1949). Otros casos de enfermedad de Chagas en el Estado Guárico (Venezuela), formas agudas y crónicas; observaciones sobre enfermedad de Chagas congénita. *Rev. Policlin. Caracas.* **17**: 17-32.
- Davila H. O., Revelli S. S., Moreno H. S., Valenti J. L., Musso O. C., Poli H. O., et al. (1994). Infection with *Trypanosoma cruzi* during pregnancy in rats and a decrease in chronic myocardial lesions in their infected offspring. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**: 506 - 511.
- Diez C., Manattini S., Imaz M. S., Zanuttini J. C. & Marcipart A. (2008). PCR (polymerase chain reaction) in neonatal Chagas' disease. An alternative for its early diagnosis?. *Medicina (B. Aires).* **58**: 436 - 437.
- Feliciangeli M. D., Sanchez-Martin M. J., Suarez B., Marrero R., Torrealba A., Bravo A., et al. (2007). Risk factors for *Trypanosoma cruzi* human infection in Barinas state, Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **76**: 915-992.
- Figallo E. L. (1962). La enfermedad de Chagas congénita. *Arch. Venez. Med. Trop. Parasitol. Méd.* **2**: 43 - 263.
- Freilij H. & Biancardi M. (2007). Enfermedad de Chagas Congénito. Mesa Redonda "Formas de transmisión

- congénita"; 1-12. Disponible en: URL: <http://www.fac.org.ar/fec/chagas2/llave/md3/md301/freilij.htm> (Consultado: Diciembre 12, 2009).
- Gavaller B. (1953). Enfermedad de Chagas congénita. *Bol. Mat. Concepción Palacios*. **4**: 167 - 173.
- González N., Galindo I., Guevara P., Novak E., Scorza J. V., Añez N., et al. (1994). Identification and detection of *Trypanosoma cruzi* by using a DNA amplification fingerprint obtained from the ribosomal intergenic spacer. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 153 - 158.
- Junqueira A. C., Chiari E. & Wincker P. (1996). Comparison of the polymerase chain reaction with classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas' disease in an endemic two region of north-eastern Brazil. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **90**: 129 - 132.
- Kolodny M. (1939). The transmission of immunity in experimental trypanosomiasis (*Trypanosoma cruzi*) from mother rats to their offspring. *Am. J. Hyg.* **30**: 19 - 39.
- Marcondes F. K., Bianchi F. J. & Tanno A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: *Braz. J. Biol.* **62**: 609-614.
- Marques de Araujo S. & Chiari E. (1996). *Trypanosoma cruzi* infection in offspring born to chagasic C3H/He mice mothers. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **91**: 211-216.
- Mayer M. & Rocha-Lima H. (1914). Zum Verhalten von Schizotrypanum cruzi in warm blutern und Arthropoden. *Arch. F. U. Schiffs -u Tropenhyg.* **18**: 257 - 292.
- Medina-Lopes M. D. & Macedo V. (1983). *Trypanosoma cruzi* no calostro humanos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **16**: 170.
- Mejía A.M. & Triana O. (2005). Análisis por LSSP-PCR de la variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi* en sangre y órganos de ratones. *Biomédica*. **25**: 76 - 86.
- Miles M. A. (1972). *Trypanosoma cruzi*-milk. transmission of infection and immunity from mother to young. *Parasitol.* **65**: 11-21.
- Mogollón N. E. (2008). *Influencia de las reinoculaciones homólogas y heterólogas con Trypanosoma cruzi sobre las crías nacidas de ratas Wistar con infección chagásica crónica*. Trabajo Especial de Grado, Univ. de Los Andes, Mérida - Venezuela.
- Moreno E. A., Rivera I., Moreno S. C., Alarcón M. & Lugo de Yarbuh A. (2003). Transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar durante la fase aguda de la infección. *Invest. Clin.* **44**: 241-254.
- Moreno E. A., Araujo M. A., Alarcón M. E., Lugo de Yarbuh A., Araujo S. & Borges R. (2006). Efectos de la infección chagásica aguda en ratas Wistar gestantes. *Rev. Cientif. FCV-LUZ.* **16**: 506 - 516.
- Moreno E. A., Méndez M. J., Alarcón M. E., Araujo S., Lugo de Yarbuh A. & Moreno S. C. (2005). Reactivación de la infección chagásica en ratas Wistar gestantes. *Kasmera*. **33**: 51 -63.
- Moreno E. A., Quintero A. C., Alarcón M. E., Lugo de Yarbuh A., Moreno S. C, Araujo S. & Borges R. (2006). Investigaciones sobre la transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar crónicamente infectadas. *Bol. Mal. Salud Amb.* **46**: 149 - 160.
- Muñoz C. P. (1998). Transmisión congénita de parásitos. pp.: 509 - 522. En: *Parasitología Clínica*. Eds.: Attias-Negheme. Publicaciones Técnicas Mediterráneo. Santiago, Chile.
- OPS (2004). *Informe de la XIII Reunión para la Comisión Intergubernamental del Cono Sur para la eliminación del Triatoma infestans y la interrupción de la tripanosomiasis americana por transfusión*. Marzo 29-31, Buenos Aires, Argentina.
- Pifano F. (1960). Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas en Venezuela. *Arch. Venez. Med. Trop. Parasit. Méd.* **3**: 73 - 99.
- Rassi A., Amato Neto V., Rassi G. G., Amato V. S., Rassi A. J., Luquetti A. & Rassi S. G. (2004). Busca retrospectiva da transmissão materna da infecção chagásica em pacientes na fase crônica. *Soc. Bras. Med. Trop.* **37**: 1 -12.
- Rolfs A., Schuller I., Finckh U. & Weber-Rolfs. (1992). PCR clinical diagnostic and research. Germany: Springer-Verlag, P 271.

- Ruiz G. (2007). Estudio de la modulación materna de la repuesta inmunológica de crías nacidas de ratas Wistar infectadas experimentalmente con *Trypanosoma cruzi*. Trabajo Especial de Grado, Univ. de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Sánchez O. N., Mora M. C. & Basombrio M. A. (2005). High prevalence of congenital *Trypanosoma cruzi* infection and family clustering in Salta, Argentina. *Pediatrics*. **115**: e668 - 672.
- Schenone H., Iglesias J., Schenone S. & Contreras M. C. (1987). Infección chagásica congénita de segunda generación. *Bol. Chil. Parasit.* **42**: 71 - 73.
- Schenone H., Gaggero M., Sapunar J., Contreras M. C. & Rojas A. (2001). Congenital Chagas' disease of second generation in Santiago, Chile. Report of two cases. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **43**: 231 - 232.
- Souza-Campos E. (1932). Tripanosome amaricana congénita do cao. *Méd. Prat.* **2**: 57 - 70.
- Sullivan J. J., Bishop H. S., Klippel-Means L., Rock L. & Ware D. (1994). Congenitally transmitted *Trypanosoma cruzi* among laboratory-reared offspring of naturally infected squirrel monkeys. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**: 170.
- Virreira M., Torrico F., Truyens C., Alonso-Veja C., Solano M. & Carlier Y. (2003). Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Trop. Méd. Hyg.* **68**: 574 - 82.
- Virreira M., Alonso-Veja C., Solano M., Jijena J., Brutus L., Bustamante Z., et al. (2006). Congenital Chagas' disease in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75**: 871-879.
- Virreira M., Truyens C., Alonso-Veja C., Brutus L., Jijena J., Torrico F., et al. (2007). Comparison of *Trypanosoma cruzi* lineages and levels of parasitic DNA in infected mothers and their newborns. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**: 102-106.
- Voller A., Draper C., Bidwell D., Brtleti A. (1975). Microplate enzyme-linked-immunosorbent assay for Chagas' disease. *The Lancet*. **1**: 426 - 428.
- Winker P., Bosseno M. F., Britto C., Yaksic N., Cardoso M. A., Medicis M. C. & Brenière S. F. (1994). High correlations between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. *FEMS Microbiol Letters*. **124**: 419 - 423.
- WHO (1991). *Control of Chagas' disease*. Tech. Rep. Ser. No. 811. Geneva, Switzerland.
- WHO (2002). *Control of Chagas' disease*. Tech. Rep. Ser. No. 905. Geneva, Switzerland.

Recibido el 07/07/2009
Aceptado el 10/04/2010

Análisis cuantitativo del crecimiento y cambio morfométrico en poblaciones de *Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi* mantenidos en cultivos axénicos puros y mixtos

Carmen Duran¹, Dubrasyka Rodríguez-Bolívar², Antonio Roschman-Gonzalez³, Mirian Strauss⁴ & Felix Tejero²

Las relaciones que se establecen entre géneros de la familia Trypanosomatidae en condiciones de coexistencia en el mismo medioambiente pueden estar vinculadas a respuestas compensatorias inter-poblacionales que incluyen cambios morfológicos (diferentes estadios) y morfométricos (diferencias mensurables). El análisis cuantitativo de tales respuestas en cultivos axénicos puros de *Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi*, así como en isomezclas axénicas de *L. chagasi*-*T. cruzi* mantenidas *in vitro*, no ha sido abordado, desconociéndose por lo tanto, particularidades biológicas. Muestras interdiarias de cultivo se fijaron, colorearon, observaron, digitalizaron y procesaron cuantitativamente. Además de cuantificar las densidades poblacionales, se registraron las magnitudes numéricas de variables morfométricas que, posteriormente, se analizaron con herramientas estadísticas. Los resultados indicaron cambios específicos en las variables investigadas, así como heterogeneidad morfométrica entre los mismos morfotipos de los mismos géneros al ser mantenidos en cultivos puros o mixtos. Los modelos de cambio morfométrico de *L. chagasi* y *T. cruzi* en cultivos puros difieren de los modelos de cambio morfométrico en los cultivos mixtos (*L. chagasi*-*T. cruzi*). Las metodologías biométricas discriminan, en términos morfométricos, poblaciones del mismo estadio (morfotipo) en ambientes diferentes.

Palabras clave: *Leishmania chagasi*, *Trypanosoma cruzi*, morfometría, *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

Leishmania chagasi y *Trypanosoma cruzi* son los agentes etiológicos de importantes y heterogéneas patologías humanas (WHO, 1990; WHO, 1991) que, además, pueden establecer infecciones simultáneas en mamíferos (incluyendo humanos) de la misma área geográfica (Travi *et al.*, 1994; Corredor-Arjona *et al.*, 1999; Bastrenta *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2007).

La diversidad de la severidad de la Enfermedad de Chagas y otras infecciones por tripanosomas, entre

otras cualidades, ha sido atribuida al pleomorfismo (Andrade, 1985; Brener, 1985; Guzmán-Marín *et al.*, 1999; Ziccardi & Lourenço-de-Oliveira, 1999; Karbowiak & Wita, 2004; Davies *et al.*, 2005), fenómeno que corresponde a la variabilidad celular que expresa un genotipo originando diferentes fenotipos como respuesta acomodaticia a las condiciones ambientales (Overath *et al.*, 1983). Es más, en el torrente circulatorio de los mamíferos pueden coexistir tripanosomas del mismo estadio, reconocibles morfológica y morfométricamente (Urdaneta-Morales, 1983; Tyler *et al.*, 1997; Urdaneta-Morales & Tejero, 1992). En el género *Leishmania* la situación es un tanto controversial. Urdaneta & Scorza (1982), describieron especies venezolanas de *Leishmania* con criterios morfométricos, y está bien documentada la heterogeneidad morfológica de los promastigotes en el tubo digestivo de los Phlebotominae (Walters *et al.*, 1989; Killick-Kendrick & Rioux, 1991; Walters *et al.*, 1993; Gossage *et al.*, 2003; Bates & Rogers, 2004), a pesar de lo cual Lukes *et al.* (2007) establecieron que

¹ Escuela de Medicina "Luis Razetti". Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas.

² Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas.

³ Centro de Microscopía Electrónica. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas.

⁴ Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas.

*Autor de correspondencia: felixtejero@gmail.com

las leishmanias del grupo donovani son indistinguibles en términos clínicos y morfológicos.

En este contexto de diversidad morfométrica, Rohlf & Marcus (1993) y Adams & Funk (1997) establecieron que, al margen de expresar las características genéticas de los organismos, podría indicar multiplicidad de estadios de desarrollo, diversidad de orígenes geográficos e, incluso, resultaría de la acción de efectos ambientales sobre los organismos. Si bien la heterogeneidad genómica de los Kinetoplastida se ha revisado (Simpson *et al.*, 2006), la diversidad morfométrica ha sido poco considerada.

El estudio de la dimensionalidad de los Trypanosomatidae, incluyendo *L. chagasi* y *T. cruzi*, históricamente se ha restringido al registro puntual del tamaño en un momento particular del ciclo de vida (Vickerman, 1976; Vickerman & Preston, 1976; Lom, 1979; Molyneux y Ashford, 1983; Gardiner, 1989; Ashford y Crewe, 2003; Tayler & Engman, 2001; Kochhar, 2004). No obstante, Urdaneta-Morales & Tejero (1992), caracterizaron morfométricamente secuencias pleomórficas en los tripomastigotes hematozoicos de *T. rangeli*, un parásito que según Guhl *et al.* (1987), complica las infecciones humanas por *T. cruzi*.

A pesar de estos antecedentes, el análisis cuantitativo del cambio morfométrico como función del tiempo que se presenta en cultivos puros de *L. chagasi* y *T. cruzi*, así como en cultivos mixtos (*L. chagasi-T. cruzi*) es un tema no investigado que merece atención por cuanto Durán *et al.* (2009), demostraron que *L. chagasi*, *T. cruzi* e isomezclas de *L. chagasi* y *T. cruzi* mantenidas *in vitro* utilizan diferencialmente los sustratos tróficos del medio de cultivo. Así, la caracterización cuantitativa del cambio morfométrico pudiera ser útil en el diseño de estrategias de control de estos importantes parásitos humanos.

Mediante la estimación del crecimiento de las poblaciones y del registro numérico de variables morfométricas indicadas por Hoare (1972), en este trabajo se investigaron las características cuantitativas del cambio morfométrico a lo largo del desarrollo de poblaciones de *L. chagasi* y *T. cruzi* mantenidas en cultivos axénicos puros, así como de isomezclas axénicas *L. chagasi-T. cruzi*.

MATERIALES Y METODOS

Se emplearon las cepas MHOM/BR/74/PP75 de *L. chagasi* e Y de *T. cruzi*. Los parásitos se mantuvieron en medio bifásico "Brain Heart Infusion" (BHI) con fase líquida de NaCl 0,85% y glucosa 1% a la que se añadieron 0,1 mg/mL de gentamicina, 100 IU/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomina y 250 µg/mL de anfotericina B, todo a pH final $7,4 \pm 0,2$. Los experimentos consistieron en tres grupos: cultivos axénicos puros de *L. chagasi*, cultivos axénicos puros de *T. cruzi* y cultivos axénicos mixtos *L. chagasi-T. cruzi* (1:1).

En la fase líquida del medio BHI se sembraron $0,2 \times 10^6$ flagelados/mL provenientes de cultivos que se encontraban en el punto medio de la fase de crecimiento exponencial. Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL con tapa de rosca no apretada provistos de medio bifásico BHI, mantenidos a 26°C en reposo (sólo se agitaron con movimientos elípticos al momento de tomar las muestras) y sin mezcla particular de gases.

Interdiariamente durante 35 días, de la fase líquida de cada grupo experimental (*L. chagasi*, *T. cruzi* y *L. chagasi-T. cruzi*) se tomaron 10 µL; con 5 µL se cuantificó el crecimiento de las formas viables (Freshney, 1987) en cámara de Neubauer (400x) y con los 5 µL restantes se hicieron extendidos sobre portaobjetos que se fijaron (glutaraldehído 0,25% en amortiguador fosfato salino glucosado) y colorearon (Giemsa 10%).

Los extendidos fueron observados en microscopio óptico (1000X) provisto de cámara digital. Siguiendo un patrón de avance sistemático (Gundersen, 1978; Miles, 1978), se registraron 60 promastigotes/extendido en el cultivo puro de *L. chagasi*, 60 epimastigotes/extendido en el cultivo puro de *T. cruzi*, así como 30 epimastigotes/extendido y 30 promastigotes/extendido en el cultivo mixto (*L. chagasi-T. cruzi*). Los argumentos establecidos por Fernández (1996) garantizaron la pertinencia del tamaño muestral y la robustez del análisis estadístico realizado. En cada uno de los parásitos se determinó la magnitud numérica de la longitud total (LT), la longitud corporal sin incluir el largo del flagelo libre (LC), el ancho máximo a nivel del núcleo (A), la distancia que separa el extremo anterior del centro del núcleo (AN), la distancia que se encuentra entre el extremo

posterior y el centro del núcleo (PN), la distancia que hay del centro del núcleo al centro del cinetoplasto (CN), la distancia que se encuentra entre el extremo anterior y el centro del cinetoplasto (AC), la distancia que se encuentra entre el extremo posterior y el centro del cinetoplasto (PC) y la longitud del flagelo libre (F), tal cual lo estableció Hoare (1972). Además, se calculó la superficie del núcleo (SN), la superficie del cinetoplasto (SC) y la superficie total sin incluir el flagelo libre (ST).

Si bien los conteos del número de organismos viables por mililitro de sobrenadante se realizaron con todos los estadios observados, el registro dimensional y el cálculo de las superficies sólo se hizo con promastigotes (*L. chagasi*) y epimastigotes (*T. cruzi*), ya que la metodología empleada no permite diferenciar interespecíficamente los otros estadios observados (amastigotes, esferoastigotes y formas aberrantes). Los registros numéricos y los cálculos de las superficies se hicieron sobre imágenes digitales empleando el programa de dominio público "Image Processing and Analysis in Java" (ImageJ).

El tratamiento cuantitativo se emprendió con Análisis de la Varianza (ANOVA) (Sokal & Rohlf, 1995), Análisis de Residuos en Tablas de Contingencia (ARTC) (Bulla, 1981; Bulla, 1995), Ajuste Local Ponderado por el método de los Mínimos Cuadrados (LOWESS) (Cleveland, 1979; Cleveland & Devlin, 1988) y Análisis de Componentes Principales (ACP) (Jolliffe, 1986). Las pruebas estadísticas se realizaron con los programas Statistica 7.0 y MVSP 3.1.

Los experimentos por triplicado se repitieron tres veces con lotes diferentes de parásitos y medio de cultivo.

RESULTADOS

La cinética de cambio en la densidad de las poblaciones muestra los picos máximos y mínimos del número de organismos viables/ml, así como el tiempo requerido para alcanzarlos; los resultados sugieren diferencias entre los tres grupos experimentales. Nótese además que la curva correspondiente al cultivo mixto (*L. chagasi-T. cruzi*) pareciera diferir de sus contrapartes puras. No obstante los rangos de error estándar insinúan similitudes consistentes, al menos en porciones particulares de las curvas (Fig. 1).

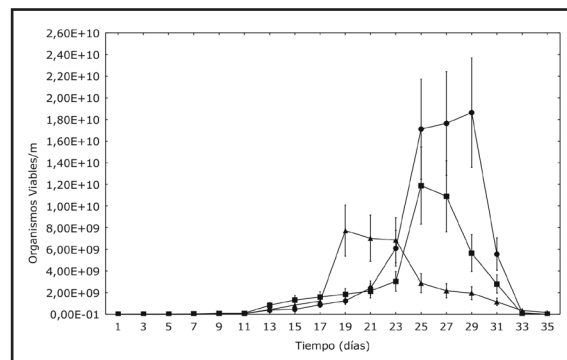
El análisis de los puntos que configuran la Fig. 1 se acometió mediante un ANOVA de una vía, prueba que con base en la varianza global observada, compara la significancia de las semejanzas o diferencias de las medias de más de dos conjuntos de datos (Sokal & Rohlf, 1995); los resultados obtenidos indican claramente que al menos dos de las medias representadas en la Fig. 1, son diferentes (Tabla I).

Los resultados de la Tabla I, si bien indica diferencias significativas en las medias, no aporta información referente a la dinámica del cambio en sí. En consecuencia, se procedió con un ARTC, ensayo que, mediante el estadístico χ^2 , estudia la diferencia entre valores observados y esperados (residuos) evaluando la desviación de la hipótesis de independencia u homogeneidad (Bulla, 1981; Bulla, 1995); el ARTC compara cuantitativamente los perfiles de las curvas de la Fig. 1. En el ARTC (Fig. 2) las barras representan los perfiles de las curvas examinadas (*L. chagasi*, *T. cruzi* y *L. chagasi-T. cruzi*). Si el residuo de

Tabla I. Resumen del Análisis de la Varianza sobre los datos de cambio temporal del número de organismos viables por mililitro de sobrenadante de medio "Brain Heart Infusion". F: F de Fischer; P: probabilidad asociada; significancia $P < 0,05$.

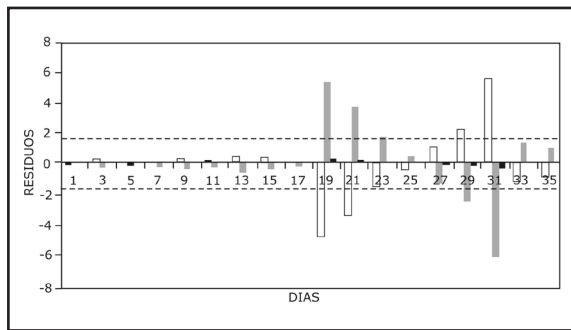
	F	P
<i>Leishmania chagasi</i> (cultivo puro)	8,133	0,000
<i>Trypanosoma cruzi</i> (cultivo puro)	7,488	0,000
<i>L. chagasi-T. cruzi</i> (cultivo mixto)	10,507	0,000

Fig. 1. Número de organismos viables por mililitro de sobrenadante de medio Brain Heart Infusion. *Leishmania chagasi*: ●; *Trypanosoma cruzi*: ■; y *Leishmania chagasi-Trypanosoma cruzi*: ▲. Los intervalos corresponden a los errores estándar.



una barra es 0, la barra no aparece representada. Por su parte, si una barra sobrepasa la línea punteada, implica que existe diferencia significativa en el residual. En la figura también se demuestra que los perfiles de las curvas de la Fig. 1, son diferentes en función del tiempo. La probabilidad asociada al χ^2 ($P = 0,0003$) avala la robustez del análisis.

Fig. 2. Representación gráfica del Análisis de Residuos sobre las curvas de cambio de número de organismos viables por mililitro de sobrenadante de medio Brain Heart Infusion en los cultivos puros de *Leishmania chagasi* (columnas blancas), *Trypanosoma cruzi* (columnas grises) y *Leishmania chagasi* - *Trypanosoma cruzi* (columnas negras). La línea punteada corresponde al intervalo de significancia para $P < 0,05$.



Con base en la reducción dimensional experimentada, en criterios de significancia estadística (datos no mostrados) y de la preeminencia morfológica que características como longitud total, ancho máximo y distancia núcleo-cinetoplasto tienen sobre la forma de los promastigotes y los epimastigotes, las magnitudes numéricas de las variables LT, A y CN se utilizaron en ensayos biométricos exploratorios como primera aproximación cuantitativa al entendimiento del cambio morfométrico en promastigotes de *L. chagasi* y epimastigotes de *T. cruzi* bajo estrés selectivo *in vitro*.

La Tabla II presenta las medias y el error estándar que las variables LT, A, CN de *L. chagasi* y *T. cruzi* alcanzaron en cultivos puros y mixtos.

Resalta la continua y drástica reducción registrada en las magnitudes numéricas de las variables LT, A y CN. Es más, a modo de ejemplo arquetípico de la relación forma-función cabe añadir que partir del día 17 no fue posible iniciar nuevos cultivos utilizando este material como siembra para establecer nuevos cultivos (datos no mostrados).

Ciertamente que los números presentados en la Tabla II son diferentes, pero carecen de significancia estadística. El ANOVA (Sokal & Rohlf, 1995) realizado

Fig. 3. Representación gráfica del Ajuste Localmente Ponderado por el método de los Mínimos Cuadrados sobre las variables Longitud Total, Ancho Máximo y Distancia Núcleo-Cinetoplasto en promastigotes de *Leishmania chagasi* mantenidos en cultivo puro (A) y cultivo mixto (B). X: Longitud Total (μm); Y: Ancho Máximo (μm); Z: Distancia Cinetoplasto-Núcleo (μm).

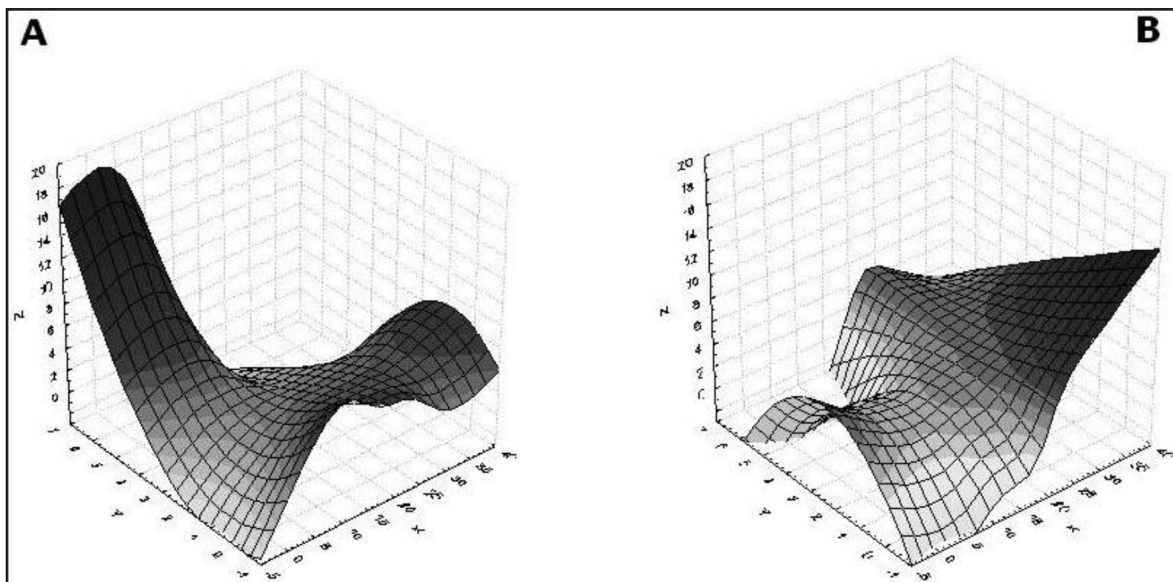


Tabla II. Magnitudes numéricas y errores estándar de las variables LT, A y CN registradas sobre promastigotes de *Leishmania chagasi* en cultivo puro y mixto, y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en cultivo puro y mixto.

Día	Cultivos Puros (<i>Leishmania</i>)			Cultivos Puros (<i>Trypanosoma</i>)		
	Promastigotes			Epimastigotes		
	LT	A	CN	LT	A	CN
1	20,77 ± 1,45	1,22 ± 0,10	4,34 ± 0,29	18,31 ± 0,69	2,24 ± 0,15	3,52 ± 0,23
3	20,25 ± 1,09	1,36 ± 0,10	4,05 ± 0,22	18,32 ± 0,60	2,25 ± 0,16	3,53 ± 0,19
5	20,42 ± 1,04	1,50 ± 0,07	4,05 ± 0,26	19,49 ± 0,94	2,40 ± 0,16	3,68 ± 0,23
7	19,64 ± 0,97	1,57 ± 0,09	3,54 ± 0,24	20,65 ± 0,81	2,68 ± 0,18	3,63 ± 0,16
9	20,20 ± 0,94	1,71 ± 0,07	3,57 ± 0,23	20,84 ± 0,82	2,42 ± 0,10	3,85 ± 0,22
11	19,65 ± 0,87	1,80 ± 0,09	3,21 ± 0,27	21,80 ± 0,92	2,86 ± 0,16	3,70 ± 0,17
13	19,11 ± 1,19	1,66 ± 0,12	3,30 ± 0,24	20,79 ± 1,17	2,87 ± 0,19	3,41 ± 0,27
15	15,68 ± 1,47	1,55 ± 0,14	2,79 ± 0,27	19,73 ± 1,61	2,53 ± 0,24	3,52 ± 0,32
17	15,19 ± 1,81	1,62 ± 0,19	2,28 ± 0,30	18,50 ± 2,04	2,37 ± 0,31	3,13 ± 0,39
19	12,94 ± 1,86	1,40 ± 0,19	1,71 ± 0,26	16,06 ± 2,17	2,37 ± 0,33	2,52 ± 0,40
21	11,19 ± 1,83	1,25 ± 0,20	1,49 ± 0,28	15,92 ± 2,52	1,93 ± 0,33	2,28 ± 0,46
23	10,38 ± 2,04	1,06 ± 0,21	1,54 ± 0,32	12,79 ± 2,44	1,82 ± 0,38	1,87 ± 0,42
25	9,45 ± 2,20	0,88 ± 0,20	0,97 ± 0,25	11,73 ± 2,53	1,60 ± 0,40	1,51 ± 0,38
27	7,89 ± 2,09	0,79 ± 0,21	1,00 ± 0,29	8,92 ± 2,27	1,33 ± 0,37	1,38 ± 0,42
29	6,21 ± 1,61	0,59 ± 0,19	0,56 ± 0,20	7,04 ± 2,15	0,97 ± 0,31	1,31 ± 0,43
31	5,15 ± 1,80	0,55 ± 0,20	0,63 ± 0,26	5,23 ± 2,06	0,74 ± 0,29	0,68 ± 0,29
33	4,54 ± 0,73	0,38 ± 0,18	0,38 ± 0,19	5,10 ± 1,65	0,55 ± 0,28	0,43 ± 0,23
35	4,67 ± 1,16	0,20 ± 0,15	0,11 ± 0,08	4,91 ± 1,37	0,31 ± 0,24	0,40 ± 0,28
Día	Cultivos Mixtos (<i>Leishmania</i> + <i>Trypanosoma</i>)					
	Promastigotes			Epimastigotes		
	LT	A	CN	LT	A	CN
1	13,79 ± 0,74	2,00 ± 0,11	2,69 ± 0,29	14,55 ± 0,74	2,83 ± 0,76	3,12 ± 0,17
3	14,33 ± 0,49	1,97 ± 0,11	2,91 ± 0,27	15,16 ± 0,75	2,97 ± 0,80	2,98 ± 0,17
5	16,18 ± 0,50	2,00 ± 0,08	3,31 ± 0,27	15,44 ± 0,61	2,61 ± 0,57	3,27 ± 0,11
7	15,45 ± 0,49	2,12 ± 0,09	3,66 ± 0,22	15,91 ± 0,65	1,84 ± 0,11	3,04 ± 0,14
9	16,32 ± 0,48	1,95 ± 0,09	3,66 ± 0,26	14,85 ± 0,45	1,89 ± 0,10	3,20 ± 0,13
11	16,71 ± 0,52	2,18 ± 0,08	3,64 ± 0,27	15,82 ± 0,54	2,17 ± 0,10	3,25 ± 0,14
13	16,66 ± 0,84	1,84 ± 0,10	3,62 ± 0,26	13,92 ± 0,89	1,77 ± 0,12	2,83 ± 0,17
15	13,55 ± 1,22	1,72 ± 0,15	3,28 ± 0,31	13,54 ± 1,23	1,75 ± 0,16	2,77 ± 0,25
17	11,79 ± 1,48	1,63 ± 0,19	3,03 ± 0,37	12,16 ± 1,36	1,84 ± 0,20	2,37 ± 0,28
19	11,46 ± 1,77	1,41 ± 0,19	2,83 ± 0,39	11,05 ± 1,47	1,45 ± 0,20	2,27 ± 0,34
21	9,72 ± 1,69	1,37 ± 0,22	2,29 ± 0,39	9,63 ± 1,54	1,11 ± 0,19	1,57 ± 0,31
23	8,78 ± 1,84	1,23 ± 0,23	2,20 ± 0,41	8,48 ± 1,63	1,13 ± 0,22	1,59 ± 0,36
25	7,27 ± 1,80	0,92 ± 0,21	1,82 ± 0,43	6,82 ± 1,54	0,85 ± 0,21	1,24 ± 0,34
27	6,94 ± 1,88	0,81 ± 0,22	1,65 ± 0,44	6,37 ± 1,69	0,72 ± 0,20	1,03 ± 0,32
29	6,91 ± 1,85	0,64 ± 0,21	1,35 ± 0,43	6,80 ± 1,49	0,60 ± 0,19	0,76 ± 0,29
31	5,19 ± 1,68	0,48 ± 0,18	1,19 ± 0,45	5,25 ± 1,61	0,59 ± 0,22	0,48 ± 0,24
33	4,85 ± 1,34	0,23 ± 0,13	0,44 ± 0,24	4,98 ± 1,03	0,27 ± 0,13	0,25 ± 0,17
35	4,79 ± 1,24	0,12 ± 0,12	0,45 ± 0,31	4,89 ± 0,75	0,22 ± 0,15	0,20 ± 0,19

sobre las medias de las variables LT, A y CN registradas durante 35 días en promastigotes de *L. chagasi* mantenidos en cultivo puro y mixto, así como en los epimastigotes de *T. cruzi* presentes en cultivo puro y mixto (Tabla I), demostró diferencias significativas (Tabla III).

El ANOVA probó inequívocamente que existen diferencias entre las medias de las variables LT, A y CN de promastigotes y epimastigotes, pero no aportó información acerca del proceso de cambio que esas variables experimentan a lo largo de los 35 días de cultivo. Es evidente que esta heterogeneidad dimensional resume un proceso natural más complejo enmarcado en el contexto de la historia del decrecimiento de las variables LT, A y CN *in vitro*, que se debe abordar en un contexto dinámico capaz de explorar y relacionar los patrones de cambio registrados en las variables seleccionadas.

Tabla III. Resumen del Análisis de la Varianza sobre las magnitudes numéricas de los registros de Longitud Total (LT), Ancho Máximo (A) y distancia Núcleo-Cinetoplasto (CN) de promastigotes de *Leishmania chagasi* y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* mantenidos en cultivo puro o mixto. F: F de Fischer; P: probabilidad asociada; significancia $P < 0,05$.

	F	P
Longitud Total (LT) de promastigotes (cultivo puro)	20,46	0,000
Ancho Máximo (A) de promastigotes (cultivo puro)	9,66	0,000
Distancia Cinetoplasto-Núcleo (CN) de promastigotes (cultivo puro)	31,99	0,000
Longitud Total (LT) de promastigotes (cultivo mixto)	13,90	0,000
Ancho Máximo (A) de promastigotes (cultivo mixto)	18,01	0,000
Distancia Cinetoplasto-Núcleo (CN) de promastigotes (cultivo mixto)	9,95	0,000
Longitud Total (LT) de epimastigotes (cultivo puro)	14,57	0,000
Ancho Máximo (A) de epimastigotes (cultivo puro)	8,89	0,000
Distancia Cinetoplasto-Núcleo (CN) de epimastigotes (cultivo puro)	15,30	0,000
Longitud Total (LT) de epimastigotes (cultivo mixto)	18,15	0,000
Ancho Máximo (A) de epimastigotes (cultivo mixto)	6,55	0,000
Distancia CinetoplastoNúcleo (CN) de epimastigotes (cultivo mixto)	21,49	0,000

El LOWESS es un modelo estadístico generador de una función de superficie que evidencia gráficamente asociaciones entre variables continuas (Cleveland, 1979; Cleveland & Devlin, 1988). En este caso particular presenta en planos tridimensionales (3D) las pautas de cambio en las relaciones que se establecen entre las variables LT, A y CN de promastigotes y epimastigotes mantenidos en cultivos puros y mixtos en medio BHI.

Mediante planos (3D), la Fig. 3 muestra diferencias en las relaciones dinámicas que se establecen entre las variables LT, A y CN de promastigotes de *L. chagasi* a lo largo de los 35 días de cultivo; el plano de la Figura 3A corresponde a las relaciones en el cultivo puro y el de la Figura 3B en el cultivo mixto.

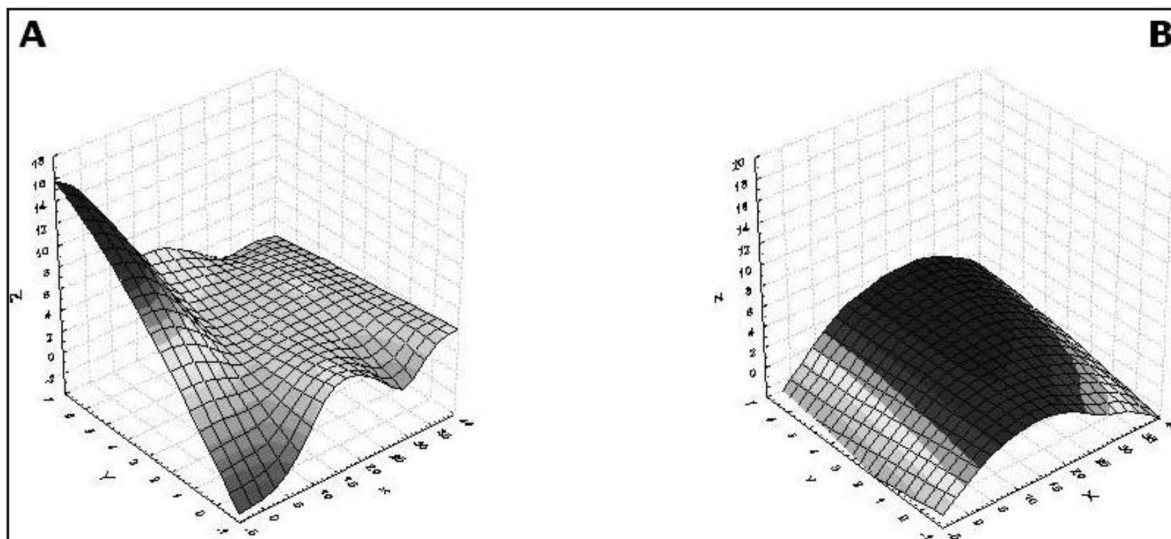
Los planos 3D que se presentan en la Fig. 4 evidencian las relaciones que aparecen entre las variables LT, A y CN de los epimastigotes de *T. cruzi* presentes en cultivos puros y en cultivos mixtos en medio BHI; el plano de la Fig. 4A corresponde a las relaciones en el cultivo puro y el de la Figura 4B en el cultivo mixto.

Las Fig. 3 y 4 presentan planos 3D de geometría variable, cuyos cambios demuestran que las relaciones establecidas entre las variables LT, A y CN cuando los parásitos se mantienen en cultivos puros y mixtos, no son iguales.

El estudio exploratorio de las variables LT, A y CN es acotado, por cuanto sólo considera 3 de las 12 variables morfométricas investigadas, restringiendo en consecuencia, la percepción de la heterogeneidad del proceso de cambio. La realidad experimental es más amplia y requiere, por lo tanto, un enfoque integrador de naturaleza multivariante.

El ACP es una técnica multivariante descriptiva que, con mínima pérdida de información, presenta las medidas numéricas de múltiples variables en un espacio 2D o 3D donde se aprecian relaciones que, de otra manera, permanecerían encubiertas (Jolliffe, 1986). El ACP permite visualizar en un espacio 3D nubes de puntos ubicados en un hiperespacio original n-dimensional. La bondad del modelo reside en la distorsión mínima que ejerce sobre las variables al ubicarlas en un espacio comprensible. La capacidad de compresión de variables del modelo redujo las variables analizadas de un hiperespacio de

Fig. 4. Representación gráfica del Ajuste Localmente Ponderado por el método de los Mínimos Cuadrados sobre las variables Longitud Total, Ancho Máximo y Distancia Núcleo-Cinetoplasto en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* mantenidos en cultivo puro (A) y cultivo mixto (B). X: Longitud Total (μm); Y: Ancho Máximo (μm); Z: Distancia Cinetoplasto-Núcleo (μm).



doce dimensional (12 ejes) a un nuevo espacio 3D que explica el 70,727% de la varianza total del sistema. Los autovalores (varianza) expresan la longitud de cada uno de los ejes (componentes) y no son crecientes; como era de esperarse la máxima varianza corresponde al primer componente (38,496%). La Tabla IV resume los resultados del ACP.

La Fig. 5 corresponde a la representación 3D de los resultados proporcionados por el ACP.

La Fig. 5 muestra cuatro nubes de puntos representadas en un espacio 3D que corresponden a las magnitudes numéricas de las variables morfométricas registradas en los promastigotes de *L. chagasi* en cultivo puro (nube 1) y mixto (nube 2), así como

Tabla IV. Cuadro resumen del Análisis de Componentes Principales sobre las variables morfométricas registradas y calculadas en los cultivos puros de *Leishmania chagasi*, *Trypanosoma cruzi* y en los cultivos mixtos de *Leishmania chagasi-Trypanosoma cruzi*.

	Eje 1	Eje 2	Eje 3
Autovalor	6,159	3,398	1,759
Porcentaje de varianza	38,496	21,24	10,992
Porcentaje acumulado de varianza	38,496	59,735	70,727

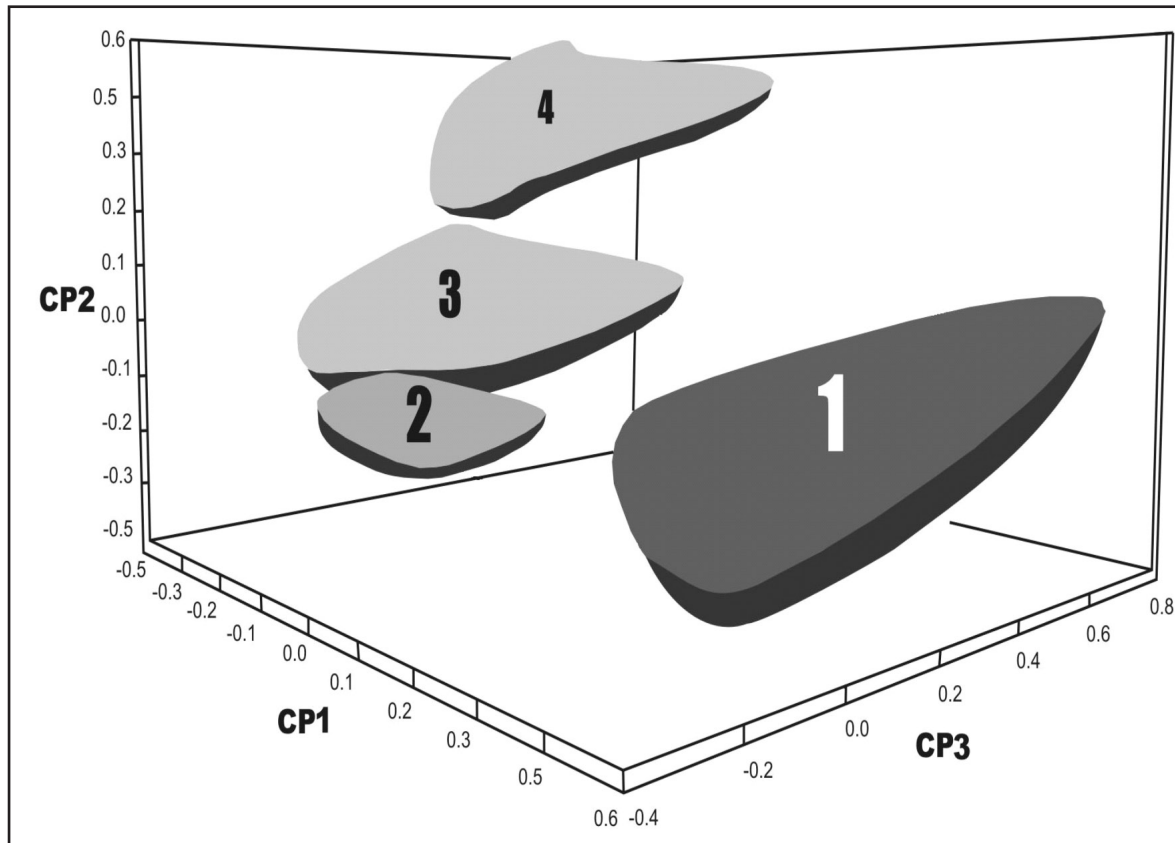
de los epimastigotes de *T. cruzi* en cultivo mixto (nube 3) y puro (nube 4). Los conjuntos numéricos están representados en un espacio reducido 3D en el que destaca la segregación de las nubes, llamando particularmente la atención las correspondientes al mismo estadio en condiciones de cultivo diferente (puro o mixto). También se aprecia mayor separación entre las nubes de *L. chagasi* (promastigotes en cultivo puro y mixto) que en las de *T. cruzi* (epimastigotes en cultivo puro y mixto).

DISCUSIÓN

Las variaciones observadas en la densidad de las poblaciones de *L. chagasi* y *T. cruzi* en cultivos puros, así como de las isomezclas (*L. chagasi-T. cruzi*), mostraron patrones gráficos, a primera vista disímiles (Fig. 1), caracterizados por picos poblacionales máximos desiguales que aparecen a tiempos diferentes, son particularidades que en el ARTC se representan como barras positivas y negativas que, con significancia estadística, demuestran gráficamente la disparidad de las curvas de variación de la densidad poblacional en la fase líquida del medio BHI (Fig. 2).

La presencia de curvas con picos de densidades poblacionales particulares indicaría la expresión de propiedades morfo-funcionales

Fig. 5. Análisis de Componentes Principales sobre las dimensiones de promastigotes de *Leishmania chagasi* y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en cultivos puros y mixtos (*Leishmania chagasi*-*Trypanosoma cruzi*). Las nubes corresponden a condiciones particulares: 1, promastigotes de *Leishmania chagasi* en cultivo puro; 2, promastigotes de *Leishmania chagasi* en cultivo mixto; 3, epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en cultivo mixto; y 4, epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en cultivo puro. CP1: Componente Principal 1; CP2: Componente Principal 2 y CP3: Componente Principal 3.



específicas en los cultivos puros de *L. chagasi* y *T. cruzi*, así como en las isomezclas *L. chagasi*-*T. cruzi* que gestionarían condiciones fisicoquímicas propias de períodos particulares en un medio ambiente que se modifica en forma continua, deletérea e irreversible por merma de substratos tróficos, modificación del pH (Duran *et al.*, 2009) y acumulación de metabolitos tóxicos o potencialmente tóxicos (Mauel, 1984; Schuster & Sullina, 2002). En consecuencia, los cambios observados en este trabajo confirmarían lo indicado por Tejero *et al.* (2004), por cuanto resultarían de la expresión de mecanismos moduladores de la forma y la función. Según Tejero *et al.* (1984), estos comportamientos corresponden a características definidas que, junto a otras propiedades, son específicas de las especies leishmánicas mantenidas *in vitro*. En este sentido, y conforme a lo demostrado por Duran

et al. (2009), las poblaciones de *L. chagasi* y *T. cruzi* presentes en cultivos mixtos, utilizan los recursos disponibles en el sobrenadante del medio BHI de forma diferente a como lo hacen al ser mantenidos en cultivos puros en condiciones idénticas.

Las magnitudes numéricas de las variables morfológicas registradas en *L. chagasi* y *T. cruzi*, pudiera asociarse con aspectos numerarios meramente taxonómicos de comparación inter-específica que, además, estarían poco relacionados con la dinámica multivariante de su biología. No obstante, el estudio de la variación dimensional, por ser expresión cuantitativa de la ontogenia de los tripanosomas (Tejero *et al.*, 2008), enriquece la perspectiva, por cuanto permite investigar el dinamismo de las relaciones que se establecen entre las variables morfológicas

que, en el transcurso del tiempo, se traduce en la expresión secuencial de fenómenos no excluyentes como aparición de estadios diferentes o de variantes fenotípicas de un estadio particular (pleomorfismo).

Los análisis exploratorios adelantados reflejaron diferencias de magnitud numérica (Tabla II) y de relaciones dimensionales en términos intra-específicos (promastigotes de *L. chagasi* en cultivo puro y mixto; epimastigotes de *T. cruzi* en cultivo puro y mixto) e inter-específicos (promastigotes y epimastigotes), pero por no ser pruebas diseñadas para segregar, no suministraron información cuantitativa que permitiera comparar los procesos de cambio morfométrico asociados a promastigotes y epimastigotes sometidos a diferentes fuentes de estrés: competencia intra-específica (cultivo puro) y competencia intra- e inter-específicas (cultivo mixto).

