



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. XLVIII, N° 2, 2008

Maracay - Aragua - Venezuela

BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL

Vol. XLVIII, N° 2, AGOSTO-DICIEMBRE, 2008

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

(antes Boletín de Malariología y Saneamiento Ambiental)

MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA SALUD

JESÚS M. MANTILLA O.
MINISTRO

**DIRECCIÓN GENERAL
DE SALUD AMBIENTAL**

IGOR O. DI RUSCIO C.
DIRECTOR

**DIRECCIÓN GENERAL
DE CONTRALORÍA SANITARIA**

DIVIS DEL CARMEN ANTUNEZ
DIRECTOR

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

JOSÉ R. DELGADO HIGUERA
DIRECTOR

Editores

José Vicente Scorza
M. Dora Feliciangeli

Diseño y Diagramación

Oswaldo Flores S.

Comité Editorial

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

Comité Honorario

Jorge Alvar (España)
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 suscripciones: **publpeiasep@yahoo.com**

Para envío de artículos: **bmsave@yahoo.com**

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

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

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

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

Boletín de Malariología y Salud Ambiental

Vol. XLVIII, N° 2

Maracay, Aragua, Venezuela

Agosto-Diciembre, 2008

CONTENIDO

REVISIÓN

- Macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores de salud ambiental
Benthic macroinvertebrates as bioindicators of environmental health
Maribet Gamboa, Rosa Reyes & Jazzmin Arrivillaga.....109

ARTÍCULOS ORIGINALES

- Enfermedad de Chagas en el estado Anzoátegui, Venezuela: Registro de un caso agudo y caracterización parasitológica y molecular del aislado
Chagas disease in Anzoategui state, Venezuela: Detection of an acute case and parasitological and molecular characterization of the parasite isolate
Antonio Morocoima, Enma J. Tineo Brito, Elizabeth Ferrer, Leidi Herrera & Melida Nuñez121
- Anomalías morfológicas y estructurales en fetos de ratones con infección aguda experimental por *Trypanosoma cruzi*
Morphological and structural anomalies in fetuses of mice with acute experimental infection by Trypanosoma cruzi
Mary Carmen Pérez, Maritza Alarcón, Loredana Goncalves, Ana Lugo de Yarbuh, Elio Moreno, Sonia Araujo & Juana Villarreal127
- Susceptibilidad de *Trypanosoma cruzi* a diferentes venenos de serpientes de Costa Rica
Susceptibility of Trypanosoma cruzi to different Costa Rican snake venoms
Amparo Castillo-Vigil, Randall Loaiza, Rodrigo Zeledón, Bruno Lomonte, Andrea Urbina & Berta Valverde135
- Reactividad alérgica a *Anisakis simplex* y su asociación con asma bronquial en niños escolares del estado Nueva Esparta
Anisakis simplex allergic reactivity and its association with bronchial asthma in scholar children from Nueva Esparta state
Franca Puccio, Domenico Cifarelli, Frank Blanco, Elianska López, Luís Sarmiento, Rodrigo Ordaz, Ivonne Figueroa, Arnaldo Capriles, Isabel Hagel, María Cristina Di Prisco, María Elena Roque, Lisette Machado & María Elena Ghezzi.....145

Valoración de la calidad del diagnóstico malárico. Red de vigilancia, municipio Cajigal, estado Sucre, Venezuela

Quality assessment of malaria diagnosis malaria surveillance-net Cajigal municipality, Sucre, Venezuela

Mayira Sojo-Milano, José Luis Cáceres García & Eliecer Sojo-Milano153

Producción, purificación y caracterización de un anticuerpo anti IgG canino como sonda en el diagnóstico de leishmaniasis visceral canina

Production and characterization of anti dog IgG antibody as a diagnostic probe in canine visceral leishmaniasis

Luisana J. Fernandes, Marlin T. Matani, Olinda Delgado, Melcenia Moreno & Martín A. Sánchez161

Diferencias en la susceptibilidad a la deltametrina en poblaciones de *Aedes aegypti* de Trujillo, Venezuela

Different susceptibility to deltamethrin in Aedes aegypti populations from Trujillo state, Venezuela

Leslie Álvarez, Carmen Castillo, Milagros Oviedo & Francisco Briceño169

Fluctuaciones estacionales y temporales de la densidad larvaria de *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) y familias de insectos asociados al hábitat en El Granzón, Parroquia San Isidro, municipio Sifontes del estado Bolívar

Seasonal and temporal fluctuations of larval densities of Anopheles darlingi Root (Diptera: Culicidae) and insects associated to the habitat in San Isidro Parish, Sifontes municipality, Bolívar state