El ACP, además de demostrar discriminación morfométrica inter-específica, una propiedad obvia por cuanto se trata de epimastigotes (*T. cruzi*) y promastigotes (*L. chagasi*), prueba taxativamente discriminación morfométrica intra-específica. En efecto, al comparar la dimensionalidad de los promastigotes (*L. chagasi*) de los cultivos puros con la dimensionalidad de los promastigotes (*L. chagasi*) de los cultivos mixtos, se aprecian dos nubes de puntos diferentes y separadas. Situación análoga se observa al cotejar las características dimensionales de los epimastigotes (*T. cruzi*) de los cultivos puros con las medidas de los epimastigotes (*T. cruzi*) de los cultivos mixtos. Los atributos dimensionales, tanto de promastigotes (*L. chagasi*) como de epimastigotes (*T. cruzi*) en los cultivos puros y mixtos, son significativamente diferentes. Bock y Von Wahlert (1965), establecieron que la capacidad de transformación observada en las especies como respuesta a los cambios medioambientales, es un atributo que evita la extinción.

Es bien conocido que los tripomastigotes hematozoicos de *T. brucei* (Vickerman, 1989), *T. rangeli* (Urdaneta-Morales & Tejero, 1992) y *T. cruzi* (Penin *et al.*, 1996), cambian de aspecto en el transcurso de la infección sin dejar de ser tripomastigotes. Al margen del significado adaptativo de dicha transformación, es menester analizar las propiedades del cambio *per se* desde la óptica de la coexistencia temporal de las formas involucradas. En tal sentido, Reuner *et al.* (1997), expresaron que la

diferenciación de los tripomastigotes delgados de *T. brucei* en tripomastigotes rechonchos, está relacionada con el número de flagelados, por cuanto limita el tamaño de las poblaciones sin depender de la respuesta inmune del hospedador. Los autores al comparar la diferenciación *in vitro* e *in vivo*, concluyen que el cambio *in vitro* refleja lo acontecido en los procesos naturales. Es más, el significado de los resultados obtenidos *in vitro* y su relación con resultados similares derivados de experimentos *in vivo*, ha sido demostrado. Hecker & Brun (1982), establecieron similitudes biológicas entre poblaciones de *T. brucei* mantenidas *in vitro* y sus contrapartes mantenidas *in vivo* y Gamboa *et al.* (2008) indicaron que los patrones de infectividad *in vitro* se corresponden con la estructura geográfica de poblaciones de *Leishmania*.

El éxito evolutivo que han alcanzado los Trypanosomatidae es incuestionable (Vickerman, 1994; Kerr, 2000). En este contexto, la relación forma-función constituye una faceta en la que sería apropiado considerar que la modulación endógena y/o exógena en poblaciones de *L. chagasi* y *T. cruzi* constituiría un elemento que, junto a otras características, avalaría la notoriedad adaptativa que han logrado.

El análisis morfométrico-poblacional de *L. chagasi* y *T. cruzi* con metodologías multivariantes permitió discriminar poblaciones del mismo estadio (promastigotes de *L. chagasi* y epimastigotes de *T. cruzi*) como función del estrés ambiental, por cuanto demuestran propiedades morfométricas y poblacionales disímiles en ambientes diferentes (cultivos axénicos puros y los cultivos axénicos mixtos). El análisis también reveló que tal disparidad es más acentuada en *L. chagasi* que en *T. cruzi*, ya que la segregación de los promastigotes es mayor que la observada entre los epimastigotes, demostrando así la interacción-dependencia de la forma y la función en estos Trypanosomatidae. Este planteamiento permite hipotetizar que las características particulares de la leishmaniasis visceral y de la Enfermedad de Chagas pudieran diferir en condiciones de infección natural concomitante *L. chagasi-T. cruzi*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Proyecto LOCTI-UCV 2007 N° P0934020 (Laboratorios ELMOR, S.A.) por el apoyo económico recibido.

Quantitative approach to the analysis of the growth and morphometric change in populations of *Leishmania chagasi* and *Trypanosoma cruzi* maintained in pure and mixed axenic cultures

SUMMARY

The relations established among genera of the Trypanosomatidae family in coexisting conditions in the same environment may be linked to inter-population compensatory answers that include morphological (differences among stages) and morphometrical (measurable difference) changes. The quantitative analysis of these answers in *Leishmania chagasi* and *Trypanosoma cruzi* pure axenic cultures, as well as in *L. chagasi* - *T. cruzi* axenic iso-mixtures *in vitro* maintained has not been approached, and consequently, potentially useful biological particularities in the control of these important human parasites are unknown. Every other day culture samples were fixed, stained, observed, digitalized and quantitatively processed. In addition to quantify, the population densities and the appearance-disappearance stage (morphotypes) dynamics, the numeric magnitudes of the morphometric variables were recorded and later analyzed with multivariate statistical techniques. The results indicate specific changes in the investigated variables, as well as morphometric heterogeneity between the same morphotypes of the same genera when maintained in pure or mixed cultivation. The morphometric change models for *L. chagasi* and *T. cruzi* in pure culture differ from the models of morphometric change in mixed cultivation (*L. chagasi*-*T. cruzi*). The biometric methodologies discriminate in morphometric terms populations of the same stage (morphotype) in different environments.

Key words: *Leishmania chagasi*, *Trypanosoma cruzi*, morphometry.

REFERENCIAS

Adams D. C. & Funk D. (1997). Morphometric inferences on sibling species and sexual dimorphism in *Neoclamisus bebianae* leaf beetles: multivariate applications of the thin-plate spline. *Systematic Biol.* **46**: 108-194.

Andrade S. G. (1985). Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **18(Suppl)**: 39-46.

Ashford C.W. & Crewe W. (2003). *The Parasites of Homo sapiens*. Taylor & Francis. London, U.K.

Bates P. D. & Rogers M. E. (2004). New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr. Mol. Med.* **4**: 601-609.

Bastrenta B., Mita N., Buitrago R., Vargas F., Flores M., Machane M., *et al.* (2003). Human mixed infections of *Leishmania* spp. and *Leishmania-Trypanosoma cruzi* in a sub Andean Bolivian area: identification by polymerase chain reaction/hybridization and isoenzyme. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **98**: 255-264.

Brener Z. (1985). General review on *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **18(Suppl)**: 1-8.

Bock W. & Von Wahlert G. (1965). Adaptation and the form-function complex. *Evolution.* **19**: 296-299.

Bulla L. A. (1981). *La vegetación del módulo experimental de Mantecal*. Trabajo de Ascenso en el Escalafón Universitario. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.

Bulla L. A. (1995). *El análisis de componentes principales en ecología*. Trabajo de Ascenso en el Escalafón Universitario. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Cleveland W. S. (1979). Locally weighted regression and smoothing scatterplots. *J. Am. Stat. Assoc.* **74**: 829-836.

Cleveland W. S. & Devlin S. J. (1988). Locally weighted regression: an approach to regression analysis by local fitting. *J. Am. Stat. Assoc.* **83**: 596-610.

Corredor-Arjona A., Alvarez-Moreno C. A., Agudelo C. A., Bueno M., Lopez M. C., Caceres E., *et al.* (1999). Prevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* infection and risk factors in a Colombian indigenous population. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **41**: 229-234.

Davies A. J., Gibson W., Ferris V., Basson L. & Smit N. J. (2005). Two genotypic groups of

- morphologically similar fish trypanosomes from the Okavango Delta, Botswana. *Dis. Aquat. Organ.* **66**: 215-220.
- Durán C., Quiroga M. F., Díaz-Bello Z., Silva S., Roschman-González A., Strauss M. & Tejero F. (2009). *Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi*: Conducta trófica en cultivos axénicos puros y mixtos. *Bol. Mal. Salud Amb.* **49**: 97-106.
- Fernández P. (1996). Determinación del tamaño muestral. *Cuad. Gestión Atención Primaria.* 3: 138-141.
- Freshney R. (1987). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique.* Alan R. Liss. New York, U.S.A.
- Gamboa D., Torres K., De Doncker S., Zimic M., Arevalo J. & Dujardin J. C. (2008). Evaluation of an *in vitro* model for experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. *Parasitology.* **135**: 319-326.
- Gardiner P. R. (1989). Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. *Adv. Parasitol.* **28**: 229-317.
- Godfrey K. (1985). Comparing the means of several groups. *New Engl. J. Med.* **313**: 1450-1456.
- Gossage S. M., Rogers M. E. & Bates P. A. (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sandflies: implications for understanding the life cycle. *Int. J. Parasitol.* **33**: 1027-1034.
- Guhl F., Hudson L., Marinkelle C. J., Jaramillo C. A. & Bridge D. (1987). Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of Chagas' disease. *Parasitology.* **94**: 475-484.
- Gundersen H. J. G. (1978). Estimators of the number of objects per area unbiased by edge effects. *Microsc. Acta.* **81**: 107-117.
- Guzmán-Marín E. S., Zavala-Castro J. E., Acosta-Viana K. Y. & Rosado-Barrera M. E. (1999). Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Biomed.* **10**: 177-184.
- Hecker H. & Brun R. (1984). Comparative morphometric analysis of bloodstream and lymph forms of *Trypanosoma (T.) brucei brucei* grown *in vitro* and *in vivo*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **76**: 692-697.
- Jolliffe I. T. (1986). *Principal Component Analysis.* Springer-Verlag. New York, U.S.A.
- Karbowiak G. & Wita I. (2004). *Trypanosoma (Herpetosoma) grosi* kosewiense subsp. n., the Parasite of the Yellow-Necked Mouse *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834). *Acta Protozool.* **43**: 173-178.
- Kerr S. F. (2000). Palearctic origin of *Leishmania*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **95**: 75-80.
- Killick-Kendrick R. & Rioux J. A. (1991). Intravectorial cycle of *Leishmania* in sandflies. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **66(Suppl 1)**: 71-74.
- Kochhar S. K. (2004). *A Textbook of Parasitology.* Dominant. New Delhi.
- Lom J. (1979). *Biology of the trypanosomes and trypanoplasms of fish.* pp. 269-338. En: *Biology of the Kinetoplastida.* Vol. 2. Eds. Lumsden W.H.R. & Evans D.A. Academic Press. London, U.K.
- Lukes J., Mauricio I. L., Schöninan G., Dujardin J. C., Soteriadou K., Dedet J. P., *et al.* (2007). Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *PNAS.* **104**: 9375-9380.
- Mauel J. (1984). Mechanisms of survival of protozoan parasites in mononuclear phagocytes. *Parasitology.* **88**: 579-592.
- Mendes D. G., Lauria-Pires L., Nitz N., Lozzi S. P., Nascimento R. J., Monteiro P. S., *et al.* (2007). Exposure to mixed asymptomatic infections with *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* in the hunab population of the greater Amazon. *Trop. Med. Int. Health.* **12**: 629-636.
- Miles R. E. (1978). The sampling by quadrants of planar aggregates. *J. Microsc.* **113**: 257-267.
- Molyneux D. H. & Ashford R. W. (1983). The Biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, Parasites of Man

- and Domestic Animals. Eds. Taylor & Francis. London, U.K.
- Overath P., Czichos J., Stock U. & Nonnengaesser C. (1983). Repression of glycoproteins synthesis and release of surface coat during transformation of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* **2**: 1721-1728.
- Penin P., Gamallo C. & de Diego J. A. (1996). Biological comparison between three clones of *Trypanosoma cruzi* and the strain of origin (Bolivia) with reference to clonal evolution studies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **91**: 285-291.
- Rohlf F. J. & Marcus L. F. (1993). A revolution in morphometrics. *Trends Ecol. Evol.* **8**: 129-132.
- Reuner B., Vassella E., Yutzy B. & Boshart M. (1997). Cell density triggers slender to stumpy differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in culture. *Mol. Bioch. Parasitol.* **90**: 269-280.
- Simpson A. G., Stevens J. R. & Lukes J. (2006). The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* **22**: 168-174.
- Schuster F. L. & Sullivan J. J. (2002). Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 374-389.
- Sokal R. R. & Rohlf F. J. (1995). *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. W. H. Freeman. New York, U.S.A.
- Taylor K. M. & Engman D. M. (1991). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol.* **31**: 472-481.
- Tejero F., Arispe M. & Silva S. (1984). Growth characteristics of *Leishmania* spp. in semi-defined and complex media. *Rev. Bras. Biol.* **44**: 417-423.
- Tejero F., Duran C. & Rodríguez D. (2004). *Morphological Changes in Crithidia. A Density-dependent Model*. Proceedings of the IX European Multicollloquium of Parasitology. pp. 127-135.
- Tejero F., Roschman-González A., Perrone-Carmona T. M. & Aso P. M. (2008). *Trypanosoma evansi*: A quantitative approach to the understanding of the morphometry-hematology relationship throughout experimental murine infections. *J. Protozool. Res.* **18**: 34-47.
- Travi B. L., Jaramillo C., Montoya J., Segura I., Zea A., Goncalves A. & Velez I. D. (1994). *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**: 557-565.
- Taylor K. M., Matthews K. R. & Gull K. (1997). The bloodstream differentiation-division of *Trypanosoma brucei* studied using mitochondrial markers. *Proc. Roy. Soc. London B.* **264**: 1481-1490
- Urdaneta H. & Scorza J. V. (1982). Bases experimentales para la identificación de *Leishmania* spp. de América por morfometría de amastigotos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **77**: 335-351.
- Urdaneta-Morales, S. (1983). Pleomorphism in trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* from blood and cell culture. *Tropenmed. Parasitol.* **34**: 225-228.
- Urdaneta-Morales S. & Tejero F. (1992). *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920): Observations upon pleomorphism. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **87**: 511-516.
- Walters L. L., Modi G. B., Chaplin G. L. & Tesh R. B. (1989). Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **41**: 295-317.
- Walters L. L., Irons K. P., Chaplin G. L. & Tesh R. B. (1993). Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* **30**: 699-718.
- WHO Expert Committee. (1990). Control of the leishmaniases. World Health Organization Technical Report Series. **793**: 1-158.
- WHO Expert Committee. (1991). Control of Chagas' disease. World Health Organization Technical Report Series. **811**: 1-95.

- Vickerman K. (1976). The diversity of Kinetoplastida flagellates. pp. 1-34. En: *Biology of the Kinetoplastida*. Vol.1 Eds. Lumsden W.H.R. & Evans D.A.. Academic Press. London, U.K.
- Vickerman K. & Preston T. M. (1976). Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. pp. 35-130. En: *Biology of the Kinetoplastida*. Vol. 1. Eds. Lumsden W.H.R. & Evans D.A. Academic Press. London. U.K.
- Vickerman K. (1989). Trypanosome sociology and antigen variation. *Parasitology*. **99**: S37-S47.
- Vickerman K. (1994). The evolutionary expansion of the trypanosomatids flagellates. *Int. J. Parasitol.* **24**: 1317-1331.
- Ziccardi Z. & Lourenço-de-Oliveira R. (1999). Polymorphism in trypomastigotes of *Trypanosoma (Megatrypanum) minasense* in the blood of experimentally infected squirrel monkey and marmosets. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **94**: 649-653.

Recibido el 25/01/2010
Aceptado el 23/06/2010

Estandarización de la prueba aglutinación directa empleando antígenos autóctonos para el diagnóstico de la leishmaniasis visceral en zonas endémicas de Venezuela

María Mercedes De Los Ríos Alicandú¹, Guillermo Terán-Ángel¹, Rosilved Silva-Basanta^{1,2} & Maira Cabrera González^{1*}

La leishmaniasis visceral es la manifestación clínica más severa de la leishmaniasis ya que puede ser fatal si no se administra el tratamiento adecuado. En Venezuela el foco más activo es la isla de Margarita, donde principalmente se ven afectados niños de 0 a 9 años. De ahí la importancia de un diagnóstico temprano, a menudo difícil en las áreas endémicas. Si bien la prueba de oro para el diagnóstico de leishmaniasis visceral es la detección directa de los parásitos, la toma de muestra es bastante invasiva e incómoda para el paciente. Más aún, la mayoría de estas técnicas son costosas, complejas y de larga ejecución. Otros métodos indirectos, como la ELISA (usando antígenos crudos o definidos del parásito) requieren de equipos y personal especializados; lo cual es difícil de cubrir en las zonas endémicas. Recientemente validamos en Venezuela, el uso de una técnica de aglutinación directa (KIT Biomedical Research) evidenciándose una elevada sensibilidad y especificidad. El antígeno empleado en esta prueba es *Leishmania donovani*. Sin embargo, en nuestro país el agente causal de esta parasitosis es *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*). Otro aspecto a considerar es la variación antigénica regional que sufre un parásito al interactuar con el vector local y con factores del hospedero; además del costo; por lo tanto desarrollamos una prueba de aglutinación directa un antígeno de *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) obtenido de perros de la isla de Margarita. Éste se comparó con la prueba comercial, ensayando sueros de pacientes de leishmaniasis visceral confirmados y controles. Empleando como patrón de oro el ELISA con rK39, obtuvimos en ambos una sensibilidad del 100%; y una especificidad del 82,85 % para la prueba comercial y 98,78% para el nuestro, lo cual pone en manifiesto la relación específica entre los anticuerpos de pacientes venezolanos y el antígeno predominante del país.

Palabras clave: leishmaniasis visceral, diagnóstico, pruebas de aglutinación, *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*), humanos, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

La *Leishmaniasis* visceral (LV) es una de las manifestaciones más severas de la *Leishmaniasis*. Es endémica en varias partes de África, India y América Latina causando unos 500.000 casos y más de 80.000 muertes por año (OPS, 1996). Salvo en pocas excepciones, esta enfermedad es causada por parásitos de las especies *Leishmania donovani* y *Leishmania infantum*. El agente causal de LV en Venezuela es

Leishmania infantum (syn. *Leishmania chagasi*) (Mauricio *et al.*, 1999).

En nuestro país, representa un problema de salud pública ya que en la última década, se ha reportado un incremento en el número de afectados (aproximadamente 50 casos por año), principalmente niños menores de diez años (Sánchez & Tapia, 2005). Esta enfermedad se ha diagnosticado en focos dispersos en las áreas central, sur este y oeste del país (Zulueta *et al.*, 1999). En la actualidad, el foco endémico más activo es el estado Nueva Esparta, en el cual se ha señalado un importante incremento en la incidencia de esta enfermedad comparado con la incidencia registrada para las otras entidades federales del país (Zerpa *et al.*, 2002).

¹ Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, apartado 4043, Caracas 1010A, Venezuela.

² Escuela de Medicina José María Vargas, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

*Autor de correspondencia: mairacab@gmail.com

El síndrome clínico de LV comprende cuadros de fiebre, pérdida de peso, hepato-esplenomegalia, anemia, leucopenia, hiperglobulinemia con la presencia de anticuerpos específicos o no contra el parásito. Igualmente se observa la presencia de auto-anticuerpos y complejos inmunes en los órganos afectados (Bryceson, 1989; Pearson & Wilson, 1989; Smith *et al.*, 1989). La LV es considerada una enfermedad crónica con alto potencial de letalidad y el éxito de su curación depende del diagnóstico temprano y de la instauración de la terapéutica de forma oportuna y precoz (Abdallah *et al.*, 2004; Adhya *et al.*, 1995; Allain & Kagan 1975). Sin embargo, el diagnóstico de la LV es difícil, el mismo se determina según los antecedentes epidemiológicos del paciente, la clínica, la visualización directa del parásito y los resultados de las pruebas serológicas. Si bien la identificación del parásito en aspirados esplénicos, de médula ósea y ganglios linfáticos, es considerada la prueba de oro en el diagnóstico de esta enfermedad, en la práctica resulta difícil e inconveniente su aplicación debido a las dificultades en obtener y examinar los tejidos de los pacientes. Por lo que se ha incrementado el uso de los métodos serológicos (Sundar & Rai, 2002). En Venezuela, acorde a los lineamientos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2002), las pruebas serológicas constituyen las pruebas confirmatorias que soportan al diagnóstico clínico y epidemiológico.

Entre las pruebas inmunoserológicas más utilizadas para el diagnóstico de LV figuran: el test de ELISA con antígenos crudos y definidos de *Leishmania* tales como el rK39 (Hommel *et al.*, 1978; Anthony *et al.*, 1980; Singh *et al.*, 1995), test de anticuerpos inmunofluorescentes (IFAT) (Duxbury & Sadun, 1964; Badaró *et al.*, 1983) y el test de aglutinación directa (DAT). Este último, permanece como la herramienta de primera línea en el diagnóstico de la LV en muchos países en vías de desarrollo, ya que es un test sencillo, con altas sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, fácil de realizar, sin requerimientos de equipos y materiales especializados (Boelaert *et al.*, 1999a, 1999b, Schallig *et al.*, 2001, 2002), no invasivo (Zijlstra *et al.*, 1992) y aplicable para programas y estudios seroepidemiológicos a gran escala (el Harith. *et al.*, 1987). Actualmente se cuenta con el FD DAT comercial (KIT Biomedical Research) el cual en estudios recientes, demostramos su aplicabilidad en el diagnóstico de LV en Venezuela (Terán-Ángel *et al.*, 2007; 2010). Sin embargo, el mismo es fabricado

con promastigotes de *L. donovani*; lo cual es una limitación ya que es muy importante considerar la variación antigénica regional que sufre el parásito al interactuar con el vector local y con factores del hospedero; además del costo del test comercial. Por ello nos propusimos desarrollar una prueba de DAT con un antígeno de cepa autóctona de *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) obtenida de perros de la isla de Margarita, Edo. Nueva Esparta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de suero

Se estudiaron veinte sueros de pacientes residentes del estado Nueva Esparta y diagnosticados con LV por criterios clínicos, epidemiológicos y serológicos (ELISA-rK39 positivo); catorce sueros de pacientes con otras patologías: dos sueros de pacientes con *Leishmaniasis* cutánea difusa, ocho sueros de pacientes con mal de Chagas, dos sueros de pacientes con tuberculosis (TBC) y dos sueros de pacientes con lupus eritematoso sistémico.

Como controles se estudiaron diez sueros de individuos voluntarios sanos de zonas no endémicas del país y diez de zonas endémicas. Todas estas muestras fueron suministradas por los laboratorios de Inmunoparasitología, Inmunología II, Fisiopatología y Tuberculosis del Instituto de Biomedicina, UCV. El trabajo contó con la aprobación de Comité de Ética del instituto de Biomedicina.

Cepa empleada para el estudio

El test fue realizado con la cepa de MCAN/VE/98/IBO-78 (*Leishmania infantum*), la cual fue aislada a partir de la médula ósea de un perro infectado procedente del estado Nueva Esparta.

Cultivo de los parásitos en medio líquido Schneider's

El parásito se cultivó estérilmente usando el medio líquido Schneider's, pH de 7,2; suplementado con Suero Fetal Bovino al 10% y con antibióticos (20 U/mL de penicilina, 20 mg/mL de estreptomycin y 0,1% de gentamicina) 1×10^5 parásitos de *Leishmania infantum* (cepa MCAN/VE/98/IBO-78) fueron cultivados en frascos de cultivo de 10 y 50 mL en oscuridad a 26°C, hasta llegar a la fase tardía de crecimiento, la cual según nuestras condiciones fue al quinto día de cultivo.

Preparación del antígeno

Los parásitos en su fase tardía de crecimiento, fueron tratados con tripsina al 0,4 % en solución de Locke (a pH 7,70; 15M de NaCl; 14mM de glucosa; 5,4mM de KCl; 1,8mM de CaCl₂ y 2,4mM de NaHCO₃) a 37°C durante 45 min. Luego de centrifugación por 15 min. a 2700g a 4°C; estos fueron fijados por 20 horas a 4°C con formaldehído (al 2%) en solución de Locke. Posterior a dos lavados con 0,9% NaCl frío, los promastigotes fueron coloreados al mantenerlos 120 minutos en una solución salina fría con 1% de citrato de sodio (34mM) más 0,02% de azul brillante de Coomassie. Finalmente, se ajustaron a 100x10⁶ parásitos/mL en solución salina con 1% de formalina, y se mantuvieron en dicha solución a 4°C hasta su utilización.

Ensayo del test de aglutinación

El test de aglutinación directa con el antígeno local (DATv) fue realizado con algunas modificaciones de lo reportado previamente (El Harith *et al.*, 1988; Terán-Ángel *et al.*, 2007).

Las muestras de suero se diluyeron en solución salina (0,9% NaCl), 1% suero fetal bovino con 0,8% β-mercaptoetanol. Se dispusieron en placas de 96 pozos, fondo en “V” (Greiner, Alemania), y se realizaron diluciones seriadas (desde 1/100 hasta 1/102400) para cada muestra a ensayar. El antígeno mantenido en formalina (DATv) se ajustó a una concentración de 5 x 10⁷ promastigotes / mL y se le adicionó a las muestras de suero en un volumen final de 100 μL. Se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente para posteriormente realizar la lectura visualmente. El título de anticuerpos fue tomado como el inverso de la dilución el último pozo donde se observó aglutinación, la cual se observa como largos botones azules. La presencia de un botón compacto representa a los pozos negativos.

Para el test comercial (FD-DAT, Biomedical Research) se procedió de igual forma, sin embargo los sueros fueron diluidos en una solución de 0,9% NaCl, 0,8% β-mercaptoetanol sin suero fetal bovino.

Análisis estadísticos

Análisis mediante Curvas de Características Operativas del Receptor (Curvas ROC): Con los títulos de

anticuerpos resultantes para los sueros ensayados con los dos test de aglutinación evaluados, se ordenaron los datos (resultados de distribución discreta politómica) y se construyeron tablas de contingencia 2x2 para cada punto de corte (título de anticuerpo) posible. Se determinó la sensibilidad, definida como la probabilidad de detectar a los verdaderos positivos; y especificidad, definida como la probabilidad de detectar a los verdaderos negativos, en cada punto de corte a fin de graficar la dispersión de pares (1-especificidad, sensibilidad) y obtener las curvas ROC (Goodenough *et al.*, 1974; Burgueño *et al.*, 1995) del test desarrollado (DATv) y del FD-DAT. Las curvas ROC fueron analizadas por el programa informático EpiDat v.3.1 (OPS, Xunta de Galicia, España). Para cada una se determinó: el Área Bajo la Curva (ABC), la cual define la probabilidad de que el resultado de la prueba evaluada resulte más alterada en un individuo enfermo en comparación a uno sano; y el error estándar asociado al ABC; además de sus respectivos intervalos de confianza. Por otra parte, se evaluó mediante una prueba χ^2 la homogeneidad de las áreas, a fin de determinar las similitudes entre los dos test de aglutinación.

Finalmente, se procedió a la elección del punto de corte más adecuado en cada ensayo como aquél más próximo a la esquina superior izquierda de la curva (punto con mayor precisión relativa de la prueba).

Análisis de validez y seguridad de las pruebas: A partir de los resultados obtenidos y empleando los puntos de corte determinados según las curvas ROC, se construyó para cada prueba una tabla de contingencia 2x2, que fueron analizadas a fin de establecer los parámetros de validez y seguridad. Dichos parámetros fueron calculados aplicando las correcciones para la evaluación de pruebas diagnósticas con patrones de referencia imperfectos (Silva, 1988; Valenstein, 1990), se empleó como patrón de referencia a la prueba de ELISA -rK39, cuyas especificidad y sensibilidad, han sido reportadas, ambas, alrededor del 97% (Burn *et al.*, 1993; Qu *et al.*, 1994; Zijlstra *et al.*, 1998; Ozensoy *et al.*, 1998; Sreenivas *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2002; Salotra *et al.*, 2003). Se determinaron los parámetros sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (probabilidad de que un sujeto esté enfermo dado que resultó positivo en el test), valor predictivo negativo (probabilidad de que un sujeto esté sano dado que resultó negativo en el test) y razón de verosimilitud

(probabilidad de un resultado particular en enfermos en base a la probabilidad del mismo resultado en sanos), además de sus respectivos intervalos de confianza. Los análisis estadísticos se realizaron usando los programas informáticos EpiDat v.3.1 (OPS, Xunta de Galicia, España) y “Calculadora Pruebas Diagnósticas” v. 1.0.2 (Unidad de Bioestadística Clínica, Hospital Ramón y Cajal, España).

RESULTADOS

Mediante la aplicación de la prueba de aglutinación directa autóctona (DATv) o comercial (FD-DAT) se obtuvieron diferentes títulos de anticuerpos para los grupos de pacientes y controles, los cuales fueron utilizados para construir las curvas ROC para cada prueba. La Fig. 1 muestra las curvas ROC resultantes en cada caso. Se aprecia una mayor Área Bajo la Curva para el DATv en comparación con el FD-DAT; por otra parte, el punto de corte o “cut-off” de elección del ensayo desarrollado DATv fue 1/400, mientras que para FD-DAT resultó mayor, 1/800. Se

calcularon también los descriptores estadísticos del análisis ROC (Tabla I).

Al establecer los puntos de corte para cada prueba, los resultados de los títulos de anticuerpos se agruparon en tres categorías: controles, enfermos de LV y otras patologías (Fig. 2). Como puede observarse, todos los pacientes con LV confirmada fueron positivos para ambos test. Se presentaron falsos positivos en otras patologías; sin embargo la reacción cruzada fue menor en nuestro ensayo (DATv: en TBC aglutinantes 0/2 y en tripanosomiasis 1/8, FD-DAT: en TBC aglutinantes 2/2 y en tripanosomiasis 4/8), además hubo menos falsos positivos en el grupo de controles.

La Tabla II representa los parámetros de validez de las pruebas. Se observa que ambos tests presentan sensibilidad de 100%, mientras que la especificidad del DATv es considerablemente mayor en comparación con el FD-DAT (98,78% y 82,85% respectivamente). Los demás parámetros determinados también fueron superiores en el DATv con respecto al FD-DAT.

Fig. 1. Comparación de las curvas ROC para el DATv y FD-DAT. Se muestran las Áreas Bajo la Curva (ABC) de las gráficas generadas para cada prueba. Los “cut-off” para el DATv y FD-DAT fueron estimados en 1/400 y 1/800 respectivamente.

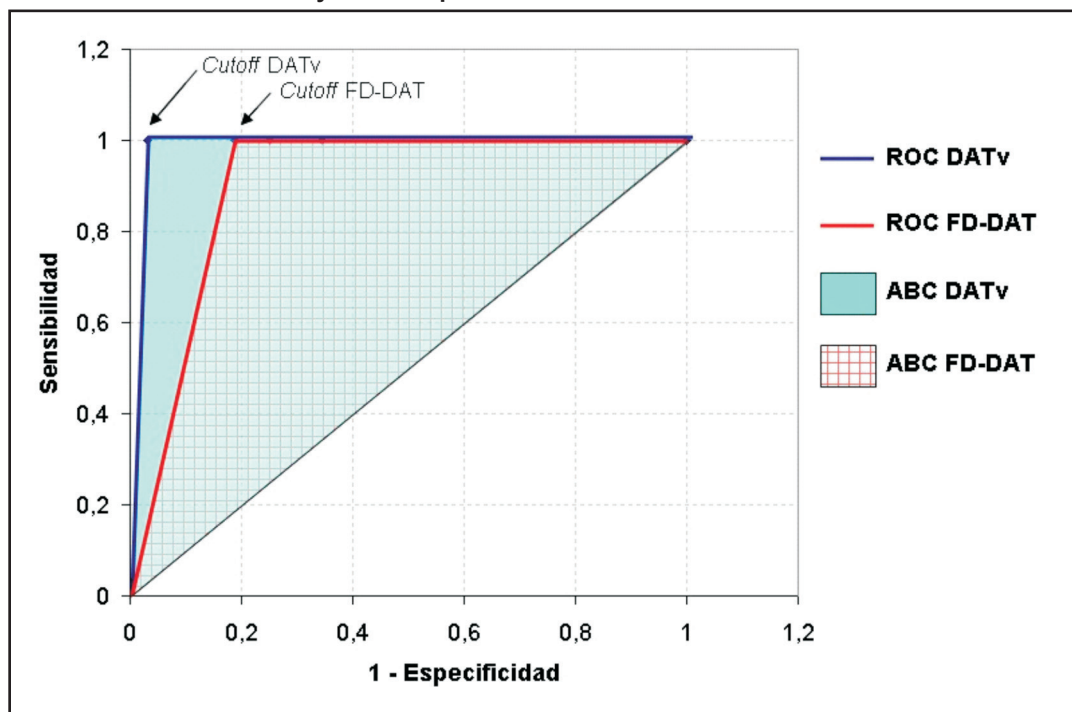


Tabla I. Descriptores estadísticos de las curvas ROC para el DATv y FD-DAT.

Prueba	Área Bajo la Curva	Error estándar*	Homogeneidad de áreas* (χ^2)
DATv	0,9063	0,0480 (0,8121-1,0004)	P=0,0056
FD-DAT	0,8594	0,0578 (0,7462-0,9726)	

Los valores entre paréntesis corresponden a los intervalos de confianza (95%).
 * Según Hanley & McNeil (1983).

Fig. 2. Resultados de las pruebas de aglutinación (DATv y FD-DAT) para la determinación de anticuerpos anti-Leishmania en humanos. ZE: zonas endémicas, ZNE: zonas no endémicas, LV: leishmaniasis visceral. En la gráfica se aprecian los valores de las medias de cada grupo (líneas horizontales).

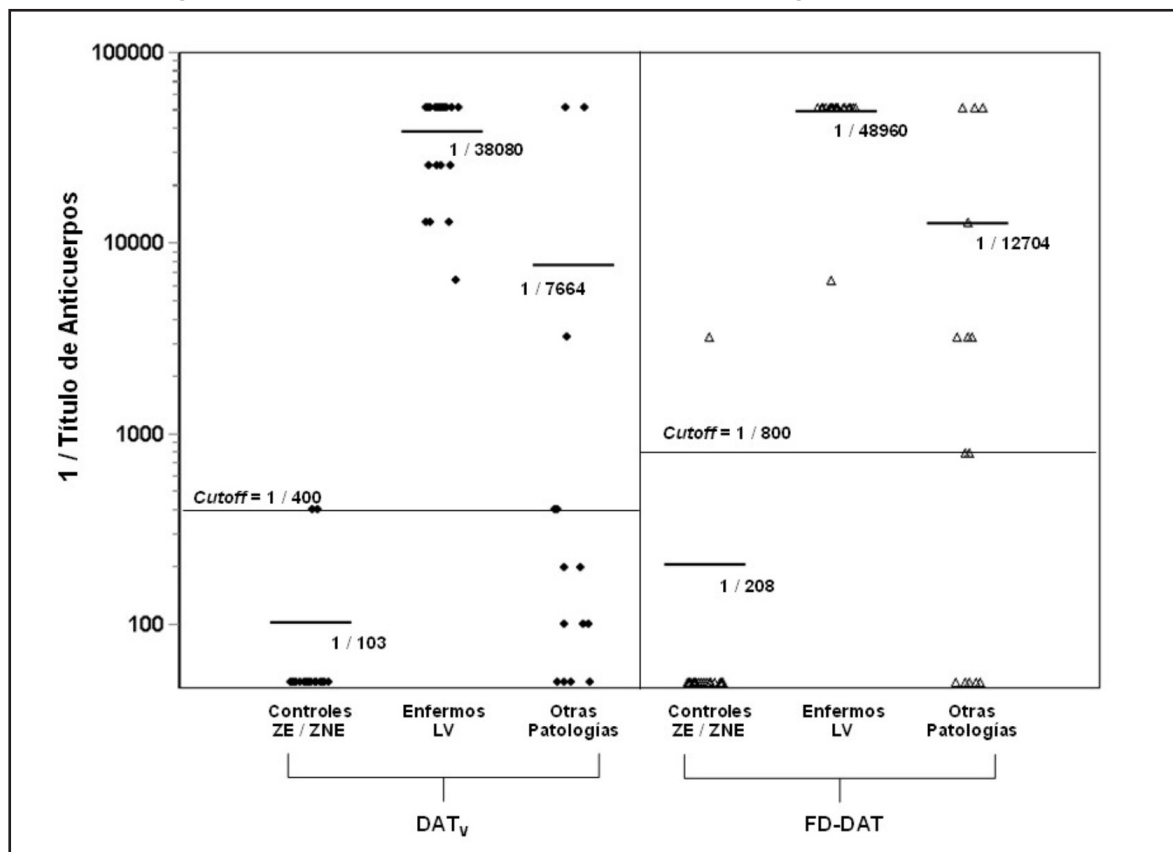


Tabla II. Sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razones de verosimilitud de las dos pruebas diagnósticas evaluadas.

Descriptor	DATv	FD-DAT
Sensibilidad (%)	100 (100 – 100)	100 (100 – 100)
Especificidad (%)	98,78 (94,99 – 100)	82,85 (69,79 – 95,91)
Valor predictivo positivo (%)	98,13 (92,33 – 100)	78,64 (62,89 – 94,40)
Valor predictivo negativo (%)	100 (100 – 100)	100 (100 – 100)
Razón de verosimilitud	86,42 (12,35 – 604,73)	6,08 (2,95 – 12,52)

Los parámetros de cada prueba fueron obtenidos al compararlas contra ELISA –rK39. Los valores entre paréntesis corresponden a los intervalos de confianza (95%).

DISCUSIÓN

En las últimas décadas, en Venezuela, se ha observado un incremento en la incidencia de LV, particularmente en los estados Falcón, Lara, Guárico, Anzoátegui, Delta Amacuro, Sucre y Nueva Esparta. Éste último se ha convertido en un foco muy importante en el país (Zulueta *et al.* 1999, Zerpa *et al.*, 2002), ya que es en esta entidad donde se ha registrado un mayor porcentaje de perros infectados que actúan como reservorio natural de la enfermedad. De igual modo, se ha evidenciado que la mayoría de los casos de infección se producen en niños de 0 a 9 años de edad; hecho dramático que impulsa el desarrollo de técnicas rápidas y certeras de diagnóstico para evitar las repercusiones de la LV en los niños (Zerpa *et al.*, 2003).

Hasta el presente dos institutos en el mundo ofrecen comercialmente dos antígenos para el test de aglutinación directa; estos son: el Instituto de Medicina Tropical del Príncipe Leopoldo de Antwerp, Bélgica y el del Instituto de Medicina Tropical de Ámsterdam, Holanda, (Biomedical Research). Ambas pruebas comerciales están fabricadas con un antígeno preparado a partir de promastigotes de *L. donovani* MHOM/SD/68/1S (Meredith *et al.*, 1995). Éste ha sido evaluado en numerosas regiones endémicas de LV alrededor del mundo incluyendo a nuestro país (Terán-Ángel *et al.*, 2007) y ha presentado sensibilidad y especificidad variables en cada una de ellas. En un metanálisis realizado en el año 2006 para evaluar el desempeño del FD-DAT desde su introducción al diagnóstico de LV desde 1986 hasta 2004; se concluyó que a pesar de presentar en la mayoría de los casos sensibilidad mayor

del 90% y especificidad comúnmente cercana al 100%, es necesaria la determinación de estos parámetros en las zonas endémicas en las que se inicia su empleo debido a la heterogenicidad de ambos valores con respecto a la localización geográfica de los estudios (Chappuis *et al.*, 2007). En ese contexto, es importante considerar la variación antigénica regional que sufre un parásito en sus epítopes al interactuar con el vector local y con factores de los hospedadores. Por ello, nos propusimos desarrollar una prueba de aglutinación directa empleando como antígeno promastigotes de *L. infantum* de la isla de Margarita, Edo. Nueva Esparta; que además, abarataría los costos de adquisición del kit frente al existente. Más aún, nuestro test sería más accesible en el medio rural en el cual predomina la enfermedad en el país; además de impulsar la producción nacional.

En el presente estudio, se comparó la efectividad de las pruebas DATv con el FD-DAT; para lo cual se llevó a cabo el análisis y graficación de curva ROC y la determinación de los parámetros de validez y seguridad de ambas pruebas.

Clásicamente, la exactitud de una prueba diagnóstica se ha evaluado en función de la sensibilidad y la especificidad, sin contar que éstas varían en función del punto de corte o “cut-off” elegido como criterio discerniente entre la población sana y la enferma. Este hecho se ha convertido en un determinante de la evaluación del FD-DAT, puesto que se han empleado numerosos puntos de corte en las diversas investigaciones: 1:800 (Singla *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 2005; Terán-Ángel *et al.*, 2007), 1:1600 (el

Harith *et al.*, 1986; Meredith *et al.*, 1995), 1: 6400 (el Harith *et al.*, 1988), 1:3200 (Mohebalí *et al.*, 2006); entre otros. Por lo tanto, se empleó una forma más global de conocer la calidad de la prueba diagnóstica desarrollada en un espectro de puntos de corte posibles: la curva ROC (Goodenough *et al.*, 1974), la cual es un instrumento con capacidad discriminativa, entre las condiciones de sano y enfermo, en una prueba a lo largo de todos los puntos de corte permitidos. Esto dibuja una curva en un sistema de ejes cartesianos. En el eje de ordenadas se ubican distintos valores de sensibilidad y en las abscisas las tasas de falsos positivos (1- especificidad), reflejando todos los pares de sensibilidad/especificidad para cada punto de corte (Domínguez Alonso & González Suárez, 2002). Por tanto, el valor de sensibilidad aumenta a medida que la especificidad disminuye. Estas gráficas son útiles para relacionar el equilibrio entre sensibilidad y especificidad de una prueba y permitir decidir cuál es el mejor punto de corte (Streiner & Cairney, 2007) sin que el análisis sea afectado por la distribución paramétrica o no paramétrica de los resultados.

En nuestro trabajo, los descriptores permitieron la comparación entre los dos test de aglutinación, estos fueron: Área Bajo la Curva (ABC), definida como la probabilidad de que el resultado de la prueba evaluada resulte más alterada en un individuo enfermo (Burgueño *et al.*, 1995). Su rango varía entre 1 (discriminación perfecta) y 0,5 (la prueba no es capaz de discernir enfermos de sanos con buena precisión diagnóstica) (Domínguez Alonso & González Suarez, 2002). Puesto que este parámetro es estimado, existe un error estándar asociado denominado EE (Streiner & Cairney, 2007). En esta investigación y, a pesar de que ambos test dibujan una curva ROC muy por encima de la diagonal que refleja el 0,5 de discriminación diagnóstica, se obtuvo una mayor ABC para el test desarrollado (DATv) en comparación con el ABC resultante del FD-DAT, implicando una mayor precisión diagnóstica del primero, específicamente en los focos endémicos de Nueva Esparta, Venezuela, evaluados.

Por otra parte, se tiene la evaluación de Homogeneidad de las áreas p, que establece las similitudes entre áreas de dos curvas trazadas, siempre que ambas presenten coincidencias en sus resultados. Mientras este valor se aproxime a 1, mayor será la homogeneidad de las ABC de los ensayos comparados (Francia *et al.*, 2006). En este caso, la homogeneidad

de las ABC de ambos ensayos dista mucho de 1, planteándose así que existen discrepancias importantes en cuanto a sensibilidad y especificidad entre los tests a considerar.

Una vez determinados los puntos de corte de cada prueba de aglutinación y con los resultados obtenidos de títulos de los sueros evaluados, se construyeron tablas de contingencia 2x2, considerando la corrección asociada a un patrón de referencia imperfecto (Valenstein, 1990): ELISA-rK39, a fin de determinar sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razón de verosimilitud de las dos pruebas. La validación de herramientas diagnósticas para LV deberían basarse en la comprobación parasitológica como método de referencia; sin embargo, ésta no es siempre posible de realizar; además de tampoco ser un patrón diagnóstico perfecto (depende de la carga parasitaria, el material obtenido por aspirado y la experticia del observador) (Zijlstra *et al.*, 1991). Por tanto, la OPS considera de igual relevancia y precisión el ELISA basado en antígeno rK39 (OPS, 2002). Para esta técnica se ha reportado una especificidad y una sensibilidad ambas de 97%, lo que lo convierte en un patrón de referencia imperfecto al emplearse para la evaluación de métodos diagnósticos de LV. Por lo tanto, y siendo ese el caso en esta investigación se deben emplear las fórmulas de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razón de verosimilitud ajustadas a esta condición del patrón o “gold standard”.

Tanto FD-DAT como DATv presentaron una sensibilidad del 100%, como se ha reportado anteriormente en Etiopía, Kenya y Brasil (el Harith *et al.*, 1986; Schallig *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2005; Da Silva *et al.*, 2006) lo que refleja la capacidad de los ensayos en la detección de los casos de LV.

Para ambas pruebas se evidenciaron resultados similares para el grupo de enfermos, cuyos títulos se mantuvieron por encima del punto de corte 1:400 (DATv) ó 1:800 (FD-DAT), afirmando así el diagnóstico positivo que presentaba el paciente. Sin embargo, se presentaron falsos positivos en otras patologías: en el FD-DAT hubo reacción cruzada con mal de Chagas, LUPUS y tuberculosis, como se ha reportado en Brasil (Silva *et al.*, 2005) y Kenya (el Harith *et al.*, 1986) para mal de Chagas y en India para tuberculosis (Kumar *et al.*, 2006); mientras que en DATv solamente se presentar reacción cruzada con los sueros de mal de Chagas. En otros estudios

evaluando el FD-DAT no evidencian ninguna reacción cruzada (Meredith *et al.*, 1995; Schallig *et al.*, 2002); sugieren que para las zonas endémicas de LV, también endémicas para tripanosomiasis, se debe elevar el punto de corte del ensayo (Harith *et al.*, 1986), lo cual puede acarrear falsos negativos. La reacción cruzada presentada por el DATv y por FD-DAT con mal de Chagas no afecta la validez de los resultados, ya que se debe tomar en consideración que ambas enfermedades son causadas por parásitos de la misma familia (por lo que es probable que compartan antígenos) además de que las manifestaciones clínicas de estas parasitosis son suficientemente disímiles entre sí, por lo que en el diagnóstico diferencial predomina la clínica. Más es importante mencionar que la isla de Margarita, estado Nueva Esparta no se considera zona endémica para tripanosomiasis (Añez *et al.*, 2004), lo que incrementa el valor diagnóstico del test desarrollado frente al existente. Además en DATv hubo menos falsos positivos en el grupo de controles, por lo que resulta una mayor especificidad de éste comparado con el FD-DAT: DATv obtuvo 98,78% y el FD-DAT 82,85%. En referencia a los valores predictivos positivos, se favorece aún más el DATv con un valor de 98,13% versus 78,64% del FD-DAT. Y la razón de verosimilitud de 86,42% del DATv en comparación con el 6,08% del FD-DAT, implica que en referencia a la prevalencia de la enfermedad en la población, el DATv es mejor que el FD-DAT para el diagnóstico de LV en el foco estudiado. Se han reportado con anterioridad disminuciones en la sensibilidad y especificidad del FD-DAT fuera de Asia y África (Chappuis *et al.*, 2007). A pesar de considerarse comparables, en estudios anteriores se ha obtenido mayor sensibilidad y especificidad con el antígeno acuoso que con el liofilizado (Abdallah *et al.*, 2004; Sundar *et al.*, 2006), lo que sugiere que durante el proceso de liofilización el antígeno resulta afectado.

Es importante reiterar que el DATv es válido por su alta sensibilidad y especificidad como criterio para diagnosticar LV en el estado Nueva Esparta, Venezuela. Estos resultados permiten afirmar que existe respuesta de anticuerpos contra antígenos propios de especie de *Leishmania infantum* vs *Leishmania donovani* en el país, implicando la “regionalización” del parásito al entrar en contacto con los hospederos de la isla de Margarita; esto se puede aprovechar para el desarrollo de test serológicos más sofisticados de los existentes en el mercado preparados con promastigotes de *L. donovani*.

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo fue financiado por el proyecto grupal de FONACIT N° G2005000375.

Standardization of direct agglutination test using native antigens for diagnosis of visceral leishmaniasis endemic areas of Venezuela

SUMMARY

Visceral leishmaniasis is the most severe form of leishmaniasis, and it is deadly if left untreated. Margarita Island is the most active visceral leishmaniasis focus in Venezuela, where most of the affected population are children between 0 to 9 years old. Therefore, an early diagnosis is very important, unfortunately, this is difficult in endemic areas. Although, the gold standard method for visceral leishmaniasis diagnosis is parasite detection; the sample retrieval is very inconvenient for patients. Moreover, most techniques are time-consuming, expensive and difficult to carry out. Other indirect methods, such as ELISA (using crude or define *Leishmania* antigens), require specialised technicians and equipment, which is unsuitable in the field areas. Recently we validated the performance of a direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Venezuela (KIT Biomedical Research). It showed elevated sensitivity and specificity. Nevertheless, this test includes *Leishmania donovani* as antigen, whereas visceral leishmaniasis in our country is caused by *Leishmania infantum* (= *L. chagasi*). Moreover, parasite antigenic variation as a result of vector-parasite and host-parasite interaction is an important factor to be considered; in addition to the costs. Therefore, we developed a direct agglutination test using *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) isolated from a naturally infected dog of Margarita Island. This was compared to the available commercial kit, and testing confirmed visceral leishmaniasis patients and healthy controls. Using rK39 ELISA as gold standard, it was found 100% sensitivity for both tests, and 82.85 % specificity for the commercial test and 98.78% for the local one, which shows the relationship between dominant local antigens and antibody's specificity displayed by Venezuelan patients.