Jesús Berti-Moser, Julio González-Rivas & Edith Navarro177

REVISTA DE REVISTAS.....191

NOTICIAS.....193

Fe de errata.....199

Indice acumulado por materia.....201

Indice acumulado por autores.....203

Revisión

Macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores de salud ambiental

Maribet Gamboa^{1*}, Rosa Reyes² & Jazzmin Arrivillaga¹

Los sistemas fluviales han estado sometidos a la fuerte presión humana, debido a la intervención no planificada que ha desencadenado un mal manejo de aguas potencialmente potables para consumo humano y riego. Estos cambios han promovido cambios microclimáticos importantes, afectando el nicho de la fauna acuática, por ser un taxa cuya dinámica es muy susceptible a perturbaciones. En el contexto del desarrollo sustentable con perspectivas hacia el aprovechamiento y conservación de ambientes acuáticos, los bioindicadores juegan un papel importante en el manejo adecuado de los recursos. Un bioindicador puede ser definido como un conjunto de especies que poseen requerimientos particulares con relación a un grupo de variables físicas o químicas, tal que los cambios de estas variables indiquen para las especies involucradas que el sistema se encuentra en los límites de las curvas del óptimo ecológico. Las comunidades de macroinvertebrados son los mejores bioindicadores de contaminación acuática, debido a que son muy abundantes, se encuentran en prácticamente todos los ecosistemas de agua dulce y su recolección es simple y de bajo costo. Los órdenes de insectos utilizados en este estudio para estimar la calidad ambiental son: Ephemeroptera, Trichoptera, Plecoptera, Diptera, Odonata y Coleoptera. En este trabajo se presentan a los macroinvertebrados acuáticos como indicadores biológicos, y su utilidad a partir del empleo de los índices bióticos para estimar la tolerancia del bentos a los contaminantes (BMWP, IBMW, BMWQ, IBF, EPT, el porcentaje de raspadores y la abundancia de Chironomidae) así como las respuestas funcionales de estos organismos a los contaminantes. El aumento de estudios de bioindicadores conllevará a la mejor comprensión de cómo y de qué manera es afectado un ecosistema de agua dulce por un contaminante.

Palabras clave: Bioindicador, ambiente acuático, macroinvertebrados, calidad del agua, desarrollo sustentable.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas los sistemas fluviales han estado sometidos a una fuerte presión de explotación, y cambio en el uso de la tierra, afectándose la calidad del agua por las principales actividades que se desarrollan asociadas a las cuencas hidrográficas (Branco, 1984). El staff de Georgia Adopt-A-Stream

(2004) definen a la contaminación ambiental como “Alteración ambiental causada por la energía o los materiales de desecho descargados al medio, donde pueden dañar la salud humana y los Ecosistemas” y establecen ciertos indicadores ambientales que permiten predecir el deterioro ambiental; uno de estos indicadores son los ensambles de animales que integran las comunidades acuáticas. Jara (2002) señaló también que las poblaciones de peces y macroinvertebrados encontrados en las aguas de un determinado ecosistema fluvial, desarrollan gran parte de su vida allí, asociándose a características típicas del agua, por lo que se constituyen en potenciales indicadores de calidad de esta.

¹ Departamento de Estudios Ambientales, Laboratorio de Genética de Poblaciones, Ecología Molecular de Insectos.

² Departamento de Biología de Organismos, Universidad Simón Bolívar, Caracas 89000, Venezuela.

*Autor de correspondencia: maribetg@gmail.com

El concepto de bioindicador aplicado a la evaluación de calidad de agua, es definido como: “especie (o ensamble de especies) que poseen requerimientos particulares con relación a uno o a un conjunto de variables físicas o químicas, tal que los cambios de presencia/ausencia, número, morfología o de conducta de esa especie en particular, indiquen que las variables físicas o químicas consideradas, se encuentran cerca de sus límites de tolerancia” (Rosemberg & Resh, 1993). Es decir, que un bioindicador es aquel cuyas respuestas biológicas son observadas frente a una perturbación ecológica y están referidos como organismos o sistemas biológicos que sirven para evaluar variaciones en la calidad ambiental.

Los bioindicadores de contaminación, calibran la calidad del ecosistema a través de información que es recogida en el agua, en la atmósfera o en el suelo, y permiten identificar, dentro de un marco de calidad, el nivel de deterioro ambiental (Arenas, 1993). Para poder evaluar el deterioro ambiental de un ecosistema acuático debido a un contaminante es necesaria la selección de una comunidad bioindicadora de calidad de agua y el conocimiento previo de la biota que caracteriza la zona de estudio. Uno de los grupos de los organismos acuáticos más utilizados para el monitoreo, son los macroinvertebrados de la comunidad bentónica. Entre las ventajas que posee cualquier macroinvertebrado que conforme un taxa bioindicador se pueden mencionar las siguientes (Zúñiga *et al.*, 1993):

- La naturaleza sedentaria de muchas especies facilitan la evaluación espacial de efectos adversos a largo plazo en la comunidad.
- Presentan ciclos de vida relativamente cortos comparados con los peces y reflejan con mayor rapidez las alteraciones del medio ambiente mediante cambios en la estructura de sus poblaciones y comunidades.
- Son de amplia distribución, abundantes y de fácil recolección por su tamaño que los hace visibles a simple vista.
- Viven y se alimentan en o sobre los sedimentos donde tienden a acumularse las toxinas, las cuales se incorporan a la cadena trófica a través de ellos.
- Son sensibles a los factores de perturbación y responden a las sustancias contaminantes presentes tanto en el agua como en los sedimentos.

Entre las desventajas de cualquier macroinvertebrado que conforme un taxón bioindicador (Minshall *et al.*, 1985) se pueden mencionar las siguientes:

- Se trata de una comunidad heterogénea y la taxonomía de algunos grupos no es bien conocida.
- Las variaciones estacionales o de dinámica de la población puede interferir en la interpretación o comparación de resultados.

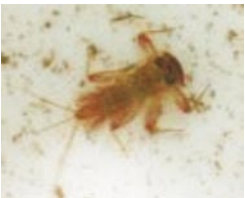
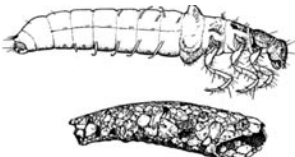
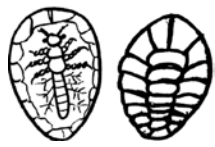
Por lo tanto, la evaluación basada en macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores de la contaminación, podría generar información de alguna perturbación que se genere y afecte los ecosistemas acuáticos. En consecuencia, este trabajo trata de recopilar información pertinente a los macroinvertebrados acuáticos como bioindicadores de la contaminación acuática, índices bióticos utilizados para monitoreo ambiental de contaminantes y respuestas funcionales de estos organismos a los contaminantes, con el fin de ilustrar el estudio de la calidad del agua mediante bioindicadores bentónicos.

Los macroinvertebrados bentónicos como indicadores de la calidad ambiental

La mayor parte de los investigadores señalan que dentro de los grupos faunísticos que son considerados como bioindicadores de la calidad ambiental, los macroinvertebrados acuáticos son los mejores bioindicadores de la calidad del agua (Arenas, 1993; Barbour *et al.*, 1995; Figueroa, 1999; Alonso *et al.*, 2002; Fenoglio *et al.*, 2002; Hynea & Maher, 2003; Cain *et al.*, 2004; Leiva, 2004; Alonso & Camargo, 2005). Los macroinvertebrados bentónicos se encuentran en todo tipo de ambiente acuático de agua dulce, como ríos o lagunas, donde son importantes para el monitoreo de ese ecosistema acuático en particular (Cummnig & Klug, 1979).

La Tabla I resume las principales características generales que presentan los macroinvertebrados bentónicos usados como bioindicadores de la buena calidad del agua. Así como también resume rasgos claves para poder realizar una identificación taxonómica rápida en el campo, y evaluarlos como bioindicador según los índices bióticos que serán señalados más adelante.

Tabla I. Los macroinvertebrados acuáticos indicadores de buena calidad del agua (McGavin, 2001; Domínguez & Fernández, 2001).

Orden de insecto	Características	Rasgos clave
PLECOPTERA 	- Nombre común: Moscas de las piedras (Familia más común: Perlidae) - Ciclo de vida: hemimetabolos (ninfas acuáticas y adultos voladores) - Fase indicadora: Ninfas. Muy sensibles a la contaminación. - Alimentación: Ninfas Carnívoras en los últimos instares - Hábitat: Ríos de aguas turbulentas, Lechos de grava.	Abdomen con un par de cercos sencillos o multiarticulados. Uñas tarsales pares. 
EFEMEROPTERA 	- Nombre común: Efímeras (Familias más comunes: Baetidae, Leptophlebiidae, Leptohyphidae, Caenidae) - Ciclo de vida: hemimetabolos (ninfas acuáticas y adultos voladores) - Fase indicadora: ninfas - Alimentación: ninfas herbívoras - Hábitat: ríos y lagunas	Abdomen generalmente con un par de cercos alargados y un filamento central normalmente visible. Uñas tarsales únicas. 
TRICOPTERA 	- Nombre común: Frigáneas (Familias más comunes: Hidropsiphidae, Hidroptilidae, Leptoceridae) - Ciclo de vida: hemimetabolos (ninfas y pupas acuáticas y adultos voladores) - Fase indicadora: ninfas - Alimentación: ninfas depredadoras o herbívoras - Hábitat: ríos, aguas quietas y rápidas.	Larvas acuáticas construyen un estuche o refugio que varía según la familia. 
ODONATA 	- Nombre común: Libélulas, caballitos del diablo (Familias mas comunes: Libellulidae, Coenagrionidae) - Ciclo de vida: hemimetabolos (larvas acuáticas y adultos voladores) - Fase indicadora: larvas - Alimentación: ninfas depredadoras - Hábitat: ríos de aguas quietas	Ojos compuestos prominentes. Branquias plumosas externas en la parte posterior del abdomen. 
COLEOPTERA 	- Nombre común: Escarabajos (Familias más comunes: Elmidae, Ptylodactilidae, Pheseniidae, Dytiscidae, Hydrophilidae) - Ciclo de vida: holometabolos (larvas, pupas y adultos) - Fase indicadora: larvas - Alimentación: ninfas herbívoras y depredadoras - Hábitat: Amplio rango indicativo: salinidad, zonas lacustres	Patas grandes y caminan por el fondo del agua. Respiran aire con el extremo del abdomen o disponen de apéndices filamentosos (branquias). 
DIPTERA  Blephariceridae	- Nombre común: moscas, mosquitos (Familias más comunes: Simuliidae, Tipulidae, Psychodidae, Dixidae, Athericidae, Blephariceridae). - Ciclo de vida: holometabolos (huevos, larvas acuáticas, pupas y adultos voladores) - Fase indicadora: larvas - Alimentación: larvas filtradoras y raspadoras - Hábitat: ríos de aguas estancadas.	Larva pequeña con protuberancias a los lados del cuerpo.