Key words: visceral leishmaniasis, diagnosis, agglutination test, *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*), human, Venezuela

REFERENCIAS

- Abdallah K. A., Nour B. Y., Schallig H. D., Mergani A., Hamid Z., Elkarim A. A., *et al.* (2004). Evaluation of the direct agglutination test based on freeze-dried *Leishmania donovani* promastigotes for the serodiagnosis of visceral *Leishmaniasis* in Sudanese patients. *Trop. Med. Int. Health.* **9**: 1127-1131.
- Adhya S., Chatterjee M., Hassan M. Q., Mukherjee S. & Sen S. (1995). Detection of *Leishmania* in the blood of early kala-azar patients with the aid of the polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **89**: 622-624.
- Allain D. S. & Kagan I. G. (1975). A direct agglutination test for leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **24**: 232-236.
- Anthony R. L., Christensen H. A. & Johnson C. M. (1980). Micro enzyme-linked immunoassay (ELISA) for the diagnosis of New World leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **29**: 190-194.
- Añez N., Crisante G. & Rojas A. (2004). Update on Chagas disease in Venezuela-a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **99**: 781-787.
- Badaró R., Reed S. G. & Carvalho E. M. (1983). Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**: 480-484.
- Boelaert M., El-Safi S., Jacquet D., de Muynck A., van der Stuyft P. & Le Ray D. (1999a). Operational validation of the direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 129-134.
- Boelaert M., El-Safi S., Mousa H., Githure J., Mbatia P. A., Gurubacharya V., *et al.* (1999b). Multi-centre evaluation of repeatability and reproducibility of the direct agglutination test for visceral leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health.* **4**: 31-37.
- Bryceson, A. (1989). Leishmaniasis after Adler. *Isr. J. Med. Sci.* **25**: 209-213.
- Burgueño M. J., García-Bastos J. L. & González-Buitrago J. M. (1995). Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. *Med. Clin. (Barc).* **104**: 661-670.
- Burns J. M., Shreffler W. G., Benson D. R., Ghalib H. W., Badaró R. & Reed S. G. (1993). Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**: 775-779.
- Chappuis F., Rijal S., Soto A., Menten J. & Boelaert M. (2006). A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ.* **333**: 723.
- Da-Silva E. S., vander Meide W. F., Schoone G. J., Gontijo C. M., Schallig H. D. & Brazil R. P. (2006). Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet. Res. Commun.* **30**: 637-643.
- Domínguez Alonso E. & González Suárez R. (2002). Análisis de las curvas receiver-operating characteristic: un método útil para evaluar procedimientos diagnósticos. *Rev. Cubana Endocrinol.* **13**: 173-180.
- Duxbury R. E. & Sadun E. H. (1964). Fluorescent antibody test for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **13**: 525-529.
- el Harith A. E., Kolk A. H., Kager P. A., Leeuwenburg J., Faber F. J., Muigai R., *et al.* (1987). Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**: 603-606.
- el Harith A., Kolk A. H., Leeuwenburg J., Muigai R., Huigen E., Jelsma T., *et al.* (1988). Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 1321-1325.
- Francia C., Barcala E., Puente B., Fernández D., Fernández G. (2006). Validación del ELISA para la detección de anticuerpos frente a infecciones

- de *Brucella abortus* en ganado vacuno. En: Memorias del XIV Congreso Internacional de la Federación Mediterránea de Sanidad y Producción de Rumiantes. Eds.: Baños P., Benedito J., Morrondo M., Hernández J., López C. Santiago de Compostela, España.
- Goodenough D. J., Rossmann K. & Lusted L. B. (1974). Radiographic applications of receiver operating characteristic (ROC) curves. *Radiology*. **110**: 89-95.
- Hanley & McNeil (1983). A method of comparing the areas under receiver operating characteristics curves derived from the same cases. *Radiology*. **148**: 839-843.
- Harith A. E., Kolk A. H., Kager P. A., Leeuwenburg J., Muigai R., Kiugu S., *et al.* (1986) A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **80**: 583-587.
- Hommel M., Peters W., Ranque J., Quilici M. & Lanotte G. (1978). The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **72**: 213-218.
- Kumar R., Pai K., Kumar P., Pandey H. P. & Sundar S. (2006). Sero-epidemiological study of kala-azar in a village of Varanasi district India. *Trop Med Int Health*. **11**: 41-48.
- Mauricio I. L., Howard M. K., Stothard J. R. & Miles M. A. (1999). Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*. **119**: 237-246.
- Meredith S. E., Kroon N. C., Sondorp E., Seaman J., Goris M. G., van Ingen C. W., *et al.* (1995). Leish-KIT, a stable direct agglutination test based on freeze dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* **33**: 1742-1745.
- Mohebbali M., Edrissian G., Nadim A., Hajjarian H., Akhoundi B., Hooshmand B, *et al.* (2006). Application of direct agglutination test (DAT) for the diagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis in Iran. *Iranian J. Parasitol.* **1**: 15-25.
- OPS (1996). *Epidemiología y control de la leishmaniasis en las Américas, por país o territorio*. Cuaderno técnico. **44**: 1-52.
- OPS (2002). *Definiciones de Caso: leishmaniasis Visceral*. Boletín Epidemiológico. **23**: 14.
- Ozensoy S., Ozbel Y., Turgay N., Alkan M. Z., Gul K., Gilman-Sachs A., *et al.* (1998). Serodiagnosis and epidemiology of visceral *Leishmaniasis* in Turkey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **59**: 363-369.
- Pearson R. D. & Wilson M. E. (1989). Host defenses against prototypical intracellular protozoans, The *Leishmania*. Parasitic infection in the compromised host. En M., W.P.D.a.G.R. (ed.). Marcel Dekker, New York, p. 31.
- Qu J. Q., Zhong L., Masoom-Yasinzai M., Abdur-Rab M., Aksu H. S., Reed S. G., *et al.* (1994). Serodiagnosis of Asian leishmaniasis with a recombinant antigen from the repetitive domain of a *Leishmania* kinesin. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**: 543-545.
- Salotra P., Sreenivas G., Beena K. R., Mukherjee A. & Ramesh V. (2003). Parasite detection in patients with post kala-azar dermal leishmaniasis in India: a comparison between molecular and immunological methods. *J. Clin. Pathol.* **56**: 840-843.
- Sánchez M. & Tapia F. (2005). Inmunología de la leishmaniasis Visceral Canina. *Bol. Mal. Salud Amb.* **45**: 81-88.
- Schallig H. D., Schoone G. J., Kroon C.C., Hailu A., Chappuis F. & Veeken H. (2001). Development and application of simple diagnostic tools for visceral *Leishmaniasis*. *Med. Microbiol. Immunol.* **190**: 69-71.
- Schallig H. D., Canto-Cavalheiro M. & da Silva E. S. (2002). Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **97**: 1015-1018.
- Silva L. C. (1988). Métodos Estadísticos para la Investigación Epidemiológica. Instituto Vasco de Estadística, Eustat, Bilbao, España.

- Silva E. S., Schoone G. J., Gontijo C. M., Brazil R. P., Pacheco R. S. & Schallig H.D. (2005). Application of direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST) for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in endemic area of Minas Gerais Brazil. *Kinetoplastid Biol Dis.* **4**: 4.
- Singh S., Gilman-Sachs A., Chang K. P. & Reed S. G. (1995). Diagnostic and prognostic value of k39 recombinant antigen in Indian leishmaniasis. *J. Parasitol.* **81**: 1000-1003.
- Singh S., Kumari V. & Singh N. (2002). Predicting kala-azar disease manifestations in asymptomatic patients with latent *Leishmania donovani* infection by detection of antibody against recombinant K39 antigen. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**: 568-572.
- Singla N., Singh G. S., Sundar S. & Vinayak V. K. (1993). Evaluation of the direct agglutination test as an immunodiagnostic tool for kala-azar in India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**: 276-278.
- Smith D., Gazzard B., Lindley R. P., Darwish A., Reed C., Bryceson A. D. & Evans D. A. (1989). Visceral leishmaniasis (kala azar) in a patient with AIDS. *Aids.* **3**: 41-43.
- Sreenivas G., Ansari N. A., Singh R., Subba Raju B. V., Bhatheja R., Negi N. S., et al. (2002). Diagnosis of visceral leishmaniasis: comparative potential of amastigote antigen, recombinant antigen and PCR. *Br. J. Biomed. Sci.* **59**: 218-222.
- Streiner D.L. & Cairney J. (2007). What's under the ROC? An introduction to receiver operating characteristics curves. *Can. J. Psychiatry.* **52**: 121-128.
- Sundar S. & Rai M. (2002). Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**: 951-958.
- Sundar S., Singh R. K., Maurya R., Kumar B., Chhabra A., Singh V., et al. (2006). Serological diagnosis of Indian visceral leishmaniasis: direct agglutination test versus rK39 strip test. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100**: 533-537.
- Terán-Angel G., Schallig H. D., Zerpa O., Rodríguez V., Ulrich M. & Cabrera M. (2007). Evaluation of the direct agglutination test as an alternative method for the diagnosis of canine and human visceral *Leishmaniasis* in Venezuela. *Biomedica.* **27**: 447-453.
- Terán-Angel G., Rodríguez V., Silva R., Zerpa O., Schallig H., Ulrich M. et al. (2010). Herramientas no invasivas en el diagnóstico de leishmaniasis visceral en Venezuela: comparación entre pruebas inmunoserológicas: DAT, rK26, rK39. *Biomedica.* **30**: 39-45.
- Valenstein P. N. (1990). Evaluating diagnostic tests with imperfect standards. *Am. J. Clin. Pathol.* **93**: 252-258.
- Zerpa O., Ulrich M., Borges R., Rodríguez V., Centeno M., Negrón E., et al. (2003). Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Venezuela. *Pan. Am. J. of Pub. Hlth.* **13**: 239-245.
- Zerpa O., Ulrich M., Benitez M., Avila C., Rodríguez V., Centeno M., et al. (2002). Epidemiological and Immunological Aspects of Human Visceral leishmaniasis on Margarita Island, Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* **97**: 1079-1083.
- Zijlstra E. E., Ali M. S., el-Hassan A. M., el-Toum I. A., Satti M., Ghalib H. W., et al. (1991). Direct agglutination test for diagnosis and sero-epidemiological survey of kala-azar in the Sudan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**: 474-476.
- Zijlstra E. E., Ali M. S., el-Hassan A. M., el-Toum I. A., Satti M., Ghalib H. W., et al. (1992). Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**: 505-507.
- Zijlstra E. E., Daifalla N. S., Kager P. A., et al. (1998). RK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **5**: 717-720.
- Zulueta A. M., Villarroel E., Rodríguez N., Feliciangeli M. D., Mazzarri M., Reyes O., et al. (1999). Epidemiologic aspects of American visceral leishmaniasis in an endemic focus in Eastern Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **61**: 945-950.

Recibido el 30/03/2010
Aceptado el 25/05/2010

Incidencia de infecciones sintomáticas y asintomáticas por virus dengue en Maracay, Venezuela: 2006 - 2007

Carlos Espino¹, Guillermo Comach¹, Gloria Sierra¹, Diamelis Guzmán¹, Daría Elena Camacho¹, Maritza Cabello de Quintana^{1,2}, Anna Chiarello^{1,2} & Tadeusz Kochel³

Con el objetivo de estimar las tasas de incidencia de infecciones sintomáticas y asintomáticas por virus dengue (DENV) durante un año (octubre 2006-septiembre 2007) en cuatro barrios de Maracay (Venezuela) se realizó un estudio prospectivo consistente de visitas domiciliarias, tres veces por semana, para detectar casos de dengue y de encuestas serológicas semestrales para determinar infecciones asintomáticas probables por DENV. Los sujetos de estudio pertenecían a una cohorte de 2663 personas ≥ 5 años de edad. El diagnóstico confirmatorio de DENV se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Las pruebas serológicas se realizaron mediante el ensayo inmunoenzimático de captura de IgM anti-dengue (MAC-ELISA). Los resultados determinaron tasas de incidencia de 5,7 y 18,6 por 100 000 personas/día (p/d) para las infecciones sintomáticas y asintomáticas, respectivamente. La tasa de incidencia de las infecciones sintomáticas observada en las personas < 15 años de edad fue significativamente mayor que la encontrada en los sujetos ≥ 15 años (15,8 versus 2,9 por 100 000 p/d). Por otro lado, las tasas de incidencia de las infecciones asintomáticas en ambos grupos de edad fueron similares (17,3 y 18,9 por 100 000 p/d, respectivamente). Se detectaron los cuatro serotipos del DENV en tres de los barrios estudiados. Se observó que la edad y la hiperendemicidad fueron probablemente los factores que más contribuyeron a la incidencia del dengue en los cuatro barrios investigados. Seguramente, las infecciones asintomáticas contribuyeron a incrementar la transmisión viral en el área de estudio.

Palabras clave: Dengue, vigilancia activa, incidencia, IgM.

INTRODUCCIÓN

Dengue es una enfermedad transmisible causada por el virus dengue (DENV, familia Flaviviridae, género: *Flavivirus*), que consiste de cuatro serotipos denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. La infección por DENV es transmitida fundamentalmente a los humanos por el mosquito *Aedes aegypti* y evoluciona clínicamente de manera asintomática, o sintomática como fiebre dengue

(FD), dengue hemorrágico (DH) y síndrome de choque por dengue (SCD) (WHO, 1997a).

Desde la década de los 50, el DH es la forma clínica más importante de esta enfermedad en Asia. En América, y específicamente en el Caribe y Sur América, se venían presentando epidemias cíclicas de FD en 1964, 1968, 1973 y 1979, con casos esporádicos de DH (PAHO, 1997). El DH tuvo poco significado en América hasta 1981, año en que ocurre la primera gran epidemia del hemisferio occidental en Cuba, que dejó un saldo de 158 personas muertas y entre ellas 101 niños (Gubler & Clark, 1995; Guzmán *et al.*, 1999). La segunda gran epidemia de DH ocurrió en Venezuela entre 1989 y 1990 en la cual se registraron más de 6000 casos de DH con 73 fallecidos (PAHO, 1990). Desde 1989 hasta 2005, Venezuela ha presentado las mayores tasas de incidencia de DH y el mayor número de fallecidos de toda América (WHO, 2002).

¹ Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales (LARDIDEV), Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Sede Aragua, Maracay, Venezuela.

² Corporación de Salud del estado Aragua (CORPOSALUD-ARAGUA), Maracay, Venezuela.

³ U.S. Naval Medical Research Center Detachment, Lima, Peru.

*Autor de correspondencia: gcomach@yahoo.com

Maracay, la capital de estado Aragua, fue la ciudad donde se confirmaron los primeros casos de dengue hemorrágico en 1989 y hasta el presente se mantiene como uno de los focos endémicos más importantes de Venezuela (Barrera *et al.*, 2000). Actualmente en Venezuela circulan todos los serotipos del virus dengue, incluyendo el DENV-2 genotipo asiático, el cual ha sido señalado como el causante de la mayoría de los casos de DH (Barrera *et al.*, 2002).

Siendo el mosquito *A. aegypti* el vector principal del dengue, la estrategia fundamental para prevenir la transmisión viral es a través de su control (WHO, 1997b). Probablemente, el método de control más eficaz es el control químico de mosquito, el cual ha sido aplicado con bastante éxito en países como Cuba y Singapur (Guzmán *et al.*, 1992; Halstead, 2000). Sin embargo, los países con dificultades técnicas y económicas para aplicar dicho control químico necesitan utilizar otras estrategias de prevención. Una de estas estrategias, es la vigilancia activa de casos de dengue durante los períodos interepidémicos a fin de detectar tempranamente los incrementos en la incidencia de la enfermedad (Feldman, 2004; Gubler, 2002; WHO, 1997b). La meta de esta estrategia es predecir las epidemias para evitar, o disminuir, los efectos que ellas producen una vez que se establecen. La otra, y tal vez la mejor, alternativa de prevención del dengue es la inmunización preventiva de las poblaciones a riesgo. En este sentido, ya se están realizando los estudios experimentales para lograr la aprobación cuatro vacunas contra el dengue; dichos estudios se encuentran en fase I y II (WHO, 2006). Sin embargo, ninguna de las vacunas experimentales se encuentra en la fase III de desarrollo. Esto significa que la implementación masiva de alguna(s) de estas vacuna(s), además de no ser inmediata, necesitará de poblaciones bien estudiadas con respecto a las tasas de incidencia de la infección por DENV, los serotipos circulantes y los grupos de edad más afectados (WHO, 2008).

En Venezuela, las estimaciones de la incidencia del dengue son basadas exclusivamente en los casos sospechosos reportados al sistema nacional de vigilancia epidemiológica (Querales, 2002). Este sistema nacional de vigilancia epidemiológica es del tipo pasivo, el cual detecta generalmente los incrementos de casos de dengue en momentos en que estos se encuentran en claro ascenso. Además de su ineficacia para prevenir las epidemias, el sistema de

vigilancia pasivo es de poca sensibilidad para detectar los casos de dengue en los períodos interepidémicos, lo cual resulta en subestimaciones de las tasas de incidencia de la enfermedad. Con los sistemas de vigilancia epidemiológica conocidos resulta imposible obtener información acerca de las infecciones asintomáticas por DENV y su posible contribución a la transmisión viral. Este tipo de información epidemiológica probablemente puede ser obtenida a través de investigaciones sero-epidemiológicas en poblaciones susceptibles aparentemente sanas (Endy *et al.*, 2002; Kuno, 1997; Porter *et al.*, 2005).

En el presente estudio se determinaron las tasas de incidencia de infecciones sintomáticas y asintomáticas por DENV en una cohorte de 2663 personas ≥ 5 años de edad, residentes de cuatro barrios de Maracay, Venezuela. Así mismo, se relacionaron las cifras de incidencia con algunas variables demográficas y ambientales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio del Estudio

El estudio fue realizado en cuatro barrios de la ciudad de Maracay, Estado Aragua, Venezuela. Maracay esta situada 100 Km al oeste de la ciudad de Caracas y a 450 mt sobre el nivel del mar. Tiene una temperatura máxima promedio de 33,4°C, así como una pluviosidad media anual de 2,12 cm en los meses de sequía (diciembre - abril) y de 12,91 cm en los meses de lluvia (mayo-noviembre). Su población es de aproximadamente 678 000 habitantes (CONAPLAN, 2001). Para el estudio se seleccionaron los cuatro barrios (La Cooperativa, Piñonal, 23 de Enero y Caña de Azúcar) que tuvieron el mayor número de casos confirmados de dengue en el año 2004 (LARDIDEV, datos no publicados).

Diseño del Estudio

Se trató de un estudio longitudinal de un año de duración, donde aceptaron participar 2663 personas residentes en 839 viviendas de los cuatro barrios objetos del estudio. Para la selección de las viviendas de cada barrio, primeramente se enumeraron las manzanas (cuadrados o bloques residenciales) de cada uno de ellos, luego se seleccionaron cuatro o cinco manzanas al azar utilizando la tabla de números aleatorios, para finalmente incorporar las viviendas de

cada manzana cuyos residentes aceptaron participar de forma voluntaria. Para detectar casos sintomáticos de dengue, se realizaron visitas domiciliarias tres veces por semana. Durante las visitas se preguntó y verificó la presencia de personas con fiebre (temperatura oral cuantificada $\geq 38^{\circ}\text{C}$) de 24-72 h de evolución. Seguidamente, un médico del estudio evaluó clínicamente a los pacientes febriles para determinar si tenían además otro(s) signo(s)/síntoma(s) compatible(s) con dengue, y para descartar cualquier foco de infección bacteriana. A estos casos se les tomó una muestra de sangre para detectar ARN de DENV y anticuerpos IgM anti-dengue. Para la detección de los casos asintomáticos se obtuvieron muestras de sangre en el momento de su ingreso al estudio y cada seis meses para determinar la presencia anticuerpos IgM anti-dengue.

Técnicas de Laboratorio

Para la confirmación de las infecciones por DENV en los casos febriles se utilizó la técnica RT-PCR descrita por Lanciotti (1992). Para la extracción del ARN viral de las muestras de sueros se empleó el Mini Kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN, Maryland, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La detección de anticuerpos IgM anti-dengue se realizó mediante la técnica MAC-ELISA descrita por Kuno (1987).

Análisis estadístico y epidemiológico

Para establecer la tasa de incidencia se consideró el tiempo en días que aportó cada participante en el estudio. Ese tiempo en días fue variable dependiendo de las personas que fallecieron, de los que se mudaron a otra residencia fuera del área de estudio y de aquellos que manifestaron no querer participar más en el estudio. La tasa de incidencia se expresó en número de casos por cada 100.000 pacientes-día (p/d), específicamente para calcular la incidencia de casos sintomáticos de dengue fueron considerados solamente aquellos casos de dengue confirmados por RT-PCR y pacientes con IgM anti-dengue positivos mediante la prueba de ELISA. Los casos, cuyo resultado de RT-PCR fue negativo, no fueron tomados en cuenta. Para establecer la significancia estadística de las comparaciones y asociaciones propuestas en este estudio, se utilizó un nivel de confianza del 95 % para la prueba χ^2 y para los intervalos de confianza (IC) de las medidas de asociación Riesgo Relativo

(RR) con densidades de incidencias. Los cálculos de estas pruebas se realizaron con el programa EpiInfo de estas pruebas se realizaron con el programa EpiInfo de estas pruebas se realizaron con el programa EpiInfo, versión 6.04 (Dean *et al.*, 1996).

Aspectos Éticos

La incorporación de las personas al estudio, así como el trato y los procedimientos médicos aplicados a las mismas durante el presente estudio, se ajustaron a los lineamientos de la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 1983, y a los requerimientos del Comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (CBIIB-UC), y del Comité de Revisión Institucional del Instituto de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de Estados Unidos, de Lima, Perú (en inglés, Naval Medical Research Center Detachment Institutional Review Board [NMRC D IRB]). Así mismo, se obtuvo la aprobación de la Corporación de Salud del Estado Aragua (CORPOSALUD-ARAGUA). A cada miembro de las viviendas seleccionadas que reunía los criterios de inclusión en el estudio, se le invitó a participar voluntariamente suministrándosele un documento de consentimiento previa información. Una vez constatado que entendió la información contenida en dicho consentimiento, se le solicitó que lo completara y firmara como prueba de su aceptación voluntaria. Finalmente, una vez firmado dicho documento, se le entregó una copia al participante, o al representante en los casos de individuos menores de 18 años.

RESULTADOS

La Tabla I muestra el total de personas que residen en los cuatro barrios investigados, las características demográficas de los sujetos de la cohorte seleccionada, y los individuos encontrados con signos/síntomas compatibles con dengue. Durante un año de seguimiento (octubre 2006-septiembre 2007), se encontró que 147 personas habían padecido fiebre y al menos otra manifestación clínica de dengue. Cuarenta y tres de ellos (1,6%), fueron confirmados como infectados por DENV mediante RT-PCR. Siete pacientes febriles (0,3%) que resultaron negativos a RT-PCR tenían anticuerpos IgM contra DENV (Resultados no mostrados).

La tasa de incidencia de las infecciones sintomáticas fue de 5,7 por 100.000 p/d (Fig. 1). Las mayores tasas de incidencia de estas infecciones sintomáticas se detectaron en los barrios Caña de

Tabla I. Población de cuatro barrios de Maracay, Venezuela, y características demográficas de las personas constituyentes de la cohorte seleccionada para determinar la incidencia de infecciones asintomáticas y sintomáticas por DENV: 2006 - 2007.

	Localidad				Total
	La Cooperativa	Piñonal	23 de Enero	Caña de Azúcar	
Población	36 413	48 082	15 324	62 025	161 844
Total de la Cohorte	517	539	576	1 032	2 663
Cohorte con muestreo semestral*	501	500	502	1 006	2 509
Total < 15 años	136	110	106	213	565
Total ≥ 15 años	381	429	469	819	2 098
<15 años: razón F/M†	1,30	0,75	0,68	0,95	0,92
≥15 años: razón F/M	2,18	1,75	2,78	2,38	2,24
Casos sospechosos de dengue‡	28	21	33	65	147

*Participantes que aceptaron dar muestras de sangre para medir IgM anti-dengue cada seis meses.

†Femenino/Masculino

‡Pacientes que tenían fiebre y al menos otro signo/síntoma de dengue

Fig. 1. Distribución, por grupos de edad, de las tasas de incidencia (casos por 100 000 p/d) de infecciones sintomáticas por DENV en cuatro barrios de Maracay, Venezuela: 2006-2007.

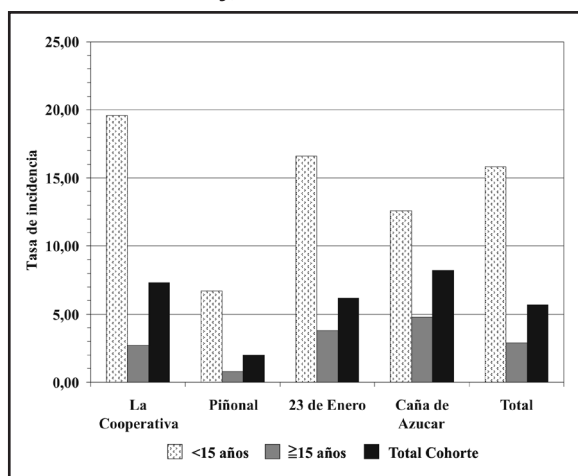
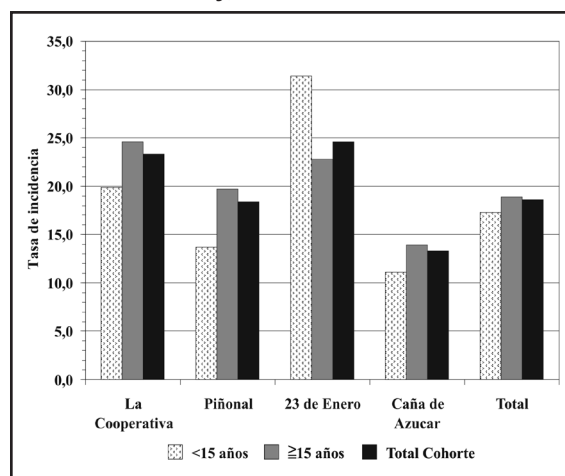


Fig. 2. Distribución, por grupos de edad, de las tasas de incidencia (casos por 100 000 p/d) de infecciones asintomáticas por DENV en cuatro barrios de Maracay, Venezuela: 2006-2007.



Azúcar y La Cooperativa (8,2 y 7,3 por 100 000 p/d, respectivamente). Según la edad, las tasas de incidencias fueron de 15,8 por 100.000 p/d en individuos <15 años de edad y de 2,9 por 100 000 p/d en individuos ≥15 años (RR = 5,48; IC: 2,97 - 10,10). La mayor diferencia entre las tasas de incidencia de ambos grupos de edad se observó en el barrio La Cooperativa (19,6 y 2,7 por 100 000 p/d, respectivamente; RR = 17,04, IC: 7,07 - 27,01).

La tasa de incidencia de las infecciones asintomáticas fue de 18,6 por 100.000 p/d, y la

mayor tasa de incidencia se encontró en el barrio La Cooperativa (23,3 por 100.000 p/d) (Fig. 2). Según la edad, las tasas de incidencia de las infecciones asintomáticas en las personas <15 años de edad fueron muy similares a las encontradas en aquellas ≥15 años (17,3 y 18,9 por 100 000 p/d, respectivamente; RR= 0,92, IC: 0,60 - 1,39).

Se detectó la circulación de los cuatro serotipos del DENV en los barrios La Cooperativa, Caña de Azúcar y 23 de Enero y de dos serotipos (DENV-1 y -3) en el barrio Piñonal (Fig. 3). Según

Fig. 3. Distribución porcentual, por barrios, de los serotipos de DENV detectados en los casos confirmados en Maracay, Venezuela: 2006-2007.

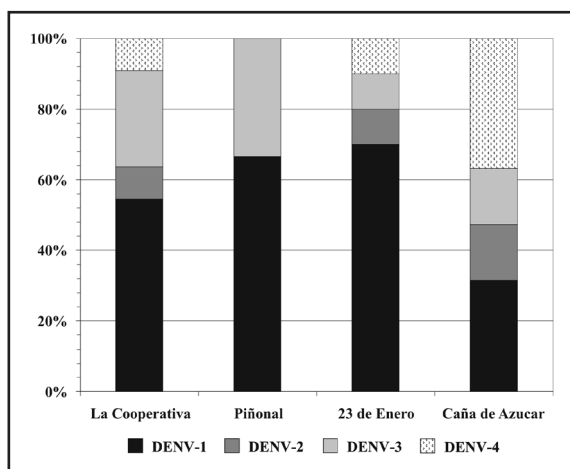


Fig. 4. Distribución porcentual, por grupos de edad, de los serotipos de DENV detectados en los casos confirmados de Maracay, Venezuela: 2006-2007.

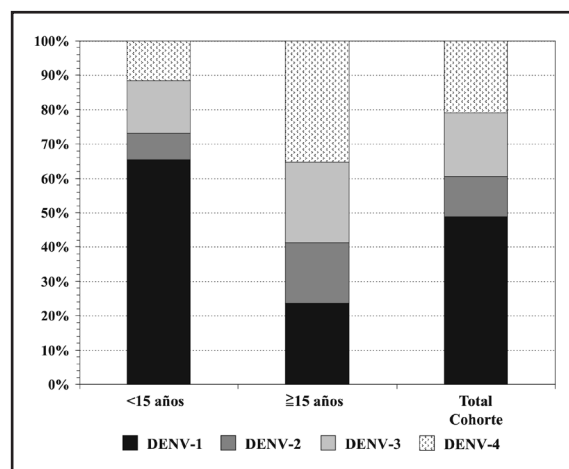
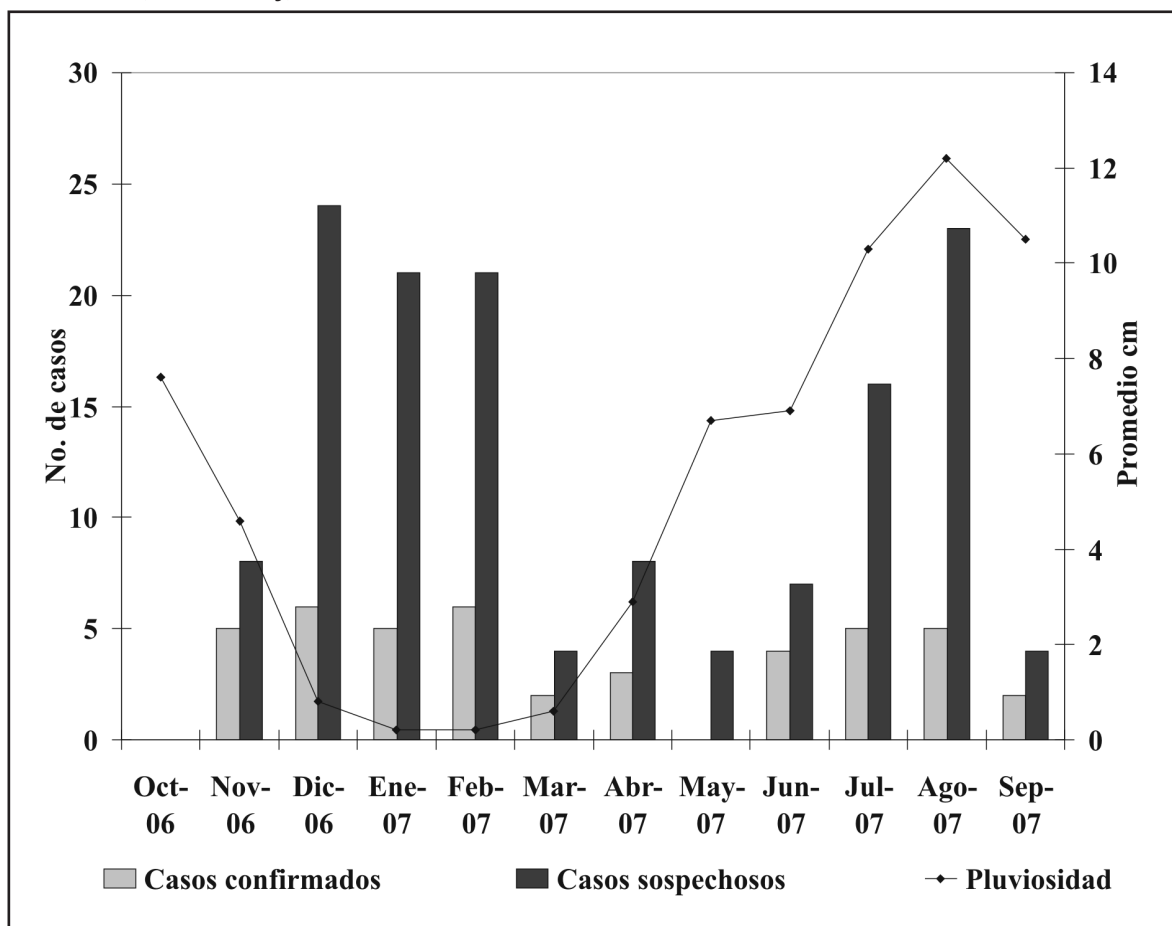


Fig. 5. Distribución cronológica de los casos sospechosos y confirmados de dengue y la pluviosidad en centímetros, en Maracay, Venezuela: 2006-2007.



la edad de los casos confirmados como dengue, los serotipos detectados con mayor frecuencia fueron DENV-1 en las personas <15 años de edad y DENV-4 en las personas ≥15 años (Fig. 4). Esta tendencia se observó en los tres barrios en los cuales circularon tales serotipos.

La distribución mensual de las frecuencias de casos sospechosos y confirmados de dengue fue bimodal y similar tanto en los meses de sequía (diciembre-abril), como en los de lluvia (mayo-noviembre) (Fig. 5). Hubo, sin embargo, un descenso considerable del número de casos al final del período de sequía, para luego aumentar coincidiendo con el inicio de las lluvias (los casos sospechosos), o dos meses después del inicio de las mismas (los casos confirmados).

DISCUSIÓN

Las búsquedas activas de casos de dengue utilizadas conjuntamente con encuestas serológicas en personas asintomáticas, es una herramienta de investigación ideal para determinar la incidencia real de casos de dengue. Si además dicha investigación se realiza en una cohorte representativa de una población susceptible a contraer la infección por DENV, las cifras de incidencia obtenidas permitirán una planificación más precisa de la fase III de los estudios de vacunación contra este virus (Endy *et al.*, 2002; WHO, 2008).

En el presente estudio se encontraron tasas de incidencia de 5,7 y 18,9 por 100 000 p/d para las infecciones sintomáticas y asintomáticas, respectivamente. La rigurosidad con que se realizó la vigilancia activa de los casos febriles, respalda, en cierta medida, la precisión de la tasa de incidencia obtenida para las infecciones sintomáticas. Sin embargo, la tasa de incidencia real de las infecciones asintomáticas posiblemente sea mayor a la encontrada en nuestro estudio, debido a que las mismas están basadas en las seroconversiones de IgM anti-dengue ocurridas en un período de seis meses. Seis meses es un tiempo suficientemente largo como para que los niveles de IgM en los casos detectados en los primeros 3 o 4 meses disminuyeran a valores indetectables (Vorndam y Kuno, 1997). La presencia de falsos IgM positivos podría presentarse debido a reacciones cruzadas con otros Flavivirus, entre los cuales destacan el virus de la Fiebre del Oeste del Nilo, el virus de la Encefalitis Japonesa, y especialmente en Venezuela el virus de la

Fiebre Amarilla. En ausencia, por los momentos, de casos confirmados para las dos primeras enfermedades, Fiebre Amarilla y su vacuna podrían ser fuente de reacciones cruzadas en poblaciones expuestas al virus de la Fiebre Amarilla y a Dengue. A pesar de ello, es posible inferir que los casos de reacciones cruzadas son más factibles mediante detección de IgG anti-dengue y mucho menos frecuentes con la técnica de determinación de IgM anti-dengue (Koraka *et al.*, 2002; Vázquez *et al.*, 2003).

Como era de esperarse en una población con menos años de exposición al DENV, la incidencia de infecciones sintomáticas encontrada en el presente estudio en los individuos menores de 15 años de edad fue mayor que la obtenida en los sujetos ≥15 años. Estos resultados son similares a los reportados en otros estudios de incidencia y seroprevalencia, realizados en la zona amazónica de Perú (Hayes *et al.*, 1996), en Nicaragua (Balmaseda *et al.*, 2006) los cuales coinciden en afirmar que la incidencia es menor a medida que aumenta la edad. Similares resultados han sido encontrados en Vietnam, Asia por Thai *et al.*, 2005 y Phuong *et al.*, 2006. Contrariamente a lo encontrado para las infecciones sintomáticas, las incidencias de las infecciones asintomáticas en ambos grupos de edad fueron bastante similares. La tasas de incidencia para las infecciones sintomáticas y asintomáticas de las personas <15 años fueron menores a las reportadas por Endy *et al.* (2002) en niños de edad escolar en Tailandia. Respecto a los sujetos ≥15 años, las tasas de incidencia observadas en éste estudio fueron similares a las publicadas por Porter en Bandung, Indonesia (Porter *et al.*, 2005).

En el presente estudio se detectó la circulación de los cuatro serotipos de DENV en tres de las localidades investigadas. Esto sugiere que el riesgo de infectarse por cualquiera de los serotipos de DENV, es semejante para los habitantes de estas localidades hiperendémicas de Maracay. Tal como lo argumenta Kuno (1997), es posible que la inmunidad adquirida en las poblaciones que residen en áreas donde ocurren epidemias anuales, con múltiples serotipos circulantes, no sea suficiente como para lograr reducir la transmisión viral.

Además de demostrarse la circulación persistente de los cuatro serotipos del DENV, en

el presente estudio destaca la mayor detección de infecciones por DENV-1 en los individuos <15 años de edad, y por DENV-4 en los sujetos ≥ 15 años. Contrariamente a lo encontrado en este estudio, otras investigaciones revelaron incidencias de infecciones por DENV-1 similares tanto en personas <15 años de edad, como en sujetos ≥ 15 años (Vaughn *et al.*, 2000). En Venezuela y de forma específica en Aragua la población adulta ha estado particularmente expuesta a DENV-1 desde la década de los setenta, siendo el serotipo predominante hasta el año 2001 cuando se presentó la epidemia de DENV-3 y la frecuencia de DENV-1 disminuyó considerablemente para reaparecer en Noviembre de 2003. Este patrón ha determinado que la población infantil haya estado menos expuesta en el pasado y justifica su mayor incidencia en los últimos años y durante la realización de este estudio (Camacho *et al.*, 2009).

Las variaciones en las tasas de incidencia anuales de los casos de dengue están relacionadas con los cambios climáticos estacionales y los brotes epidémicos cíclicos (Chadee *et al.*, 2005; Kuno, 1997; Nagao *et al.*, 2003; WHO, 1997), Contrariamente a lo reportado, en nuestro estudio se encontraron frecuencias similares de casos sospechosos y confirmados de dengue en las dos estaciones climáticas (seca y lluviosa). Aunque no se dispone de índices del vector en el estado Aragua durante la época de sequía, reportes oficiales en el estado vecino de Carabobo reportan su presencia en estos meses del año. Llama la atención que esto ocurre justamente durante la peor y más prolongada epidemia de dengue que se haya registrado en el estado Aragua y Venezuela desde la re-introducción del DENV-3 en el año 2000 (LARDIDEV, datos no publicados).

En conclusión, para este estudio la edad fue probablemente el factor que más contribuyó a la incidencia del dengue en los cuatro barrios investigados. Seguramente, las infecciones asintomáticas contribuyeron a incrementar la transmisión viral en el área de estudio. Las visitas domiciliarias para detectar casos de dengue combinadas con las encuestas serológicas semestrales en personas asintomáticas, probaron ser herramientas útiles para estimar la incidencia real de las infecciones por DENV, en Maracay, Venezuela

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Corporación de Salud del estado Aragua (CORPOSALUD-ARAGUA) por el apoyo prestado a esta investigación tanto en las visitas realizadas a las viviendas de los participantes como en la realización de las pruebas serológicas. También agradecemos el apoyo brindado por el personal directivo y de atención médica en el Hospital Central de Maracay y el Hospital José Carabaño Tosta del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales. De igual manera, agradecemos a las enfermeras y enfermeros que participaron en el estudio por su constancia en las visitas domiciliarias para garantizar un mínimo de tres visitas por cada individuo participante. Finalmente nuestro agradecimiento a las comunidades de Piñonal, la Cooperativa, 23 de Enero y Caña de Azúcar por apoyar la realización de este estudio.

FINANCIAMIENTO

Esta investigación fue financiada por el Instituto de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de Estados Unidos, de Lima, Perú (en inglés, Naval Medical Research Center Detachment), Unidad de Trabajo B032 6000.RAD1.S.B302, protocolo NMRC.D.2005.0007.

EXONERACIÓN DE RESPONSABILIDADES

Los puntos de vista expresados en este artículo son aquellos de los autores y no necesariamente reflejan la política oficial o la posición del Departamento de la Marina, el Departamento de defensa, o el Gobierno de los Estados Unidos.

DECLARACIÓN DE DERECHOS DE AUTORÍA

Tadeusz J. Kochel es militar en servicio (o empleado) del Gobierno de los Estados Unidos. Este trabajo fue preparado como parte de sus deberes oficiales. El Título 17 U.S.C. § 105 establece que “la protección de Derechos de Autoría por este título no es procedente para ningún trabajo del Gobierno de los Estados Unidos”. El título 17 U.S.C. § 101 define como trabajo del Gobierno de los Estados Unidos cualquier trabajo realizado por militares en servicio o empleados del Gobierno de los Estados Unidos como parte de los deberes oficiales de esas personas.

Incidence of symptomatic and asymptomatic dengue virus infections in Maracay, Venezuela: 2006 – 2007

SUMMARY

The incidence rates of symptomatic and asymptomatic dengue virus (DENV) infections in four “barrios” of Maracay, Venezuela, during one-year (October 2006-September 2007) were estimated. A prospective study consisting of house visits three-times a week to detect dengue cases, and semiannual serological surveys to determine probable asymptomatic dengue virus (DENV) infections was conducted. The study subjects belonged to a cohort of 2,663 people ≥ 5 year-old. Confirmatory diagnosis of DENV infections was carried out by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Serological surveys were performed by anti-dengue IgM-capture immunoassay (MAC-ELISA). The results showed that the incidence rates for symptomatic and asymptomatic infections were determined to be 5.7 and 18.6 per 100,000 persons/day (p/d), respectively. The incidence rate of symptomatic infections was significantly higher in persons < 15 year-old than that found in subjects ≥ 15 years (15.8 versus 2.9 per 100,000 p/d). On the other hand, the incidence rates of asymptomatic infections in both age groups were similar (17.3 and 18.9 per 100,000 p/d, respectively). All four DENV serotypes were detected in three of the four “barrios” studied. Finally, age and hyperendemicity were probably the contributing factors to the incidence of dengue in the four “barrios” investigated. Surely, the asymptomatic infections contributed to increase the viral transmission in the study area.

Key Words: Dengue, active surveillance, incidence, IgM.

REFERENCIAS

Balmaseda A., Hammond S., Tellez Y., Imhoff L., Rodríguez Y., Saborío S. *et al.* (2006). High seroprevalence of antibodies against dengue virus in a prospective study of schoolchildren in Managua, Nicaragua. *Trop. Med. Int. Health.* **11**: 935-942.

Barrera R., Delgado N., Jiménez M. & Villalobos I. (2000). Estratificación de una ciudad

hiperendémica en dengue hemorrágico. *Pan. Am. J. Public Health.* **8**: 225-233.

Barrera R., Delgado N., Jiménez M. & Valero S. (2002). Eco-epidemiological factors associated with hyperendemic dengue haemorrhagic fever in Maracay city, Venezuela. *Pan. Am. J. Public Health.* **26**: 84-95.

Camacho D. E., Ferrer E., Rodríguez-Henríquez F., Sierra G., Bosch I., Schmidt D. *et al.* (2009). Genotipificación de virus dengue tipo 1 circulantes en el estado Aragua durante el período 1997 – 2007. *Salus.* **12 (Supl 1)**: 73-87.

Chadee D. D., Willimas F. L. R. & Kitron U. D. (2005). Impact of vector control on a dengue fever outbreak in Trinidad, West Indies, in 1998. *Trop. Med. Int. Health.* **10**: 748-754.

Dean A. G., Dean J. A., Coulombier D., Brendel K. A., Smith D. C., Burton A. H. *et al.* (1996). Epi Info: a word processing, database, and statistics program for public health on IBM compatible microcomputers. 6. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention. Documento en línea: <http://www.cdc.gov/EpiInfo/downloads.htm> (Consultado: 2009, Septiembre 07).

Endy T., Chunsuttiwat S., Nisalak A., Libraty D., Green S., Rothman A. *et al.* (2002). Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: A prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *Am. J. Epidemiol.* **156**: 40-51.

Endy T. P., Nisalak A., Chunsuttiwat S., Libraty D. H., Green S., Rothman A. L. *et al.* (2002). Spatial and temporal circulation of dengue virus serotypes: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *Am. J. Epidemiol.* **156**: 52-59.

Feldman K. (2004). Endemic dengue: surveillance strategy challenges. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **37**: 413-415.

CONAPLAN (Consejo Araguëño de Planificación y Presupuesto) (2001). Anuario 2001. Gobernación del Estado Aragua. 8ª Edición, Maracay, Venezuela.

Gubler D. J. & Clark G. G. (1995) Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The emergence of a global health problem. *Emerg. Infect. Dis.* **1**: 55-57.

- Gubler D. (2002). How effectively is epidemiological surveillance used for dengue programme planning and epidemic response? *Dengue Bull.* **26**: 96-106.
- Guzmán M. G., Kourí G. & Bravo J. R. (1999) La Emergencia de la fiebre hemorrágica en las Américas. Reemergencia del dengue. *Rev. Cubana Med. Trop.* **51**: 5-13.
- Halstead S. (2000) Successes and failures in dengue control - Global Experience. *Dengue Bull.* **24**: 60-70.
- Hayes C., Phillips I., Callahan J., Griebenow W., Hyams K., Wu S. *et al.* (1996). The epidemiology of dengue virus infection among urban, jungle, and rural populations in the Amazon region of Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **55**: 459-463.
- Koraka P., Zeller H., Niedrig M., Osterhaus A. & Groen J. (2002). Reactivity of serum samples from patients with a flavivirus infection measured by immunofluorescence assay and ELISA. *Microbes Infect.* **4**: 1209-1215.
- Kuno G., Gómez I. & Gubler D. J. (1987). Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **36**: 153-159.
- Kuno G. (1997). Factor influencing the transmission of dengue viruses. pp. 61-80 En: *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Eds. Gubler DJ & Kuno G. Wallingford UK: CAB International.
- Lanciotti R. S., Calisher C. H., Gubler D. J., Chang G. J. & Vorndam A. V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 545-551.
- Nagao Y., Thavara U., Chitnumsup P., Apiwat-Tawatsin A., Chansang C. & Campbell-Lendrum D. (2003). Climatic and social risk factors for Aedes infestation in rural Thailand. *Trop. Med. Int. Health.* **8**: 650- 659.
- PAHO (1990). Dengue hemorrhagic fever in Venezuela. *Epidemiol. Bull.* **11**: 7-9.
- PAHO (1997). *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: guidelines for prevention and control*. Scientific publication N° 548. Washington, USA.
- Phuong H., de Vries P., Nga T., Giao P., Hung le Q., Binh T. *et al.* (2006). Dengue as a cause of acute undifferentiated fever in Vietnam. *BMC Infect. Dis.* **6**: 123.
- Porter K. R., Beckett C. G., Kosasih H., Tan R., Alisjahbana B., Rudiman P. I. *et al.* (2005). Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever in a cohort of adults living in Bandung, West Java, Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **72**: 60-66.
- Querales J. (2002). Dengue: causas, características clínicas y prevención. Caracas. **110**: 328-332
- Thai K., Binh T., Giao P., Phuong H., Hung le Q., Van Nam N. *et al.* (2005). Seroprevalence of dengue antibodies, annual incidence and risk factors among children in southern Vietnam. *Trop. Med. Int. Health.* **10**: 379-386.
- Vázquez S., Valdés O., Pupo M., Delgado I., Alvarez M., Pelegrino J. *et al.* (2003). MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies after yellow fever vaccination. *J. Virol. Meth.* **10**: 179-184.
- Vaughn D. W., Green S., Kalayanarooj S., Innis B. L., Nimmannitya S., Suntayakorn S. *et al.* (2000). Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J. Infect. Dis.* **181**: 2-9.
- Vorndam V & Kuno G. (1997). Laboratory diagnosis of dengue virus infections. pp. 313-334. En: *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Eds. Gubler DJ & Kuno, G. CAB International Wallingford, UK.
- WHO (1997a). *Dengue Hemorrhagic Fever: diagnosis, treatment, prevention and control*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO (1997b). *Technical Meeting. Management of Dengue Epidemic*. Documento en línea: <http://www.searo.who.int/en/Section10/Section332/Section519.htm>. (Consultado: 2009, Septiembre 07).

WHO (2006). *Meeting of the WHO Task Force on Clinical Trials of Dengue Vaccines*. Documento en línea: www.who.int/vaccines-documents/ (Consultado: 2009, Septiembre 07).

WHO (2008). *Guidelines for the Clinical Evaluation of Dengue Vaccines in Endemic Areas*. World Health Organization . Documento en línea: www.who.int/vaccines-documents/. (Consultado: 2009, Septiembre 07).

WHO (2002). *DengueNet*. World Health Organization. Documento en línea: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/denguenet/en/index.html/>. (Consultado: 2009, Septiembre 07).

Recibido el 12/09/2009
Aceptado el 13/03/2010

Diversidad enzimática de la fracción soluble de un aislado venezolano de adultos *Paragonimus* sp.

Erika Gómez Martínez^{1*}, Diana Ballén², Marcos Tulio Díaz¹, Zoraida Díaz Bello³, Reinaldo Zavala-Jaspe³, Belkisyolé Alarcón de Noya³, Oscar Noya³ & Italo M. Cesari²

Paragonimus sp. es un trematodo que causa inflamación crónica del pulmón en mamíferos carnívoros y en el hombre, constituyendo un problema de salud pública en países asiáticos y latinoamericanos. Los trematodos poseen enzimas que facilitan la penetración y migración en diferentes hospederos a fin de garantizar su ciclo evolutivo. Con el objetivo de evaluar la diversidad enzimática de la fracción soluble (FSPA, 100.000 g) de un aislado venezolano de adultos de *Paragonimus* sp. se realizaron determinaciones enzimáticas a diferentes pH, usando curvas de calibración (A 405 nm vs. nmol) para interpolar la absorbancia de grupos *p*-nitrofenol o *p*-nitroanilina liberados por la hidrólisis de sustratos sintéticos; se utilizaron también sustratos 2-naftilamídicos y 2-naftólicos para determinar esterasas, peptidasas, fosfomonoesterasas y glicosidasas. Se demostró que fosfohidrolasas, glicosidasas y peptidasas están presentes en la FSPA, destacándose la β -NAG (0,55 μ mol/h/mg, pH 5,5) y la cistein proteasa (0,4 μ mol/h/mg, pH 5,5) como las actividades más elevadas, señalando la importancia funcional de la actividad glicosídica y peptídica en este parásito, las cuales están probablemente relacionadas con su hábitat y su necesidad de degradación de secreciones pulmonares. Estos resultados representan los primeros estudios enzimáticos registrados en vermes adultos de un aislado venezolano de *Paragonimus* sp. obtenidos del reservorio *Didelphis marsupialis*.

Palabras clave: *Paragonimus* sp., enzimas, trematodos, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

La paragonimiasis es un problema de salud pública en países asiáticos y en algunos países de Latinoamérica (Yokogawa, 1965; Alarcón de Noya *et al.*, 1985). Los parásitos migran a través de varios tejidos hospederos hasta alcanzar los pulmones, por lo que igual que la mayoría de los trematodos, *Paragonimus* debe poseer una serie de enzimas necesarias para la invasión, migración y nutrición que lo ayudan a adaptarse y sobrevivir en los diferentes

hábitat hospederos, para cumplir su ciclo y garantizar su persistencia en el tiempo.

Recientes evidencias bioquímicas y proteómicas demuestran que los vermes adultos de *Paragonimus westermani* excretan/secretan proteasas que juegan un papel importante en la nutrición (hemoglobinasas), en la patogénesis de la paragonimiasis y en inmunomodulación de la respuesta del hospedero (Choi *et al.*, 2006; Song & Kim, 1994; Lee *et al.*, 2006); en particular, se describen varias cisteín-proteasas en adultos y distintos estadios de *P. westermani* capaces de hidrolizar sustratos sintéticos tales como CBZ-Phe-Arg-AFC(carboxybenzyl-phenylalanyl-arginyl-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin) a sus respectivos óptimos de pH (Song & Kim, 1994; Na *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006). Muchas enzimas de trematodos son antigénicas y han resultado de gran valor diagnóstico (Ikeda *et al.*, 1996. Alarcón de Noya *et al.*, 1997; Cesari *et al.*, 1992; Pujol *et al.*, 1989).

¹ Laboratorio de Parasitología. Departamento de Biomedicina. Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCA), Universidad de Oriente, Venezuela.

² Unidad de Trematodiasis. Centro de Microbiología y Biología Celular. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela.

³ Laboratorio de Inmunología. Instituto de Medicina Tropical (IMT) Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

*Autor de correspondencia: eri1578@hotmail.com

Las cisteín proteasas de *P. westermanni* son antígenos inmunodominantes (Lee *et al.*, 2006).

Con el objetivo de evaluar la diversidad enzimática de la fracción soluble (FSPA) de un aislado venezolano de adultos de *Paragonimus sp.* se realizaron determinaciones según Dresden & Asch (1972) y Cesari *et al.* (1998, 2000) a diferentes pH, usando curvas de calibración (A 405 nm vs. nmol) para interpolar la absorbancia de los grupos *p*-nitrofenol o *p*-nitroanilina liberados por la hidrólisis de sustratos sintéticos (Cesari, 1974; Cesari *et al.*, 1998; Dresden & Asch, 1972); también se utilizaron sustratos 2-naftilamídicos y 2-naftólicos para determinar esterasas, peptidasas, fosfomonoesterasas y glicosidasas (API ZYM II, API ZYM 2520, BioMerieux, Marcy L'Etoile, Francia) (Cesari *et al.*, 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la fracción soluble (FSPA, 100.000 g) del aislado de vermes adultos de Paragonimus sp.

Los vermes adultos de *Paragonimus sp.* obtenidos de *Didelphis marsupialis* fueron resuspendidos en 50 mM de Tris pH 7,2, a razón de 8 parásitos por cada 3 mL de solución. La preparación fue homogenizada en Potter-Evehjelm a 4°C y ultracentrifugada a 100.000 g por 2 horas a 4°C (ultracentrifuga Beckman modelo L8-M). El sobrenadante (fracción soluble, FSPA) fue dializado contra 50 mM de Tris pH 7,2 durante toda la noche a 4°C (Cesari, 1974; Cesari *et al.*, 1998). Posteriormente, se le realizó la determinación de proteínas por el método de Bradford (1976).

Diversidad enzimática de la fracción soluble (FSPA, 100.000 g)

Para obtener el perfil enzimático de la FSPA de *Paragonimus sp.* se siguió la metodología desarrollada por Dresden & Asch (1972) y Cesari *et al.* (2000). Se realizaron determinaciones enzimáticas a pH ácido y alcalino mediante microensayos en placas MAXISORP (NUNC) fondo plano y un lector de placas SpectraMAX 250 (Molecular Devices). Las actividades enzimáticas detectadas correspondieron a: las fosfomonoesterasas Fosfatasa Ácida (FAc, pH = 5,0) y Fosfatasa Alcalina (FAL, pH = 9,6) utilizando como sustrato *p*-nitrofenil fosfato; las aminopeptidasas Leucín Aminopeptidasa (LAP, pH = 8,0) y L- α -Alanin

Aminopeptidasa (α -AAP, pH = 8,0) utilizando como sustrato L- α -Alanina *p*-nitroanilida; las glicosidasas N-Acetil- β -D-Glucosaminidasa (β -NAG, pH = 5,5) utilizando como sustrato *p*-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida, α -manosidasa (α -MAN, pH = 5,5) utilizando como sustrato *p*-nitrofenil- α -D-manósido y N-Acetil- α -D Glucosaminidasa (α -NAG, pH = 5,5) utilizando como sustrato *p*-nitrofenil- α -D-glucósido; y Cisteín-Proteasa (CP, pH = 5,5) utilizando el sustrato sintético CBZ.Phe-Arg-*p*-nitroanilida en presencia de L-cisteína. Los ensayos se leyeron a 405 nm. Se usaron curvas de calibración para interpolar los valores de absorción de la muestra (A vs. nmol) y calcular las distintas actividades. Se utilizó 1 N NaOH para detener la mayoría de las reacciones realizadas a pH ácido con excepción del ensayo de cisteín-proteasa donde se utilizó ácido acético al 20%. Por el contrario, para todas las reacciones realizadas a pH alcalino se utilizó ácido acético al 20%, con excepción del ensayo de Fosfatasa Alcalina donde la reacción se terminó añadiendo 1 N NaOH. La actividad enzimática fue expresada en términos de μ moles o nmoles de sustrato hidrolizado por 1 hora, definiéndose a la actividad específica como la actividad referida a la concentración de proteínas en la muestra (μ mol/h/mg) (Cesari *et al.*, 1983; 1992; 2000).

Galería enzimática API ZYM

Se utilizó una serie de sustratos sintéticos adsorbidos sobre un soporte sólido en el fondo de pocillos dispuestos sobre tiras de plástico (series API ZYM II y API ZYM 2520, BioMerieux, Marcy L'Étoile, France). La serie API ZYM 2520 contenía un conjunto de sustratos 2-naftólicos (2N) y 2-naftilamídicos (2-NA) para la determinación de esterasas (2N-butilato, 2N-fosfato, 2N-caprilato, 2N-miristato), peptidasas (L-Leucil-2NA, L-Valil-2NA, L-Cistil-2NA, N-Benzoil-DL-Arginine-2NA, N-Glutaryl-Fenilalanina-2NA), fosfohidrolasas (2N-fosfato, Naftol-AS-BI-fosfato), glicosidasas (6-Br-2N- α -D-galactopiranosido, 2N- β -D-galactopiranosido, Naftol-AS-BI- β -D-glucurónido, 2N- α -D-glucopiranosido, 6-Br-2N- β -D-glucopiranosido, 1N-acetil- α -D-glucosaminida, 6-Br-2N- α -D-manopiranosido, 2N- α -L-fucopiranosido). La serie API ZYM II contiene un conjunto de sustratos específicos para la determinación de peptidasas (α -L-Glu-2NA, N-Benzil-L-Leu-2NA, S-Benzil-L-Cys-2NA, D-L-Met-2NA, Gly-Gly-HBr-2NA, Gly-L-Phe-2NA, Gly-L-Pro-2NA, L-Leu-Gly-2NA y L-Ser-L-Tyr-2NA). En cada pocillo se colocó

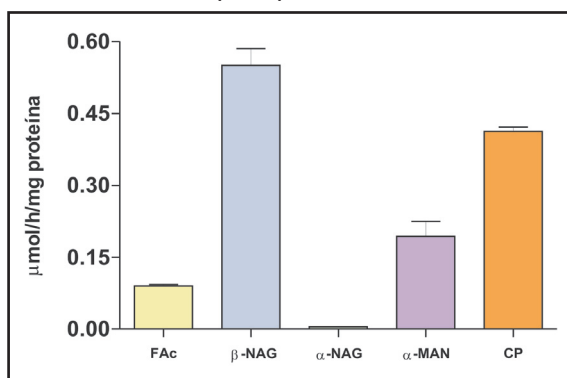
65 μ l de FSPA y las tiras de sustrato se incubaron por 2 horas a 37°C en cámara húmeda. Transcurrido el tiempo se añadieron 35 μ l de reactivo A (2,5 g de Trizma-Base; HCl 37%; 1 g de SDS y 10 ml de agua destilada) y 35 μ l de reactivo B (35 mg de Fast-Blue; 10 ml de 2-metoxietanol). Después de 10 minutos, el sobrenadante de cada pocillo fue transferido a un pocillo correspondiente en una placa de ELISA y se leyó a diferentes longitudes de ondas entre 450 nm y 620 nm según el producto cromogénico liberado (naftilamina o naftol) acomplejados con Fast Blue. Se estableció como unidad de actividad enzimática la cantidad de enzima que produjo, por la hidrólisis del sustrato, una absorción de 0,1 unidades de densidad óptica (DO) a la longitud de onda (nm) utilizada en una hora (U), definiéndose a la actividad específica como la actividad referida a la concentración de proteínas en la muestra (Cesari *et al.*, 2000).

RESULTADOS

Diversidad enzimática de la fracción soluble (FSPA, 100.000 g) de un aislado venezolano de adultos de Paragonimus sp.

Entre las actividades enzimáticas que se detectaron a pH ácido (5,5), la N-acetil- β -D-glucosaminidasa (β -NAG) presentó la actividad específica más alta (0,55 μ mol/h/mg), observándose

Fig. 1. Actividades enzimáticas de la FSPA 100.000 g detectadas a pH ácido (pH 5,5) sobre sustratos sintéticos. FAc: Fosfatasa Ácida; β -NAG: N-Acetil- β -D-Glucosaminidasa; α -NAG: N-Acetil- α -D-Glucosaminidasa; α -MAN: α -manosidasa; CP: Cisteín-Proteasa. Se realizaron dos experimentos independientes por cada actividad enzimática; en la figura se muestra los resultados de un experimento realizado por triplicado y reportado como media \pm DE ($n = 3$).



para la Cisteín-Proteasa (CP) y la α -manosidasa (α -MAN) actividades específicas de 0,41 y 0,19 μ mol/h/mg respectivamente, seguida por la fosfatasa ácida (FAc) (0,09 μ mol/h/mg) (Fig. 1). La N-acetil- α -D-glucosaminidasa (α -NAG) a pH 5,5 fue insignificante.

A pH alcalino, se midió la actividad Elastasa (pH 10) la cual presentó valores muy bajos (0,0012 μ mol/h/mg) y la actividad α -Alanin Aminopeptidasa (α -AAP, pH 8,0; 0,03 μ mol/h/mg). Se midieron también las actividades Leucín Aminopeptidasa (LAP, pH 8,0) y Fosfatasa Alcalina (FAL, pH 9,6), las cuales mostraron valores de 0,015 y 0,014 μ mol/h/mg, respectivamente (Fig. 2). Las actividades alcalinas fueron menos activas que las ácidas (Fig. 1, 2).

Sustratos API ZYM II

La incubación de la FSPA con los derivados 2-naftilamídicos (2NA) de varios amino ácidos y dipéptidos de la serie API ZYM II permitió la detección de hidrólisis sobre L-seril-tirosina (735 U/mg) y glicil-prolina (1305 U/mg). Los otros sustratos no fueron hidrolizados significativamente (Fig. 3).

Sustratos API ZYM 2520

La utilización de esta serie permitió corroborar algunos de los resultados obtenidos en los ensayos

Fig. 2. Actividades enzimáticas en la FS 100.000 g detectadas a pH alcalino. FAL: Fosfatasa Alcalina; α -L-AAP: α -Alanina Aminopeptidasa; LAP: Leucín Aminopeptidasa; Elastasa. Se realizaron dos experimentos independientes por cada actividad enzimática; en la figura se muestra los resultados de un experimento realizado por triplicado y reportado como media \pm DE ($n = 3$).

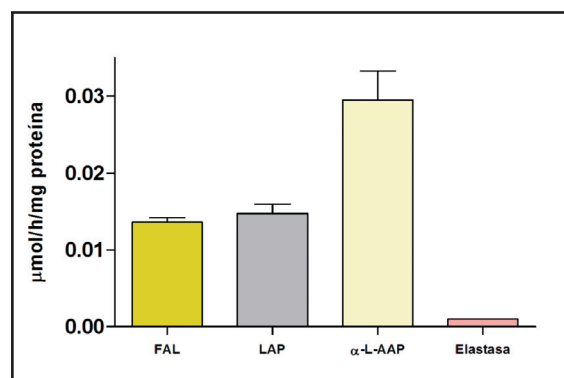
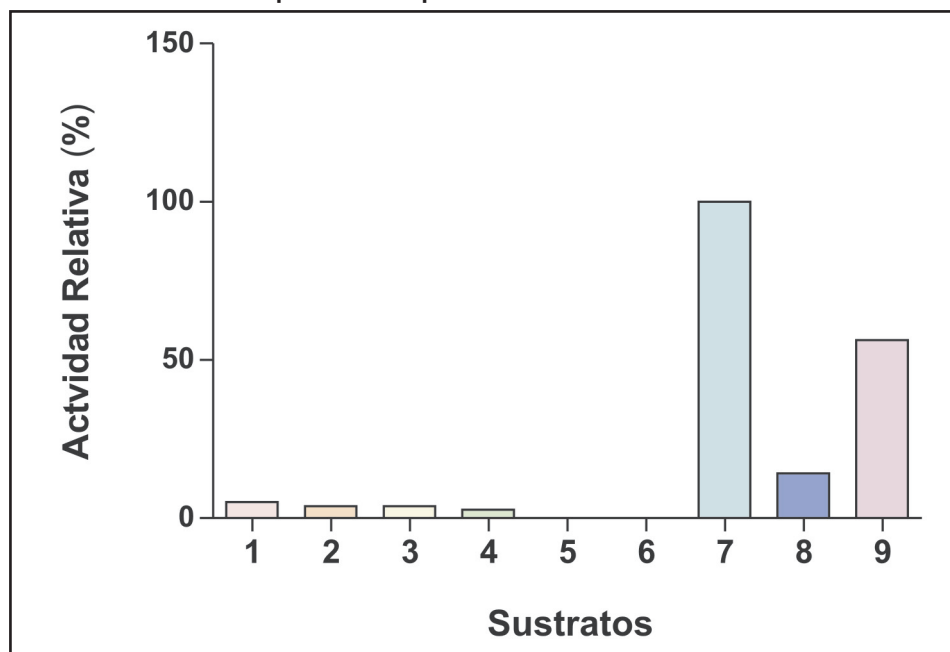


Fig. 3. Actividad enzimática de la FSPA 100.000 g sobre sustratos 2-Naftilamídicos (2-NA) EN API ZYM II. (1) γ -L-Glutaminil-2-NA (piroglutamasa); (2) N-Benzoil-L-Leucil-2-NA (quimiotripsina); (3) S-Benzil-L-Cistil-2-NA (Cistil Endopeptidasa); (4) D-L-Metionil-2-NA (Metionil Aminopeptidasa; (5) Glicil-Glicil-2-NA (glicil-glicina dipeptidasa); (6) Glicil-L-Fenilalanil-2-NA (Glicil-Fenilalanina dipeptidasa); (7) Glicil-L-Protil-2-NA (Glicil Prolina dipeptidasa); (8) L-Leucil-Glicil-2-NA (Leucil Glicina dipetidasa); (9) L-Seril-L-Tirosil-2-NA (Seril Tirosina dipeptidase). Se realizaron dos experimentos independientes por cada serie de sustratos enzimáticos, una serie de sustratos fue incubada sin fracción enzimática como control; en la figura se muestra los resultados de un experimento representativo.



realizados con los sustratos sintéticos *p*-nitrofenilados o *p*-nitroanilidas (Fig. 1, 2, 4). Las actividades hidrolíticas más elevadas a pH ácido fueron: N-Acetil- β -D-Glucosaminidasa (1625 U/mg), Fosfatasa Ácida (980 U/mg) y Naftol-AS-BI-Fosfohidrolasa (885 U/mg); luego, la Leucil Arilamidasa (355 U/mg) y la β -Galactosidasa (215 U/mg) (Fig. 1). Otras actividades detectadas en esta galería fueron: C8-Lipasa (170 U/mg) y Fosfatasa Alcalina (125 U/mg), seguidas por Cistina-Arilamidasa (115 U/mg) y α -Manosidasa (105 U/mg). No se detectó actividad α -Galactosidasa, β -Glucosidasa, Valina-Arilamidasa y α -Fucosidasa (Fig. 4).

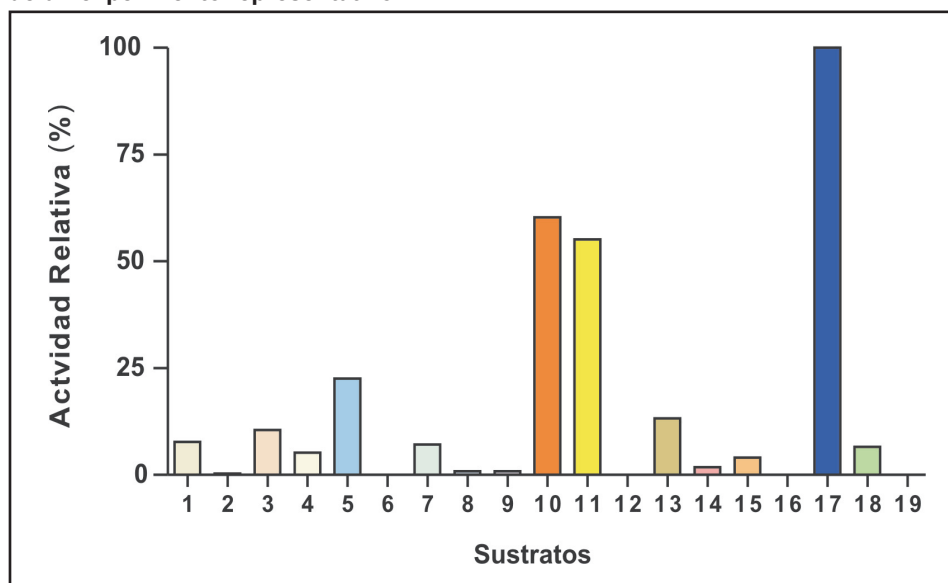
DISCUSIÓN

La importancia de las enzimas en el metabolismo de adaptación de los helmintos está bien establecida (Dresden & Deelder, 1979; Chapman &

Mitchell, 1982; Hotez *et al.*, 1985). Las actividades proteolíticas han sido estudiadas en extractos crudos o en productos de excreción/secreción liberados in vitro de estadios larvales y parásitos adultos de trematodos utilizando sustratos no específicos de proteasas como Azocoll, y sustratos específicos como elastina, fibrina y péptidos sintéticos derivatizados con aminometilcoumarina (Barret, 1980). Cornejo *et al.*, (1994) reportaron la presencia de enzimas proteolíticas liberadas por adultos de *Paragonimus mexicanus*. En Venezuela, ningún estudio se ha realizado sobre las enzimas de especies similares; por ende se decidió evaluar la diversidad enzimática general en la fracción soluble (FSPA) de *Paragonimus sp.*, en la cual se hallaron varias glicosidasas, fosfatasa y peptidasas.

En el presente estudio y bajo las condiciones experimentales descritas, la actividad más relevante que se observó en FSPA fue la glicosidasa N-acetil-

Fig. 4. actividad enzimática de la FSPA 100.000 g sobre sustratos 2-Naftil (2-N) y 2-Naftilamidicos (2-NA) ENAPI ZYM 2520. (1) 2N-fosfato pH 8,0 (Fosfatasa Alcalina); (2) 2N-butirato (C4 Esterasa); (3) 2N-caprilato (C8 Lipasa); (4) 2N- miristato (C14 Lipasa); (5) L-Leu-2-NA (Leucín Aminopeptidasa); (6) L-Val-2-NA (Valil Aminopeptidasa); (7) L-Cys-2-NA (Cisteín Aminopeptidasa); (8) N-benzoil-DL-Arg-2NA (endopeptidasa tipo tripsina); (9) N-glutaril-L-Phe-2NA (endopeptidasa tipo quimiotripsina); (10) 2N-fosfato pH 5,2 (Fosfatasa Ácida); (11) Naftol-AS-BI-fosfato pH 5,2 (Naftol Fosfohidrolasa); (12) 2N- α -D-Gal (α -Galactosidasa); (13) 2N- β -D-Gal (β -Galactosidasa); (14) Naftol-AS-BI- β -D-glucurónido (β -D-Glucuronidasa); (15) 2N- α -D-Glc (α -Glucosidasa); (16) 2N- β -D-Glc (β -Glucosidasa); (17) 1N-Acetil- β -D-Glucosaminida; (18) 2N- α -D-Man (α -Manosidasa); (19) 2N- α -L-Fuc (α -Fucosidasa). Se realizaron dos experimentos independientes por cada serie de sustratos enzimáticos, una serie de sustratos fue incubada sin fracción enzimática como control; en la figura se muestra los resultados de un experimento representativo.



β -D-glucosaminidasa (β -NAG, pH 5,5); esta actividad fue detectada tanto con el sustrato *p*-nitrofenil- β -D-N-acetilglucosaminida (Fig. 1) como con 1-naftil- β -D-N-acetilglucosaminida de la serie API ZYM 1250 (Fig. 4). La β -NAG actúa hidrolizando oligosacáridos donde está involucrada la β -D-N-acetilglucosamina, residuo azucarado que forma parte de muchos polímeros estructurales, entre los que se incluye la mucina (Lehninger & Cox, 1995). A diferencia de β -NAG, no se observó actividad α -N-acetilglucosaminidasa (Fig. 1). En localización intracelular, la β -NAG es una enzima lisosomal; su presencia en las células del túbulo proximal renal contribuye significativamente en la degradación de mucopolisacáridos y glicoproteínas (García *et al.*, 2001). Su alta actividad en FSPA sugiere que los vermes adultos de *Paragonimus* sp. degradan glicoconjugados con cadenas oligosacáridicas unidas por enlace tipo-N (mucinas), en concordancia con los

resultados de Fujino *et al.* (1983) quienes reportaron que las β -glucosaminidasas de jóvenes y adultos de *Paragonimus ohirai* y de *P. westermanni* son muy activas en la degradación y/o en la modulación de glicoconjugados de origen parasitario o hospedero. En otras especies, los estudios realizados con productos de excreción-secreción de *F. hepatica* han sugerido que las β -glucosaminidasas cumplen una función en la degradación de la mucina (Irwin *et al.*, 2004). Otras glicosidasas con actividad relevante fueron la α -Manosidasa y la β -Galactosidasa (Fig. 1, 4). La presencia de estas tres actividades glicosidasas en FSPA (100.000 g) es interesante por cuanto que en *P. ohirai* y *P. westermanni* están involucradas en la degradación secuencial de las mucinas (Fujino *et al.*, 1983) otorgándole por consiguiente al *Paragonimus* sp. esta capacidad. En su estadio adulto en el pulmón, *Paragonimus* entra en contacto con el moco bronquial

y probablemente degrada la mucina presente en este fluido biológico. Otros sustratos para glicosidasas no fueron hidrolizados (no hubo detección significativa de α - o β -Glucosidasa, β -Glucuronidasa, α -Fucosidasa) (Fig. 1, 4), sugiriendo baja actividad de las enzimas correspondientes o que sencillamente no se expresan en los vermes adultos. Fujino *et al.*, 1983 asociaron a las β -Glucuronidasas sólo con vermes juveniles mientras que las β -Galactosidasas se localizaron tanto en vermes jóvenes como en adultos.

En el ámbito de las proteasas, se observó una fuerte actividad Cisteín Proteasa (CP) (Fig. 1). En *Paragonimus sp.* se han descrito varias cisteín proteasas en metacercarias, vermes adultos y huevos. En metacercarias de *P. westermani*, se han descrito tiol proteasas que juegan un papel crucial en el desenquistamiento de las larvas, en la penetración de los tejidos, en la evasión de la helmintoxicidad por eosinófilos y en la inflamación (Yamakami *et al.*, 1995; Chung *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 2001; Sajid & McKerrow, 2002). En los productos de excreción/secreción (ES) de estas formas parasitarias, originados en la vejiga secretoria, se han caracterizado una CP de 27-kDa y otra de 28-kDa; la de 27-kDa induce la desgranulación de eosinófilos humanos con secreción de una neurotoxina (EDN) y el anión superóxido, mientras que la de 28-kDa facilita la migración de las metacercarias en los tejidos; la desgranulación de los eosinófilos es un evento clave para la eliminación de los helmintos y la inducción de inflamación en el sitio de infección (Chung *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2005; Na *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2008). Estas CP disminuyen dramáticamente durante la maduración en el hospedador definitivo, fenómeno este quizás relacionado con la disminución de la actividad de penetración y migración de la metacercaria dentro del hospedador definitivo (Chung *et al.*, 1997). Park *et al.* (2001) caracterizaron en *P. westermani* una CP similar a la catepsina F de *S. mansoni* localizada principalmente en las glándulas vitelogénicas de los vermes adultos, sugiriendo un posible rol en la producción de huevos de este parásito. Choi *et al.* (2006) caracterizaron una CP con alta homología a la hemoglobinasas de *F. hepatica* y de *S. mansoni* que se expresa en el epitelio intestinal de los vermes adultos de *P. westermani*, sugiriendo una función digestiva sobre la hemoglobina hospedera. En los productos de excreción/secreción (ES) de vermes adultos de *P. mexicanus* se describieron varias bandas en geles de SDS-PAGE con actividad proteolítica tiol-dependiente

activas a pH 4,5 (Cornejo *et al.* 1994). Una CP de 24-kDa presente en adultos de *P. westermani* (PwCP2) fue clonada y sobreexpresada en *E. coli* para ser utilizada en ensayos de diagnóstico; antisueros contra esta CP reconocieron esta proteasa tanto en ES como en extractos solubles de adultos de *P. westermani* (Yang *et al.*, 2004), lo cual sería concordante con la alta actividad CP detectada en nuestros extractos solubles de vermes adultos ya que una parte de los productos de ES del parásito son igualmente integrantes de la FSPA (Yang *et al.*, 2004). El análisis proteómico de productos ES en adultos de *P. westermani* han informado sobre la existencia de 16 CP en estos productos (Lee *et al.*, 2006). En extractos crudos de huevos inmaduros de *P. westermani* se observó alta actividad CP asociada con una banda de 35-kDa que no está presente en metacercarias ni adultos y cuya función no se conoce aún (Kang *et al.*, 1995). Se necesitan estudios ulteriores para conocer la diversidad (isoformas) y las funciones de la actividad CP detectada en el presente estudio.

Una enzima que pertenece al grupo de seril endopeptidasas y que juega un papel importante en ciertas relaciones hospedero-parásito es la elastasa. Esta actividad fue medida usando el sustrato N-succinil-Ala-Ala-Phe-Leu-p-nitroanilida; se detectaron valores muy bajos de actividad (Fig. 2), concordando este resultado con análisis previos los cuales sugieren que la expresión de las elastasas es estadio-específico; por ejemplo, en *S. mansoni* está presente solo en el estadio larval y está relacionada con la degradación de macromoléculas presentes en la piel tales como queratina, laminina, colágeno tipo IV, fibronectina y elastina, y seguramente le sirve al parásito durante la penetración por la piel del hospedero (Pierrot *et al.*, 1996). La elastasa de *S. mansoni*, al ser excretada, estimula el sistema inmunológico del hospedero, encontrándose en el suero de pacientes infectados con esquistosomiasis anticuerpos anti-elatasa (Pierrot *et al.*, 1996), un claro ejemplo de la importancia que tienen los antígenos enzimáticos y su posible aplicación al inmunodiagnóstico (Pujol *et al.*, 1989, Pierrot *et al.*, 1996, Alarcón de Noya *et al.*, 1997, Cesari *et al.*, 1998). No se detectó actividad endopeptidasa sobre sustratos generalmente hidrolizados por serín proteasas (tripsina, quimiotripsina) (Fig. 2, 4).

La actividad exopeptidasa (aminopeptidasas, dipeptidasas) fue significativa en FSPA (Fig. 3, 4). En FSPA, la actividad dipeptidasa fue más elevada que la actividad aminopeptidasa. Los sustratos mayormente

hidrolizados fueron: Gly-Pro-2-NA > Ser-Tyr-2-NA > Leu-Gly-2-NA (Fig. 3). Las N-aminopeptidasas podrían jugar un papel tanto en la fase final de la degradación de di- u oligopéptidos derivados de la digestión de proteínas, como en otros aspectos de la interacción hospedero-parásito. Los sustratos para aminopeptidasas mayormente hidrolizados fueron: p-nitrofenil- α -L-alanina > p-nitrofenil- α -L-leucina (pH 8,0). La α -AAP está generalmente asociada con la absorción de aminoácidos; libera preferencialmente alanina y aminoácidos secuencialmente de la porción N-terminal de péptidos (Lehninger & Cox, 1995). La leucin arilamidasa (detectada también con el sustrato L-leucil-2-naftilamida a pH 7,0) presentó valores medianos de actividad enzimática en la FSPA (Fig. 2, 4). En diferentes especies del género *Schistosoma* la LAP ha sido relacionada con la absorción de nutrientes por la superficie de su tegumento (Cesari *et al.*, 1983). Song *et al.*, (2008) sugieren que en *P. westermani*, la Leucin Aminopeptidasa está presente tanto en el parásito adulto como en la metacercaria y cumple funciones intracelulares relacionadas con el catabolismo final de la hemoglobina, difundiendo pequeños péptidos desde el epitelio intestinal del parásito e hidrolizándolos en aminoácidos libres, igualmente sugieren que esta enzima pudiera tener roles adicionales en la biología de *Paragonimus*.

En cuanto a la actividad fosfohidrolasa, la fosfatasa alcalina dio valores bajos (Fig. 2, 4). Fujino *et al.* (1989) describieron actividad FAL en vermes adultos de *Paragonimus* colectados tanto de perros como de ratas; mientras que la actividad FAc se observó en vermes extraídos de perros pero no de ratas, excepto en gránulos lisosomales del tegumento. La actividad FAc fue más importante que la alcalina y dio resultados positivos tanto con el sustrato p-nitrofenil fosfato como con 2-naftol fosfato en la serie API ZYM. La FAc cataliza la misma reacción que la FAL pero en el intervalo de pH 4,3-6,0 y está ampliamente distribuida en diferentes organismos; es considerada como un marcador lisosomal (Lehninger *et al.*, 1995). La hidrólisis del sustrato naftol-AS-BI-fosfato fue llevada a cabo probablemente por una isoforma de la fosfatasa ácida. La presencia de fosfatasa en vermes adultos de *Paragonimus* sp. reportada en este trabajo (Fig. 2) concuerda con lo descrito en vermes adultos de *P. westermani* cuando se encuentran en un hospedero definitivo como el perro (Fujino *et al.*, 1989). En *S. mansoni*, la FAc se observa en los espacios extracelulares de las invaginaciones del tegumento

de los vermes adultos (Cesari *et al.*, 1981). Entre las diversas funciones del tegumento en los trematodos está absorber y transportar moléculas de origen hospedero; las fosfatasa participan en estos procesos de absorción de nutrientes y están generalmente presente en sitios de intercambio con el ambiente, relacionadas con la introducción y el transporte de carbohidratos al ambiente interno del parásito (Cesari, 1974).

Los resultados obtenidos con los derivados p-nitrofenilados y p-nitronilida de diferentes sustratos enzimáticos en los diferentes ensayos in vitro utilizados para cada enzima fueron en general corroborados en las series enzimáticas de tipo API ZYM. Los resultados descritos en el presente trabajo representan los primeros estudios enzimáticos que se registran en adultos de *Paragonimus* sp. obtenidos en Venezuela de un reservorio silvestre como *Didelphis*. Futuros estudios permitirán profundizar los presentes hallazgos, así como también realizar comparaciones de dichas determinaciones tanto en diferentes preparaciones del parásito como en extractos de excreción-secreción y preparados de huevos, además de la purificación de cada una de ellas, su definición antigénica y su posible aplicación en técnicas de inmunodiagnóstico.

Enzymatic diversity of enzymes in the soluble fraction of adult worms from a Venezuelan isolate of *Paragonimus* sp.

SUMMARY

Paragonimus sp. is a trematode that causes chronic inflammation of the lung in carnivorous mammals and humans, which constitute a public health problem in Asian and Latin American countries. Trematodes have enzymes that facilitate their penetration and migration through different host organs to ensure their life cycle. To evaluate the enzymatic diversity of the soluble fraction (FSPA, 100,000 g) of a Venezuelan isolate of *Paragonimus* sp. adult worms, several enzyme determinations were conducted at different pH. The activities of enzymes releasing p-nitrophenol or p-nitroanilina from the corresponding dye-related synthetic peptides were assessed by interpolating absorbance (A 405 nm) values in the corresponding calibration curve (A 405 nm vs. nmol); on the other hand, absorbances

of 2-naphtylamine and 2-naphtols released from another series of synthetic substrates were read at different wavelengths between 450 nm and 620 nm to assess for the activity of the corresponding hydrolases. Phosphohydrolase, glycosidase and peptidase activities were detected in FSPA, β -N-acetyl- β -D-glucosaminidase (0.55 μ mol/h/mg, pH 5.5) and cystein protease (0.4 μ mol/h/mg, pH 5.5) being higher than all the other detected activities. These activities are probably related to the adult worm habitat and its need for glycan and peptide degradation of lung secretions. These results represent the first enzymatic study done with a Venezuelan isolate of adult *Paragonimus sp.* worms collected from the common reservoir *Didelphis marsupialis*.

Key words: *Paragonimus sp.*, enzymatic activity, trematodes, Venezuela.

REFERENCIAS

- Alarcón de Noya B., Noya O., Torres J. & Botto C. (1985). A field study of Paragonimiasis in Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**: 766-769.
- Alarcón de Noya B., Cesari I., Losada S., Colmenares C., Balzán C., Hoebeke J. *et al.* (1997). Evaluation of alkaline phosphatase immunoassay and comparison with other diagnostic methods in areas of low transmission of schistosomiasis. *Acta Trop.* **66**: 69-78.
- Barret A. J. (1980). Fluorometric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates. *Biochem. J.* **187**: 909-912.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.* **72**: 248-252.
- Cesari I. M. (1974). *Schistosoma mansoni*: distribution and characteristics of alkaline and acid phosphatase. *Exp. Parasitol.* **36**: 405-414.
- Cesari I. M., Simpson A. J. & Evans W. H. (1981). Properties of a series of tegumental membrane-bound phosphohydrolase activities of *Schistosoma mansoni*. *Biochem. J.* **198**: 467-73.
- Cesari I. M., Auriault C. & Capron A. (1983). Aminopeptidase activity in adult *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* **69**: 280-284.
- Cesari I. M., Bouty I., Bout D., De Noya B. & Hoebeke J. (1992). Parasites enzymes as tool to investigate immune response. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **87**: 55-65.
- Cesari I. M., Ferrer A., Kombila M., Pichard E., Decam E., Li-Shu Q., *et al.* (1998). Specificity of the solid phase alkaline phosphatase immunocapture assay for the diagnosis of human *Schistosoma mansoni* infection. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92**: 38-39.
- Cesari I. M., Ballen D., Perrone T., Oriol O., Hoebeke J. & Bout D. (2000). Enzyme activities in *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen. *J. Parasitol.* **86**: 1137-1140.
- Chapman C. & Mitchell C. (1982). Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* **11**: 165-178.
- Choi J-H., Lee J-H., Yu H-S., Jeong H-J., Kim J., Hong Y. C., *et al.* (2006). Molecular and biochemical characterization of hemoglobinase, a cysteine proteinase in *Paragonimus westermani*. *Korean J. Parasitol.* **44**: 187-196.
- Chung Y. B., Yang H. J., Kang S. Y., Kong Y. & Cho S. Y. (1997). Activities of different cysteine proteases of *Paragonimus westermani* in cleaving human IgG. *Korean J. Parasitol.* **35**: 139-142.
- Chung Y-B., Kita H. & Shin M-H. (2008). A 27 kDa cysteine protease secreted by newly excysted *Paragonimus westermani* metacercariae induces superoxide anion production and degranulation of human eosinophils. *Korean J. Parasitol.* **46**: 95-99.
- Cornejo W., Tantalean M. & Huiza A. (1994). Enzimas proteolíticas liberadas in vitro por adultos de *Paragonimus mexicanus*. *Rev. Per. Med. Trop.* **8**: 57-61.
- Dresden M. & Asch H. (1972). Proteolytic enzymes in extracts of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Biochem. Biophys. Acta.* **289**: 378-384.

- Dresden M. & Deelder A. (1979). *Schistosoma mansoni*: thiol proteinase properties of adult worm hemoglobinase. *Exp. Parasitol.* **48**: 190-197.
- Fujino T., Fukuda K., Hamajima F. & Ishii Y. (1989). Studies on host specificity in *P. westermani*: II Histochemical and cytochemical characterization of metacercariae and worms from rats and dogs. *J. Helminthol.* **63**: 315-327.
- Fujino T., Higo H. & Ishii Y. (1983). Histochemical studies of glycosidase activity in juveniles and adults of the lung *Paragonimus*. *Parasitol.* **86**: 119-126.
- García V., Yanes L. & Callejon A. (2001). Disfunción tubular proximal renal en la diabetes mellitus insulino dependiente. *Nefrol.* **3**: 32-37.
- Hotez P., Trang N., McKerrow J. & Cerami A. (1985). Isolation characterization of a proteolytic enzyme from the adult hookworm *Ancylostoma caninum*. *J. Biol. Chem.* **260**: 7343-7348.
- Ikeda T., Oikawa Y. & Nishiyama T. (1996). Enzyme-linked immunosorbent assay using cysteine proteinase antigens for immunodiagnosis of human paragonimiasis. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.* **55**: 434-437.
- Irwin J., Monrrisey P., Walshe A., O'Neill S., Carrington S., Mattheus E., et al. (2004). Glycosidase activity in the excretory-secretory products of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitol.* **129**: 465-472.
- Kang S. Y., Cho M. S., Chung Y. B., Kong Y. & Cho S. Y. (1995). A cysteine protease of *Paragonimus westermani* eggs. *Korean J. Parasitol.* **33**: 323-330.
- Lee E. G., Na B. K., Bae Y. A., Kim S. H., Je E. Y., Ju J. W., et al. (2006). Identification of immunodominant excretory-secretory cysteine proteases of adult *Paragonimus westermani* by proteome analysis. *Proteomics.* **6**: 1290-1300.
- Lehninger N. & Cox. (1995). *Principios de Bioquímica*. 2da edición. Ed. Omega, Barcelona, España.
- Na B. K., Kim S. H., Lee E. G., Kim T. S., Bae Y. A., Kang I. et al. (2006). Critical roles for excretory-secretory cysteine proteases during tissue invasion of *Paragonimus westermani* newly excysted metacercariae. *Cell Microbiol.* **8**: 1034-1046.
- Park H., Hong K., Sakanary J., Choi J., Park S., Kim K., et al. (2001). *Paragonimus westermani*: cloning of a cathepsin F-like cysteine proteinase from the adult worm. *Exp. Parasitol.* **98**: 223-227.
- Pierrot C., Godin C., Liu J., Capron A. & Khalife J. (1996). *Schistosoma mansoni* elastase: an immune target regulated during the parasite life cycle. *Parasitol.* **113**: 519-26.
- Pujol F., Alarcón de Noya B. & Cesari I. (1989). Immunodiagnosis of *Schistosomiasis mansoni* with APIA (alkaline phosphatase immunoassay). *Immunol. Invest.* **18**: 1071-1080.
- Sajid M. & McKerrow J. (2002). Cysteine proteases in parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* **120**: 1-21.
- Shin M. H., Kita H., Park H. Y. & Seoh J. Y. (2001). Cysteine protease secreted by *Paragonimus westermani* attenuates effector functions of human eosinophils stimulated with immunoglobulin G. *Infection and Immunity.* **69**: 1599-1604.
- Shin M. H., Chung Y. B. & Kita H. (2005). Degranulation of human eosinophils induced by *Paragonimus westermani*-secreted protease. *Korean J. Parasitol.* **43**: 33-37.
- Song C. & Kim T. (1994). Characterization of a cysteine proteinase from adult worms of *Paragonimus westermani*. *Korean J. Parasitol.* **32**: 231-241.
- Song S-M., Park J., Kim J., Kim, S. Hong Y., Kong H. & Chung, D. (2008). Identification and characterization of *Paragonimus westermani* leucine aminopeptidase. *Parasitol. Int.* **57**: 334-341.
- Yang H., Chung Y., Kang S., Kong Y. & Cho S. (2002). Excretory bladder: the source of cysteine proteases in *Paragonimus westermani* metacercariae. *Korean J. Parasitol.* **40**: 89-92.
- Yang S. H., Park J. O., Lee J. H., Jeon B. H., Kim W. S., Kim S. I., et al. (2004). Cloning and

characterization of a new cysteine proteinase secreted by *Paragonimus westermani* adult worms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **71**: 87-92.

Yamakami K, Hamajima F, Akao S. & Tadakuma T. (1995). Purification and characterization of acid cysteine protease from metacercariae of the

mammalian trematode parasite *Paragonimus westermani*. *Eur. J. Biochem.* **233**: 490-497.

Yokogawa M. (1965). *Paragonimus* and paragonimiasis. *Adv. Parasitol.* **3**: 99-158.

Recibido el 23/11/2009
Aceptado el 10/04/2010

Infección por *Trypanosoma cruzi* y polimorfismo del Citocromo B del ADN mitocondrial en *Triatoma maculata* de Anzoátegui y Portuguesa, Venezuela **Nilsa González-Brítez¹, Antonio Morocoima², Clara Martínez¹ & Hernán J. Carrasco^{1*}**

Con el fin de entender la dinámica poblacional de *Triatoma maculata*, se analizó el polimorfismo genético y los índices de infección con *Trypanosoma cruzi*, utilizando triatominos provenientes de ecotopos y regiones geográficas diferentes. El índice de infección parasitaria para *T. maculata*, fue de 29.8% a través de la observación directa al microscopio y 40.3% utilizando el método de reacción en cadena de la polimerasa. Los niveles de infección encontrados incrementan la importancia de *T. maculata* como vector involucrado en el ciclo de transmisión de *T. cruzi*. El análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de una región del gen Cyt B, permitió establecer en forma preliminar, diferencias en los patrones de bandas de este gen, según el origen geográfico de cada población. Esto puede asociarse a cambios relacionados con procesos adaptativos involucrados en la colonización de nuevos hábitats. No se observó variación genética para vectores capturados en diferentes ecotopos de una misma localidad. Sin embargo es evidente la participación del vector en el ciclo de transmisión, mostrando que la presencia de *T. maculata* en las casas no puede ser ignorada.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, *Triatoma maculata*, RFLP-PCR, citocromo b.

INTRODUCCIÓN

Los triatominos son insectos hematófagos que pertenecen al orden Hemiptera, familia Reduviidae y subfamilia Triatominae, comprendiendo un grupo de 138 especies (Galvão *et al.*, 2003; Costa & Felix, 2007). Los vectores primarios tienen hábitos intradomiciliarios y son los principales transmisores del *Trypanosoma cruzi*, parásito causante de la Tripanosomosis Americana, una de las más importantes enfermedades metaxénicas, cuya prevención se basa principalmente en el control vectorial, por lo cual es necesario conocer profundamente las características de estos insectos. Existen otros triatominos que demuestran tendencias sinantrópicas relacionadas con su distribución, potencial de colonización y su comprobada

capacidad vectorial, por lo cual han sido considerados como vectores de menor importancia en la transmisión del parásito, tal como *Panstrongylus megistus*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma maculata* y otros.

Una especie originalmente silvestre, adaptada al peridomicilio que habita palmas y árboles secos asociados con aves, roedores y marsupiales, es *Triatoma maculata* (Erichson, 1848), la cual exhibe importancia epidemiológica cuando se encuentra naturalmente infectada con *T. cruzi* y presenta características de colonización de viviendas humanas (Torrealba *et al.*, 1985; Lent & Wygodzinsky, 1979; Luitgards-Moura *et al.*, 2005). Esta especie ha sido descrita en Brasil, Venezuela, Colombia, Surinam, Guyana Francesa y algunas islas del Caribe (Carcavallo *et al.*, 2000). En Venezuela, aunque *Rhodnius prolixus* es el vector responsable de la transmisión doméstica, *T. maculata* es considerada una especie ornitófaga asociada a gallinas y palomas del peridomicilio, y aunque no se conoce mucho de su capacidad vectorial, esta contribuye con la transmisión del parásito (Pifano, 1969; 1973) y la misma ha sido asociada con frecuentes procesos de

¹ Instituto de Medicina Tropical (IMT), "Dr Felix Pifano" Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela.

² Centro de Medicina Tropical de Oriente, Universidad de Oriente (UDO) Núcleo de Anzoátegui, Barcelona, estado Anzoátegui, Venezuela.