Dentro de los macroinvertebrados listados, solo algunas familias pertenecientes al Orden Díptera, fisiológicamente pueden resistir altos grados de contaminación acuática, ya sea en aguas estancadas o de corriente, siendo estos organismos considerados como buenos indicadores de aguas de baja calidad (Tabla II).

Macroinvertebrados y su uso en índices bióticos

Para estimar cambios a niveles morfológicos, fisiológicos o de desarrollo de estos organismos, que puedan indicar que las condiciones físicas y/o químicas están fuera de sus límites del nicho ecológico realizado (biorremediación), es necesario

Tabla II. Los dípteros, macroinvertebrados acuáticos indicadores de aguas estancadas y de baja calidad (McGavin, 2001; Domínguez & Fernández, 2001a; Alonso et al., 2002).

Orden Díptera	Características	Rasgos clave
Familia Culicidae 	• Nombre común: mosquitos. • Ciclo de vida: holometabolos (huevos, larvas acuáticas, pupas y adultos voladores) • Fase indicadora: larvas • Alimentación: larvas filtradoras y raspadoras. • Hábitat: aguas estancadas	Larva ápoda con cabeza reducida. Penachos de pelos en el tubo respirador, por lo que cuelgan de cabeza hacia abajo de la superficie para tomar aire.
Familia Ephryidae 	• Nombre común: moscas, mosquitos. • Ciclo de vida: holometabolos (huevos, larvas acuáticas, pupas y adultos voladores) • Fase indicadora: larvas • Alimentación: larvas filtradoras y raspadoras. • Hábitat: aguas estancadas	Cuerpo alargado con propatas en la mitad del mismo y un penacho de setas en la parte posterior.
Familia Chironomidae 	• Nombre común: moscas, mosquitos • Ciclo de vida: holometabolos (huevos, larvas acuáticas, pupas y adultos voladores) • Fase indicadora: larvas • Alimentación: larvas filtradoras y raspadoras. • Hábitat: aguas estancadas y lólicas	Cuerpo alargado, con un penacho de setas en la parte posterior.
Familia Psychodidae 	• Nombre común: moscas • Ciclo de vida: holometabolos (huevos, larvas acuáticas, pupas y adultos voladores) • Fase indicadora: larvas • Alimentación: larvas filtradoras y raspadoras. • Hábitat: aguas estancadas y lólicas	Cuerpo alargado con abundantes setas en todo el cuerpo
Familia Sirfidae 	• Nombre común: moscas • Ciclo de vida: holometabolos (huevos, larvas acuáticas, pupas y adultos voladores) • Fase indicadora: larvas • Alimentación: larvas filtradoras y raspadoras. • Hábitat: aguas estancadas y lólicas	Cuerpo robusto con un tubo respiratorio alargado y delgado

implementar índices ecológicos-bióticos de tolerancia (Mason *et al.*, 1999; Niemi *et al.*, 2004; Mohammad *et al.*, 2005).

En un principio se desarrollaron índices bióticos en los cuales era necesario una identificación taxonómica de los macroinvertebrados hasta el nivel de género o especie (Roldán, 2003), o una estimación cuantitativa de sus abundancias (Alonso & Camargo, 2005), pero se ha comprobado que los índices más prácticos (por su facilidad de obtención) son aquellos en los que solo son necesarios datos cualitativos (presencia o ausencia) y una identificación taxonómica hasta el nivel de familia (Leiva, 2004). Igualmente un muestreo exhaustivo puede garantizar la colecta de los taxa presentes en el sitio de estudio (Alba-Tercedor, 1996) y dar mayor confiabilidad al índice empleado.

Estos índices bióticos en general, suelen ser específicos para un tipo de alteración o contaminación y/o región geográfica, y se basan en el concepto de organismo indicador (Tabla III). Permiten la valoración del estado ecológico de un ecosistema acuático afectado por un proceso de contaminación cualquiera. Para ello a los grupos de macroinvertebrados de una muestra se les asigna un valor numérico en función de su tolerancia a un tipo de contaminación dependiendo del índice (Alonso & Camargo, 2005).

Para ilustrar estos índices, a continuación se muestran tres ejemplos de contaminación, los cuales exponen la reducción o aumento del número de los macroinvertebrados acuáticos dependiendo del tipo de contaminación al cual han sido sometidos.

Ejemplo 1: Alonso *et al.* (2002) mostraron la relación existente entre el índice BMWQ y la concentración de oxígeno disuelto y de amonio medidos a lo largo de un gradiente de contaminación orgánica en el río Henares. Observan como la disminución de oxígeno disuelto en el agua y el incremento de amonio reduce el valor de este índice. Esta variación conjunta que mostraron estos dos parámetros con el BMWQ valida la utilidad de este índice como bioindicador de contaminación por materia orgánica.