*Autor de correspondencia: herman.carrasco@ucv.ve

domiciliación (Cortes & Suárez, 2005; Feliciangeli *et al.*, 2003; Luitgards-Moura *et al.*, 2005), pero sigue siendo difícil evaluar su papel en la transmisión, debido a que presentan índices de infección inferiores a los registrados para el vector primario. Basados en la escasa información epidemiológica de los vectores secundarios en las áreas endémicas del Venezuela, es importante realizar un estudio de las poblaciones de *T. maculata*, que involucren indicadores de infección y variabilidad poblacional, siendo esto último de gran importancia ya que pudiera estar asociado a cambios en el patrón de comportamiento del vector. Tomando en cuenta estos antecedentes, y con el fin de brindar información epidemiológica en algunas áreas de ocurrencia de *T. maculata*, se utilizó el método de amplificación del ADN del kinetoplasto (k-DNA), para detectar la presencia del parásito en los triatomíneos, así como la Reacción en Cadena del ADN Polimerasa seguido del Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) para determinar el polimorfismo intraespecífico del gen citocromo b entre poblaciones provenientes de diferentes regiones geográficas.

Esta información es esencial para el diseño de estrategias de control del vector, ya que, aunque secundario, es pertinente el conocimiento de sus potencialidades como transmisor del parásito, así como para el monitoreo del proceso de colonización domiciliar por *T. maculata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Los ejemplares fueron colectados en diferentes ecotopos de los caseríos rurales: “El Eneal” (10° 07' 00" N, 064° 36' 00" O) y “Pica de Neveri” (10° 06' 00" N, 064° 37' 00" O) del estado Anzoátegui, “Jabillal” (09° 42' 51" N, 069° 18' 41" O) y “Las Panelas” (08° 58' 47" N, 069° 58' 26" O) del estado Portuguesa (Fig. 1).

El estado Anzoátegui está caracterizado por bosques tropicales de altitud media, temperatura de 28 a 30°C y periodos muy marcados de lluvias (Benítez, 2004). En varios caseríos al norte del estado se ha determinado el incremento en los índices de infección con *T. cruzi* e infestación con *T. maculata* dentro de las viviendas (Gamboa, 1962; Morocoima, 2008 Com pers).

El estado Portuguesa está compuesto por bosques húmedos y relieves montañosos al pie de

los Andes venezolanos y la temperatura media es de 25°C. La infestación peridomiciliar con *T. maculata* se encuentra localizada principalmente en áreas bajas (Benítez, 2006).

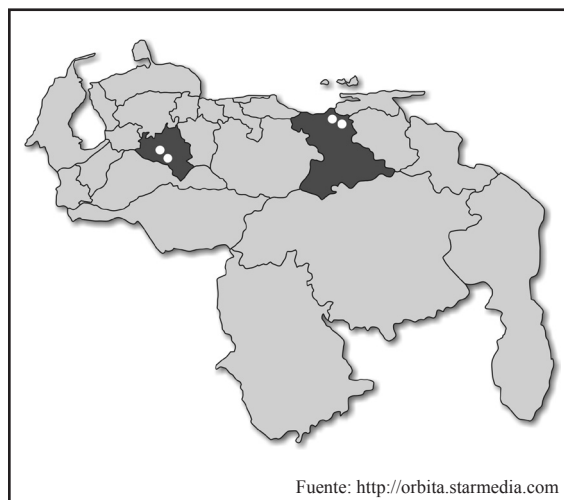
En los caseríos estudiados, la mayoría de las viviendas están construidas con madera, cemento o bahareque y techos de palma o zinc. El peridomicilio está compuesto por refugios de animales domésticos, gallineros y otros anexos, así como por la presencia de palmas alrededor de los ranchos (más abundante en Anzoátegui), que reúnen las condiciones óptimas y constituyen un importante albergue para los insectos.

Material biológico

La búsqueda activa de insectos se realizó con ayuda del personal de Malariología y el tiempo de búsqueda por vivienda fue de 45 minutos aproximadamente. Se analizaron para ambas regiones un total de 120 biotopos, entre los que se incluyeron 82 viviendas y 38 ambientes extra-domésticos (gallineros, nidos de aves, palmeras y cúmulos de madera), seleccionados al azar por medio del muestreo aleatorio simple (Spiegel & Stephens, 2001).

Los triatomíneos silvestres se colectaron luego de la disección de las palmas y a través de la colocación de trampas en árboles y palmeras que se encontraban

Fig. 1. Área de Estudio: Zona de colecta de triatomíneos en los estados de Portuguesa y Anzoátegui. Los puntos blancos indican la ubicación de los caseríos seleccionados en ambos estados.



en la proximidad de las casas (máximo 300 metros) (Noireau *et al.*, 1999). Se capturaron 124 *T. maculata* (74 adultos y 50 ninfas), clasificados de acuerdo con la clave de Lent & Wygotzinsky (1979). Estos insectos fueron codificados según sexo, ecotopo y estado, de los cuales 72 insectos provenían de Anzoátegui (23 del peridomicilio, 22 del domicilio y 27 silvestres), y 52 de Portuguesa. (36 del peridomicilio y 16 silvestres). Para el análisis parasitológico, las heces frescas se obtuvieron por presión abdominal.

Diagnóstico parasitológico de Infección por Trypanosoma cruzi

Observación directa al microscopio (ODM): Fue examinado el total de triatominos capturados utilizando la muestra fecal diluida en solución salina al 0,85% para luego realizar la búsqueda de tripanosomas activos según el método de Brener modificado (Brener, 1962). Posteriormente se calcularon los índices de infección natural de *T. maculata* presente en las comunidades.

Aislamiento y amplificación por PCR de la región variable de los minicírculos del ADN del kinetoplasto (k-DNA) de T. cruzi

La extracción de ADN del parásito se realizó del resto sanguíneo del promesenterón de cada insecto siguiendo el protocolo Wizard® (Genomic DNA Purification, Promega). La amplificación del k-DNA del parásito, se realizó en 20 µL de volumen final de reactivos de PCR y 100 ng ADN blanco, utilizando los iniciadores S35 (5'- AAA TAA TGT ACG GG (T/G) GAG ATG CAT GA-3') y S36 (5'- GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT-3') (Sturm *et al.*, 1989). El control negativo consistió en la amplificación del ADN extraído a partir de heces de triatominos sanos criados en el laboratorio. Los productos del PCR fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %, en buffer TBE 1X (45mM Tris-borato, EDTA 1mM). Los geles fueron visualizados en un transluminador UV a través del programa de captura de imágenes KODAK DC 120.

Aislamiento, amplificación y digestión de un fragmento del gen citocromo b (cyt-b) de T. maculata

Una muestra representada por el 35 % de la población total (41 insectos de ambas regiones) fue sometida a la extracción de ADN a partir de las patas,

las cuales fueron previamente lavadas con buffer PBS (Phosphated Buffered Saline) para evitar contaminación y posteriormente fueron crio fracturadas en nitrógeno líquido según el método reportado por García *et al.*, (1998). Con el pellet obtenido se realizó el protocolo de extracción del Wizard® (Genomic DNA Purification Kit, Promega) y el producto final fue resuspendido en 40 µL de solución de rehidratación (Miller *et al.*, 1988).

Para la amplificación del fragmento del gen mitocondrial citocromo b y su posterior digestión enzimática fueron utilizados 20 triatominos de Portuguesa (13 de peridomicilio y 7 silvestres) y 21 de Anzoátegui (7 de peridomicilio, 8 silvestres y 6 de domicilio). La mezcla de reacción se realizó en 25 µL de volumen final que contenía 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,6), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1,0 U. de enzima ADN Taq Polimerasa (BIOTAQ™ DNA Polymerase, Bionline), 10 pmol de los cebadores Cytb-32F y Cytb-82R (Monteiro *et al.*, 2000) y 50 ng de ADN genómico. La amplificación del gen se realizó bajo las siguientes condiciones, desnaturalización a 95°C por 5 minutos, seguida de 95°C por 1 minuto, 60°C por 50 segundos, 72°C por 45 segundos (35 ciclos), con extensión final a 72°C por 5 minutos. El control negativo incluyó todos los componentes con excepción del ADN molde. El producto de PCR fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio y una alícuota del mismo fue digerida durante toda la noche a 37°C, con 5 U de endonucleasa de restricción de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las enzimas utilizadas fueron *AluI*, *BamHI*, *HhaI*, *PstI*, *NotI*, *HindIII* y *SalI* (BioLabs Inc., New England y Promega Corp. USA), seleccionadas acorde al análisis de restricción sobre secuencias del mismo gen en otras especies que fueron tomadas del Gen Bank.

Los perfiles de restricción fueron visualizados en agarosa 2,5 % y digitalizados en el software Quantity One de BIORAD. La interpretación del patrón de bandas se realizó a través de la estimación del tamaño de pares de bases de los fragmentos amplificados comparados con la escalera de 200 pb (Hyperladder™ I de BIOLINE) disponible en el laboratorio.

RESULTADOS

Diagnóstico parasitológico de Infección por T. cruzi

En la Tabla I se resume el número de triatominos capturados por caseríos y ecotopos de

Tabla I. Número de *T. maculata* adultos (A) y ninfas (N) capturados según ecotopos y caseríos del estado Anzoátegui y Portuguesa.

Estados	Caseríos	Ecotopos					
		Domicilio (D)		Peridomicilio(PD)		Silvestre (S)	
		A	N (%)	A	N (%)	A	N (%)
Anzoátegui	Pica de Neveri	8	6 (43,7%)	5	5 (31,2 %)	5	3 (25 %)
	El Eneal	8	0 (20 %)	8	5 (32,5 %)	13	6 (47,5 %)
Portuguesa	Las Panelas	0	0 (0 %)	12	8 (71,4 %)	7	1 (28,5 %)
	Jabillal	0	0 (0%)	6	10 (66,6 %)	2	6 (33,3 %)
*Sub total Infestación		22/124 (17,7%)		59/124 (47,5%)		43/124 (34,6%)	
**Sub total Colonización		6/50 (12%)		28/50 (56%)		16/50 (32%)	

* Sub total de infestación: número y porcentaje de *T. maculata* adultos y ninfas capturados en cada ecotopo.

** Sub total de colonización: número y porcentaje de ninfas de *T. maculata* capturadas en cada ecotopo.

Tabla II. Detección de *T. cruzi* en *T. maculata* utilizando los métodos de Observación Directa al Microscopio (ODM) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Caseríos	Tamaño de Muestra	ODM	PCR	Infección/Estado	
				ODM	PCR
Las Panelas (Portuguesa)	28	6 (21,4%)	11 (39,2%)	15,3 %	30,7%
Jabillal (Portuguesa)	24	2 (8,33%)	5 (20,8%)		
Pica de Neveri (Anzoátegui)	32	14 (43,7%)	15 (46,8%)	40,2%	47,2%
El Eneal (Anzoátegui)	40	15 (37,5%)	19 (47,5%)		
Total	124	37 (29,8%)	50 (40,3%)		

acuerdo a la región de la cual provienen, así como los índices de infestación y colonización por cada ecotopo. Para el análisis por ODM y PCR, se utilizó el 100 % de los ejemplares y se observó la mayor sensibilidad del PCR, obteniéndose para Anzoátegui 29/72 individuos positivos por microscopia y 34/72 positivos por PCR. Para el estado Portuguesa se obtuvieron 8/52 positivos por observación directa y 16/52 positivos por PCR (Tabla II). El método de amplificación por PCR evidenció la presencia del fragmento de 330pb, correspondiente a la región variable de los minicírculos del kinetoplasto de *T. cruzi*, según Sturm *et al.* (1989) (Fig. 2).

Reacción en Cadena del ADN Polimerasa -Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP)

Con la amplificación del gen Cyt-b se obtuvo un producto de aproximadamente 580 bp (Fig. 3), el cual fue digerido con las enzimas de restricción ya mencionadas: Las enzimas *HhaI* y *PstI* no mostraron

diferencias en los fragmentos generados para los individuos provenientes de los dos estados, mostrando un único sitio de restricción. La Fig. 4 corresponde a la digestión con la enzima *AhaI*, que generó fragmentos diferentes según el origen geográfico de los triatomos. Para los individuos de Portuguesa, se generaron dos fragmentos de restricción; de 430 y 150 bp aproximadamente, mientras que para las poblaciones de Anzoátegui se observaron varios fragmentos de digestión parcial y al menos tres fragmentos de restricción bien definidos de aproximadamente 350bp, 150bp y 80bp. Las enzimas restantes no exhibieron sitios de restricción en ninguna de las poblaciones estudiadas (foto no mostrada).

DISCUSIÓN

La frecuencia de infección encontrada por el método parasitológico directo, sugiere que el riesgo que *T. maculata* podría representar en la transmisión de la

Fig. 2. Amplificación del fragmento de 330 pb de kDNA de *T. cruzi* mediante PCR en deyecciones de *T. maculata* provenientes del estado Anzoátegui y Portuguesa. Carriles: 3, 4, 5 y 6 Anzoátegui. Carriles 1, 2, 7, 8, 9, 10 Portuguesa. Carril 11: Control positivo (cepa TcI). Carril 12: Control negativo. PM: 100 pb (Promega).

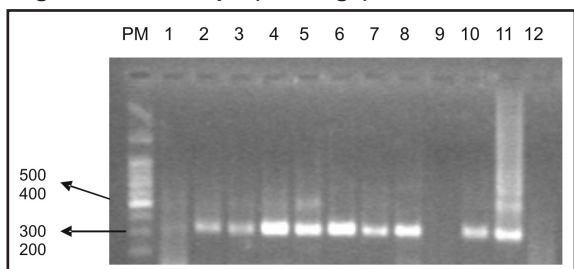
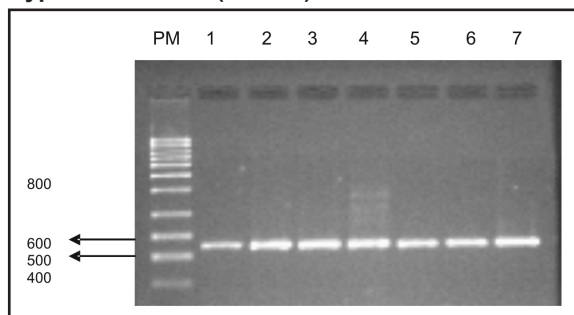
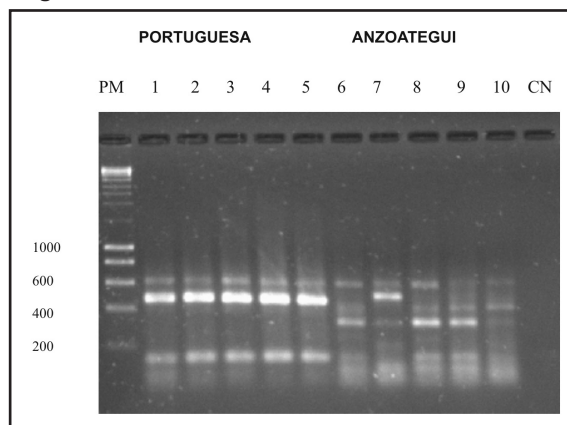


Fig. 3. Producto de amplificación de aproximadamente 580 bp del gen Cyt-b, obtenido con *T. maculata*. Carriles 1, 2: Triatomo de peridomicilio de El Eneal y Pica de Neveri. Carriles 3, 4: Triatomo de domicilio de El Eneal y Pica de Neveri. Carriles 5, 6: Triatomo de peridomicilio de Jabillal y Las Panelas. Carril 7: Triatomo silvestre de Las Panelas. PM: escalera de 100 pb, HyperLadder™ IV (Bioline).



Tripanosomosis puede estar subestimado, sin embargo con la amplificación del k-DNA del parásito, utilizando ADN de las deyecciones de triatomos, se logró mejor aproximación de los índices reales de infección con *T. cruzi* (Brito *et al.*, 2001; Guevara *et al.*, 2005; Zalloum *et al.*, 2005). Los niveles de infección subestimados muestran limitado potencial de transmisión para *T. maculata*, hecho que podría no ser real en estos caseríos, principalmente cuando se les compara con los índices de infección obtenidos (5,8 a 20%) para *R. prolixus* (Benítez, 2006). A pesar de esto, el papel del *T. maculata* en la transmisión de la Tripanosomosis en Venezuela, es difícil de evaluar, debido a la escasa información sobre la especie, habiéndose reportado en la década del 70, índices de infestación entre 0,8% y 4,5% (Gamboa &

Fig. 4. Perfil de PCR-RFLP del gen Cyt-b de adultos de *T. maculata*, generado con la enzima AluI. PM: escalera de 200 pb, HyperLadder™ I (Bioline). Carriles: 1-5 triatomos de Portuguesa (1, 2 y 3.PD, 4 y 5 S). Carril 6-10: triatomos de Anzoátegui (6 y 7 S, 8 y 9.PD y 10 D). CN: Control negativo.



Pérez-Ríos, 1965; Tonn *et al.*, 1978). Posteriormente en el 2003, Alvarez *et al.*, (2003) reportaron que la infección de *T. maculata* con *T. cruzi* varió entre 0,78 % y 13,2 %, y datos más recientes dieron índices de infección de 0.36% para tres especies de vectores, incluido *T. maculata* (Rojas *et al.*, 2008). Ambos estudios fueron para los estados Lara y Yaracuy. Por otra parte, en algunas áreas rurales colombianas asociadas a la presencia de *T. maculata*, se registraron índices de infestación del 20% e infección de 58,3%, así como casos seropositivos en niños menores de 9 años (Cortes & Suárez, 2005). En nuestro trabajo, los triatomos presentaron índices de infección por ODM, de 15,3% y 40,2% y por PCR de 30,7 % y 47,2% para Portuguesa y Anzoátegui respectivamente, lo que podría involucrar a esta especie como un vector eficiente en la transmisión del parásito.

Aunque son escasos los estudios realizados en el estado Anzoátegui, se han registrado casos seropositivos para la enfermedad de Chagas con riesgo de transmisión activa (Añez *et al.*, 2003). Sin embargo la mayor infección vectorial observada podría atribuirse a la simpatría con *R. prolixus* y a la presencia de *Didelphis marsupialis* (principal reservorio de *T. cruzi*) en los ecotopos silvestres, los cuales, en algunos casos se encuentran a menos de 300 metros del peridomicilio, que aunado a la tala y quema de bosques de la zona, ha facilitado la migración y colonización de viviendas por

T. maculata (Morocoima *et al.*, 2005). Esta característica coincide con el caserío Pica de Neverí, debido a que en el mismo fueron encontradas ninfas intradomiciliares (6/50), aunque el hallazgo se observó en solo tres viviendas, esto se explicaría por la colonización peridomiciliar (principalmente gallineros) favorecida por la presencia de animales que actúan como fuente de alimento; e incluso por el desorden peridomiciliar que incrementaría su infestación en detrimento del domicilio, como ya lo afirmaron otros autores (de Andrade *et al.*, 1995). La menor infección hallada en los caseríos de Portuguesa, podría ser explicada por la mayor densidad de *R. prolixus*, que por ser vector primario tiene la capacidad de desplazar a los de menor importancia epidemiológica y mantenerlos en su biotopo original, donde su fuente principal de alimento son las aves, las cuales son refractarias al parásito.

Por otra parte, el PCR-RFLP es una prueba alternativa para la diferenciación entre poblaciones de vectores, la cual es importante para orientar el control y contribuir al señalamiento de tendencias de la transmisión natural. Los haplotipos diferentes en las dos poblaciones de *T. maculata* obtenido con la enzima *Alu* I, muestra la utilidad del gen citocromo b como marcador de polimorfismo intraespecífico y el perfil de restricción obtenido sugiere que las poblaciones naturales retienen algunos índices de variabilidad genética, probablemente como indicador de estructura poblacional en la distribución de haplotipos del gen amplificado. Es decir, que la variación observada en la longitud de los fragmentos de restricción con *Alu* I infiere en forma preliminar, la existencia de alelos diferentes para ambas poblaciones, afirmación basada también en otros resultados hallados en el análisis de secuencias del mismo gen (datos no publicados). Aun así, los autores consideran que se requiere profundizar el estudio con genes menos conservados. Por otro lado, cuando se consideran las poblaciones de una misma localidad, es difícil establecer afirmaciones concluyentes sobre el polimorfismo genético, debido al hallazgo de variaciones propias del individuo, afectado por factores ambientales o fuentes alimenticias, como parece observarse en un ejemplar adulto (Fig. 4, carril 7) proveniente de una palma silvestre que ha mostrado perfil distinto a otros insectos del mismo biotopo. Por otra parte, debido al reducido número de ejemplares utilizado por ecotopo (± 8 ejemplares/ecotopo) en este tipo de análisis, no es posible concluir acerca de características genéticas específicas. Sin embargo, apoyados en otros resultados obtenidos con morfometría

geométrica, se sugiere la similaridad morfológica entre individuos de diferentes ecotopos correspondientes a una misma localidad (datos no mostrados).

De esta manera, aunque el polimorfismo se observó con una única enzima, el elevado índice de infección natural nos lleva a pensar en la ocurrencia de cambios en el comportamiento y la dinámica adaptativa de *T. maculata*, principalmente en Anzoátegui, lo que incrementaría su relación con la transmisión del parásito. Estos cambios son ayudados por las acciones antropogénicas (deforestación, caza) que impactan el hábitat natural y por ende su fuente de alimento, por lo cual los insectos son presionados a migrar y buscar microambientes similares a su hábitat natural, hecho que podría conducir a la domiciliación de los vectores (Wolff & Castillo, 2002). En el estado Anzoátegui, la proximidad de los biotopos silvestres a las viviendas favorecen el desplazamiento de los vectores y esto les permite establecerse exitosamente como nuevo eslabón de los focos domiciliarios (Noireau *et al.*, 1999). La movilidad de los insectos entre hábitats adyacentes nos lleva a pensar en la mayor facilidad de colonización vectorial, acorde a un estudio obtenido por Sánchez-Martin *et al.*, (2006), donde reportaron que las palmeras infestadas dentro de los 100 metros de la vivienda representa un factor de riesgo importante para la colonización domiciliar, aunado al elevado índice de infección natural que mantiene la infección humana en las comunidades.

Debido a ésto es importante la vigilancia epidemiológica para los vectores secundarios que buscan ocupar el espacio dejado por el vector domiciliario; con el fin de asegurar que estas especies no se conviertan en un severo problema de salud pública. Para ello es necesario, incrementar las medidas de control a través de la capacitación activa de la comunidad, así como disminuir la colonización triatomínica en áreas suburbanas, de manera que este control sea sostenible en el tiempo.

Por último, señalamos que el análisis del k-DNA puede representar un método sencillo y práctico para el diagnóstico durante el monitoreo epidemiológico de la enfermedad de Chagas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado por los autores con el apoyo financiero del FONACIT a través del proyecto de

grupo G-2005000827. Agradecemos también la ayuda brindada por los técnicos David Chique y Marlene Rodríguez, a la dirección de Malariología, Acarigua, estado Portuguesa y finalmente a los habitantes de las localidades estudiadas por su cordial receptividad y colaboración.

***Trypanosoma cruzi* infection and cytochrome b polymorphism of mitochondrial dna in *Triatoma maculata* of Anzoátegui and Portuguesa states, Venezuela.**

SUMMARY

In order to understand more about the populational dynamics of *Triatoma maculata*, the genetic polymorphism and the infection indexes of *Trypanosoma cruzi* were analysed, using triatomine obtained from different ecotopes and geographical regions. The parasitic infection index of *T. maculata* was 29.8% using the microscope direct observation, and 40.3% by the polymerase chain reaction method. Both methods were important for epidemiological screening of the vectors with low potential of infection. The amplification of one region the Cyt B gene of these organisms, followed by a restriction fragments length polymorphism analysis, allowed us to establish different patterns of bands according to the geographic origin of each population, which indicates the lack of migration between individuals of Portuguesa and Anzoátegui states. These genetic differences may be associated with changes in adaptative events involved in the colonization of new habitats. The lack of polymorphism among vectors collected in different habitats of the same region showed an important genetic flow which has epidemiological implications in the risk of transmission of the disease, showing that the presence of *T. maculata* in houses cannot be ignored.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, *Triatoma maculata*, RFLP-PCR, cytochrome b.

REFERENCIAS

Alvarez C., Gil A., Bonfante R., Superlano Y., Aldana E. & Rodríguez-Bonfante C. (2003). *Movimiento de los Vectores de la Enfermedad de Chagas en municipios de Lara y Yaracuy*. Documento en Línea: <http://www.ucla.edu.ve/dmedicin/postgrado/CCT-UCLA.htm> (Consultado: 2009, Mayo 21).

Añez N., Crisante G., Rojas A., Díaz N., Añez-Rojas N., Carrasco H., *et al.* (2003). La cara oculta de la enfermedad de Chagas en Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **43**: 45-57.

Benítez J. (2004). *Aspectos Básicos de la Enfermedad de Chagas*. Manual del Educador. Dirección de Salud Ambiental. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Maracay. Venezuela.

Benítez J. (2006). *Programa Nacional de Control de Chagas*. Informe Situación 2006. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Caracas. Venezuela.

Brener Z. (1962). Therapeutic activity and criterion of cure of mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* **4**: 389-396.

Brito C., Silveira C., Cardoso M., Marques P., Luqueti A., Macedo V., *et al.* (2001). Parasite Persistence in treated Chagasic patients revealed by Xenodiagnosis and Polimerase Chain Reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **96**: 823-6

Carcavallo R., Jurberg J., Lent H., Noireau F. & Galvao C. (2000). Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomol. Vect.* **7**: 1-99.

Cortés L. & Suárez H. (2005). Triatominos (Reduviidae: Triatominae) en un foco de enfermedad de Chagas en Talaigua Nuevo (Bolívar, Colombia). *Biomédica.* **25**: 568-74

Costa J. & Felix M. (2007). *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **102**: 87-90.

de Andrade A., Zicker F., de Oliveira R., Da Silva I., Silva S., Sgambatti S., *et al.* (1995). Evaluation of risk factors for house infestation by *Triatoma infestans* in Brazil. *A. J. Trop. Med. Hyg.* **53**: 443-447.

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.
- Galvão C., Carcavallo R., Rocha D. & Jurberg J. (2003). A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa.* **202**: 1-36.
- Gamboa J. (1962). Dispersión de *Rhodnius prolixus* en Venezuela. *Bol. Inf. Dir. Malariol. San. Amb.* **3**: 262-272.
- Gamboa J. & Pérez Ríos L. (1965). El "rancho" venezolano: Su Influencia en la Prevalencia Triatomina Doméstica. *Bol. Inf. Dir. Mal. San. Amb.* **5**: 129-140.
- García A., Carrasco H., Schofield C., Stothard J., Frame I., Valente S., et al. (1998). Random Amplification of Polymorphic DNA as a Tool for Taxonomic Studies of Triatomine Bugs (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* **35**: 38-45.
- Guevara A., Garzon E., Bowen C., Cordova X., Gomez E. & Ouassi E. (2005). High infection rates of *Triatoma dimidiata* are associated with low level of *T. cruzi* seroprevalence in Pedro Carvo, Ecuador. Use of a tc24 gene- based PCR approach. *Parasite.* **12**: 65-68.
- Lent H. & Wygodzinsky P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull. Am. Mus Nat. Hist.* **163**: 123-520.
- Luitgards-Moura J., Borges-Pereira J., Costa J., Zauza P. & Rosa-Freitas M. (2005). On the possibility of autochthonous Chagas disease in Roraima, Amazon region, Brazil, 2000-2001. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **4**: 45-54.
- Miller S., Dykes D. & Polesky H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids. Res.* **16**: 1215-1217.
- Monteiro F., Wesson D., Dotson E., Schofield C. & Beard B. (2000). Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **62**: 460-465.
- Morocoima A., Sotillo E., Salaverría C., Maniscalchi M., Pacheco F. & Chique D. (2005). Domiciliación del vector peridomiciliario de la enfermedad de Chagas, *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) en caserío rural del norte del estado Anzoátegui. *Acta Cient. Venezolana.* **55 (Suppl. 1)**: 215.
- Noireau F., Zegarra M., Ordoñez Y., Gutierrez T. & Dujardin J. P. (1999). Genetic Structure of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) Domestic Populations from Bolivia: Application on Control Interventions. *Mem. Inst. Osw. Cruz.* **94**: 347-351.
- Pifano F. (1969). *Algunos aspectos en la ecología y epidemiología de las enfermedades endémicas con focos naturales en el área tropical, especialmente en Venezuela.* Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. Ed. Caracas. Venezuela.
- Pifano F. (1973). La epidemiología de la enfermedad de Chagas en Venezuela. *Arch. Venez. Med. Trop. Parasitol. Med.* **5**: 171-84.
- Rojas M., Várquez P., Villarreal M., Velandia C., Vergara L., Moran Borges L., et al. (2008). An entomological and seroepidemiological study of Chagas disease in an area in central-western Venezuela infested with *Triatoma maculata* (Erichson, 1848). *Cad. Saúde Pública.* **24**: 2323-2333.
- Sánchez- Martin M., Feliciangeli M. D. & Campbell D., Davis C. (2006) Could the Chagas disease elimination program in Venezuela be compromised by reinvasion of houses of houses by sylvatic *Rhodnius prolixus* bug populations?. *Trop. Med. Int. Health.* **11**: 1585-1593.
- Spiegel M. & Stephens L. (2001). *Estadística.* 2da. Edición. Ed. McGraw Hill Interamericana. Ciudad de Méjico. Méjico.
- Sturm N., Degraeve W. & Morel C. & Simpson L. (1989). Sensitive Detection and Schizodeme

- classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* **3**: 205-214.
- Tonn R., Otero M., Mora E., Espinola H. & Carcavallo R. (1978). Aspectos biológicos, ecológicos y distribución geográfica de *Triatoma maculata* (Erichson 1848), (Hemiptera, Reduviidae), en Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **18**: 16-24.
- Torrealba J., Tonn R. & Carcavallo R. (1985). Parásitos, Reservorios, Control, Situación Regional. p 465-72. En: *Factores Biológicos y Ecológicos en la Enfermedad de Chagas*, Carcavallo R., Rabinovich J., Tonn R. (eds), Tomo II. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. OMS, Ministerio de Salud y Acción Social. Buenos Aires, Argentina.
- Wolff M. & Castillo D. (2002). Domiciliation trend of *Panstrongylus rufotuberculatus* in Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **97**: 297-300.
- Zalloum L., Gomez M., Kinoshita A., Toledo M., Priori A. & De Araujo S. (2005). *Trypanosoma cruzi*. Two genetic group in Parana state, Southern Brazil. *Exp Parasitology.* **111**: 55-58.

Recibido el 01/09/2009
Aceptado el 21/02/2010

Caracterización ecológica de los anofelinos y otros culícidos en territorio indígena del Bajo Caura, Estado Bolívar, Venezuela

Yasmin Rubio-Palis^{1,2*}, Jorge E. Moreno³, Mariapia Bevilacqua⁴, Domingo Medina⁴, Ángela Martínez⁵, Lya Cardenas⁴, Hernán Guzmán³ & Julio González¹

Se reporta por primera vez una lista de especies de anofelinos y culicinos presentes en el territorio indígena del Bajo Caura, estado Bolívar. Entre larvas y adultos se colectaron en total ocho especies de anofelinos pertenecientes a los subgéneros *Anopheles* Meigen, *Lophopodomomyia* Antunes, *Stethomyia* Theobald, *Nyssorhynchus* Blanchard del género *Anopheles* Meigen y *Chagasia bathana* Dyar y 10 géneros de culicinos entre los cuales se identificaron siete especies. Se identificaron y caracterizaron los criaderos con base a la hidrología en arroyo, caño, manantial, laguna, pantano y charco. En colectas de estadíos inmaduros la especie más abundante fue *Anopheles triannulatus* (Neiva & Pinto), mientras que en colectas de adultos con cebos humanos y trampas CDC la especie más abundante fue el vector de malaria *An. darlingi* Root. Las trampas de luz ultravioleta resultaron ineficientes para capturar anofelinos y culicinos. Se reporta por primera vez para el estado Bolívar los géneros *Coquillettidia* Dyar y *Johnbelkinia* Zavortink, así como las especies *Aedes (Ochlerotatus) fulvus* (Wiedemann) y *Ae. (Och.) serratus* (Theobald).

Palabras clave: *Anopheles* spp, culicinos, criaderos, malaria, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

El estado Bolívar es el principal foco de malaria en Venezuela, reportando entre el año 2000 y 2008 un total de 173.843 casos (MPPS, 2000-2008). El municipio Sucre, ocupa el tercer lugar en casuística de malaria (9,2%) en el estado Bolívar y para 2008 culminó el año en situación de epidemia (ISP, 2008). A pesar de la importancia epidemiológica de este municipio, son pocos los estudios publicados sobre vectores, los cuales se refieren a trabajos realizados en la parte baja de la cuenca del río Caura en el área

habitada principalmente por criollos (Osborn *et al.*, 2004; Rubio-Palis, 1995; Rubio-Palis *et al.*, 1997), desconociéndose totalmente la fauna de anofelinos en el territorio indígena. El presente trabajo constituye el primer reporte sobre Culicidae del territorio indígena de las etnias Ye'kwana y Sanema, el cual abarca parte del bajo, el medio y alto río Caura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La descripción eco-epidemiológica del área de estudio ha sido previamente publicada (Bevilacqua *et al.*, 2009). Durante el mes de octubre de 2005, correspondiente al periodo de lluvias en la región, se realizaron colectas de mosquitos en cuatro localidades: Boca de Ninchare (Wunküyadiña) (06° 34'N, 64° 49'W), Surapire (Kadajiyuña) (06° 28'N, 64° 45'W), El Playón (02° 59'N, 61° 12'W) e Iikutú (Sukutuu) (05° 55'N, 64° 51'W) (Fig. 1). Las dos primeras están habitadas por indígenas de la etnia Ye'kwana, El Playón es un campamento turístico

¹ Laboratorio de Ecología de Vectores, Dirección de Salud Ambiental, Ministerio del Poder Popular para la Salud. Maracay, Venezuela.

² BIOMED, Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela.

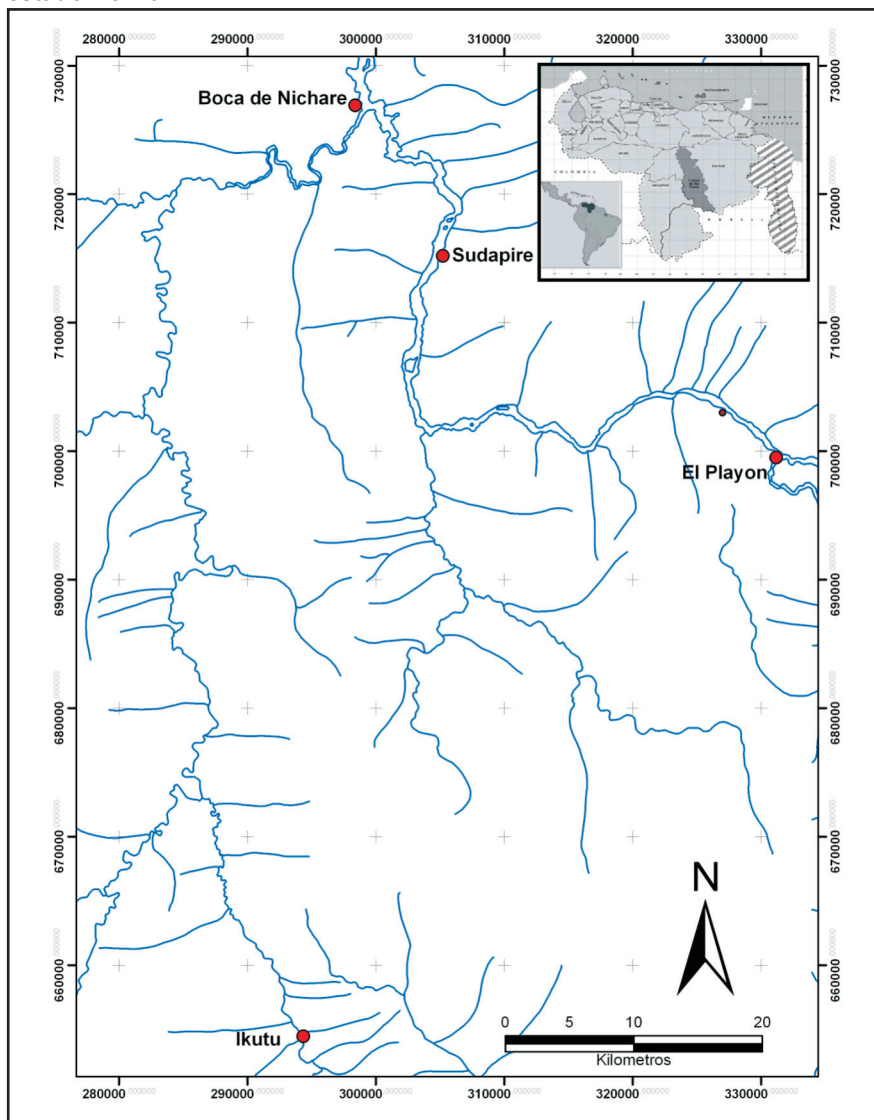
³ Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnaldo Gabaldon", Centro de Investigaciones de Campo "Dr. Francesco Vitanza", Tumeremo, estado Bolívar, Venezuela.

⁴ Asociación Venezolana para la Conservación de Áreas Naturales (ACOANA), Caracas, Venezuela

⁵ Instituto de Salud Pública del estado Bolívar, Ciudad Bolívar, Venezuela

*Autor de correspondencia: rubiopalis@gmail.com

Fig. 1. Ubicación relativa del área de estudio, Bajo Caura, municipio Sucre, estado Bolívar.



administrado por indígenas Ye'kwana y la localidad de Ikutú está habitada por indígenas Sanema. Estas localidades fueron seleccionadas de mutuo acuerdo con la Organización Indígena de la cuenca del Caura “Kuyujani” y líderes de las comunidades, previa información y consentimiento, con base en sus necesidades de salud así como características ecológicas y epidemiológicas de interés para el estudio.

En cada localidad de estudio se realizaron reuniones, con amplia participación de ancianos, adultos, adolescentes y niños, a fin de explicar y demostrar las actividades a realizar. Las comunidades

seleccionaron tres personas como contraparte local del equipo de entomología, las cuales se entrenaron en las técnicas de colecta de mosquitos adultos con trampas de luz y con cebo humano, así como la colecta de estadios inmaduros e identificación de criaderos. Posteriormente, se les entrenó en la identificación a nivel de subfamilia en Anophelinae y Culicinae.

Caracterización de criaderos

En cada localidad se realizó el reconocimiento del área en un radio de aproximadamente 3 km alrededor de cada comunidad, a fin de identificar los criaderos

potenciales de anofelinos. En cada sitio se procedió a georeferenciar (coordinadas UTM) y caracterizar los criaderos considerando los parámetros hidrológicos (temperatura, profundidad, pH, color aparente, corriente, sombra y permanencia) y vegetación asociada (cobertura, especies, tipo). La colecta de mosquitos (larvas y pupas) se realizó mediante 30 inmersiones con el cucharón de cono truncado de 230 mL de capacidad, contándose el número de larvas colectadas en cada inmersión. Posteriormente se transportaron los especímenes colectados al laboratorio de campo para su identificación preliminar in vivo a nivel de especie. Esta metodología, desarrollada por los autores, consiste en la colocación en una lámina portaobjeto excavada de la larva de cuarto estadio viva en una gota de agua, para su observación en el microscopio compuesto con aumento 10x. Esta técnica permitió la observación al natural de los caracteres diagnósticos de las especies y su identificación in situ mediante el uso de las claves taxonómicas de Cova-García & Sutil (1977), Farañán & Linthicum (1981) y Navarro (1996). En caso de dificultades en la identificación de la larva, esta fue desarrollada hasta fase adulta obteniéndose una colección asociada del espécimen según la metodología descrita por Belkin *et al.* (1965). Es importante señalar que siempre que fue posible, se preservaron las crías asociadas a fin de contar con una colección de referencia del área.

Colectas de mosquitos adultos

En cada localidad, se colocaron simultáneamente en el interior de seis casas seleccionadas, tres trampas de luz del tipo CDC y tres trampas de luz ultravioleta, entre las 1800 y 0600 hrs, durante tres noches consecutivas en el mes de Octubre de 2005. Simultáneamente se realizaron colectas con cebos humanos en el peridomicilio de casas seleccionadas entre las 1800 y 2200 hrs; solamente fue posible hacer colectas de 12 horas (1800-0600 hrs) en la localidad de Boca de Nichare durante una noche. Cada noche se rotaba la ubicación de las trampas y del cebo. Además, durante las colectas de larvas, se procedía a capturar culicinos adultos atraídos hacia los colectores. Al día siguiente se procedía a montar en alfileres e identificar a nivel de especie los especímenes colectados utilizando las claves de Cova García & Sutil (1977), Farañán & Linthicum (1981), Rubio-Palis (2000) y Wilkerson & Sallum (1999). Para la identificación de culicinos se utilizaron las claves de Forattini (1965), Lane (1953) y Liria & Navarro (2009). Los

especímenes colectados se hallan depositados en la colección del Centro de Investigaciones de Campo “Dr. Francesco Vitanza” en Tumeremo, estado Bolívar, Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldon”, Ministerio del Poder Popular para la Salud.

RESULTADOS

Tipos de criaderos

Durante el estudio se identificaron y caracterizaron criaderos de mosquitos localizados en ecosistemas boscosos y agrupados con base a la hidrología en arroyo, caño, manantial, laguna, pantano y charco (Tabla I). Además, para los culicinos se incluyeron los recipientes artificiales y naturales.

- **Arroyo.** Son corrientes de agua con escaso caudal, de flujo lento y régimen estacional intermitente. Se encuentran en lugares total o parcialmente sombreados en terrenos con plano inclinado y sustrato areno-franco-limoso. Las aguas son cristalinas, poco profundas (10-50 cm) y pH 5,5-7,0. Se encuentra hojarasca flotante, mientras que en las márgenes se observan gramíneas de bajo porte y arbustos. Este tipo de criadero se encontró en todas las localidades, excepto en Surapire. Las especies de anofelinos y culicinos colectados en arroyos se muestran en la Tabla I; las especies más abundantes en este tipo de criadero fueron *Anopheles (Anopheles) mediopunctatus* (Lutz) y *Chagasia bathana*. La densidad de anofelinos fue de 0,33 larvas/cucharón.
- **Caño.** Los ríos o caños en esta área son tributarios menores del río Caura, que se encuentran en zonas boscosas de altura y cobertura media, con el dosel interrumpido frecuentemente; parcialmente sombreados y sobre terrenos en plano inclinado. Son corrientes de aguas cristalinas, de caudal regular, régimen permanente, flujo de moderado a alto dependiendo de las precipitaciones estacionales y profundidad variable (30-50 centímetros hasta tres metros), sustrato arenoso con escaso aporte de hojarasca. El pH medido varía entre 5,5 y 7,0. Por lo general, carecen de vegetación hidrofita, pero donde penetra la luz pueden encontrarse cúmulos de *Mayaca* sp. y gramíneas. Se caracterizan por la acumulación de grandes cantidades de detrito en los recodos y otros lugares donde la corriente disminuye, constituyendo excelentes criaderos de larvas de mosquitos. Este tipo de criadero se encontró en las localidades de Boca de

Tabla I. Número de larvas colectadas por especie de Culicidae y por tipo de criadero en el Bajo Caura, estado Bolívar. Octubre 2005.

Especie	Arroyo (N= 7)	Caño (N= 3)	Manantial (N= 1)	Laguna (N= 2)	Pantano (N= 4)	Charco (N= 4)	Recipientes Naturales ¹	Recipientes Artificiales ²
Anophelinae	126	265	3	382	152	2	0	0
<i>An. (Anopheles) mediopunctatus</i>	15	12	0	0	55	2	0	0
<i>An. (Nyssorhynchus) darlingi</i>	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>An. (Nyssorhynchus) oswaldoi</i> s.l.	3	102	0	2	60	0	0	0
<i>An. (Nyssorhynchus) triannulatus</i>	0	0	0	294	0	0	0	0
<i>An. (Lophopodomyia) squamifemur</i>	5	1	0	0	0	0	0	0
<i>An. (Stethomyia) sp.</i>	3	0	3	0	0	0	0	0
<i>Chagasia bathana</i>	53	43	0	0	0	0	0	0
No identificables ³	47	107	0	84	37	0	0	0
Culicinae	17	2	2	2	39	0	4	38
<i>Aedes sp.</i>	0	0	0	0	0	0	3	0
<i>Culex sp.</i>	5	1	0	0	1	0	0	4
<i>Culex (Culex) sp.</i>	1	0	0	0	3	0	0	32
<i>Culex (Melanoconion) spp.</i>	3	1	0	2	35	0	0	1
<i>Haemagogus (Haemagogus) janthinomys</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Psorophora (Janthinosoma) lutzii</i>	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Trichoprosopon sp.</i>	7	0	2	0	0	0	0	0
<i>Wyeomyia sp.</i>	0	0	0	0	0	0	1	0
Toxorhynchitinae	0	0	0	0	0	0	4	2
<i>Toxorhynchites (Lynchiella) haemorrhoidalis</i>	0	0	0	0	0	0	4	2

1 Recipientes naturales: incluye fitotelmata y huecos en lecho rocoso del río

2 Recipientes artificiales: pipotes, canoa

3 No identificables: larvas de primer y segundo instar no identificables

Nichare, Surapire e Iikutú, donde se colectaron cuatro especies de anofelinos y dos especímenes del género *Culex* Linnaeus (Tabla I). La densidad de anofelinos fue superior a la encontrada en arroyos (0,72 larvas/cucharón).

- **Manantial.** Son surgencias de aguas subterráneas, constituidos por flujos lentos de agua cristalina, de dinámica permanente, que emergen a la superficie desde corrientes subterráneas, sobre sustrato arenoso con aporte de hojarasca y profundidad variable (15-50 cm). Sólo se identificó un manantial en Boca de Nichare, el cual se encuentra en una zona boscosa de cobertura media, parcialmente sombreado y carece

de vegetación macrofita; sin embargo, en lugares donde inciden los rayos del sol se pueden observar pequeñas cantidades de alga verde-filamentosa en las márgenes. El pH medido fue de 6,0. En este criadero sólo se colectaron tres especímenes de *Anopheles* del subgénero *Stethomyia*, siendo la densidad de 0,1 larvas/cucharón. Además, se colectaron dos larvas de culicinos del género *Trichoprosopon* Theobald (Tabla I).

- **Laguna.** Cuerpos de agua en depresiones naturales del terreno sobre suelos poco permeables de sustrato limo-arcilloso con régimen estacional variable (intermitente o permanente), de profundidad variable,

pero siempre inferior a 2 metros, color variable de cristalino a ámbar, pH de 5,5 a 6,0. Las lagunas están ubicadas en zonas donde el dosel del bosque se interrumpe, por lo que están expuestas casi totalmente al sol, permitiendo la proliferación de plantas acuáticas entre las cuales destacan hidrófitas y heliofitas tales como gramíneas, *Mayaca* sp., *Utricularia* sp., *Pistia* sp. y algas verdes-filamentosas en abundancia, con mucho aporte de hojarasca. Este tipo de criadero fue localizado solamente en Surapire. Los nichos formados por cúmulos de vegetación hidrófila, alga verde-filamentosa y detrito, a pleno sol, son criaderos excelentes para larvas de mosquitos, especialmente para *Anopheles (Nyssorhynchus) triannulatus* (Tabla I). Este tipo de criadero presentó la densidad más alta de anofelinos (1,27 larvas/cucharón). En cuanto a culicinos, sólo se colectaron dos especímenes de *Culex (Melanoconion)* sp.