Ejemplo 2: La eutrofización de los Ecosistemas fluviales, consiste principalmente en un incremento excesivo en las concentraciones de

compuestos inorgánicos de fósforo y nitrógeno, uno de los principales causantes de la degradación ecológica de los Ecosistemas acuáticos. En condiciones naturales los nutrientes son limitantes para los productores primarios, de tal forma que su aumento dentro de ciertos límites genera un incremento en la densidad del grupo de los raspadores, ya que su recurso trófico se ve incrementado (Cain *et al.*, 2004). Alonso & Camargo (2005) mostraron la proporción de raspadores aguas arriba y aguas abajo de pequeños embalses de cabecera en ríos del centro de España. Los puntos situados aguas abajo de los embalses presentaron mayores concentraciones de fosfato, lo que incrementó la producción primaria (medida como concentración de clorofila *a*) y como consecuencia la proporción de raspadores en la comunidad de macroinvertebrados bentónicos. Debido a los graves efectos que genera la eutrofización en los Ecosistemas fluviales, el incremento en el porcentaje de raspadores que forman la comunidad de macroinvertebrados respecto a las condiciones naturales o de referencia podría ser empleado como un buen indicador de este tipo de contaminación.

Ejemplo 3: Las minas abandonadas de donde se extraían metales a partir de sulfuros polimetálicos son una importante fuente de contaminación para los ríos cercanos, debido a que los sulfuros no extraídos se oxidan al quedar expuestos a la intemperie generando sulfatos y ácido sulfúrico (Cain *et al.*, 2004). Esto hace disminuir el pH de las aguas receptoras y por lo tanto facilita la biodisponibilidad de los metales (cobre, hierro, mercurio, cinc, etc.). Un estudio en España demostró como las actividades mineras producen una reducción del número de taxa de macroinvertebrados pertenecientes a los órdenes Ephemeroptera, Plecoptera y Trichoptera (=riqueza EPT) aguas abajo de una mina abandonada de carbón (García-Criado *et al.*, 1999) de la provincia de León. El índice EPT mostró una alta correlación con dos parámetros físico-químicos indicativos de contaminación minera (conductividad del agua y la concentración de sulfatos). Este mismo estudio mostró que el índice biótico IBMWP también fue sensible a la contaminación minera (García-Criado *et al.*, 1999). Debido a que la contaminación por metales ocasiona la disminución de Ephemeroptera, Plecoptera y Trichoptera, los índices de riqueza de taxones EPT y el índice biótico IBMWP son adecuados como índices preliminares para valorar este tipo de perturbación.

Tabla III. Índices bióticos usados para estimar la tolerancia del bentos a los contaminantes (Leiva, 2004).

Índice	Nombre extendido	Fundamento	Utilidad
BMWP	'Biological Monitoring Working Party'	Otorga valores de 1 a 10 a las diferentes familias de macroinvertebrados. Los más tolerantes a la contaminación reciben valores menores y los más sensibles valores mayores. La suma total de valores nos indica la calidad biológica de la comunidad.	Valoración de la contaminación por materia orgánica en las Islas Británicas. Permite: la determinación de invertebrados presentes, la calificación ambiental de la familia taxonómica, la valoración cuantitativa del medio
IBMWP (antes BMWP')	'Iberian Monitoring Working Party'	Adaptación del BMWP a la Península Ibérica	Valoración de la contaminación por materia orgánica en la Península Ibérica.
BMWQ	'Biological Monitoring Water Quality'	Mismo fundamento que el anterior pero con valores de 1 a 15.	Valoración de la contaminación por materia orgánica en la Península Ibérica.
IBF	Índice biótico de familia	$IBF = 1/N \sum ni ti$ Donde: N = número total de individuos en la muestra (Estación). ni = número de individuos en una Familia ti = puntaje de tolerancia de cada Familia.	- Presenta una alta sensibilidad en la calidad de agua. - Los resultados hacen posible clasificar las estaciones en clases de calidad de agua, las cuales se representan en un mapa de calidad de agua
Riqueza EPT	Riqueza de taxa pertenecientes a los grupos de Efemerópteros, Plecópteros y Tricópteros.	Las especies de estos grupos de insectos son sensibles a las perturbaciones humanas.	Contaminación en general y alteraciones del hábitat.
Porcentaje de Raspadores	Porcentaje de individuos de la comunidad pertenecientes al grupo trófico de los raspadores.	El incremento en nutrientes aumenta la producción primaria lo que favorece a este grupo.	Eutrofización fluvial.
Abundancia de Chironomidae	Abundancia de individuos de la familia Chironomidae	Este grupo es muy tolerante a la contaminación por materia orgánica.	Contaminación por materia orgánica.

Estos índices bióticos se han venido modificando, debido a que se ha empleado un nuevo marco conceptual que orienta los estudios de los cuerpos de agua corriente hacia la comprensión global del ecosistema teniendo como unidad de integración la cuenca hidrográfica. La nueva estrategia de acción es la valoración de la integridad biótica de los ríos (Relvea *et al.*, 2000; Neumann *et al.*, 2003a y b). Para esto fue necesaria la integración de aquellos factores naturales susceptibles de ser modificados por la actividad humana y de cuyo estado depende

la integridad biótica de los cuerpos de agua. Con éste propósito Karr (1991) identificó cinco grupos de variables cuyas modificaciones afectan directamente a la integridad biótica:

- La Calidad del Agua: temperatura, turbidez, oxígeno disuelto, acidez, alcalinidad, sustancias orgánicas o inorgánicas, metales pesados y sustancias tóxicas.
- La Estructura del Hábitat: tipo de sustrato, profundidad del agua, velocidad de la corriente y

- complejidad espacio-temporal del hábitat físico.
- El Régimen del Flujo: volumen de agua y variaciones temporales del caudal.
- Las Fuentes Energéticas: tamaño, cantidad y tipo de la materia orgánica entrante y los cambios temporales en el patrón de suministros energéticos.
- Las Interacciones Bióticas: competencia, depredación, enfermedades, parasitismo y mutualismo.

La clasificación anterior deja claro que la integridad biótica de un cuerpo de agua resulta de la interacción de procesos físicos, químicos y biológicos. De modo que el diseño de cualquier herramienta para evaluar la condición de un cuerpo de agua debe estar basado en la valoración de los componentes más representativos de la integridad biótica como aquellos relacionados con la estructura de la comunidad, la composición taxonómica, la condición individual y con los procesos biológicos (Chutter, 1972; Saiz *et al.*, 1996; Hilsenhoff, 1998; Segnini, 2003).

Estudio de los macroinvertebrados acuáticos como indicadores de la salud ambiental acuática en Latinoamérica

El esfuerzo de investigación que se ha hecho en Latinoamérica para desarrollar o aplicar métodos biológicos en la evaluación de los sistemas lóticos aún es incipiente. Algunos de los trabajos realizados se pueden mencionar a continuación:

- 1) El efectuado en Venezuela por Lugo & Fernández (1994) evaluaron los efectos de la contaminación orgánica sobre la composición y diversidad de la entomofauna en un río de la región central del país, sin utilizar índices bióticos. Sin embargo, Segnini (2003) revisó los diferentes enfoques en el uso del concepto de los macroinvertebrados como bioindicadores.
- 2) En Argentina, Domínguez & Fernández (1998) generaron un índice biótico para evaluar la condición ecológica de los ríos de una cuenca altoandina. Rodríguez Capítulo (1999) y Rodríguez Capítulo *et al.* (2001) desarrollaron índices bióticos para sistemas lóticos de la llanura pampeana (IBPAMP). Recientemente Fernández *et al.* (2006) presentaron un diagnóstico de la situación ambiental de los ríos del Noroeste Argentino y analizan la posibilidad de un índice integrado.

- 3) En Colombia, Zúñiga *et al.* (1993) y Riss *et al.* (2002), y adaptaron el sistema BMWP para evaluar varias cuencas, mientras Gutiérrez *et al.* (2003) implementaron un método basado en redes neuronales para estimar la calidad del agua en la cuenca media y alta del río Bogotá.
- 4) En Brasil, Henriquez (2003) usó un índice integrado para evaluar la cuenca media en lagunas costeras.
- 5) En Nicaragua, Fenoglio *et al.* (2002) compararon varios índices bióticos con datos obtenidos de varios ríos.
- 6) En México, Weigel *et al.* (2002) desarrollaron un índice integrado para evaluar ríos en la zona centro occidental del país.
- 7) En Chile, Arenas (1993) Figueroa (1999), Jara (2002), Figueroa *et al.* (2003), Sheibler (2003), Toro *et al.* (2003) y Leiva (2004), aplicaron diversos Índices Bióticos en varios ríos meridionales.

El índice mayormente empleado en Latinoamérica es el índice BMWP para estudios de monitoreo de la salud ambiental de un ecosistema de agua dulce y aunque el empleo de otros índices han sido utilizados (los mostrados en Tabla III), este sigue siendo el índice que por excelencia se aplica.

A continuación se muestran estudios mas detallados del rol de los macroinvertebrados en la salud ambiental, donde luego de aplicar lo índices arriba mencionados, los autores incluyen la herramienta bioquímica, obteniendo una visión mas amplia del uso de los macroinvertebrados como bioindicadores.

Respuestas funcionales de los macroinvertebrados a los contaminantes: estudios de biomarcadores

Los biomarcadores pueden definirse como las variaciones genéticas, celulares, bioquímicas, fisiológicas o etológicas que pueden ser monitoreadas a nivel tisular, en los fluidos corporales y/o a nivel del individuo completo; brindando evidencia de la exposición a uno o más componentes químicos (Depledge *et al.*, 1995). Investigaciones recientes muestran cambios cuantificables (bioquímicos, fisiológicos o morfológicos) en los macroinvertebrados bentónicos cuando se asocian a la exposición de un tóxico.

Mattingly *et al.* (2001), reseñan el aislamiento de un gen correlacionado con la respuesta fisiológica

a hierro y cadmio en insectos acuáticos. En esta investigación se trabajó con ADNc que codifica para una proteína, designada para el díptero, *Chironomus tentans*, como la α tubulina 1 (CTTUB1), la cual presenta similitud al funcionamiento de las α tubulinas de los otros invertebrados y vertebrados. La producción de ARN mensajero y de la proteína CTTUB 1, aumenta cuando la larva está expuesta a compuestos de hierro o cadmio. Adicionalmente, el patrón de distribución celular de la proteína CTTUB 1, en las células epiteliales del intestino medio de la larva es afectado por la presencia del cadmio, generándose un mecanismo de regulación de la síntesis de la α tubulina mediada por este metal, considerándose esta respuesta bioquímica del insecto inmaduro al cadmio como un biomarcador de la contaminación por metales.