- **Pantano.** Con la denominación de pantanos se identifican cuerpos de agua muy similares a las lagunas en cuanto a atributos físicos y dinámica hídrica, pero se diferencian de estos últimos en el origen. Los pantanos están formados por acumulaciones de agua de lluvia o desborde, sobre suelos poco permeables de sustrato areno-arcilloso, con abundante aporte de hojarasca producida por el dosel del bosque. Son poco profundos (<50 cm), de color marrón a ámbar, con pH medio de 6,5. Tienen una dinámica estacional y al estar profusamente sombreados, carecen de cualquier tipo de vegetación hidrófita, pero si abundante detrito, materia orgánica y sólidos en suspensión. En este tipo de criadero se encontraron estadios inmaduros de *An. (Nyssorhynchus) oswaldoi* (Peryassú) y *An. (Anopheles) mediopunctatus* (Tabla I), reportándose una densidad de 0,51 larvas/cucharón. En cuanto a culicinos, se colectaron sólo larvas del género *Culex*. Este tipo de criadero se encontró en las localidades de Boca de Nichare, Ikutú y El Playón.
- **Charco.** Tipo de criadero formado por pequeños depósitos de agua estancada, turbia, de color ámbar, producidos por la acumulación de lluvia en depresiones naturales del terreno o en el lecho de líneas de drenaje secas. Son de carácter temporal, pero al estar ubicadas en zonas boscosas profusamente sombreadas, permanecen el tiempo suficiente para permitir el desarrollo de larvas de mosquitos. Tienen pocos centímetros de profundidad (<5 cm) y se forman sobre suelos de sustrato arenoso y limoso, con abundante aporte de hojarasca proveniente del dosel. En este tipo de criadero sólo se colectó *An. mediopunctatus* en baja densidad (0,07 larvas/cucharón) en Boca de Nichare. No se colectaron culicinos.

Además se inspeccionaron recipientes naturales (fitotelmata y huecos en las rocas) y artificiales. En la localidad de El Playón se colectaron larvas de *Toxorhynchites haemorrhoidalis* (Fabricius) y *Wyeomyia* sp. en brácteas de *Heliconia* sp., mientras que en huecos del lecho rocoso del río Caura se colectaron especímenes de *Aedes* sp. (Tabla I). En cuanto a las colectas en recipientes artificiales, tenemos que en agua acumulada en una canoa en Ikutú se encontraron dos larvas de *Tx. haemorrhoidalis* y en un pipote de 200 litros de capacidad encontrado en Boca de Nichare se colectaron larvas de *Psorophora (Janthinosoma) lutzii* (Theobald) y *Culex* spp. (Tabla I).

Estadios inmaduros

Se colectó un total de 928 larvas de anofelinos de las cuales se identificaron 647 correspondientes a siete especies (Tabla I), resultando el criadero tipo arroyo el de mayor diversidad de especies (5); mientras que las lagunas representaron los criaderos con mayor abundancia de larvas (382), seguidas del criadero tipo caño (265). *Anopheles triannulatus* fue la especie más abundante (32,5%) seguida de *An. oswaldoi* (20,1%), *An. mediopunctatus* (9,1%), *Chagasia bathana* (6,8%), *An. (Lophopodomyia) squamifemur* Antunes (0,7%), *An. (Stetomyia)* sp. (0,7%) y *An. (Nys.) darlingi* (0,2%). Las especies más frecuentes fueron *An. oswaldoi* s.l. y *An. mediopunctatus*, siendo colectadas en cuatro de los seis tipos de criaderos muestreados. *Anopheles triannulatus*, a pesar de ser la especie más abundante, sólo fue colectada en las lagunas al igual que *An. darlingi*. En el manantial fue colectada únicamente *An. (Stetomyia)* sp., mientras que *An. squamifemur* y *Ch. bathana* se colectaron en cursos de agua tipo arroyo y caño. Un número significativo de larvas (256) no fueron identificados a nivel de especie, debido principalmente a alta mortalidad en los estadios I y II.

En cuanto a los estadios inmaduros de culicinos, se colectaron un total de 104 larvas pertenecientes a siete géneros: *Aedes* Linnaeus, *Culex*, *Haemagogus* Wiliston, *Psorophora* Robineau-Desvoidy, *Toxorhynchites* Theobald, *Trichoprosopon* Theobald y *Wyeomyia* Theobald (Tabla I). El criadero artificial del tipo pipote de 200 L presentó la mayor abundancia de larvas de *Culex* spp.

Distribución espacial de las especies de anofelinos y culicinos

En general observamos que el número de especies de anofelinos colectadas y tipo de criaderos

variaron en función de la localidad (Tabla II). Así tenemos que en la localidad de Boca de Nichare se encontraron los criaderos tipo arroyo (3), caño (3), manantial (1), pantano (2) y charco (1); colectándose seis especies de anofelinos, y donde se registró el mayor número de especies pero la menor cantidad de larvas colectadas. *Anopheles mediopunctatus* fue la especie más abundante, seguida de *An. oswaldoi s.l.*, siendo ésta última la única especie del subgénero *Nyssorhynchus* colectada en esta localidad. Estas dos especies se colectaron principalmente en criaderos tipo pantano y caño. La tercera especie más abundante en Boca de Nichare, *Ch. bathana*, fue colectada solamente en los caños junto con *An. squamifemur*. En esta localidad se colectaron especímenes del subgénero *Stethomyia* en el manantial (Tabla I). En cuanto a los culicinos, la diversidad encontrada fue menor colectándose especímenes de *Culex* sp., *Cx. (Mel.)* sp. y *Trichoprosopon* sp.

En Surapire se identificaron dos lagunas y un caño, donde se colectaron cinco especies de anofelinos, siendo esta localidad la segunda con más especies después de Boca de Nichare. Se colectó la mayor cantidad de larvas, duplicando el número colectado en Ikutú. Este superávit en la abundancia de larvas se debe fundamentalmente a *An. triannulatus*, que fue la especie más abundante de todas. Esta especie fue colectada en lagunas junto con *An. oswaldoi s.l.* y *An. darlingi*, siendo este el único sitio donde se colectaron tres especies del subgénero *Nyssorhynchus* y el único donde se colectaron estadios inmaduros de *An. darlingi*. En Surapire también se colectó *An. mediopunctatus* en el caño (Tabla I). En tanto que sólo se colectaron especímenes de *Cx. (Mel.)* sp. (Tabla II).

El Playón fue la localidad donde se colectó la menor cantidad de especies, sólo fueron colectadas *An. oswaldoi s.l.* y *Ch. bathana* en criaderos tipo arroyo

Tabla II. Número de larvas de Culicidae colectadas en cada localidad del Bajo Caura, estado Bolívar. Octubre 2005.

Especies	Localidad				Total
	Nichare	Surapire	El Playón	Ikutú	
Anophelinae	120	432	128	248	928
<i>An. (Anopheles) mediopunctatus</i>	72	9	0	1	82
<i>An. (Nyssorhynchus) darlingi</i>	0	2	0	0	2
<i>An. (Nyssorhynchus) oswaldoi</i>	20	4	36	107	167
<i>An. (Nyssorhynchus) triannulatus</i>	0	294	0	0	294
<i>An. (Lophopodomyia) squamifemur</i>	1	0	0	5	6
<i>An. (Nyssorhynchus) sp.</i>	2	2	0	15	19
<i>An. (Stethomyia) sp.</i>	6	0	0	0	6
<i>Chagasia bathana</i>	19	0	68	9	96
No identificables	0	121	24	111	256
Culicinae	31	2	58	13	104
<i>Aedes</i> sp.	0	0	3	0	3
<i>Culex</i> sp.	2	0	9	0	11
<i>Culex (Culex)</i> sp.	0	0	35	1	36
<i>Culex (Melanoconion)</i> spp.	18	2	10	12	42
<i>Haemagogus (Haemagogus) janthinomys</i>	1	0	0	0	1
<i>Psorophora (Janthinosoma) lutzii</i>	1	0	0	0	1
<i>Trichoprosopon</i> sp.	9	0	0	0	9
<i>Wyeomyia</i> sp.	0	0	1	0	1
Toxorhynchitinae	0	0	5	1	6
<i>Toxorhynchites (Lynchiella) haemorrhoidalis</i>	0	0	5	1	6

Tabla III. Número de mosquitos adultos del género *Anopheles* colectados con cebo humano y trampas de luz CDC por localidad, Bajo Caura, estado Bolívar. Octubre 2005.

Localidad	Especies	Cebo Humano	Trampa CDC	Total
Boca de Nichare	<i>An. darlingi</i>	10	0	10
	<i>An. nuneztovari</i>	3	0	3
Surapire	<i>An. darlingi</i>	62	135	197
	<i>An. nuneztovari</i>	9	0	9
	<i>An. braziliensis</i>	1	0	1
El Playón	<i>An. nuneztovari</i>	5	0	5
Ikutú	<i>An. darlingi</i>	5	2	7
	<i>An. oswaldoi</i>	9	0	9*
	<i>An. braziliensis</i>	1	0	1
Total	<i>An. darlingi</i>	77	137	214
	<i>An. nuneztovari</i>	17	0	17
	<i>An. braziliensis</i>	2	0	2
	<i>An. oswaldoi</i>	9	0	9

(*) 8 especímenes fueron colectados en horas diurnas en la orilla de un criadero tipo pantano

(2) y un pantano. Esto contrasta con los hallazgos para otros culicidos, donde se colectó la mayor diversidad de especies en diversos tipos de criaderos (naturales y artificiales): *Aedes* sp., *Culex* spp., *Cx. (Cul.)* sp., *Cx. (Mel.)* sp., *Tx. haemorrhoidalis* y *Wyeomyia* sp.

Por ultimo, en Ikutú al igual que en Surapire, se colectaron cinco especies, siendo esta localidad la segunda en abundancia de larvas de anofelinos (Tabla II). Aquí la colecta estuvo constituida mayoritariamente por *An. oswaldoi* s.l., especie colectada abundantemente en el criadero tipo pantano. También se colectaron algunas larvas de *An. mediopunctatus* s.l., *An. squamifemur* y *Ch. bathana* en criaderos tipo arroyo. En cuanto a culicidos, se colectaron larvas de *Cx. (Cul.)* sp., *Cx. (Mel.)* sp. y *Tx. haemorrhoidalis*.

Colecta de adultos

Se colectaron en total 242 anofelinos (Tabla III); 105 (43,4%) de ellos con cebo humano y 137 (56,6%) con trampas CDC. Las trampas de luz ultra violeta resultaron inefectivas para colectar anofelinos y culicinos en esta región de Venezuela, sin embargo resultaron positivas para las colectas de flebotominos. Se colectaron picando sobre cebo humano y en trampas de luz CDC, cuatro especies de anofelinos, todas pertenecientes al subgénero *Nyssorhynchus* distribuidos de la siguiente manera: *An. darlingi* 88,4%, *An. nuneztovari* 7,02%, *An. oswaldoi* s.l. 3,7% y *An. braziliensis* 0,8% (Tabla III). La localidad con mayor número de anofelinos fue Surapire con 207

mosquitos (87%), seguida de Ikutú (7%) y Boca de Nichare (5,4%), mientras que en El Playón se colectaron sólo cinco mosquitos (2,1%). A excepción de El Playón, se colectaron hembras adultas de *An. darlingi* en todas las localidades, siendo Surapire la localidad donde presentó mayor abundancia. La cantidad de especímenes de esta especie colectados con trampas CDC duplico la cantidad colectada con cebo humano. En Ikutú, tan sólo dos mosquitos se colectaron con la trampa CDC. En Boca de Nichare e Ikutú se colectaron 10 y 5 especímenes de *An. darlingi* respectivamente, mientras que en El Playón no se colectaron hembras adultas de esta especie. La segunda especie en importancia, *An. nuneztovari*, estuvo presente en tres de las localidades muestreadas en cantidades más o menos similares, estando ausente únicamente en Ikutú, localidad donde su lugar fue tomado por *An. oswaldoi* s.l., siendo esta la única localidad donde se colectó esta especie picando a las personas. No obstante, hay que aclarar, que ocho mosquitos de los nueve *An. oswaldoi* s.l. de Ikutú, fueron colectados de día, dentro del bosque, en la orilla de un criadero positivo a esta especie. Además de estas especies, también se colectó un ejemplar de *An. braziliensis*, en colectas nocturnas en Surapire e Ikutú.

En cuanto a culicinos tenemos que se colectó un total 75 hembras adultas sobre cebos humanos solamente en las localidades de Boca de Nichare, El Playón e Ikutú (Tabla IV), ya que ambos tipos de trampas de luz resultaron ineficientes para culicinos. La mayor diversidad de especies (13) se registró en El Playón.

Tabla IV. Número de mosquitos adultos de Culicinae colectados sobre cebos humanos en el Bajo Caura, estado Bolívar. Octubre 2005.

Especies	Localidad			Total
	Boca de Nichare	El Playón	Ikutu	
<i>Aedes fulvithorax</i>	0	1	0	1
<i>Aedes fulvus</i>	0	5	0	5
<i>Aedes serratus</i>	0	2	0	2
<i>Coquillettidia</i> sp.	0	1	0	1
<i>Culex (Melanoconion)</i> spp.	0	3	1	4
<i>Haemagogus janthinomys</i>	0	1	2	3
<i>Johnbelkinia</i> sp.	0	5	0	5
<i>Limatus</i> sp.	1	1	1	3
<i>Limatus durhamii</i>	0	1	0	1
<i>Psorophora</i> sp.	0	1	0	1
<i>Psorophora lutzii</i>	7	21	3	31
<i>Trichoprosopon</i> sp.	0	2	0	2
<i>Wyeomyia</i> sp.	0	16	0	16
Total	8	60	7	75

DISCUSIÓN

El presente estudio constituye el primer reporte sobre la fauna de anofelinos y otros culicidos que se encuentran en el área indígena del Bajo Caura. Se identificaron un total de ocho especies de anofelinos y siete de culicinos. La mayor diversidad de anofelinos se reportó en los estadios inmaduros (Tabla I), mientras que en las capturas de hembras adultas se colectaron sólo cuatro especies (*An. darlingi*, *An. nuneztovari*, *An. oswaldoi s.l.* y *An. braziliensis*) (Tabla II). Estudios previos realizados en el área de criollos del Bajo Caura (Las Majadas) reportaron la presencia de *An. argyritarsis* Robineau-Desvoidy, *An. marajoara*, *An. darlingi* y *An. braziliensis* (Rubio-Palis, 1995; Rubio-Palis *et al.*, 1997), las dos primeras no colectadas en este estudio. Es importante resaltar la presencia de *An. nuneztovari*, no reportada anteriormente en los estudios de Rubio-Palis (1995) y Rubio-Palis *et al.* (1997) y la cual aparentemente ha colonizado recientemente las áreas con deforestación del estado Bolívar (Moreno *et al.*, 2004). Esta especie es un importante vector de malaria en el occidente de Venezuela (Rubio-Palis *et al.*, 1992, Rubio-Palis, 1994) y en otros países de sur América como Brasil (Arruda *et al.*, 1986; Galardo *et al.*, 2007; Pòvoa *et al.*, 2001; Tadei *et al.*, 1998), Colombia (Fajardo & Alzate, 1987), Perú (Hayes *et al.*, 1987) y Surinam (Panday, 1977).

En el área de estudio se identificaron seis tipos de criaderos naturales de anofelinos: arroyo, caño, manantial, laguna, pantano y charco (Tabla I). Se observó variación en cuanto al tipo de criadero y la riqueza de especies entre localidades. El criadero tipo caño y la especie *An. oswaldoi s.l.* fueron identificados en todas las localidades. *Anopheles oswaldoi s.l.* la encontramos en diversos criaderos: arroyo, caño, laguna y pantano (Tabla I). Estudios previos en la cuenca amazónica, reportan la presencia de esta especie en charcos y pantanos, prefiriendo criaderos usualmente ubicados en lugares bien sombreados en el interior del bosque (Faran & Linthicum, 1981). Esta especie ha sido colectada en pozos y pantanos densamente sombreados en el municipio Sifontes del estado Bolívar (Moreno *et al.*, 2000), mientras que en el estado Amazonas fue colectada en lagunas asociadas a macrofitas sumergidas y detrito (Rejmánková *et al.*, 1999; Rubio-Palis *et al.*, 2005). Cabe señalar que *An. oswaldoi s.l.* ha sido incriminada en la transmisión de malaria en el occidente de Venezuela (Rubio-Palis *et al.*, 1992), por lo que de encontrarse en altas densidades, eventualmente podría actuar como vector secundario en el Bajo Caura.

Estudios realizados en el municipio Sifontes del estado Bolívar, señalan que *An. triannulatus* es la especie mas abundante y presente en mayor diversidad

de criaderos (Moreno *et al.*, 2000). El hábitat característico de *An. triannulatus* es el tipo laguna, expuesta a pleno sol, asociadas a macrofitas sumergidas y emergentes, donde usualmente es colectada en mucha abundancia (Faran & Linthicum, 1981; Moreno *et al.*, 2000; Rejmánková *et al.*, 1999; Rubio-Palis *et al.*, 2005). Estos reportes coinciden con los resultados del presente estudio (Tabla I).

Anopheles darlingi es considerado el mejor y más potente vector de malaria de la región amazónica (Faran & Linthicum, 1981; Rubio-Palis, 2000). Esta especie ha sido colectada en diversos tipos de criaderos, tales como pozos en el bosque, charcas, pantanos y arroyos, pero siempre en lugares parcial o totalmente sombreados con abundante vegetación flotante o emergente (Faran & Linthicum, 1981); no obstante, esta especie también ha sido colectada en lagunas similares a las muestreadas en este estudio, en el municipio Sifontes del estado Bolívar (Moreno *et al.*, 2000) y en Amazonas (Rubio-Palis *et al.*, 2005). La presencia de *An. darlingi* en este tipo de criadero, a pesar de la baja abundancia característica de esta especie, más la evidencia aportada por Moreno *et al.* (2000) en el municipio Sifontes, sugieren que las lagunas o criaderos de aguas estancadas, a pleno sol o parcialmente sombreadas, con abundantes macrofitas flotantes y/o emergentes, son los hábitats de importancia epidemiológica a ser monitoreados constantemente a fin de identificar aquellos susceptibles de aplicación de medidas de control de mosquitos. Los resultados de este estudio también sugieren que la baja abundancia y frecuencia en los criaderos de especies del subgénero *Nyssorhynchus*, se debe justamente a la escasez de hábitats del tipo laguna; situación que puede cambiar con el tiempo como consecuencia de la presión demográfica humana que tiende a aumentar la heterogeneidad ambiental y por ende, generar mayor número de hábitats adecuados para la proliferación de anofelinos vectores de malaria (Póvoa *et al.*, 2003).

En cuanto a las demás especies de anofelinos reportadas en este estudio tenemos que no ha sido posible identificar la especie de la Serie Arribalzagia del subgénero *Anopheles* presente en el área de estudio, identificada preliminarmente como *An. mediopunctatus*, puesto que no fue posible contar con crías asociadas. En efecto, la Serie incluye *An. mediopunctatus* (Lutz), *An. forattinii* Wilkerson & Sallum y *An. costai* (Fonseca & Ramos), cuyos hembras adultas y larvas son indistinguibles; sólo

es posible diferenciar entre estas tres especies por caracteres en las bolsas alares de la pupa y en algunas disimilitudes en la forma y posición de los apéndices de los lóbulos dorsal y ventral de la claspeta en la genitalia del macho (Sallum *et al.*, 1999; Wilkerson & Sallum, 1999). La revisión de algunas especies de la Serie Arribalzagia de Venezuela mostró que en el municipio Sifontes del estado Bolívar esta presente *An. costai*, mientras que en Amazonas se encuentra *An. forattinii* (Moreno & Rubio-Palis, 2003), poniéndose en duda la presencia de *An. mediopunctatus* en Venezuela puesto que la presencia de esta especie hasta el presente sólo ha sido verificada en la región costera de algunos estados del sur-oeste de Brasil (Wilkerson & Sallum, 1999). Resulta indispensable realizar más colectas y obtener crías asociadas para la identificación precisa de las especies presentes.

Chagasia bathana ha sido previamente colectada en el estado Bolívar en caños sombreados en asociación con *An. squamifemur* (Moreno *et al.*, 2000). Cabe destacar que las especies referidas anteriormente, carecen de importancia epidemiológica, por lo que en consecuencia, el tipo de hábitat natural, poco intervenido, en el cual se encuentran, tampoco la tiene.

En cuanto a los culicinos, se colectaron especies pertenecientes a seis géneros en criaderos naturales y artificiales, cuya identificación a nivel de especies merece particular atención para estudios futuros, en especial las especies del subgénero *Melanoconion* Theobald del género *Culex*. Estas especies resultaron las más abundantes en criaderos tipo pantano, mientras que las del subgénero *Culex* Linnaeus fueron más abundantes en el criadero artificial tipo pipote de 200 L.

Este estudio preliminar de la fauna de anofelinos adultos muestra que hay tres especies picando a la gente en las localidades seleccionadas, exceptuando *An. braziliensis*, especie de la cual sólo se colectaron dos especímenes. *Anopheles darlingi*, principal vector de malaria en los estados Bolívar, Amazonas y Delta Amacuro (Rubio-Palis, 2000), se encontró en tres de las localidades seleccionadas para el estudio. Con respecto a esta especie, se deben resaltar dos aspectos. En primer lugar, su notoria superioridad en abundancia en Surapire, con respecto a las otras localidades, hecho que puede estar asociado a la presencia en este lugar de lagunas

completamente expuestas al sol; si bien este no es el hábitat característico de esta especie, hay que tener en cuenta que *An. darlingi* también puede comportarse como una especie oportunista que explota estos ambientes. Al respecto, existen numerosos ejemplos de cómo las alteraciones ambientales incrementan las oportunidades para las poblaciones de mosquitos antropofílicos, aumentando su rango de distribución e incrementando el riesgo epidemiológico (Póvoa *et al.*, 2003; Tadei *et al.*, 2000; Vittor *et al.*, 2006). El segundo hecho, es el éxito de colecta con trampas CDC en comparación al método de cebo humano en la misma localidad, de lo cual se pueden derivar dos interpretaciones, no excluyentes. La primera es metodológica, hay antecedentes de que las trampas de luz pueden sustituir a los cebos humanos como método de colecta en condiciones de alta densidad de mosquitos (Moreno *et al.*, 2002; Rubio-Palis & Curtis, 1992; Rubio-Palis *et al.*, 1999). La segunda interpretación es epidemiológica, sugiriendo que este es un hecho derivado de la ubicación de las trampas con respecto a la ubicación del criadero. Estos resultados indican que se debe realizar un análisis espacial para verificar la relación entre la colocación de las trampas y el criadero, así como las características de las viviendas. Más allá de estas interpretaciones queda claro que, de haber transmisión de malaria en esta zona, *An. darlingi* es sin duda el vector principal aun cuando, *An. nuneztovari* y *An. oswaldoi* s.l. pudiesen estar involucrados como vectores secundarios. Estas especies han sido incriminadas como vectores de malaria en el occidente de Venezuela (Rubio-Palis *et al.*, 1992).

Otro aspecto a resaltar de los resultados, es la composición de las especies. En las localidades Nichare - Surapire - El Playón, ubicadas en eje fluvial del río Caura, se colectaron las mismas especies, *An. darlingi* y *An. nuneztovari*, pero en Iikutú, ubicada a orillas del río del mismo nombre y relativamente alejada de este eje, aparece un nuevo elemento picando, *An. oswaldoi* s.l. Este hecho sugiere la necesidad de ampliar las colectas a fin de cubrir un área representativa del Bajo Caura y disponer de más elementos para caracterizar a la fauna de anofelinos presentes en este territorio, hasta ahora, inexplorado. En conclusión, con respecto a los anofelinos, los resultados de las colectas sugieren que de las cuatro localidades estudiadas, Surapire es la que presenta mayor riesgo de transmisión de malaria con base en la abundancia de *An. darlingi* capturados, junto con la presencia de casos de malaria

confirmados, evidenciando un foco de transmisión. En esta oportunidad fue posible identificar un criadero tipo laguna próximo a las viviendas, donde es factible aplicar medidas de control mediante la aplicación de biolarvicidas, tales como *Bacillus sphaericus*.

Con respecto a las colectas de culicinos adultos, encontramos mayor diversidad (13 especies) en la localidad de El Playón, resultando como primer registro para el estado Bolívar los géneros *Coquillettidia* y *Jonhbelkinia* y dos especies del subgénero *Ochlerotatus* Lynch-Arribáizaga de *Aedes*: *Ae. fulvus* y *Ae. serratus*. Las especies del género *Aedes*, particularmente las del subgénero *Ochlerotatus*, han sido involucradas en transmisión del ciclo epizootico del virus de Encefalitis Equina Venezolana en el Caribe, mientras que especies del subgénero *Melanoconion* de *Culex* han sido involucradas en la transmisión del ciclo enzoótico (Weaver *et al.*, 2004); sin embargo, estas no representan un factor de riesgo a la enfermedad en el Caura debido a la ausencia de equinos. Las que si representan un riesgo para la salud de la población en esta zona, son las especies del género *Haemagogus*, cuyas especies han sido involucradas repetidas veces en el mantenimiento del ciclo enzoótico del virus de la fiebre amarilla según refieren Liria & Navarro (2009). De este género se colectaron tres especímenes de *Ha. janthinomys* picando en El Playón e Iikutú. Asimismo, destacan en la colecta de culicinos por su abundancia la especie *Ps. lutzii* y especímenes no identificados del género *Wyeomyia*, la mayoría de ellos colectados picando durante el día en áreas boscosas. Hay que tener en cuenta que algunas especies del género *Psorophora* han sido involucradas en la transmisión de varios arbovirus (Liria *et al.*, 2001). Otra amenaza para la salud, relacionada con la presencia de culicinos antropofílicos en esta zona y teniendo en cuenta la afluencia constante de turistas, la representa el Virus del Nilo Occidental, cuya circulación en el país en aves ha sido recientemente confirmada (Bosch *et al.*, 2007).

Es importante señalar que las trampas de luz ultravioleta resultaron ineficientes para colectar anofelinos y culicinos, pero colectaron un total de 42 flebotominos, los cuales han sido enviados al Laboratorio de Referencia de Flebotomos-BIOMED-UC para su identificación. Si bien se carece de estadísticas precisas, se ha observado en esta área la ocurrencia de casos de leishmaniasis.

Este estudio constituye el primer esfuerzo para identificar la fauna de anofelinos y vectores de malaria potenciales en el Bajo Caura, siendo necesario desarrollar estudios longitudinales que nos permitan caracterizar la dinámica de transmisión y en consecuencia aplicar medidas de control y prevención efectivas. Un programa de control y prevención de malaria sustentable en territorios indígenas debe contar con el apoyo de un sistema de vigilancia epidemiológica y entomológica realizada por personal calificado residente en el área.

AGRADECIMIENTOS

A todos los miembros de las comunidades visitadas, al equipo local de entomología integrado por Wilmer Caura, Javier Dominguez y Jhonny Espinosa.

Ecological characterization of anophelines and culicines in the indigenous territory of the Lower Caura River, Bolívar State, Venezuela

SUMMARY

This is the first report of anophelines and culicines species in the indigenous territory of the Lower Caura River, Bolívar State. A total of 8 species of anophelines belonging to the subgenus *Anopheles* Meigen, *Lophopodomyia* Antunes, *Stethomyia* Theobald, *Nyssorhynchus* Blanchard of the genus *Anopheles* Meigen and *Chagasia bathana* Dyar and 10 genera of culicines were collected and 7 species identified. Larval habitats were identified and characterized based on the hidrology in stream, small river, spring, lagoon, swamp and pool. Culicines were also collected in artificial and natural containers. The most abundant species in collections of immature stages was *Anopheles triannulatus* (Neiva & Pinto), while in adult collections on human landing catches and CDC light traps the most abundant species was the malaria vector *An. darling* Root. Ultra violet up draft light traps were inefficient to collect anophelines and culicines. It is reported for the first time the presence in Bolívar State of the genus *Coquillettidia* Dyar and *Johnbelkinia* Zavortink, and the species *Aedes (Ochlerotatus) fulvus* (Wiedemann) and *Ae. (Och.) serratus* (Theobald).

Key words: *Anopheles* spp, larval habitats, malaria, Venezuela.

REFERENCIAS

- Arruda M., Carvalho M. B., Nussenzweig R., Maracic M., Ferreira W. & Cochrane A. H. (1986). Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**: 873-881.
- Belkin J. N., Hoge C. H. L., Galindo P., Aitken T. H. G., Schick R. X. & Powder W. A. (1965). Mosquito studies (Diptera, Culicidae) II. Methods for the collection, rearing and preservation of mosquitoes. *Contrib. Amer. Ent. Inst.* **1**: 20-78.
- Bevilacqua M., Medina D. A., Cárdenas L., Rubio-Palis Y., Moreno J. & Martínez A. (2009). Orientaciones para fortalecer el programa de malaria en zonas remotas con población indígena en el Caura, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **49**: 53-71.
- Bosch I., Herrera F., Navarro J. C., Lentito M., Dupuis A., Maffei J., et al. (2007). West Nile Virus, Venezuela. *Emer. Infect. Dis.* **4**: 651-653.
- Cova-García P. & Sutil E. (1977). Claves gráficas para la clasificación de anofelinos de Venezuela. Publi. Div. End. Rurales, Dir. Malariol. *SAN. Amb. Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. Maracay.* 65 pp.
- Fajardo P. & Alzate A. (1987). *Anopheles nuneztovari* como vector de malaria en el bajo calima, Buenaventura. *Colombia Médica.* **18**: 14-18.
- Faran M. E. & Linthicum K. J. (1981). A handbook of the Amazonian species of *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* **13**: 1-81.
- Forattini O. W. (1965). *Entomología Médica.* 3º Volume. Editora da Universidade de São Paulo. 504 pp.
- Galardo A. K. R., Arruda M., Dálmeida Couto A. A. R., Wirtz R. A., Lounibos L. P. & Zimmerman R. H. (2007). Malaria vector incrimination in three rural riverine villages in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **76**: 461-469.

- Hayes J., Calderón G., Falcón R. & Zambrano V. (1987). Newly incriminated anopheline vectors of human malaria parasites in Junin Department, Perú. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* **3**: 418-422.
- ISP (2008). Boletín Regional. Dirección Regional de Salud Ambiental y Contraloría Sanitaria. Reporte Epidemiológico de la División Epidemiológica Sanitaria Ambiental. Instituto de Salud Pública. Semana 52. Estado Bolívar.
- Lane J. (1953). *Neotropical Culicidae*. Volume I & II. University of São Paulo, São Paulo, Brazil. 648 p.
- Liria J. & Navarro J. C. (2009). Claves fotográficas para hembras de *Haemagogus* Williston 1826 (Diptera: Culicidae) de Venezuela, con nuevo registro para el país. *Bol. Mal. Salud Amb.* **49**: 283-292.
- Liria J., Barrera R. & Navarro J. C. (2001). Nuevos registros de *Psorophora* Robineau-Desvoidy, 1827 (Diptera: Culicidae: Aedini) en Venezuela. *Entomotropica*. **16**: 197-198.
- MPPS (2000-2008). Boletín Epidemiológico, Semana Epidemiológica N° 52. Ministerio del Poder Popular para la Salud. República Bolivariana de Venezuela. Caracas.
- Moreno J. & Rubio-Palis Y. (2003). Primer reporte de *Anopheles* (*Anopheles*) *costai* y *An.* (*Ano.*) *forattinii* (Diptera: Culicidae) en Venezuela. *Entomotropica*. **18**: 211-213.
- Moreno J., Rubio-Palis Y. & Acevedo P. (2000). Identificación de criaderos de anofelinos en un área endémica del estado Bolívar, Venezuela. *Bol. Malariol. San. Amb.* **40**: 21-30.
- Moreno J., Rubio-Palis Y., Sánchez V. & Mariany D. (2004). Primer registro de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *nuneztovari* Gabaldón, 1940 (Diptera: Culicidae) en el estado Bolívar, Venezuela y sus implicaciones eco-epidemiológicas. *Entomotropica*. **19**: 55-58.
- Moreno J., Rubio-Palis Y., Pérez E., Sánchez V. & Páez E. (2002). Evaluación de tres métodos de captura de anofelinos en un área endémica de malaria del estado Bolívar, Venezuela. *Entomotropica*. **17**: 157-165.
- Navarro J. C. (1996). Actualización taxonómica de la tribu Anophelini de Venezuela, con nueva clave para la identificación de larvas de 4º estadio. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **35**: 25-43.
- Osborn F. R., Rubio-Palis Y., Herrera M., Figuera A. & Moreno J. E. (2004). Caracterización Ecoregional de los Vectores de Malaria en Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **44**: 77-92.
- Panday R. S. (1975). Age structure of some mosquito populations in a coastal area in Suriname. *Mosq. News.* **35**: 305-308.
- Póvoa M. M., Wirtz R. A., Lacerda R. N. L., Miles M. A. & Warhurst D. (2001). Malaria vectors in the municipality of Serra do Navio, State of Amapá, Amazon region, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **96**: 179-184.
- Póvoa M. M., Conn J. E., Schlichting C. D., Amaral J. C. O. F., Segura M. N. O., da Silva A. N. M. *et al.* (2003). Malaria vectors, epidemiology, and the re-emergence of *Anopheles darlingi* in Belém, Pará, Brazil. *J. Med. Entomol.* **40**: 379-386.
- Rejmánková E., Rubio-Palis Y. & Villegas L. (1999). Larval habitats of anopheline mosquitoes in the Upper Orinoco River, Venezuela. *J. Vector Ecol.* **24**: 130-137.
- Rubio-Palis Y. (1994). Variation in the vectorial capacity of some anophelines in western Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**: 420-424.
- Rubio-Palis Y. (1995). Observaciones sobre el patrón de actividad hematofágica del vector de la malaria *Anopheles darlingi* en las poblaciones del sur de Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **35**: 66-70.
- Rubio-Palis Y. (2000). *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *de Venezuela: taxonomía, bionomía, ecología e importancia médica*. Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental “Dr. Arnoldo Gabaldón” y Proyecto Control de Enfermedades Endémicas, Maracay, Venezuela.
- Rubio-Palis Y. & Zimmerman R. H. (1997). Ecoregional classification of malaria vectors in the neotropics. *J. Med. Entomol.* **34**: 499-510.

- Rubio-Palis Y., Wirtz R. A. & Curtis C. F. (1992). Malaria entomological inoculation rates in western Venezuela. *Acta Tropica*. **52**: 167-174.
- Rubio-Palis Y., Guzmán H. & Magris M. (1999). Evaluación de la eficiencia de trampas de luz vs cebo humano para capturar *Anopheles darlingi* Root. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **39**: 30-32.
- Rubio-Palis Y., Menare C., Quinto A., Magris M. & Amarista M. (2005). Caracterización de criaderos de anofelinos (Diptera: Culicidae) vectores de malaria del Alto Orinoco, Amazonas, Venezuela. *Entomotropica*. **20**: 29-38.
- Rubio-Palis Y., Manguin S., Ayesta C., Guzmán H., Arcia J. M., González J. & Pérez E. (1997). Revisión taxonómica de los anofelinos vectores de malaria en el sur de Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **37**: 35-48.
- Sallum M. A., Wilkerson R. C. & Forattini O. P. (1999). Taxonomic study of species formerly identified as *Anopheles mediopunctatus* and resurrection of *An. costai* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **36**: 282-300.
- Tadei W. P. & Dutary-Thatcher B. (2000). Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo*. **42**: 87-94 .
- Tadei W. P., Thatcher-Dutary B., Santos J. M., Scarpassa V. M., Rodrigues I. B. & Rafael M. S. (1998). Ecological observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **59**: 325-335.
- Vittor A. Y., Gilman R. H., Tielsch J., Glass G., Shields T., Sánchez Lozano W., et al. (2006). The effect of deforestation on the human-biting rate of *Anopheles darlingi*, the primary vector of falciparum malaria in the Peruvian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **74**: 3-11.
- Weaver S. C., Ferro C., Barrera R., Boshell J. & Navarro J. C. (2004). Venezuelan Equine Encephalitis. *Annu. Rev. Entomol.* **49**:141-174
- Wilkerson R. C. & Sallum M. A. (1999). *Anopheles (Anopheles) forattinii*: a new species in Series Arribalzagia (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **36**: 345-354.

Recibido el 03/01/2009
Aceptado el 22/04/2010

Evaluación de la persistencia de una formulación comercial de *Bacillus sphaericus* en criaderos naturales de anofelinos vectores de malaria en estado Bolívar, Venezuela

Jorge E. Moreno^{1*}, Porfirio Acevedo², Ángela Martínez², Víctor Sanchez¹ & Luis Petterson¹

El municipio Sifontes del estado Bolívar es la principal área endémica a malaria de Venezuela. Durante los últimos cinco años se ha reportado en este municipio un promedio anual cercano a 15 mil casos, alcanzándose durante 2009 la cifra de 20.282, lo que constituye una situación de epidemia. En este municipio se evaluó la persistencia de una formulación comercial de *Bacillus sphaericus* Neide (Vectolex CG 7,5%) en criaderos naturales de *Anopheles marajoara*, *An. triannulatus* y *An. braziliensis*. Para ello se realizaron dos experimentos en los cuales se evaluaron las dosis de 2 y 3 gr/m² durante 60 y 90 días. Los resultados indican que hay diferencias en la persistencia por tipo de criadero y especie de anofelino. La tendencia general para todas las especies indica que el porcentaje de reducción de la población larvaria fue de 100% durante la primera semana, luego disminuyó paulatinamente hasta más o menos 40% después de los 28 días, para luego recuperarse a alrededor de 60% a los 45 días, manteniéndose así hasta el día 90 con ambas dosis. Este comportamiento es más evidente para *An. marajoara*, mientras que con *An. triannulatus* la eficacia se mantiene alrededor de 80% durante 90 días con 3 gr/m². Sobre *An. braziliensis*, la eficacia se mantiene en 100% hasta el día 14 con ambas concentraciones, para luego caer abruptamente sin recuperación. Es la primera vez que se evalúa *B. sphaericus* sobre estas especies de anofelinos en Venezuela, considerándose estos resultados muy prometedores para el control de vectores.

Palabras clave: *Bacillus sphaericus*, persistencia, malaria, vectores, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

La malaria es de naturaleza endemo-epidémica en el estado Bolívar. Esta enfermedad irrumpe con fuerza en el estado a partir del brote de El Dorado en 1988 con 30.690 mil casos, 66% de la malaria del país en ese año, manteniéndose así hasta 1992 cuando cae a 11.679 casos. En el decenio 1993-2003 hubo en promedio un poco más de ocho mil casos por año, pero entre 2004 y 2009 el promedio anual se elevó a 27.536 casos, cerrando el último año con más de 30 mil, lo que equivale a 85% de la malaria de Venezuela. Entre 1989 y 2009, en promedio 47% de la

malaria del estado Bolívar se generó en el municipio Sifontes, ubicado en el noreste del estado, por lo que este municipio es considerado uno de los principales focos de malaria en Venezuela. En el año 2004 se inicia una epidemia en el municipio con más de 15 mil casos, la cual se mantiene hasta 2009 con un promedio de 15 mil casos por año en ese lapso, cerrando 2009 con 20.282 casos, 67% de la malaria del estado. La fórmula parasitaria promedio entre 2004 y 2009 arroja 77% para *Plasmodium vivax*, 20% para *P. falciparum* y menos de 2% para infecciones mixtas. A partir de 2003, poco después de reportada su reaparición en el estado, hasta 2009 se han registrado 218 casos de *P. malariae* (Pacheco *et al.*, 2001).

El municipio Sifontes constituye un foco meso-endémico de malaria inestable, donde la transmisión ocurre durante todo el año con brotes epidémicos provocados principalmente por factores

¹ Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon", MPPS. Centro de Investigaciones de Campo "Dr. Francesco Vitanza", Tumeremo, estado Bolívar, Venezuela.

² Dirección de Salud Ambiental del estado Bolívar, Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela.

*Autor de correspondencia: joreremo@yahoo.com

antrópicos. Por tal motivo esta zona es considerada de alto riesgo a malaria (Ach , 1998). La actividad económica principal de la región, la minería aurífera, parece estar íntimamente relacionada con la morbilidad mal rica, debido a la fuerte intervención ambiental propiciada por el uso inadecuado de la tierra. La alteración del suelo crea ambientes propicios para la cría de anofelinos y a la vez induce cambios en el patrón de comportamiento de las especies. Debido a la estrecha relación entre minería y malaria, ésta ha sido catalogada en la zona como una enfermedad ocupacional (Ach , 1998).

Acercas de los vectores de malaria, en este foco han sido involucradas dos especies en la transmisión, *Anopheles darlingi* y *An. marajoara*, teniéndose a *An. nuneztovari* como un vector emergente en potencia por su abundancia y ubicuidad (Moreno *et al.*, 2004; 2007). Los huecos de minas hechos por los mineros, han sido descritos como los principales criaderos de anofelinos en el  rea (Moreno *et al.*, 2000)

Las estrategias clásicas de control de vectores, fundamentadas en el rociamiento intra-domiciliario de insecticidas y las nebulizaciones espaciales, han resultado insuficientes para resolver el problema, debido principalmente al comportamiento exofílico de los vectores y al fenómeno de la resistencia a los insecticidas, principalmente a los piretroides (Molina *et al.*, 1997). A esto se le suman factores sociales propios de las comunidades mineras, tales como viviendas provisionales que no poseen superficies adecuadas para el rociamiento de insecticida, hábitos laborales que exponen a la gente a la picada de los mosquitos y alta movilidad entre localidades. Esta problemática ha obligado la búsqueda de nuevas estrategias de control, dentro de un enfoque de control integrado basado en el conocimiento de la ecología de las especies, y basado en el concepto de control selectivo de vectores el cual incluye opciones tales como el control de los criaderos, el control biológico de vectores y el uso de mosquiteros impregnados con insecticida (Berti & Zimmerman, 1998; OPS, 1999). Dentro de este orden de ideas se diseño un estudio con la finalidad de evaluar el impacto de la introducción del agente de control biológico *Bacillus sphaericus* Neide (Bsp) sobre las poblaciones de mosquitos, el cual comienza con la medición de la persistencia del producto en criaderos naturales de anofelinos, un aspecto vital en la viabilidad de un programa de control integrado de vectores, basado en la aplicación de biolarvicidas. En este trabajo se presentan

los resultados de la evaluación de la presentación comercial de *B. sphaericus* Vectolex[®] CG 7,5%, en criaderos naturales de anofelinos y se discuten sus alcances para el control de la malaria.

MATERIALES Y METODOS

 rea de estudio

El municipio Sifontes del estado Bolívar abarca 24.392 km² y est  ubicado en el extremo oriental del estado (lat 6  00' -7  54' N, long 60  44' -61  39' W). Desde el punto de vista del relieve, en este municipio se distinguen dos tipos de paisaje, sabanas al norte y llanos cubiertos por selva al sur, ambos incluidos dentro de la región fisiogeogr fica Sabanas de Guayana, que son áreas de sabanas con topografía ondulada de variada intensidad, cuya altura varía entre 100 y 500 msm (Hernández Grillet, 1987). Este territorio abarca casi en su totalidad la cuenca del Cuyun -Yuruari, formada por la confluencia de dos río del mismo nombre y que tiene una extensión de 50.000 km², de los cuales aproximadamente 12.000 se encuentran fuera del territorio venezolano. Esta zona presenta un tipo climático de sabana, con ocho a nueve meses de lluvia, estando la temporada más lluviosa entre abril y septiembre con un pico en junio, y una temporada seca o menos lluviosa entre octubre y marzo, siendo febrero el mes más seco. La temperatura media mensual fluctúa entre 22 y 26 C. Según la clasificación de Holdridge, referida por Hernández Grillet (1987) la zona está dominada por vegetación tipo bosque húmedo y sabanas, distinguiéndose dos categorías de bosque, bosque medio al norte y oeste y bosque denso al sureste del municipio. Desde el punto de vista eco-epidemiológico la zona entra en la categoría de malaria en bosques bajos interiores (Rubio-Palis & Zimmerman, 1997; Osborn *et al.*, 2004). El  rea se encuentra considerablemente afectada por actividades antrópicas tales como la minería, la explotación maderera y la ganadería, siendo sus principales manifestaciones la disminución de cobertura vegetal, la fragmentación de hábitat, la sedimentación de los ríos, la contaminación del agua con mercurio y la erosión del suelo (Rodríguez, 1999).

Diseño experimental

Este estudio se ajusta a la fase II de la secuencia de estadios de evaluación propuestos por el Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud

(WHO, 2005). Siguiendo el procedimiento estándar propuesto por el protocolo, para cada bioensayo, en los criaderos seleccionados, se establecieron tres parcelas experimentales o replicas, por cada tratamiento y por el control, siendo un tratamiento una dosis (gr/m^2) del producto aplicado. Se evaluaron dosis de 2 y 3 gr/m^2 en dos bioensayos de la presentación granulada de *B. sphaericus* Vectolex® CG 7,5%, aplicado con la mano en parcelas de 10 metros por lado. Las parcelas fueron ubicadas dentro del criadero de manera tal que fueran lo mas homogéneas posible, en cuanto a características físicas y ecológicas tales como exposición solar, cobertura vegetal y profundidad. Las parcelas fueron dispuestas en un gradiente ascendente por tratamiento, comenzando por los controles y ascendiendo en las concentraciones, para evitar contaminaciones al control y entre concentraciones.

Características de los de criaderos

Los criaderos fueron seleccionados en función de su homogeneidad física, estabilidad, temporalidad y abundancia de larvas, realizándose bioensayos en dos criaderos tipos laguna y un herbazal, identificados previamente como criaderos de *An. triannulatus*, *An. braziliensis* y *An. marajoara* (Moreno *et al.*, 2000).

Las lagunas son cuerpos de aguas estancadas, permanentes, de origen natural, completamente soleadas y ubicadas en ambientes de sabana. El sustrato es variable con predominio de los tipos arenoso y franco arenoso, el color del agua varía entre ámbar y cristalina, dependiendo de la época del año. Los valores fisico-químicos promedio medidos previamente en las lagunas fueron 29,8°C para la temperatura del agua, 52,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en la conductividad eléctrica, 6,2 el pH y 31,4 mg/L el total de sólidos disueltos (TDS). La vegetación hidrófila esta dominada por plantas enraizadas y flotantes, perteneciente a los géneros *Mayaca*, *Eleocharis* y *Ludwigia*, en orden de magnitud, acompañadas por *Utricularia*, *Salvinia* y Alga Verde Filamentosa (AVF). El criadero tipo herbazal inundado es originado por acumulación de agua de lluvia en un suelo limoso poco permeable completamente expuesto al sol, con sustrato de turbera, con aporte de abundante materia orgánica en descomposición. Este cubre un área de aproximadamente 50 hectáreas con una lámina de agua poco profunda, alrededor de 50 cm. en los lugares de mayor profundidad. Su característica principal es que está cubierto en más de 90% por *Eleocharis*, con presencia de *Utricularia*, *Mayaca*, *Ludwigia*

y AVF hacia las orillas. Su dinámica hídrica es de agua estancada permanente, aunque durante sequías extremas pueden secarse completamente. Generalmente el agua es de color ámbar. Durante estudios previos de caracterización de criaderos se registraron valores promedio de temperatura de 29,1°C, pH de 5,7, conductividad de 51,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y TDS de 26,8 mg/L .

Toma de muestras

Se realizó un muestreo con reemplazo, tomándose en cada evaluación una muestra de 20 cucharonzos por parcela, devolviéndose las larvas al criadero después de ser contadas e identificadas. La evaluación pre-aplicación se realizo el día 0, el mismo día de la aplicación. Luego se evaluó los días 2, 4, 7, 14, 21, 28 y 35 después de la aplicación, y así sucesivamente cada 7 días hasta los días 60 y 90 en cada caso. El porcentaje de reducción de larvas de III y IV estadio, fue calculado mediante la formula de Mulla que indica que el Porcentaje de Reducción será igual a $100 - [(C1/C2 \times T2/T1)100]$, donde C1 = control antes de la aplicación, C2 = control después de la aplicación, T1 = tratamiento antes de la aplicación, T2 = tratamiento después de la aplicación (Mulla *et al.*, 1971; 1988). Debido a la presencia de más de una especie de anofelino en los criaderos, las larvas fueron identificadas vivas *in situ*, mediante la observación en el microscopio de caracteres taxonómicos conspicuos que caracterizan a cada una de estas especies y permiten distinguirlas entre sí con facilidad mediante el uso de las claves taxonómicas de Faran & Linthicum (1981) y Navarro (1996).

Análisis estadístico

De acuerdo al protocolo estándar (WHO, 2005), las diferencias entre tratamientos y especies, así como la interacción entre ambas variables, fueron analizados mediante un análisis de varianza de dos factores realizado sobre los porcentajes de reducción como variable dependiente, factorizados por dosis y especies, y luego de ser sometidos a la transformación arcoseno. El análisis fue realizado con el programa SPSS for Windows versión 10.0 (SPSS Inc., 2000).

RESULTADOS

Primer bioensayo

Los valores para el número total de larvas colectadas en las tres replicas experimentales del

primer bioensayo, antes y después del tratamiento, para todas las especies juntas y por especie de anofelino son mostrados en la Tabla I. La Fig. 1 correspondiente al primer bioensayo realizado en una laguna, muestra el porcentaje de reducción de larvas de anofelino de tercer y cuarto estadio sin discriminar por especie. En esta figura se observa que hay reducción alrededor de 100% hasta el día 7, manteniéndose alrededor de 80% hasta el día 21 y 60% hasta el día 28, lo cual puede ser considerado bueno en términos de persistencia. Después de una ligera caída, se manifiesta una fuerte recuperación de 60% de reducción en la dosis de 2 gr/m² a los 60 días y 80% para 3 gr/m² a los 45 días, manteniéndose ambas concentraciones alrededor de este valor hasta los 90 días.

La Fig. 2 muestra la eficacia del producto sobre *An. marajoara*. Al graficar el efecto por especie, se hace evidente que la tendencia descrita en la figura 1 para las larvas de tercer y cuarto estadio, se debe fundamentalmente a esta especie, dada la similitud entre ambas figuras. En este caso, igualmente el porcentaje de reducción para las larvas de *An. marajoara* se mantiene hasta el día 7 en 100% para 2 gr/m² y sobre 95% para 3 gr/m², luego ambas dosis caen a alrededor de 80% el día 21 y a 60% el día 28, para mostrar una recuperación a los 60 y 45 días para 2 y 3 gr/m² respectivamente, luego de una fuerte caída. En el caso de *An. triannulatus*, el comportamiento de la persistencia es muy diferente, en la Fig. 3 se aprecia que luego de los siete primeros días con 100% de reducción, esta se mantiene alrededor de 80%

hasta el día 90 para 3 gr/m², mientras que muestra un comportamiento bastante irregular para 2 gr/m².

Segundo bioensayo

Los valores para el número total de larvas de *An. braziliensis* colectadas en las tres replicas experimentales del segundo bioensayo, antes y después del tratamiento hasta el día 60, son mostrados en la Tabla I. La Fig. 4 muestra como, a diferencia de los anteriores, si bien la eficacia del producto se mantiene en 100% hasta el día 14 con ambas dosis, los resultados son más discretos que los anteriores, debido a que el porcentaje de reducción cae bruscamente y se mantiene alrededor del 60% del día 21 al 28 para 2 gr/m², mientras que con 3 gr/m² la caída es más pronunciada manteniéndose solo hasta el día 28 por debajo de 40%.

Análisis de la varianza

La comparación entre tratamientos y especies en cada bioensayo realizado mediante análisis de varianza de dos factores, con las dosis de Vectolex® CG y las especies de anofelinos como factores independientes, permiten evaluar la eficacia de las dosis aplicadas y observar el efecto que éstas tienen sobre las especies de mosquitos. De esta manera, en el bioensayo 1, en cual se evaluaron dosis de 2 y 3 gr/m² sobre *An. marajoara* y *An. triannulatus*, el análisis de varianza muestra que únicamente el factor especie fue altamente significativo ($F = 74,286; P = 0,000$), mientras que ni el factor dosis ($F = 1,648; P = 0,207$)

Tabla I. Número total de larvas de III-IV estadio colectadas en las tres réplicas experimentales antes (día 0) y después del tratamiento con 2 y 3 g/m² de Vectolex® CG 7,5% por especie de anofelino.

Día	<i>Anopheles</i> sp.		<i>An. marajoara</i>		<i>An. triannulatus</i>		<i>An. braziliensis</i>	
	2gr	3gr	2gr	3gr	2gr	3gr	2gr	3gr
0	83	106	79	96	5	13	29	7
2	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
7	1	4	0	4	0	0	0	0
14	22	22	27	16	4	6	0	0
21	32	19	24	14	6	5	3	1
28	40	49	30	39	9	8	5	2
35	61	98	48	76	12	11	6	4
45	68	23	58	18	7	1	15	8
60	25	31	21	24	2	3	1	1
90	38	63	22	57	15	4	-	-

Fig. 1. Porcentaje reducción de larvas de III-IV estadio de *Anopheles* sp. en laguna tratada con Vectolex® CG 7,5%.

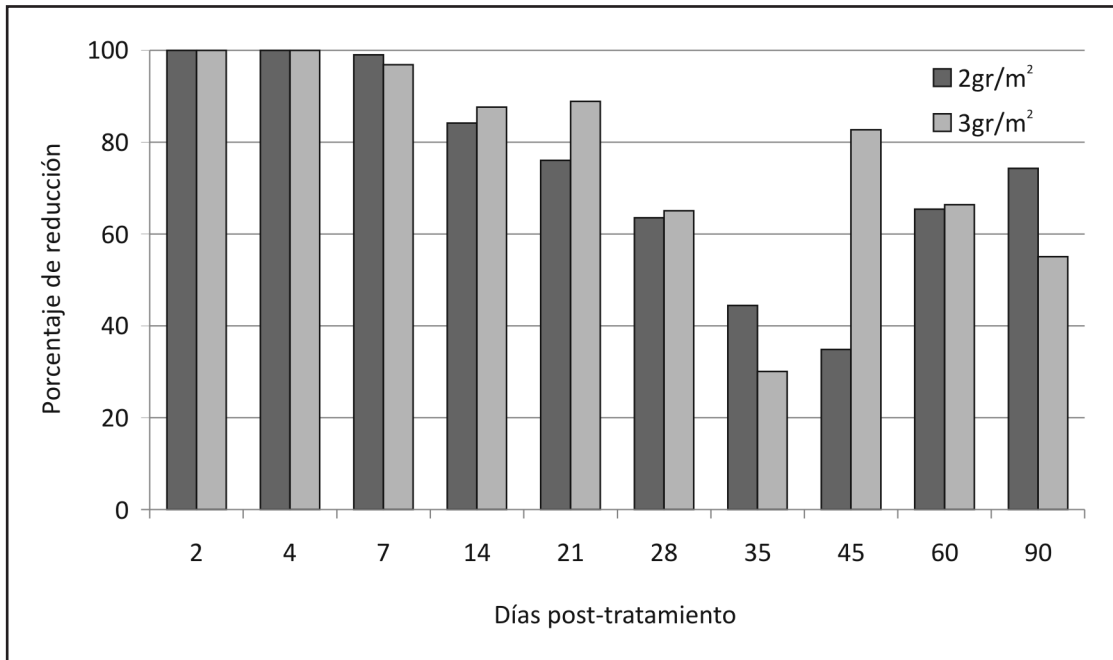


Fig. 2. Porcentaje reducción de larvas de III-IV estadio de *Anopheles marajoara* en laguna tratada con Vectolex® CG 7,5%.

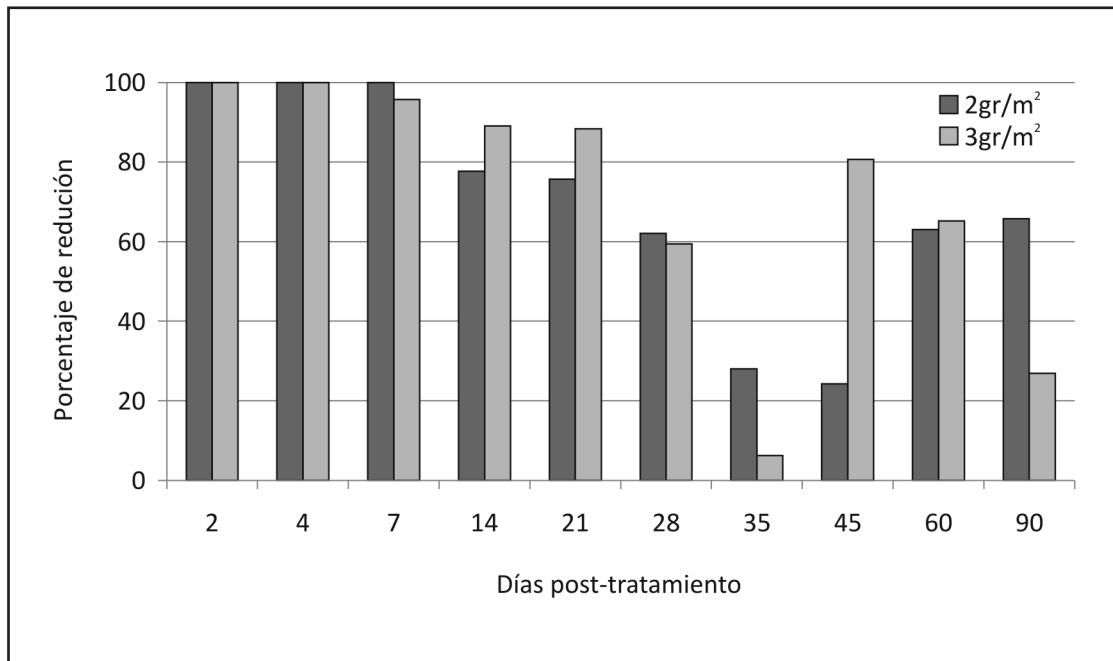


Fig. 3. Porcentaje reducción de larvas de III-IV estadio de *Anopheles triannulatus* en laguna tratada con Vectolex® CG 7,5.

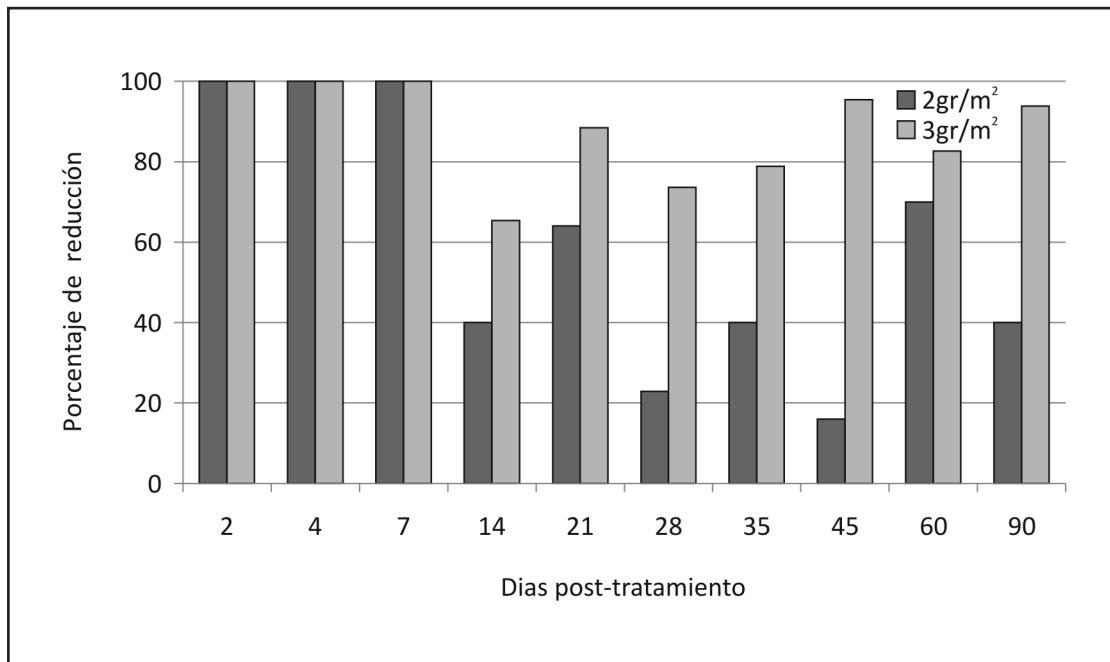
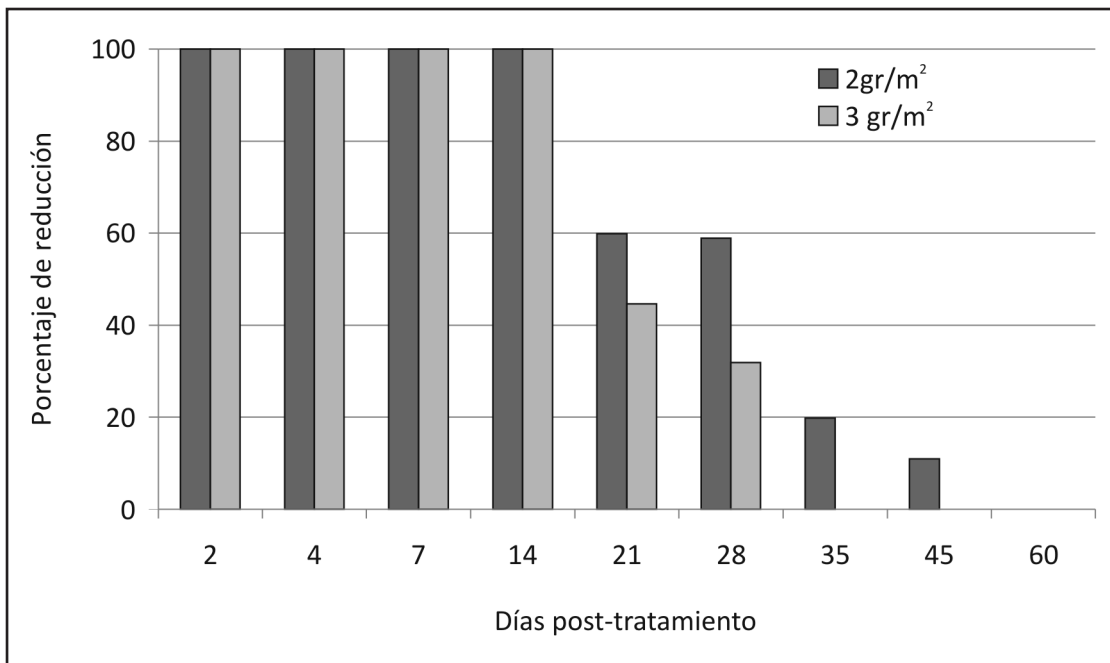


Fig. 4. Porcentaje de reducción de larvas de III y IV estadio de *Anopheles braziliensis* en pastizal tratado con Vectolex® CG 7,5%.



ni la interacción dosis por especie ($F = 1,501$; $P = 0,228$) fueron significativos, lo cual conduce a que las diferencias observadas en los porcentajes de reducción son únicamente debido a las especies, no habiendo suficiente evidencia para afirmar que sean debido a las dosis aplicadas.

DISCUSIÓN

En general los resultados obtenidos en los dos bioensayos, para todas las especies evaluadas, pueden considerarse buenos en términos de persistencia del producto en los criaderos. Los resultados del primer bioensayo son prometedores desde el punto de vista del control. Una eficacia superior al 60% hasta el día 28 puede considerarse viable dentro de un programa de control, además de la recuperación mostrada a partir de los 45 días, lo cual evidencia que el proceso de reciclaje se está llevando a cabo en los criaderos, característica fundamental de este producto que constituye una de sus principales bondades (Des Rochers & García, 1984). En ambas especies, el biolarvicida se mantiene activo hasta los 90 días, con un mejor desempeño en *An. triannulatus*, lo cual posibilita el uso de este producto en el control. Por otro lado, las gráficas parecen evidenciar diferencias entre las especies en la respuesta a las dosis aplicadas, no obstante a que el análisis de varianza niega esta posibilidad.

En el otro bioensayo, los resultados sobre *An. braziliensis* son muy buenos durante las dos primeras semanas, manteniéndose en 100% de reducción en este lapso, para luego desplomarse en forma abrupta, lo cual dificulta la interpretación de los resultados. Una de las causas de este comportamiento, puede ser la baja densidad de larvas de anofelinos en los criaderos, tal como ha sido descrito previamente para esta zona por Moreno *et al.* (2000), lo cual puede causar sesgo en el muestreo. Por esta razón, una alternativa para la interpretación de los resultados puede ser la observación de la densidad relativa de larvas, es decir, la densidad antes y después de la aplicación del producto. A pesar de ello, los resultados son importantes debido a que es la primera vez que se evalúa este producto sobre esta especie en Venezuela. Por otro lado, es necesario seguir evaluando la eficacia del biolarvicida sobre *An. braziliensis*, teniendo en cuenta que esta especie ha sido señalada como vectora de malaria en la región de sabanas altas del país (Osborn *et al.*, 2006)

El análisis de varianza, provee de una herramienta muy útil que permite el examen detallado de los resultados y la comparación exhaustiva del efecto de los tratamientos sobre las diferentes especies de anofelinos no siempre evidentes en los gráficos de persistencia. En este caso, los resultados del análisis no revelaron interacciones significativas entre las dosis y las especies, lo cual significa que no hay evidencia suficiente para señalar una respuesta diferencial de las especies de mosquitos a las diferentes dosis aplicadas, que sugiera la existencia de susceptibilidad específica al biolarvicida. No obstante, se considera que este es un aspecto a seguir siendo investigado.

Más allá de los resultados alcanzados en los bioensayos, hay varios aspectos positivos que destacan en los experimentos realizados. El primer bioensayo, permite establecer una persistencia de alrededor de 28 días con recuperación de la eficacia a los 45 días para *An. marajoara* con ambas dosis, y de 90 días por encima de 80% para *An. triannulatus* con 3 gr/m², lo cual es excelente, siendo en ambos casos igualmente efectivo, lo que es muy importante si se tiene en cuenta que *An. marajoara* es un vector importante de malaria en esta área (Moreno *et al.*, 2007). Resultados muy similares, de mas o menos 28 días de persistencia, fueron obtenidos con esta misma formulación del producto por Berti *et al.* (2002) aplicado contra *An. aquasalis* en el estado Sucre a las mismas concentraciones. A diferencia de este trabajo, ellos solo obtuvieron efectividad de 100% solo hasta el día 4, mientras que en nuestro caso se mantuvo hasta el día 7 con ambas especies. Igualmente, en otro trabajo Berti & González (2004) obtuvieron reducción larval superior al 80% durante 24 días, sobre *An. aquasalis* en Sucre, pero con la formulación WDG a 51% de Vectolex, que es una formulación de una concentración de ingrediente activo mucho más elevada que ésta. A la luz de estos resultados, los nuestros pueden ser considerados muy buenos.

En el caso de *An. braziliensis*, los resultados son mas modestos, se alcanzó una persistencia de 21 días de alrededor de 60%, no obstante, destaca en esta especie la persistencia de 100% alcanzada hasta el día 14 en el herbazal, resultado similar al obtenido para *An. triannulatus* en el mismo, lo que sugiere diferencias notables en la efectividad del producto de acuerdo al tipo de criadero.

Por ultimo, además de los resultados prometedores para el control de vectores alcanzados,

hay que destacar el hecho de que es la primera vez que este producto se evalúa sobre especies estas especies de anofelinos, y es la primera vez que se evalúan biolarvicidas en esta área endémica, lo que constituye un paso fundamental en el diseño e implementación de nuevas estrategias de control de malaria en ese foco y abre nuevas expectativas en la lucha contra esta enfermedad en esta región del país.

AGRADECIMIENTOS

Al personal administrativo y gerencial de la Dirección de Salud Ambiental del Estado Bolívar por el apoyo logístico recibido durante todas las fases de ejecución del proyecto y a las personas en el campo quienes permitieron la realización de los experimentos en sus propiedades. Este proyecto fue financiado por Fonacit bajo el contrato N° 2002000410.

Evaluation of the persistence of a commercial formulation of *Bacillus sphaericus* in malaria vectors anopheline larval habitats in Bolívar state, Venezuela

SUMMARY

Sifontes municipality in Bolivar state is the main malaria endemic area in Venezuela. During the last five years an annual average of 14,000 cases has been reported, reaching 13,450 during 2008, resulting in an epidemic situation. A commercial formulation of *Bacillus sphaericus* Neide (Vectolex CG 7.5%), was evaluated in larval habitats of *Anopheles marajoara*, *An. triannulatus* and *An. braziliensis*. Two experiments were carried out in a lagoon and a pasture inundated area, 2 and 3 gr/m² doses were evaluated during 60 and 90 days. The results point out that there are differences in the persistence depending on the type of larval habitat and anopheline species. The general trend indicated that for all the species the persistence of the Vectolex, therefore the reduction of the larval population was 100% during the first week. However, it fell under 40% after day 28, then recovered by day 45, and remaining around 40% for 90 days with both doses. A similar pattern was observed for *An. marajoara*, whereas for *An. triannulatus* the efficacy remained around 80% during 90 days only at 3 gr/m². With *An. braziliensis* there was 100% persistence until day 14 with both doses, for then fell abruptly without recovering. This is the first time that *B. sphaericus* was evaluated for these anopheline species in Venezuela, considering these results promissory for the malaria control program.

Key words: *Bacillus sphaericus*, persistence, malaria, vectors, Venezuela.

REFERENCIAS

- Aché R. A. (1998). Situación actual de la malaria en Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **38**: 68-72.
- Berti J. & Zimmerman R. (1998). Métodos para el control integrado de los vectores de la malaria en Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **37**: 123-136.
- Berti M. J. & Gonzáles J. E. (2004). Evaluación de la efectividad y persistencia de una nueva formulación de *Bacillus sphaericus* contra larvas de *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae) en criaderos naturales del estado Sucre, Venezuela. *Bol. Malariol. Sal. Amb.* **44**: 21-27.
- Berti M. J., Ramirez X., Gonzales J. E. & 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. *Entomotopica.* **17**: 1-5.
- Des Rochers B. & García R. (1984). Evidence for persistence and recycling of *Bacillus sphaericus*. *Mosquito News.* **44**: 160-165.
- Faran M. E. & Linthicum K. J. (1981). A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematic.* **13**: 1-81.
- Hernandez Grillet R. (1987). *Geografía del estado Bolívar*. Academia Nacional de la Historia, CVG Siderúrgica del Orinoco, C.A. Italgráfica, S.R.L. Caracas, Venezuela.
- Molina de F. D., Saume R. F., Bisset J. *et al.*, (1997). Establecimiento de la línea de susceptibilidad de la fase adulta de *Anopheles* spp. a insecticidas químicos. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **37**: 55-69.
- Moreno J., Rubio-Palis Y., Acevedo P. (2000). Identificación de criaderos de anofelinos en un área endémica del estado Bolívar, Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **40**: 21-30.
- Moreno J., Rubio-Palis Y., Sánchez V. & Mariany D. (2004). Primer registro de *Anopheles*

- (*Nyssorhynchus*) *nuneztovari* Gabaldon, 1940 (Díptera: Culicidae) en el estado Bolívar, Venezuela y sus implicaciones eco-epidemiológicas. *Entomotropica*. **19**: 55-58.
- Moreno J., Rubio-Palis Y., Paez E., Perez E. & Sanchez V. (2007). Abundance, biting behavior and parous rate of anopheline mosquito species in relation to malaria incidence in gold-mining areas in southern Venezuela. *Med. Vet. Entomol.* **21**: 339-349.
- Mulla M., Norland R., Fanara D., Darwazeh H. & Mekean D. (1971). Control of chironomid midges in recreational lakes. *J. Econ. Entomol.* **64**: 300-307.
- Mulla M. S., Axelrod H., Darwazeh H. A. & Matanmi B. A. (1988). Efficacy and longevity of *Bacillus sphaericus* 2362 formulations for control of mosquito larvae in dairy wastewater lagoons. *J. Am. Mosq. Cont. Assoc.* **4**: 448-452.
- Navarro C. J. C. (1996). Actualización taxonómica de la tribu Anophelini de Venezuela, con nueva clave para la identificación de larvas de 4to estadio. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **35**: 25-43.
- OPS (1999). *Informe de la situación de los programas de malaria en las Américas* (Organización Panamericana de la Salud). 41° Concejo Directivo, CD41/INF/1. Washington, D.C.
- Pacheco M., Villegas L., Páez E. & Moreno J. (2001). Re-emergencia de *Plasmodium malariae* en el estado Bolívar. *Bol. Vzlanol. Infectol.* **11**: 5
- Osborn F. R., Rubio-Palis Y., Herrera M., Figuera A. & Moreno J. E. (2004). Caracterización ecoregional de los vectores de malaria en Venezuela. *Bol. Malariol. Sal. Amb.* **44**: 77-92.
- Rodriguez A. R. (1999). *Conservación de humedales de Venezuela. Inventario, diagnóstico ambiental y estrategia*. Comité Venezolano de la UICN. Caracas, Venezuela.
- Rubio-Palis Y. & Zimmerman R. H. (1997). Ecoregional classification of malaria vectors in the neotropics. *J. Med. Entomol.* **34**: 499-510.
- WHO (2005). *Draft. Guideline for laboratory and field testing of mosquito larvicides* (World Health Organization). WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13, Geneva.

Recibido el 13/12/2009
Aceptado el 10/05/2010

Toxicidad por insecticidas organofosforados en fumigadores de Campaña contra el Dengue, estado Aragua, Venezuela, año 2008

María José Gómez F. & José Luis Cáceres G.

Un estudio descriptivo sobre las condiciones de salud y su relación con la exposición a plaguicidas, de los "fumigadores" de la campaña contra el dengue en el estado Aragua, fue realizado en una muestra no probabilística de 50 trabajadores, a los cuales se les aplicó una encuesta para investigar: características personales y de trabajo, conocimientos sobre insecticidas y enfermedades asociadas, además de inspeccionar locales, equipos y condiciones de trabajo. De la muestra general, 28% resultaron fumadores. Los grados de instrucción predominantes fueron primaria y secundaria (44%). El promedio de años como fumigador fue de 14,3. Sólo 40% tiene conocimiento de enfermedades producidas por organofosforados, 62% presentó antecedentes de intoxicación. 30% refirieron presentar enfermedades cardiovasculares, gastrointestinales y neurológicas. A mayor cantidad de años de labor, mayor la intensidad de signos y síntomas llegando a producir enfermedades. 38% de los niveles de Acetilcolinesterasa medidos, resultaron alterados. Las variables: grupo de edad, grado de instrucción, fumar, años de labor, falta de conocimiento de enfermedades y antecedentes de intoxicación, se asociaron a valores anormales de colinesterasa, sin presentar significancia estadística ($P>0,05$). La selección de los trabajadores, su capacitación, dotación de equipos y materiales adecuados, su vigilancia clínica epidemiológica, su evaluación permanente y su respectivo tratamiento deben ser revisados y tenidos en cuenta por la Corporación de Salud del estado Aragua (CORPOSALUD), haciéndolas, normas de obligatorio cumplimiento.

Palabras clave: Toxicidad, Insecticida organofosforado, fumigadores.

INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas sintéticos surgen entre 1930 y 1940 como resultado de investigaciones enfocadas al desarrollo de armas químicas que originalmente fueron probadas en insectos. El Dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), sintetizado en 1874, se utilizó por primera vez durante la segunda Guerra Mundial para proteger a los soldados estadounidenses contra enfermedades transmitidas por vectores (OMS, 1990). En Venezuela su uso se inicia el 2 de diciembre de 1945, como parte del programa de lucha contra la malaria (VII Congreso Salud Pública, 1986).

Desde hace varias décadas los insecticidas son utilizados ampliamente para proteger las cosechas

de los daños provocados por plagas, así como para mantener los ambientes urbanos libres de insectos, que en muchos casos pueden actuar como vectores transmisores de enfermedades, tanto humanas como animales (Sogorb-Sanchez *et al.*, 2004).

La industrialización, los intereses económicos de los grandes productores de plaguicidas, así como la necesidad de controlar químicamente las plagas, favoreció su fabricación y consumo a escala mundial y originó, a su vez, una carrera incesante en la búsqueda de compuestos análogos menos tóxicos al ser humano y más efectivos y selectivos con las plagas. Sin embargo, al paso de los años se hicieron evidentes los efectos indeseables de los plaguicidas sobre la salud del ser humano y sobre el medio ambiente. Independientemente de sus beneficios, los plaguicidas son sustancias químicas deliberadamente tóxicas, creadas para interferir algún sistema biológico en particular y que carecen de selectividad real (OMS, 1993).

Universidad de Carabobo, Sede Aragua. Venezuela.

*Autor de correspondencia: jolucag@cantv.net.ve

Debido a su toxicidad intrínseca, mas no a su selectividad, los plaguicidas pueden poner en riesgo el medio ambiente, organismos no blanco (Auteri *et al.*, 1999) y causar lesiones agudas y crónicas en la salud humana (Al Saleh, 1994).

El difundido uso de plaguicidas organofosforados para el control de plagas en el ámbito doméstico, agrícola y veterinario contribuye a su disponibilidad (Pose *et al.*, 2000) y actualmente, miles de productos se comercializan en todo el mundo, sin que sus efectos nocivos sean obstáculos que limiten su producción (Ramírez & Lacasaña, 2001).

Los organofosforados son los insecticidas más utilizados para el control de plagas en los cultivos tanto a nivel internacional como en Venezuela, y junto con los carbamatos, son los más frecuentemente involucrados en intoxicaciones en todo el mundo. (Visentín & Fait, 2002; García, 1998; Silva *et al.*, 2000; Córdoba, 2001). Los dos, son agentes inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, lo cual da origen a la acumulación de acetilcolina, siendo este mecanismo el responsable de la toxicidad aguda de estos insecticidas (Mármol-Maneiro, 2003). El uso de los plaguicidas organofosforados en Venezuela se ha extendido desde hace tres décadas, a partir de la prohibición del uso de los plaguicidas organoclorados, por tener alta persistencia en el ambiente y ser extremadamente tóxicos (Picó *et al.*, 1994).

Considerando su acelerado uso en las últimas décadas, debido al repunte de enfermedades endémicas como dengue, cólera y malaria y además la inexistencia o poca protección de los trabajadores que los manejan, estas sustancias se han convertido en un gran problema de salud pública con alta probabilidad de ocasionar intoxicaciones agudas y efectos a largo plazo (Mármol-Maneiro, 2003).

Una forma práctica de determinar, evaluar y controlar el riesgo de exposición a plaguicidas en estos trabajadores, es mediante lo que se conoce como monitoreo biológico de exposición. En el caso particular de los plaguicidas organofosforados y carbamatos, la prueba más sencilla, rápida y confiable a aplicar es la determinación sanguínea de la actividad colinesterásica, ya que dichos productos químicos tienen reconocida acción inhibitoria sobre esta enzima (Ibarra *et al.*, 2002). La disminución de su actividad en sangre, puede ser usada como un marcador de la

exposición a estos agentes, y se utiliza como vigilancia biológica sistemática (Mármol-Maneiro, 2003).

Dada la reaparición del dengue en el estado Aragua en 1989, su posterior endemidad, y la presión ejercida sobre el vector mediante nebulización de organofosforados, resulta de gran importancia el estudio de las condiciones de salud de los “fumigadores” de la campaña contra el dengue, adscritos a la Corporación de Salud del estado Aragua (Corposalud Aragua), Venezuela, y su relación con la exposición a plaguicidas, determinando su posible toxicidad a través del estudio de la enzima acetilcolinesterasa eritrocitaria y a su vez, aportar datos relevantes en el ámbito de la toxicología y la salud ocupacional en el estado.

METODOLOGÍA

Fue realizado un estudio descriptivo a trabajadores de la campaña contra el dengue en el estado Aragua, durante el año 2008, cuyos criterios de inclusión fueron: ser fumigador, chofer de equipo pesado para fumigación o Inspector de Salud Pública de Corposalud Aragua, y estar en contacto directo con el insecticida utilizado.

De un universo de setenta y ocho (78) personas activas en el programa, se aceptó una muestra no probabilística de cincuenta participantes en el estudio, de los municipios: Girardot, Francisco Linares Alcántara, Mario Briceño Iragorri, Sucre, Zamora, Santos Michelena y Mariño. Se les informó ampliamente sobre los objetivos de la investigación y los beneficios derivados del estudio y se obtuvo el consentimiento informado de cada uno de ellos, haciendo énfasis en la confidencialidad de los datos, el derecho a la intimidad y la privacidad. Se aplicó una encuesta validada por tres (3) expertos y estructurada de la siguiente forma: identificación del participante (nombre, edad, género, dirección), hábito tabáquico, grado de instrucción, cargo desempeñado, años de labor, horas de exposición, capacitación sobre el uso de insecticidas, conocimientos sobre los plaguicidas usados, equipos de protección, conocimientos sobre enfermedades agudas y crónicas producidas por el uso indebido de plaguicidas y presencia de antecedentes de intoxicación.

La actividad colinesterásica fue medida por la Unidad de Toxicología Regional de CORPOSALUD

Aragua, como parte del chequeo normativo semestral del programa al personal de fumigadores, mediante el Método de Michel, basado en una técnica potenciométrica que mide eléctricamente la cantidad de ácido según el cambio de pH producido por la acción de la enzima en una solución tampón estándar durante un tiempo determinado. Se usó potenciómetro Metrohm. La unidad que emplea es delta de pH/hora, cuyos valores referenciales son: 0,857 pH/hora (Michel, 1949).

Además fueron inspeccionados los locales, condiciones de trabajo, equipos de protección y otros aspectos para hacer una evaluación global de la situación laboral de los trabajadores. El procesamiento de los datos fue realizado a través del programa Epi-Info 6,04, en análisis univariado o bivariado. Se aplicó la prueba χ^2 , para evaluar las diferencias de frecuencia de niveles de colinesterasa eritrocitaria con relación al tiempo de exposición al plaguicida, grado de instrucción, y enfermedades asociadas, determinando las asociaciones mediante análisis de Odds Ratio.

RESULTADOS

Cincuenta trabajadores pertenecientes a Corposalud Aragua y quienes desarrollaron labores de inspección y fumigación de insecticida organofosforado, en la campaña contra el dengue durante el año 2008, fueron estudiados en búsqueda de morbilidad por exposición a dicho insecticida.

De los participantes, 49 (98%) fueron hombres y una mujer (2%). Sus edades estuvieron comprendidas entre los 23 y 66 años, para un promedio de 45,3 años. De la muestra general, 28% resultaron fumadores. Los grados de educación predominante fueron primaria y secundaria, ambos con 44% de frecuencia. Entre los cargos desempeñados por los trabajadores expuestos directamente al insecticida organofosforado se encontraron: fumigadores (78%), chofer de equipo pesado de nebulización (12%) e Inspector de salud pública (10%). El promedio de años como fumigador fue de 14,3. Los grupos de trabajo y exposición más frecuentes fueron los de 0 a 4 y 15 a 19 años (24%). En promedio, los fumigadores presentaron una exposición ante el insecticida, de 6 horas diarias. 58% respondió afirmativamente en cuanto a la participación en cursos de capacitación sobre el uso y manipulación de plaguicidas organofosforados antes de iniciar el contacto, con los mismos.

Sólo cuarenta por ciento de los trabajadores indicó tener conocimiento de enfermedades agudas y crónicas producidas por el uso indebido del plaguicida organofosforado, 62% presentó algún antecedente de intoxicación (cefalea, irritación de piel y ojos, debilidad, problemas neuroconductuales, depresión y ansiedad, mareos, náuseas, rinitis, problemas de sueño y anorexia).

De los fumigadores que afirmaron presentar antecedentes, 37% expresaron síntomas específicos, como: irritación de piel y mucosas, disnea y convulsiones. Treinta y tres por ciento reveló síntomas leves, como: mareos, debilidad o astenia, cefalea y vómitos. Treinta por ciento refirieron presentar enfermedades cardiovasculares, gastrointestinales, y neurológicas, representada esta última proporción por: hipertensión arterial 40%, úlcera gástrica 20% y hernias lumbares 40%.

Se observó que el rango de años de labor más frecuente en los síntomas leves y específicos fue entre 10 y 19 años, mientras que las enfermedades asociadas que presentaron los fumigadores se encontraron en el grupo de 20 a 29 años de labor. A mayor cantidad de años de labor, mayor es la intensidad de los signos y síntomas de intoxicación llegando a producir enfermedades.

En cuanto a los niveles de Acetilcolinesterasa medidos por la Unidad de Toxicología, 38% resultaron alterados. Al asociar los años de labor con los niveles de colinesterasa, encontramos que aquellos fumigadores con más de 5 años de actividades, representan un factor predisponente de intoxicación aunque no estadísticamente significativo, observándose 19% más de probabilidad de poseer valores alterados de colinesterasa que los de menos de cinco años de labor (OR: 1,19, IC: 0,32 – 4,34, $P>0,05$). La falta de conocimiento de enfermedades agudas y crónicas se asocia también a valores anormales de colinesterasa, encontrando que el mismo es un factor predisponente para los fumigadores, ya que representa 2,63 veces más probabilidad de encontrar valores anormales, pero estadísticamente no significativo (OR: 2,63, IC: 0,65 – 10,99, $P>0,05$). Otras variables como: pertenecer al grupo de edad entre 50 y 59 años (OR: 1,23, IC: 0,31 – 4,78, $P>0,05$), grado de instrucción primaria (OR: 3,01, IC: 0,72 – 13,21, $P>0,05$), fumar (OR: 3,03, IC: 0,67 – 14,25, $P>0,05$) y antecedentes de intoxicación (OR: 0,53, IC: 0,14 – 2,00, $P>0,05$) resultaron no significativas.

DISCUSIÓN

La toxicidad de los trabajadores de la campaña antidengue en el estado Aragua, por insecticida organofosforado, fue determinada a través de la enzima acetilcolinesterasa eritrocitaria, arrojando que 38% del personal presentó cifras alteradas. Este valor es considerado alto si se le compara con trabajos similares.

En un estudio realizado en siete Departamentos colombianos entre 1998-2001, donde se evaluó epidemiológicamente la exposición a plaguicidas organofosforados, y cuyo objetivo fue determinar la actividad de la acetilcolinesterasa en trabajadores con riesgo de exposición a plaguicidas aplicados en los cultivos agrícolas, fueron realizados 25.356 pruebas de acetilcolinesterasa, de las cuales, 7,6% mostraron resultados anormales (Cárdenas *et al.*, 2005).

En La Habana, Cuba, durante los meses de enero a marzo de 2002 se realizó un estudio de los niveles de la actividad colinesterásica (ACE) en sangre total en 243 fumigadores de la campaña masiva contra el mosquito *Aedes aegypti*. La investigación persiguió como objetivo principal; conocer, controlar y prevenir la exposición de esos trabajadores a los plaguicidas inhibidores de la ACE utilizados en la fumigación. Los resultados de las determinaciones practicadas reflejaron que 18,5 % de los fumigadores presentaban disminución significativa de ACE (Ibarra *et al.*, 2002).

En la Facultad de Bromatología de la Universidad Nacional de Entre Ríos Argentina, en el año 2000, se realizó un estudio, cuyos objetivos fueron comparar las Colinesterasas sérica y eritrocitaria en personas expuestas laboralmente a insecticidas organofosforados como medida de la intensidad de exposición a dichos plaguicidas, y evaluar mediante un interrogatorio diferentes aspectos relacionados con el uso de plaguicidas, que pudieran significar riesgo para la salud del operador. Fue medida la actividad enzimática de la Colinesterasa de 32 personas expuestas laboralmente a plaguicidas organofosforados, como medida de la intensidad de exposición a insecticidas inhibidores de las mismas. 21,9% de los operarios presentaron diferentes grados de inhibición en una o ambas Colinesterasas e inclusive algunos de ellos con claros síntomas de exposición elevada a dichos insecticidas (Goldaracena *et al.*, 2000).

En un estudio realizado en Honduras en el año 2001 sobre niveles de colinesterasa sérica y sintomatología observada en obreros que trabajaban con insecticidas organofosforados, cuyo objetivo general fue conocer la exposición de la población hondureña urbana y rural a los plaguicidas y su efecto sobre la salud ocupacional de los trabajadores, para luego contribuir a la implementación de medidas de prevención, se obtuvieron muestras de sangre por punción venosa de 140 hombres y 12 mujeres. Analizado globalmente, 11,6% de la población control estudiada mostró niveles anormalmente bajos de colinesterasa sérica; correspondiendo 3,6% a los varones y 8% a las mujeres (Sierra *et al.*, 2001).

Aunque no se demostró significación estadística, el estudio observó que a mayor cantidad de años de labor, mayor era la intensidad de los signos y síntomas de intoxicación llegando a producir enfermedades.

Este tipo de resultado tuvo evidencia significativa en un área agrícola del Estado de Río de Janeiro, Brasil, en el año 2004, donde se llevó a cabo un estudio de Monitoreo Biológico y Evaluación Clínica de trabajadores fumigadores de Pesticida Expuestos a Organofosforados. Se obtuvo al mismo tiempo muestras de orina y sangre, en la mañana después de un turno normal de fumigación. Se realizó evaluación clínica para identificar signos y síntomas importantes de intoxicación relacionados con exposición a organofosforados. Con respecto a la acetilcolinesterasa eritrocitaria, los resultados mostraron asociaciones sin significación estadística ($P>0,05$) en el grupo de categoría baja, al compararlo con el grupo de categoría normal en las siguientes situaciones: actividad de aplicar o mezclar pesticidas (OR=3,12), más de 3 horas de turno de trabajo aplicando pesticidas (OR=2,43), uso de organofosforado (OR=3,39), insomnio (OR=2,47), e indicios de fasciculación muscular (OR=2,48) (Lima, 2004).

Cuando comparamos la sintomatología característica por inactivación de colinesterasa, al igual que el estudio realizado sobre el impacto de las fumigaciones ejecutadas en el departamento Putumayo dentro del Plan Colombia en el 2002, se observó; cefalea, mareos, náuseas, epigastralgia, debilidad, vómitos, disnea e irritación en piel y mucosas. En Ecuador, en octubre de 2002, se realizó un estudio sobre los Impactos de las fumigaciones ejecutadas en

el Departamento Putumayo dentro del Plan Colombia, cuyo objetivo principal fue verificar las afectaciones en poblaciones de Colombia y Ecuador. Los análisis médicos practicados, permitieron relacionar la sintomatología descrita por la población con la que se produce por inactivación de la colinesterasa, observando una sobre estimulación del Sistema Nervioso Central, causando a su vez: dolor de cabeza, mareos, náuseas, vómitos, dolor abdominal y debilidad. A estos síntomas les acompañan otros que son más específicos del Round Up Ultra, caracterizado por ser fuertemente irritante de ojos y piel (Maldonado *et al.*, 2002).

En Honduras, en el año 2001, los síntomas más observados comprendieron: cefalea, problemas oculares, debilidad, problemas neuro conductuales, depresión y ansiedad, mareos, náuseas, rinitis, problemas de sueño y anorexia; el resto de los síntomas se relacionaron a estimulación de receptores muscarínicos o nicotínicos centrales o periféricos (Sierra *et al.*, 2001).

Además, en el estudio fueron evaluadas las asociaciones de variables como: el hábito de fumar, horas de exposición, años de labor, equipos de protección, curso de capacitación y antecedentes de exposición a organofosforado, con los niveles de colinesterasa, intentando conseguir la causa del descenso de estos niveles, no encontrando asociación. Este hallazgo resulta interesante puesto que nos indicaría contaminación ambiental, probablemente por uso casero, sanitario, agroindustrial o sencillamente que los valores de referencia de la colinesterasa puedan variar.

Henao & Corey (1991) investigaron en Colombia, mediante la técnica Lovibond, que utiliza sangre completa para la medición, dos muestras representativas de sendas poblaciones laborales sin exposición a estos plaguicidas, una en el Valle de Aburrá (415 personas) y la otra en el Oriente (412 personas). En ambos casos, los valores hallados difirieron considerablemente de los utilizados como referencia en Colombia, que han sido tomados de estudios realizados en países con características poblacionales muy diferentes y obtenidas en grupos no representativos de la población.

No obstante existen numerosas situaciones que pueden disminuir los niveles de acetilcolinesterasa

sérica incluyendo factores genéticos. La importancia de contar con valores autóctonos fue reforzada a partir de 1990, cuando se descubrió el polimorfismo de delección-inserción del gen de la colinesterasa y se encontró una asociación entre los genotipos de este polimorfismo y los niveles séricos de la enzima. Así, las personas homocigóticas para el alelo con la delección tienen concentraciones plasmáticas mayores que las homocigóticas para el alelo con la inserción, mientras que las heterocigóticas poseen valores intermedios. La fuerza de esta influencia varía en poblaciones de diferente origen étnico (Ruprecht *et al.*, 2001).

Además de las variaciones normales de índole genética, como las antes referidas, los niveles de esta enzima pueden verse afectados por variantes genéticas disfuncionales, por la disminución de su biosíntesis y por la exposición a inhibidores enzimáticos como lo son los insecticidas organofosforado (Morton, 1998).

Sin embargo, lo que se recomienda universalmente en el presente es que a cada trabajador se le realice previamente, antes de ser sometido por primera vez a la exposición, la prueba correspondiente, y que su cifra le sirva como valor de base o de referencia individual (Stellman, 1998), de tal forma, el trabajador se considerará sobreexposto y, por consiguiente, en riesgo de intoxicación, cuando las cifras de su actividad enzimática sean menores que el equivalente a 70 % de su valor de base. Cuando se sospecha la exposición a organofosforados y carbamatos, un resultado dentro de los rangos normales de actividad, y en ausencia de valores de AChE basales, no es suficiente para diagnosticar ausencia de intoxicación (López-Carrillo & López-Cervantes, 1993).

Por otra parte, en las instalaciones municipales donde se mantienen los insecticidas, se pudo comprobar que los mismos se encuentran en sus respectivos envases debidamente sellados hasta el momento de su apertura y mezcla. Tanto en la bodega como en la sección que utiliza el personal para reunirse, comer, vestirse, etc., las condiciones de limpieza son regulares. Se observó insecticida regado por el suelo en algunos espacios. La limpieza se hace con una escoba, lo cual aumenta la contaminación especialmente porque son lugares estrechos, con poca ventilación y sin extractor de aire. Hay un baño para que los trabajadores, principalmente los que pesan el insecticida, se bañen después de la jornada de trabajo, lo cual no es obligatorio, observándose que casi nunca lo utilizan. La

forma adecuada de usar el insecticida, las precauciones en el trabajo, conocimientos sobre los tóxicos, sólo se les explica al momento de empezar a trabajar con dicha institución.

Por ello, es importante concluir sobre el riesgo presente en los fumigadores de la Corporación de Salud del estado Aragua, los cuales en sus labores: pesan y transfieren insecticidas manualmente, cumplen labores entre seis y ocho horas diarias, la mayoría trabaja con su propia ropa, aunque CORPOSALUD les proporciona mientras están en servicio; guantes, mascarillas, bragas, gorras, botas de seguridad, los cuales no usan con regularidad por resultarles incómodos. También se pudo constatar, que no se efectúa ninguna selección especial de los trabajadores para esta tarea, no se les realiza examen pre-ocupacional ni médico, por lo que se ignora si padecen patologías que contraindiquen dicha tarea. Tampoco son realizados exámenes de Colinesterasa al ingresar el trabajador; pero sí una o dos veces al año, aunque, si el laboratorio se encuentra fuera de labores, no lo realizan.

Se hace de suma importancia, profundizar sobre los efectos que los plaguicidas del grupo organofosforado producen en los trabajadores expuestos directamente a los mismos por razones laborales. La selección de los trabajadores, su capacitación, dotación de equipos y materiales adecuados, su vigilancia clínica epidemiológica, su evaluación permanente y su respectivo tratamiento, deben ser revisados y tenidos en cuenta por CORPOSALUD, haciéndolas normas de obligatorio cumplimiento.

Toxicity by organophosphate insecticides of fumigators working on the dengue control campaign in Aragua state, Venezuela, 2008

SUMMARY

A descriptive study on the conditions of health and their relation to the exhibition to pesticides, and of the “fumigators” of the campaign against dengue in the Aragua state, sampled 50 workers, to whom a survey was applied to investigate: personal characteristics of work, knowledge on insecticides and diseases, besides an inspection the premises, equipment and work environment. From this general sample 28% were smokers. The predominant educational level was elementary school and high school (44%). The fumigator average of working years was of 14.3.

Only 40% had knowledge of diseases produced by organophosphate, 62% presented poisoning antecedents. 30% claimed to display cardiovascular, gastrointestinal and neurological diseases. The greater the number of work years, the greater the intensity of signs and symptoms of associated diseases. 38% of the measured levels of acetylcholinesterase were altered. The variables: smoking, years of work, educational level, age group and the lack of knowledge of diseases and intoxication antecedents were associated with abnormal values of acetylcholinesterase, without showing statistical significance. The selection of the workers, their qualification and suitable equipment and materials, their clinical epidemiologic monitoring, their permanent evaluation and respective treatment must be reviewed and taken into account by CORPOSALUD (Corporación de Salud del estado Aragua), making them norms of obligatory fulfillment.

Key words: Toxicity, Organophosphate Insecticide, fumigator.