Watts *et al.* (2001) estudiaron el efecto del 17 ethinylestradiol y bisphenol en el desarrollo y reproducción del díptero *Chironomus riparius* en dos generaciones. Sus resultados indicaron que el tiempo de desarrollo y el porcentaje de emergencia de adultos fueron afectados durante la exposición a los contaminantes, lo que les llevó a sugerir que esta respuesta bio-fisiológica puede ser un indicador para detectar la presencia del 17 ethinylestradiol y bisphenol en ambientes acuáticos.

Hwang *et al.* (2001) correlacionaron positivamente la talla corporal y el tiempo intermuda de la larva de *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) con el incremento en las concentraciones de hexachlorobiphenyl (HCBP). Sin embargo, a concentraciones extremas de residuos en el cuerpo de la larva, el porcentaje de sobrevivencia larval disminuye, reflejándose una respuesta bio-fisiológica en el individuo.

Croteau *et al.* (2002) determinaron que el insecto *Chaoborus* posee proteínas tipo metalotioninas que se unen al Cadmio, y que la producción de estas está correlacionada positivamente con la cantidad del metal. Estos autores señalaron que la producción de proteínas tipo metalotioninas pudiera ser usado para monitorear las concentraciones de la sustancia contaminante.

Recientemente Buchwalter & Luoma (2005), exploraron las características fisiológicas y morfológicas implicadas en la variabilidad de

la incorporación de cadmio y zinc disueltos en una variedad de macroinvertebrados bentónicos que mostraron diferencias a la susceptibilidad-tolerancia a la contaminación por metales. Los investigadores concluyeron que el uso de estos insectos, como bioindicadores ecológicos de un metal pesado dentro de un ecosistema contaminado, mejoraría el entendimiento de cómo y por qué dichas especies presentan diferencias en la incorporación de metales esenciales. Igualmente establecieron que la determinación de los mecanismos subyacentes responsables de las diferencias en la sensibilidad específica de una especie a un contaminante podría reducir ambigüedades en la separación de efectos de un metal o contaminante específico y ayudar a definir cual macroinvertebrado bentónico pudiera ser el biomarcador más eficaz en una contaminación real.

Adicionalmente, Barata *et al.* (2005) condujeron un estudio integral donde consideraron análisis químicos de metales seleccionados en el tejido del tricoptero *Hydropsyche exocellata*, con las respuestas de varias enzimas antioxidantes peroxidases, de enzimas fase II y niveles de peróxidos lipídicos, y concluyeron que las medidas integradas optimizan el biomonitoreo ambiental.

Finalmente, las recientes investigaciones señalan la necesidad de un enfoque multifactorial, que permita integrar el uso de las respuestas genéticas, químicas, bioquímicas, celulares, biológicas y etológicas en el biomonitoreo de agentes contaminantes dentro de los manuales de procedimientos para detectar perturbaciones o impactos ambientales en sistemas acuáticos, sugiriéndose el uso de los macro invertebrados bentónicos confiables para determinar el biomonitoreo de Ecosistemas de agua dulce (Mandaville, 2002).

Para Venezuela, el aumento de estudios de esta índole podrán generar mejores recursos de saneamiento y monitoreo ambiental, así como establecer índices de contaminación y perspectivas de rehabilitación de ríos, así como nuevas leyes y decretos de protección de los Ecosistemas de agua dulce.

En conclusión, la inclusión de los macroinvertebrados de aguas dulces como parte del monitoreo ambiental de un ecosistema de esta índole, ha tenido un auge a nivel mundial en los

últimos años, la apertura de nuevas ideas y maneras de estudiar el monitoreo ambiental ha conllevado a obtener conocimiento acerca como y con qué tipo de contaminante afectan las aguas dulces mediante el implemento de presencia/ausencia, comportamiento y bioquímica de estos animales. Por tanto, estos bioindicadores presentan una medida alternativa de la salud ambiental.

AGRADECIMIENTOS

A los profesores Eduardo Domínguez (Laboratorio de limnología, Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán-Argentina) y María del Carmen Zuñiga (Instituto de investigación de Entomofauna Acuática, Universidad del Valle, Cali-Colombia) por sus valiosas sugerencias.

Benthic macroinvertebrates as bioindicators of environmental health

SUMMARY

The fluvial system has been under strong human pressure, due to a lack of urban planning, which has triggered a potentially dangerous potable water problem for human consumption and irrigation. These changes in the quality of the fluvial systems have promoted important microclimatic changes, within the niche of special aquatic fauna, macroinvertebrates, that have a susceptible population dynamics to habitat disturbances. For sustainable development it is necessary to consider aquatic atmosphere conservation and to propose an adequate management plan, which includes bioindicators as a potential tool, to evaluate the perturbation grade and monitor the fluvial system within the water conservation plan. A bioindicator is defined as a set of species, with specific requirements in relation to physical or chemical variables, so that the significant changes of these variables indicates for the species that the system is perturbed and the species are close to tolerance limits. The assemblages of macroinvertebrates are the best bioindicators of contaminated water, because they are very abundant, are present in all the fresh water ecosystems, easy to collect and monitoring is low cost. The taxa to consider for environmental quality are: Ephemeroptera, Trichoptera, Plecóptera, Diptera, Odonata and Coleóptera. In this work we suggest the use of these aquatic macroinvertebrates as biological bioindicators, and their utility as biotic

indices to estimate the tolerance of benthos to the polluting agents (BMWP, IBMW, BMWQ, IBF, EPT, the percentage of scrapers and the abundance of Chironomidae) as well as the functional response of these organisms to the polluting agents. Increasing studies of biomarkers leads to a better understanding of how fresh water is affected by a pollutant.