REFERENCIAS

- Al-Saleh I. A. (1994). Pesticides: a review article. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **13**: 151-161.
- Auteri D. & Mammone T. (1999). Pestigis: sistema de decisión de apoyo para la valoración del impacto ambiental de plaguicidas en Lombardía, Italia. *Boletín Técnico.* **2**: 2-7.
- Cárdenas O., Silva E., Morales L. & Ortiz J. (2005). Estudio epidemiológico de la exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos en siete departamentos colombianos, 1998-2001. *Biomédica.* **25**: 170-180.
- Córdoba P. (2001). *Toxicología manual moderno*. 4ta edición. Bogotá – Colombia. Editorial ISBM 958-9446-16-17.
- García J. E. (1998). Intoxicaciones agudas con plaguicidas: costos humanos y económicos. *Rev. Panam. Salud Pública.* **4**: 383-387.
- Goldaracena C. (2001). Valores referenciales de colinesterasa sérica y eritrocitaria para una población clínicamente sana de la ciudad de Gualeguaychú. *Acta Toxicol. Argent.* **9**: 46-56.

- Henao S. & Corey G. (1991). *Plaguicidas inhibidores de las colinesterasas*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. OPS/OMS. Serie Vigilancia 11. Metepec, México.
- Ibarra E. J., González A., Díaz H., Jaime A., González R. M., Guevara T., *et al.* (2002). Exposición a plaguicidas inhibidores de la colinesterasa en fumigadores de la campaña anti *Aedes aegypti* en la ciudad de La Habana de enero a marzo de 2002. *Rev. Cub. Salud Trab.* **3**: 51-54.
- Lima J. (2004). Monitoreo biológico y evaluación clínica de trabajadores fumigadores de pesticida expuestos a organofosforados en un área agrícola del estado de Río de Janeiro, Brasil. *Revista Ciencia & Trabajo.* **6**: 112-123
- Lopez-Carrillo L. & Lopez-Cervantes M. (1993). Effect of exposure to organophosphate pesticides on serum cholinesterase levels. *Arch. Environ. Health.* **48**: 359-363.
- Maldonado A., Gallardo L., Alvarez T., Chiriboga G., Moscoso R., Monge E., *et al.* (2002). Impactos en Ecuador de las fumigaciones realizadas en el Putumayo dentro del Plan Colombia. Disponible en <http://www.ciponline.org/colombia/0210ecfu.pdf>. (Consultado: 2009, Septiembre 08).
- Mármol-Maneiro L., Fernández-D'Pool J., Sánchez B. & Sirit Y. (2003). Perfil seminal en trabajadores expuestos a plaguicidas inhibidores de la colinesterasa. *Invest. Clin.* **44**: 105-117.
- Michel H. O. (1949). An electrometric method for determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. *J. Lab. Clin. Med.* **34**: 1564-1568.
- Morton F. (1988). Detection of cholinesterase inhibition. The significance of cholinesterase measurements. *Ann. Clin. Lab. Sc.* **18**: 345-352.
- OMS (1990). *Plaguicidas organoclorados*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Serie Vigilancia, 9. México.
- OMS (1993). *Plaguicidas y salud en las Américas*. División Salud y Ambiente. Washington.
- Picó Y., J. C. Moltó M. Redondo E. Viana, J. Manes & G. Font. (1994). Monitoring of the pesticide levels in natural waters of Valencia Community (Spain). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **53**: 230-237.
- Pose D., De Ben E., Delfino N. & Burger M. (2000). Intoxicación aguda por organofosforados. Factores de riesgo. *Rev. Med. Uruguay.* **16**: 5-13.
- Ramírez J. A. & Lacasaña M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch. Prev. Riesgos Labor.* **4**: 67-75.
- Ruprecht B., Schurmann M., Ziegenhagen M. W., vom Bauer E., Meier D., Schlaak M. *et al.* (2001). Corrected normal values for serum ACE by genotyping the deletion/insertion-polymorphism of the ACE gene. *Pneumologie.* **55**: 326-332.
- Silva E., Morales L. & Ortiz J. (2000). Evaluación epidemiológica de plaguicidas inhibidores de acetilcolinesterasa en Colombia, 1996-1997. *Biomédica.* **20**: 200-211.
- Sogorb-Sanchez M. A., Vilanova-Gisbert E. & Carrera-Gonzalez V. (2004). Nuevas perspectivas en los tratamientos de intoxicaciones por insecticidas organofosforados y agentes nerviosos de guerra. *Rev. Neurol.* **39**: 739-747.
- Stellman J. M. (1998). *Encyclopaedia of occupational health and safety*. 4th ed. Geneva. International Labour Office.
- Sierra A., Padilla G. & Cambar P. (2001). Niveles de colinesterasa sérica y sintomatología observados en obreros que trabajan con insecticidas organofosforados. Honduras. *Biblioteca Virtual de Salud.* **54**: 1986-1993.
- Visentin S., Fait A. (2002). El proyecto IPCS/OMS sobre vigilancia epidemiológica en las intoxicaciones agudas por plaguicidas. *Boletín Técnico.* **5**: 1-14.
- VII Congreso Venezolano de Salud Pública. (1986). Tomo II, M.S.A.S. Oficina de Publicaciones, Caracas.

Recibido el 27/12/2009
Aceptado el 10/04/2010

Aspectos clínicos, epidemiológicos y de tratamiento de cinco casos de envenenamiento por erizos de mar en Adícora, península de Paraguaná, estado Falcón, Venezuela

Dalmiro Cazorla*¹, Jesús Loyo², Lusneida Lugo² & María Acosta¹

Se realizó un estudio descriptivo y prospectivo para analizar aspectos clínicos, epidemiológicos y de tratamiento de los envenenamientos ocasionados por erizos de mar (Equinodermata) en Adícora, Península de Paraguaná, estado Falcón, Venezuela. Entre Diciembre 2006 y Diciembre de 2007, se atendieron los pacientes que se presentaron en la emergencia ambulatoria por heridas de erizos de mar. Se hizo evaluación clínica e interrogatorio. El tratamiento consistió de aplicación tópica de solución antiséptica yodada; anestésico local, analgésico antiinflamatorio endovenoso, antibiótico terapia *per os* y toxoide tetánico. Se registró 1 (20%) individuo herido por *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) y 4 (80%) por *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758), todos los casos eran turistas foráneos: 4 (80%) varones y 1 (20%) del sexo femenino, siendo 3 (60%) niños escolares y 2 (40%) adultos jóvenes. Los accidentes ocurrieron durante los meses de Febrero (3/5; 60%), Agosto (1/5; 20%) y Junio (1/5; 20%), mayormente en horas vespertinas (80%) durante actividades recreativas. Los pacientes asistieron a la emergencia ambulatoria entre 10 a 15 minutos después del accidente, con un tiempo promedio de $12 \pm 2,74$. Las heridas punzantes se presentaron de forma de "puntos negros" con 1-8 espinas, siendo localizadas todas en los miembros inferiores. Las manifestaciones clínicas observadas fueron: dolor intenso, eritema y edema, en 100% de los casos. Se obtuvo una evolución postratamiento satisfactoria entre 20-45 minutos. Los envenenamientos por erizos de mar en Adícora, estado Falcón, Venezuela, se presentaron en una frecuencia baja, con manifestaciones clínicas a nivel local, requiriendo tratamiento sintomático, las cuales si se atienden a tiempo y se retiran las espinas evolucionan sin complicaciones.

Palabras clave: Erizos de mar, envenenamiento, epidemiología, manifestaciones clínicas, tratamiento, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

El Phylum de los equinodermos (Echinodermata) comprende numerosas especies de animales marinos generalmente no agresivos y de movimientos lentos agrupadas en 5 clases, incluyendo los ofiuros (Ophiuroidea), los lirios de mar (Crinoidea), las estrellas de mar (Asteroidea), los erizos de mar

(Echinoidea) y los pepinos de mar (Holothuroidea), estando en las 3 últimas mencionadas, las especies que ocasionan envenenamientos al humano (Barnes, 1977; Schwartz & Meinking, 1997; Haddad, 2003; Menéndez-Valderrey, 2006).

La clase de los equinoideos (= "como un erizo") abarca alrededor de 950 especies, que se agrupan clásicamente en los erizos regulares con simetría pentarradial (erizos de mar) y los erizos irregulares o bilaterales (erizos corazón o dólares de arena), estando las especies venenosas de importancia médica en los denominados erizos regulares, que comprenden cerca de 80 (Liram *et al.*, 2000; Haddad, 2003; Menéndez-Valderrey, 2006); sin embargo, se debe resaltar que en la actualidad de acuerdo a criterios evolutivos, la

¹ Laboratorio de Entomología, Parasitología y Medicina Tropical (LEPAMET), Centro de Investigaciones Biomédicas, Decanato de Investigaciones, Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda", Coro, estado Falcón, Venezuela.

² Secretaría Regional de Salud, Ambulatorio Rural II, Adícora, estado Falcón, Venezuela.

*Autor de correspondencia: lutzomyia@hotmail.com

clase se subdivide en las subclases Euechinoidea y Perischoechnoidea (Myers *et al.*, 2008).

Los erizos de mar se caracterizan por presentar cuerpo globoso, con un caparazón calcáreo recubierto por espinas o púas grandes y móviles compuestas de carbonato de calcio, y a cuyos lados se sitúan apéndices denominados pedicelarios. Se distribuyen geográficamente desde los polos hasta el Ecuador, habitando generalmente sobre las rocas, donde se pueden camuflar, con un intervalo batimétrico que puede ir desde los 0 hasta más de 5000 metros de profundidad (Barnes, 1977; Haddad *et al.*, 2001; Borrero-Pérez *et al.*, 2002; Menéndez -Valderrey, 2006).

Los accidentes ocurren cuando las personas, generalmente en actividades recreativas y/o profesionales (“surfistas”, buzos), pisan o rozan accidentalmente a los erizos, incrustándoseles, con mucha frecuencia en la región plantar, las espinas que son muy frágiles y se fraccionan, pudiendo ocasionar desde traumas mecánicos dolorosos y punzantes con edema y eritema, y cuando no se retiran las espinas, formación de granulomas a cuerpo extraño, infecciones secundarias, necrosis, celulitis, sinovitis y artritis (O’Neal *et al.*, 1964; Cracchiolo & Goldberg, 1977; Haddad *et al.*, 2001; Haddad, 2003; Wu *et al.*, 2003).

El veneno se puede inyectar a través de las espinas compactas cuando se rompe el tejido epitelial que las rodea, o cuando se quiebran las espinas con interior hueco; o mediante los pedicelarios (Haddad *et al.*, 2001). La composición del veneno de los erizos de mar no se encuentra del todo bien dilucidada, sin embargo, se sabe que contiene serotonina, sustancias colinérgicas, histamina y glicósidos con actividad hipotensora, hemolítica, cardiotóxica y neurotóxica, pudiendo ocasionar efectos clínicos sistémicos de consideración, que incluyen náusea, parestesia, disnea, hepatitis, hipotensión, lo que puede comprometer potencialmente la vida del individuo (Nakagawa *et al.*, 1991; Haddad *et al.*, 2001; Satoh *et al.*, 2002; Haddad, 2003; Wu *et al.*, 2003; Rossetto *et al.*, 2006).

Lytechinus variegatus (Lamarck, 1816) y *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) conocidos como erizos verde-blanco y negro respectivamente, son ampliamente distribuidos desde el sureste de los Estados Unidos de América hasta Brasil, incluyendo Venezuela donde se pesca y se consumen

sus gónadas (Zoppi, 1967; Gómez, 2002; Astudillo *et al.*, 2005). En Brasil, ambas especies de erizos de mar se encuentran involucradas en accidentes a bañistas, buceadores y pescadores, considerándose que *E. lucunter* es responsable de cerca del 50% de los accidentes traumáticos que se atienden en las unidades de emergencia (Haddad *et al.*, 2001; Haddad, 2003). Aunque ambos equinodermos poseen pedicelarios con veneno, la problemática clínica se presenta básicamente a nivel traumático ante la dificultad de extraer las espinas, lo cual de no hacerse puede ocasionar efectos locales y sistémicos de consideración (Haddad *et al.*, 2001; Haddad, 2003). En Venezuela, es poco, para no decir nada, lo que se sabe acerca de los aspectos clínicos, epidemiológicos y del tratamiento de los accidentes ocasionados por ambas especies de erizos, así como de otras especies de erizos, equinodermos o de los animales marinos en general.

El estado Falcón en la región nor-occidental de Venezuela, posee alrededor de 700 kilómetros de playas, las cuales son habitualmente visitadas por numerosos turistas especialmente en las épocas de vacaciones, siendo las ubicadas en la península de Paraguaná y particularmente en la bahía de Adícora, unas de las más concurridas. En el presente trabajo se documentan los perfiles clínicos, epidemiológicos y del tratamiento de cinco accidentes ocasionados por erizos de mar en los balnearios falconianos de Adícora.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio de tipo prospectivo y descriptivo, se realizó en los individuos que aduciendo haber sido heridos por erizos de mar, consultaron entre Diciembre de 2006 y Diciembre de 2007, la emergencia del ambulatorio rural tipo II de la población de Adícora (11°93’N; 69°8’O), puerto pesquero y balneario turístico ubicado en la bahía de Adícora, de la península de Paraguaná, región semiárida del nor-occidente de Venezuela. El área posee una zona de vida bioclimática correspondiente al monte espinoso tropical (MET) (Ewel *et al.*, 1976).

Siguiéndose los principios básicos de bioética de la declaración de Helsinki, se obtuvo el consentimiento de los individuos, mediante anamnesis. Se indagaron datos de interés epidemiológico: procedencia, lugar y hora del envenenamiento,

actividad que realizaba. Se hizo evaluación clínica, especialmente hacia la búsqueda de signos y síntomas atribuidos comúnmente a los envenenamientos por erizos marinos, incluyendo, entre los locales: dolor intenso, edema y eritema, y dentro de los sistémicos parestesia, náusea, disnea, etc.

La intensidad del dolor del accidente se evaluó a través de la escala visual analógica (VAS) cromática del dolor, que determina la intensidad del dolor en forma subjetiva según colores desde el blanco hasta el rojo oscuro, con equivalencia numérica de 0 a 10, siendo cero (0) sin dolor, 2 leve, 4 moderado, 6 severo, 8 muy severo y 10 dolor intolerable.

Para el reconocimiento de la especie, se interrogaba al paciente y/o sus acompañantes sobre las características anatómicas de éstas, y se les mostraba fotos de animales marinos venenosos, incluyendo erizos y otros equinodermos, de manera tal de poder identificarlo específicamente, de acuerdo a claves taxonómicas *ad hoc* (Haddad, 2003). La identificación taxonómica de ejemplares de erizos recolectados en las playas de Adícora, fue gentilmente hecha por los Dres. Milena Benavides Serrato (Universidad de Puerto Rico), Mayagüez, Puerto Rico, y Vidal Haddad (Instituto Butantan), Brasil.

El tratamiento terapéutico consistió en realizar asepsia y antisepsia tópica de las heridas con solución antiséptica yodada (povidona®); infiltración de 1 cc de lidocaína (1%); retiro quirúrgicamente de las espinas mediante pinzas de disección; analgésico antiinflamatorio no esteroideo (Ketoprofeno®) vía endovenosa: una ampolla de 100 mg/8 horas/3 días; antibiótico de amplio espectro cefalosporina (Cefadróxilo®) a razón *per os* de 500 mg dos veces al día por 10 días. Adicionalmente, se aplicó intramuscularmente toxoide antitetánico. Es importante señalar que a ninguno de los pacientes se les aplicó compresas o se sumergió el miembro afectado en agua caliente, tal como se recomienda en los envenenamientos por animales marinos y particularmente por erizos (Atkinson *et al.*, 2006; Rossetto *et al.*, 2006), debido a que para el momento de los accidentes el ambulatorio no disponía de los elementos tecnológicos *ad hoc*.

La evolución clínica de los pacientes se monitoreó durante 1-3 días, después de haberse instaurado el tratamiento; aplicándose, así mismo, VAS de dolor.

Análisis estadístico

La comparación entre los VAS de dolor antes y después del tratamiento se hizo por la *t* de Student. Los datos fueron analizados mediante paquete estadístico MINITAB versión 13.20 (MiniTab Inc., EUA).

RESULTADOS

Durante 12 meses de observación, se atendieron 5 individuos con heridas punzantes por erizos de mar de las especies *L. variegatus* (1 caso; 20%) (Fig. 1) y *E. lucunter* (4 casos; 80%) (Fig. 2). Los accidentes ocurrieron en los meses de Febrero (3/5; 60%), Agosto (1/5; 20%) y Junio (1/5; 20%). Todos los individuos eran turistas foráneos: 2 (40%) procedentes de otras regiones del estado Falcón, y 3 (60%) del estado Zulia, Venezuela, siendo heridos

Fig. 1. *Lytechinus variegatus*.

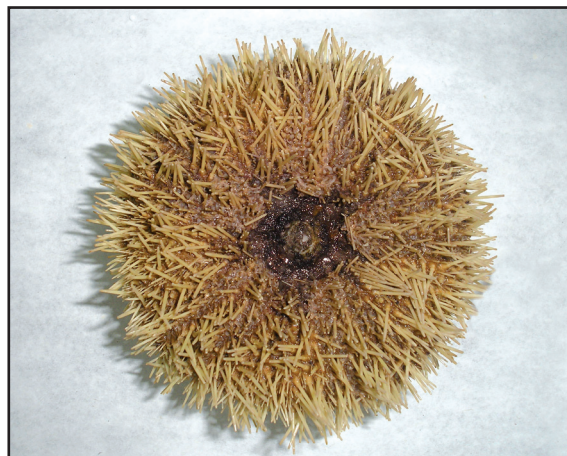
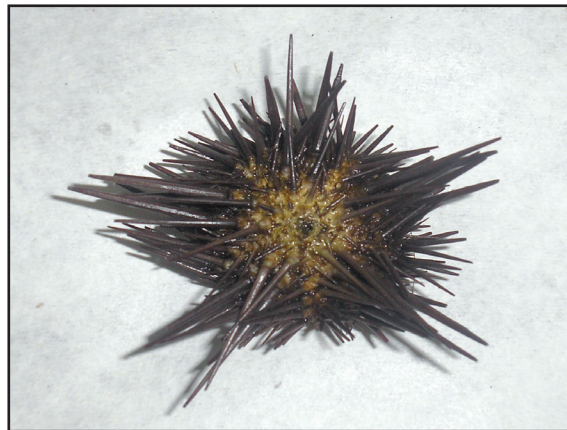


Fig. 2. *Echinometra lucunter*.



todos los casos cuando se bañaban a orillas de la playa o buceaban, en actividades recreativas; 4 (80%) de los accidentes ocurrieron durante la tarde, y 1 (20%) en la mañana. En el sexo masculino se presentaron 4 (80%) envenenamientos, mientras que en el femenino 1 (20%), siendo 3(60%) de edad escolar (7, 11 y 12 años) y 2 (40%) adultos jóvenes (20 y 26 años). Los pacientes asistieron a la emergencia ambulatoria entre 10 a 15 minutos después del accidente, con un tiempo promedio de $12 \pm 2,74$. Las heridas punzantes se presentaron de forma de “puntos negros” representados por las espinas de los erizos en número de 1,4,6,6 y 8 ($= 5 \pm 2,65$), las cuales fueron localizadas en su totalidad en los miembros inferiores: 4 (80%) en el derecho y 1 (20%) en el izquierdo; 4 (80%) en la región plantar del pie incluyendo los dedos y 1 (20%) en el tendón del talón de Aquiles.

Las manifestaciones clínicas observadas fueron: dolor punzante ($\bar{x} = 8,2 \pm 1,10$), eritema y edema, en el 100% de los casos.

Todos los pacientes respondieron satisfactoriamente entre 20 y 45 minutos después de haberse instaurado el tratamiento terapéutico, obteniéndose VAS de dolor significativamente bajo ($\bar{x} = 1,0 \pm 0,61$; $t = 12,83$, $P = 0,0001$). Las heridas cicatrizaron completamente sin presentar edema, eritema, necrosis ni sobreagregación bacteriana, a los 2-3 ($\bar{x} = 2,2 \pm 0,45$) días.

DISCUSIÓN

Llama la atención que en Venezuela existen pocos reportes médicos, al menos en revistas especializadas, y registros acerca de heridas y/o envenenamientos producidos por erizos de mar, toda vez que muchos de estos equinodermos son intensamente pescados, lo que aumenta las posibilidades de contacto, y consumidos por considerarse que sus gónadas poseen propiedades afrodisíacas, y de que en el territorio nacional existen especies de interés en la Salud Pública como las estudiadas en el presente artículo, y otras como *Tripneustes ventricosus* (Lamarck, 1816) y *Diadema antillarum* (Philipi, 1845) que se encuentran también ampliamente distribuidas (Zoppi, 1967; Machado-Allison & Rodríguez-Acosta, 1997; Gómez, 2002; Astudillo *et al.*, 2005; Noriega *et al.*, 2006). Probablemente esto se deba, al menos en parte, a que muchos de estos accidentes ocurren en poblaciones pequeñas y aisladas, donde los individuos

se automedican o acuden a curanderos, o como ocurre en Brasil donde se dan varios casos en los cuales “surfistas” y buzos se encuentran familiarizados con estos accidentes y no acuden a la consulta médica (Machado-Allison & Rodríguez-Acosta, 1997; Haddad *et al.*, 2001). Además, se debe tener en cuenta que estos eventos clínicos no son de registro obligatorio, y muchas veces se considera erróneamente, aun por el personal de salud, que no requieren de atención médica (Haddad *et al.*, 2001). En virtud de lo discutido, se sugiere que en el país debe existir un subregistro de casos, tal como ocurre con otros accidentes por animales marinos y fauna venenosa en general (Machado-Allison & Rodríguez-Acosta, 1997).

McWilliam *et al.* (1991) sostienen que dentro de los animales marinos espinosos, las heridas ocasionadas por erizos marinos son las que se reportan con mayor frecuencia. Sin embargo, en un año de observación en la bahía de Adícora, se atendieron tan sólo 5 casos de heridas por estos equinodermos, lo que representa cerca del 5% del total de accidentes por animales marinos que se presentaron durante 1 año en la emergencia ambulatoria. En este mismo sentido, esos resultados contrastan con los obtenidos por otros investigadores en otras regiones del mundo. Así por ejemplo, en las costas del Atlántico brasileño se reporta que *E. lucunter* es responsable de cerca del 50% del total de los accidentes que se atienden en los puestos de socorro (Haddad *et al.*, 2001; Haddad, 2003); mientras que en las costas jordanas del golfo de Aqaba en el mar Rojo, al erizo de mar negro (*D. antillarum*) se le atribuyen alrededor del 90% de todos los casos de heridas por animales marinos en niños, durante dos años de observación (Mutair *et al.*, 2006).

Similarmente como la mayoría de los accidentes ocasionados por animales marinos que se observaron en el transcurso de 12 meses en la bahía de Adícora, los detectados por erizos de mar parecieran seguir un patrón estacional, al encontrarse que 4 (80%) de los 5 ocurrieron durante los meses vacacionales de verano, siendo precisamente todos los individuos turistas foráneos, los cuales generalmente desconocen de la problemática de los accidentes por animales marinos, y particularmente por erizos de mar, y que por descuido los pisan, al encontrarse sobre las rocas del lecho marino, o cuando intentan defenderse de la acción de una oleada violenta. Esto último dicho explicaría el hecho de que todas las heridas se presentaron en miembros inferiores, con mayor énfasis

hacia la región plantar, lo que coincide con otros investigadores (Haddad *et al.*, 2001; Haddad, 2003; Mutair *et al.*, 2006).

Haddad *et al.* (2001) destacan el hecho de que *L. variegatus* y *E. lucunter* a pesar de poseer pedicelarios, los efectos clínicos de sus heridas se observan mayormente a nivel local, lo cual coincide con lo detectado con las poblaciones de erizos de ambas especies en Adicora. Asimismo, estos investigadores señalan la necesidad de la atención médica rápida y el retiro de todas las espinas de los erizos de mar de las heridas, como una manera de evitar las complicaciones tales como granulomas de cuerpo extraño, infecciones secundarias, artropatías.

Afortunadamente, los cinco pacientes registrados en Adicora acudieron entre 10 a 15 minutos después del accidente, y se les extrajeron todas las espinas, que no fueron más de 8 ($\bar{x} = 5 \pm 2,65$), ya que los efectos sistémicos se pueden presentar cuando el número de espinas incrustadas es superior a 15-20 (Auerbach, 1991; Smith, 2002). En virtud de esto, el tratamiento fue básicamente sintomático, respondiendo satisfactoriamente los cinco individuos entre 20-45 minutos después de la aplicación del mismo, cicatrizándose las heridas completamente a los 2-3 ($\bar{x} = 2,2 \pm 0,45$) días sin ninguna complicación local ni sistémica. Es importante indicar que a pesar de que usualmente se recomienda sumergir la parte anatómica afectada por las espinas en agua caliente (cerca de 50°C), ya que se cree que el calor inactiva el veneno de los erizos (Auerbach, 1991; Atkinson *et al.*, 2006), en los pacientes atendidos en la emergencia de Adicora no fue posible su aplicación, como ya se mencionó, debido a la carencia tecnológica *ad hoc* en este centro asistencial. Sin embargo, el clínico debe ser cuidadoso con no provocar heridas por quemaduras adicionales, particularmente si se ha administrado el anestésico local. Por otra parte, ante la referencia de muerte debido a tétano por heridas de animales marinos, y la presencia de otras bacterias (e.g., *Vibrio*, micobacterias) además de *Clostridium* potencialmente patógenas en el agua de mar, la aplicación de povidona, además de retirar cualquier "cuerpo extraño" de la herida, la profilaxis con antibiótico de amplio espectro y la anti-tetánica es de carácter perentorio y obligatorio (Auerbach *et al.*, 1987; Fenner *et al.*, 1998), tal como se hace ante los envenenamientos y heridas por animales marinos y particularmente por erizos, por nuestro equipo de trabajo en la emergencia ambulatoria de Adicora.

Los tratamientos caseros o populares que se aplican los habitantes locales no poseen un basamento científico. En este sentido, en Brasil los pobladores irrigan las lesiones con orina o alcohol (Rossetto *et al.*, 2006), mientras que los habitantes de Adicora esperan a que evolucione la herida y se inflame, para luego aplicar parafina caliente, y entonces poder retirar las espinas o púas con mayor facilidad. Desde que el equipo de investigación del presente trabajo comenzó a documentar los perfiles clínico-epidemiológicos y del tratamiento de los accidentes por animales marinos en la Bahía de Adicora, se ha querido sensibilizar, en primer lugar, a las autoridades de Salud del estado para que se dediquen a proteger a los usuarios de estas playas, mediante la educación con vallas, panfletos y/o charlas, de manera tal de que las personas, especialmente turistas, y particularmente en el caso de los erizos de mar, utilicen zapatos con suelas gruesas, y se encuentren alertas ante la posibilidad de contacto con los animales marinos; así mismo, se pretende llamar la atención para que se den las premisas básicas de Medicina Marina en nuestras facultades de Ciencias de la Salud, y de que el personal médico, especialmente los que ejercen en el medio rural, realicen los registros de los accidentes por animales marinos, pudiéndose así comprender mejor su dinámica de ocurrencia.

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Milena Benavides Serrato (Universidad de Puerto Rico), Mayagüez, Puerto Rico, y Vidal Haddad (Instituto Butantan), Brasil, por la identificación de ejemplares de erizos marinos y a la comunidad de pescadores de Adicora, por su desinteresada ayuda.

Clinical, epidemiological and treatment aspects of five cases of sea urchin envenomation in Adicora, Paraguaná peninsula, Falcón state, Venezuela

SUMMARY

A descriptive and prospective survey was conducted to investigate epidemiological, clinical and treatment profiles on injuries caused by sea urchins (Equinodermata). Between December 2006 and December 2007, patients with sea urchin injuries were attended in ambulatory emergency facilities at Adicora, Falcón state, Paraguaná peninsula, a semiarid north-western region from Venezuela.

Subjects were clinically examined and interrogated. Treatment consisted of application of topical antiseptic povidone-iodine solution; local anesthetic, anti-inflammatory analgesic administered intravenously, antibiotic therapy *per os* and tetanus immunization. Envenomations by the green sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) (n=1, 20%) and the black sea urchin *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) (n=4, 80%) were recorded. Visitors were involved in all cases: 4 (80%) males and 1 (20%) female, being 3 (60%) school age children and 2 (40%) young adults. The accidents occurred during February (3/5; 60%), August (1/5; 20%) and June (1/5; 20%), in the afternoon (80%) when individuals were bathing or swimming at the beach. The time between ambulatory medical assistance and the accident varied from 10 to 15 minutes, with a mean time of 12 ± 2.74 . The puncture injuries were located on the lower limbs in all patients, with 1 – 8 spines. Clinical manifestations observed were: intense pain, edema and erythema in all cases, with no systemic compliance. All patients had a satisfactory post-treatment evolution, between 20 to 45 minutes. Injuries by sea urchins in Adicora, Paraguaná peninsula, Falcón state, Venezuela, appeared with a low frequency and local manifestations, requiring symptomatic treatment. Lesions with immediate medical treatment and the complete removal of spines evolved with no complications.

Key Words: Sea urchin, envenomation, epidemiology, clinic manifestations, treatment.

REFERENCIAS

- Astudillo D., Rosas J., Velásquez A., Cabrera T. & Maneiro C. (2005). Crecimiento y supervivencia de larvas de *Echinometra lucunter* (Echinoidea: Echinometridae) alimentadas con las microalgas *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana*. *Rev. Biol. Trop.* **53** (Suppl 3): 337-344.
- Atkinson P., Boyle A., Hartin D. & McAuley D. (2006). Is hot water immersion an effective treatment for marine envenomation? *Emerg. Med. J.* **23**: 503-508.
- Auerbach P., Yajko D., Nassos P., Kizer K., McCosker J., Geehr E., *et al.* (1987). Bacteriology of the marine environment: implications for clinical therapy. *Ann. Emerg. Med.* **16**: 643-649.
- Auerbach P. (1991). Marine envenomations. *N. Engl. J. Med.* **325**: 486-493.
- Barnes R. (1977). *Zoología de los invertebrados*. 3a ed. Ed. Interamericana. México, D.F.
- Borrero-Pérez G., Solano O. & Benavides-Serrato, M. (2002). Lista revisada de los erizos (Echinodermata: Echinoidea) del Mar Caribe Colombiano. *Biota Colombiana*. **3**: 141-148.
- Cracchiolo A. & Goldberg L. (1977). Local and systemic reactions to puncture injuries by the sea urchin spine and the date palm thorn. *Arthritis Rheum.* **20**: 1206-1212.
- Ewel J., Madriz A. & Tosi Jr. J. (1976). *Zonas de vida de Venezuela. Memoria explicativa sobre el mapa ecológico*. 4ª ed. Editorial Sucre. Caracas, Venezuela.
- Fenner P. (1998). Dangers in the ocean: the traveler and marine envenomation. II. Marine vertebrates. *J. Travel. Med.* **5**: 213-216.
- Gómez A. (2002). Abundancia de erizo *Lytechinus variegatus* (Lamarck) en la costa norte, este y oeste de la Isla de Margarita (Venezuela). *Acta Cient. Venez.* **53**: 15-20.
- Haddad V., Novaes S., Miot H. & Zuccon, A. (2001). Accidents caused by sea urchins - the efficacy of precocious removal of the spines in the prevention of complications. *An. Bras. Dermatol.* **76**: 677-681.
- Haddad V. (2003). Animais aquáticos de importância médica no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **36**: 591-597.
- Liram N., Gomori M. & Perouansky M. (2000). Sea urchin puncture resulting in PIP joint synovial arthritis: case report and MRI study. *J. Travel Med.* **7**: 43-45.
- Machado-Allison A, Rodríguez-Acosta A. (1997). *Animales venenosos y ponzoñosos de Venezuela*. 1a Ed. Ediciones del CDCH Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- McWilliam L., Curry A., Rowland P. & Watson J. (1991). Spinous injury caused by a sea urchin. *J. Clin. Pathol.* **44**: 428.

- Menéndez -Valderrey J. (2006). Equinodermos, lirios de mar, estrellas, erizos, ... Asturnatura.com. Num. 100. Documento en Línea disponible en: <http://www.asturnatura.com/articulos/equinodermos/inicio.php> ISSN1887-5068. [Consultado: 2009, Enero, 19].
- Mutair R., Amayreh W., Salayta G. & Khashashneh I. (2006). Marine Animal Injuries to children in the South of Jordan. *Middle East Journal of Family Medicine*. **4**: 38-41.
- Myers P., Espinosa, R., Parr, C., Jones T., Hammond G. & Dewey T. (2008). The Animal Diversity Web (online). Documento en Línea disponible en: <http://animaldiversity.org>. [Consultado: 2009, Enero, 20].
- Nakagawa H, Tu A. & Kimura A. (1991). Purification and characterization of Contractin A from the pedicellarial venom of sea urchin, *Toxopneustes pileolus*. *Arch. Biochem Biophys*. **284**: 279-284.
- Noriega N., Pauls S. & del Mónaco C. (2006). Abundancia de *Diadema antillarum* (Echinodermata: Echinoidea) en las costa de Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* **54**: 793-802.
- O'Neal R., Halstead B. & Howard L. (1964). Injury to human tissues from sea urchin spines. *California Med.* **101**: 199-202.
- Rossetto A., Mora J. & Haddad V. (2006). Case Report. Sea urchin granuloma. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* **48**: 303-306.
- Satoh F., Nakagawa H., Yamada H., Nagasaka K., Nagasaka T., Araki Y., et al. (2002). Fishing for bioactive substances from scorpionfish and some sea urchins. *J. Nat. Toxins.* **11**: 297-304.
- Schwartz S. & Meinking T. (1997). Venomous marine animals of Florida: morphology, behavior, health hazards. *J. Fla. Med. Assoc.* **84**: 433-440.
- Smith M. (2002). Skin problems from marine echinoderms. *Dermatol. Ther.* **15**: 30-33.
- Wu M., Chou S., Huang T. & Deng J. (2003). Sea-urchin envenomation. *Vet. Hum. Toxicol.* **45**: 307-309.
- Zoppi E. (1967). Contribución al conocimiento de los Equinodermos de Venezuela. *Act. Biol. Venez.* **5**: 267-333.

Recibido el 12/06/2009
Aceptado el 31/01/2010

Notas Científicas

Enfermedad de Chagas de transmisión oral: vinculación del caso índice con una microepidemia urbana en Venezuela

Belkisyolé Alarcón de Noya^{1,3*}, Zoraida Díaz-Bello¹, Cecilia Colmenares^{1,3}, Raiza Ruiz-Guevara³ & Oscar Noya^{2,3,4}

Se describe el proceso de investigación clínico-epidemiológica y de laboratorio que permitió establecer el nexo entre un caso de Enfermedad de Chagas en fase aguda aislado y una comunidad escolar urbana, así como la estrategia de diagnóstico y tratamiento de una emergencia médica para evitar mayor severidad clínica y mortalidad.

Palabras clave: transmisión oral, Enfermedad de Chagas, microepidemia, Venezuela.

En condiciones naturales, la Enfermedad de Chagas (ECh) es una enzootia que se mantiene entre diversas especies de mamíferos y los vectores reduvídeos. En las grandes ciudades de América Latina como Caracas, la transmisión de la ECh puede ocurrir, de manera infrecuente, por contacto con reduvídeos, por transfusión de hemoderivados, trasplante de órganos, por vía transplacentaria, accidentes de laboratorio, o por vía oral (Prata, 2001. *Lancet Infect. Dis.* **1**: 92-100). En todos los casos, la sospecha epidemiológica es un reto para el clínico ya que habitualmente se asocia la infección por *Trypanosoma cruzi* a la picadura del triatomino y al medio rural. En la presente nota se describe como fue la secuencia de eventos que permitieron relacionar un caso agudo urbano de ECh con el mayor episodio de transmisión oral descrito hasta la fecha.

Los antecedentes del caso índice

En diciembre 2007 un escolar de 9 años de edad fue referido al Hospital Universitario de Caracas (HUC) para descartar malaria por presentar fiebre 40° de 3 semanas de evolución, escalofríos, malestar general y antecedente reciente de viaje a un área con transmisión palúdica en el oriente de Venezuela (estado Monagas). En la gota gruesa y extendido se observaron escasos tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*. El hallazgo fue confirmado en la Sección de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical (IMT), donde además se realizó el examen en fresco, ensayo inmunoenzimático (ELISA) para determinar respuesta IgM e IgG, hemaglutinación indirecta, reacción en cadena de la polimerasa, cultivo e inoculación en ratones (Alarcón de Noya, *et al.*, 2010. *JID.* **201**: 1308-1314). Una vez confirmado el caso, se procedió a indagar el lugar de infección ya que el paciente era natural y procedente de Caracas, donde es infrecuente la transmisión vectorial de ECh (Alarcón de Noya, *et al.*, 2009. *Rev. Biomed.* **20**: 158-164), nunca había pernoctado en el campo y el único antecedente posible era un viaje al interior del país

¹ Sección de Inmunología, ² Sección de Biohelmintiasis, Instituto de Medicina Tropical, ³ Cátedra de Parasitología, Escuela "Luís Razetti", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. ⁴ Centro para Estudios sobre Malaria, IAES, INHRR, MPPS. Caracas, Venezuela.

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

3 meses antes. En dicha ciudad permaneció en un hotel ciudadano, no hubo observaciones de presencia de triatomínicos ni manifestaciones de puerta de entrada siendo poco probable que éste hubiese sido el lugar de infección. Los familiares acompañantes a esta visita fueron evaluados serológicamente resultando negativos.

Sin un antecedente epidemiológico claro, se planteó la posibilidad de infección transfusional ó congénita reactivada. No se encontraron factores clínicos y de laboratorio que pudieran indicar una condición inmunosupresora y no había antecedentes de transfusiones. La serología practicada a la madre resultó negativa. Por otra parte, el resultado de la determinación de IgM por ELISA con valores elevados y de IgG positiva en el escolar, indicaban infección reciente y descartaba la hipótesis de una infección congénita.

Al final de esa primera semana se solicitó a los familiares tratar de recordar sitios de paseo, familiares enfermos o alguna situación especial que ayudase a buscar el origen de la infección. Hasta ese momento, no se lograba comprender como un joven de clase media residente en Caracas, de hábitos ciudadanos, con todos sus parientes asintomáticos, sin factores de riesgo aparentes y sin manifestaciones de puerta de entrada podría haberse infectado con *T. cruzi*.

La conexión con el segundo caso

Durante ese fin de semana (cinco días después del diagnóstico) un pariente del caso índice constató que una docente de la escuela (Unidad Educativa “Andrés Bello” del Municipio Chacao de Caracas) se encontraba hospitalizada en el HUC con sintomatología similar a la del primer caso diagnosticado (fiebre alta con escalofríos, astenia, cefalea, mialgias y artralgias, de tres semanas de evolución). El personal del IMT tomó muestra sanguínea en la cual se encontraron tripomastigotes de *T. cruzi* en el examen en fresco y serología para ECh (ELISA-IgG e IgM) positiva. Es así como esta segunda paciente se convierte en el vínculo que conecta el caso índice con la Unidad Educativa “Andrés Bello”. En el interrogatorio se descartó la posibilidad de algún paseo, actividad o evento de maestros y alumnos que enlazara los dos casos. A su vez, esta docente informó de otras maestras hospitalizadas con síntomas

similares, sin mejoría y con diagnósticos diversos como dengue, mononucleosis infecciosa, fiebre de origen desconocido y síndrome paraneoplásico.

Otros casos

Al inicio de la siguiente semana, se procedió a la búsqueda, en diversas clínicas de Caracas de las maestras hospitalizadas, a todas se les tomó muestra sanguínea para el diagnóstico parasitológico e inmunológico de ECh. Sus médicos tratantes fueron informados. Ese lunes (10 de diciembre 2007) acudieron al IMT siete personas entre docentes y personal administrativo de la mencionada escuela, presentando algunas de ellas, fiebre alta prolongada de cuatro semanas de evolución, astenia, mialgias y edema facial y en extremidades inferiores. Dos de ellos presentaron anasarca. En el IMT se les tomó muestra para serología y estudios parasitológicos tendientes al descarte de ECh. La determinación de anticuerpos específicos IgM e IgG anti-*T. cruzi* fue positiva y en cuatro de estos individuos, el examen en fresco demostró la presencia de tripomastigotes de *T. cruzi*. A partir de ese momento y ante la notificación de la existencia de otros estudiantes enfermos de varios niveles educativos y edades, se estableció la hipótesis de un mecanismo de transmisión a partir de una fuente común, ya que todas estas personas, residentes en diversas zonas de la ciudad, sólo tenían como antecedente compartido el hecho de asistir a la misma institución educativa durante el día, surgiendo como única hipótesis posible la de consumo de alimentos o bebidas contaminados con triatomínicos ó sus deyecciones.

Notificación del caso fatal e inicio del muestreo de diagnóstico

El martes 11 de diciembre ocurrió el deceso de un estudiante de cinco años procedente de la escuela en cuestión por lo que el personal del IMT se dirigió al plantel educativo para dar inicio al muestreo de diagnóstico masivo e inmediato, a toda la población con actividades en la Escuela “Andrés Bello”. Las autoridades del Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) fueron notificadas y recomendamos no clausurar la escuela con el fin de evitar la dispersión de escolares, maestros y posibles contactos. El personal del centro educativo y del servicio médico del municipio (Salud Chacao) se integró al equipo de trabajo.

Con el fallecimiento del escolar se despertó una gran angustia en la comunidad educativa a lo que hubo que dar respuesta inmediata en asamblea con maestros y representantes sobre lo que pudiera estar pasando. El personal de la escuela de manera organizada inició las llamadas telefónicas a representantes para obtener el consentimiento que permitiera el diagnóstico inmediato de infección por *T. cruzi*.

El estudio consistió en la toma de una muestra sanguínea para la determinación de anticuerpos IgM e IgG específicos anti-*T. cruzi* por ELISA (Díaz-Bello *et al.*, 2008. *Invest. Clin.* **49**: 141-150). Sólo en un número limitado de personas se logró realizar pruebas de diagnóstico parasitológico (examen al fresco, gota gruesa, extendido, cultivo e inoculación en ratones) y examen por biología molecular, ya que estando en días previos al receso navideño, tanto de la escuela como del IMT, la situación se convirtió en una verdadera emergencia médica. Era urgente la emisión de los resultados de laboratorio en virtud de la severidad clínica que venían presentando los pacientes de este brote y en prevención de otro deceso tomando en cuenta la elevada mortalidad registrada en otros episodios de transmisión oral de la ECh (Pinto *et al.*, 2008. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **41**: 602-614; Valente *et al.*, 2009. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **103**: 291-297).

Durante el muestreo del 11 al 14 de diciembre de 2007 se diagnosticó y entregó resultados a 856 personas, de las cuales 123 resultaron positivas a los ensayos inmunoenzimáticos. En un segundo muestreo un mes más tarde, realizado a las mismas personas más otras que no estuvieron presentes en el estudio de diciembre, sólo se encontraron dos nuevos casos. La cobertura final fue de 1000 personas examinadas y 103 atribuibles a la transmisión oral de *T. cruzi* (tasa de infección 10,3%) (Alarcón de Noya, *et al.*, 2010. *Op. cit.*). En otras personas no se logró confirmar por hemaglutinación indirecta o “western blot” el diagnóstico inicial por ELISA y dos fueron catalogadas como infección crónica. No obstante, todas las 125 personas recibieron tratamiento anti-parasitario.

Tratamiento anti-parasitario

Considerando el período vacacional y la proximidad de la Escuela “Andrés Bello” al servicio

médico municipal que ofrece Salud Chacao, el personal médico de esta dependencia fue el encargado de administrar el tratamiento específico para la ECh, según nuestras indicaciones, a los pacientes ambulatorios. Para el momento no se disponía en el país de la suficiente cantidad de los medicamentos recomendados. La representación de la Organización Panamericana de la Salud en Venezuela lo solicitó de forma urgente. La mayoría de las personas recibió una o dos semanas de benznidazol y luego se completó con nifurtimox, dependiendo de la disponibilidad del tratamiento.

Analizando los resultados obtenidos de esta experiencia, se considera que los siguientes aspectos justifican la presente comunicación:

1. En el caso de enfermedades metaxénicas en fase aguda, como en la transmisión oral de la ECh que nos ocupa, se debe buscar la fuente de infección pues es muy probable que otras personas puedan haberse infectado.
2. Bajo situaciones de emergencia médica de casos agudos de ECh, lo más importante es el diagnóstico rápido y la inmediata administración de tratamiento, que en el presente caso fue la causa de la baja letalidad (0,9%) a pesar de la alta morbilidad.
3. No se debe clausurar el centro o institución afectado, a fin de evitar la dispersión de los pacientes y de esta manera poder tener control del diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los casos.
4. La difusión del conocimiento de los nexos epidemiológicos debe concienciar al personal del sector salud a tener en cuenta el diagnóstico de ECh en casos de fiebre prolongada de origen desconocido aún cuando la presencia del vector no se haya demostrado.
5. Como método de diagnóstico de elección se recomienda por su sensibilidad, especificidad y rapidez, iniciar con la determinación de anticuerpos IgG e IgM por el ensayo inmunoenzimático ELISA, permitiendo la inmediata aplicación del tratamiento. El diagnóstico confirmatorio con otras pruebas de diagnóstico (examen en fresco, gota gruesa y extendido, hemaglutinación indirecta, western blot, MABA, cultivo, inoculación en animales, xenodiagnóstico artificial, PCR) puede realizarse en un segundo tiempo ó a un grupo más reducido de personas.
6. La aparición simultánea de síntomas en un grupo numeroso, de bajo riesgo, que no habitan en una misma residencia, debe hacer plantear como

hipótesis inicial, la transmisión oral de *T. cruzi*.
7. Es imprescindible la integración del personal de salud (bioanalistas, médicos, psicólogos, etc.) con el personal de la institución afectada, manteniendo una constante comunicación a través de asambleas, de la situación del brote, con sus expectativas, dificultades y dudas que surjan a lo largo del estudio.

AGRADECIMIENTOS

A todo el personal de la Sección de Inmunología y de las otras secciones del IMT que se sumaron en el momento de la emergencia. A los médicos, enfermeras y personal de apoyo de Salud Chacao quienes desde el inicio del muestreo se integraron a las actividades de diagnóstico y tratamiento. Al personal de la Unidad Educativa "Andrés Bello" de Chacao, padres y representantes. Al Dr. Renato Gusmão, representante de la OPS/OMS para Venezuela y el Caribe y a la Dirección de

Epidemiología del MPPS. Financiamiento parcial: FONACIT F-2005000199, Proyecto Multidiagnóstico FONACIT-UCV-G-2005000387.

Orally transmitted Chagas disease: epidemiological connection of the index case with an urban outbreak in Venezuela

SUMMARY

The clinical, laboratory and epidemiological investigations that established the connection between the index case of an acute episode of Chagas disease and an orally acquired outbreak in an urban school in Caracas are described. The strategy used for early diagnosis and treatment of this medical emergency prevented major clinical severity and mortality.

Key words: oral transmission, Chagas disease, outbreak, Venezuela.

Recibido el 18/09/2009
Aceptado el 08/03/2010

BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL

(ISSN-1690-4648)

(antes: Boletín de Malariología y Saneamiento Ambiental)

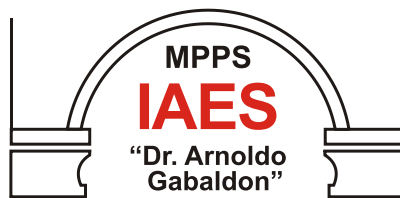
El Boletín de Malariología y Salud Ambiental es una revista científica que publica artículos sobre diferentes aspectos de la Medicina Tropical (incluyendo patología, estudios clínicos, experimentales y terapéuticos, estudios sociales, epidemiología y control), Parasitología (protozoología, helmintología, entomología, malacología, bioquímica, inmunología, biología molecular, genética), Ingeniería Sanitaria y Salud Ambiental.

Es objetivo de la revista publicar nuevos conocimientos y metodologías para el entendimiento de la dinámica de la transmisión de enfermedades infecciosas virales y parasitarias y sus vectores, dentro de su contexto eco- y socio-epidemiológico, en apoyo y para el diseño y manejo oportuno de los programas de prevención y control y la salud ambiental.

El Boletín de Malariología y Salud Ambiental es una publicación periódica semestral con un (1) volumen y dos(2) números (Julio y Diciembre) por año, distribuida nacional e internacionalmente en formato impreso y en formato electrónico a través de la siguiente dirección de Internet: <http://www.iaes.edu.ve>

El Boletín está estructurado en nueve Secciones

- I.- 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**