Key words: bioindicators, aquatic environment, macro invertebrates, water quality, sustainable environment.

REFERENCIAS

- Alba-Tercedor J. (1996). Macroinvertebrados acuáticos y calidad de las aguas de los ríos. *IV Siaga*. **2**: 203-213.
- Alonso A. & Camargo J. A. (2005). Estado actual y perspectivas en el empleo de la comunidad de macroinvertebrados bentónicos como indicadora del estado ecológico de los Ecosistemas fluviales españoles. *Ecosistemas*. **3**: 1-12.
- Alonso A., De la Puente M. & Camargo J.A. (2002). *Valoración de los efectos de la contaminación orgánica sobre la comunidad de macroinvertebrados bentónicos en la cabecera del río Henares (Guadalajara, España)*. XI Congreso de la Asociación Española de Limnología y III Congreso Ibérico de Limnología. Madrid 17-21 Junio.
- Arenas J. (1993). *Macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores de la calidad del agua del río Bío Bío, Chile*. Tesis de Doctorado de la Facultad de Ciencias, Universidad de Concepción. 111pp.
- Barata C., Lekumberri I., Vila-Escalé M., Prat N. & Porte C. (2005). Trace metal concentration, antioxidant enzymes activities and susceptibility to oxidative stress in the trichoptera larvae *Hidropsyche exocellata* from the Llobregat river basin (NE Spain). *Aquat. Toxicol.* **74**: 3-19.
- Barbour M. T., Gerritsen J., Snyder B. D. & Stribling J. B. (1995). Revision to Rapid Bioassessment Protocols for use in stream and rivers: Periphyton, benthic macro invertebrates and fish. EPA 841_D_97-002.

- Branco S. (1984). *Limnología Sanitaria, estudio de la polución de las aguas continentales*. Editorial Secretaría general de la Organización de los Estados Americanos. 120pp.
- Buchwalter D. B. & Luoma S. (2005). Differences in dissolved cadmium and zinc uptake among stream insect: mechanistic explanations. *Environ. Sci. Technol.* **39**: 498-504.
- Cain D., Luoma S. & Wallace W. (2004). Linking metal bioaccumulation of aquatic insect to their distribution patterns in mining-impacted river. *Environ. Toxicol. and Chem.* **23**:1463-1473.
- Chutter F. (1972). An empirical biotic index of the quality of water in South African streams and rivers. *Water Research.* **6**: 19-30.
- Croteau M., Hare L., Campell P. & Coyillard Y. (2002). Metallothionein-like metal binding protein in the biomonitor Chaoborus: occurrence and relationship to ambient metal concentrations in lakes. *Environ. Toxicol. and Chem.* **22**:737-741.
- Cummig K. & Klug J. (1979). Feeding ecology of stream invertebrates. *Annual Review Ecology and Systemic.* **10**: 147-172.
- Depledge M., Aagaard A. & Gyorkos P. (1995). Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioral biomarkers. *Mar. Pollut. Bull.* **21**: 19-27.
- Domínguez E. & Fernández H. (1998). *Calidad de los ríos de la Cuenca del Salí (Tucumán Argentina) medida por un índice biótico*. Serie Conservación de la Naturaleza. Fundación Miguel Lillo, Tucumán. 38 pp.
- Domínguez E. & Fernández H. (2001). *Guía para la determinación de los artrópodos bentónicos Sudamericanos*. Universidad Nacional de Tucumán. Facultad de Ciencias Naturales. Instituto M. Lillo. Editorial universitaria de Tucumán. Tucumán, Argentina. 237 pp
- Fenoglio S., Badino G. & Bona F. (2002). Benthic macroinvertebrate communities as indicators of river environment quality: an experience in Nicaragua. *Rev. Biol. Trop.* **50**: 1125-1131.
- Fernández H., Domínguez E., Romero F. & Cuezco M.G. (2006). *Calidad de agua y bioindicación en ríos de montaña*. Serie Conservación de la Naturaleza. N° 16, ISSN 0325-9625. Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina.
- Figueroa R. (1999). *Macroinvertebrados bentónicos como indicadores biológicos de calidad de agua, Río Damas, Osorno, X Región de los Lagos, Chile*. Tesis para optar al Magister en Ciencias mención en Zoología. 105 pp.
- Figueroa R., Valdovinos C., Araya E. & Parra O. (2003). Macroinvertebrados bentónicos como indicadores de calidad de agua de ríos del Sur de Chile. *Rev. Chilena Hist. Nat.* **76**: 275-285.
- García-Criado F., Tomé A., Vega F. & Antolín C. (1999). Performance of some diversity and biotic indices in rivers affected by coal mining in northwestern Spain. *Hydrobiol.* **394**: 209-217.
- Gutierrez J., Riss W. & Ospina R. (2004). Bioindicación de la calidad del agua con macroinvertebrados acuáticos en la sabana de Bogotá, utilizando redes neuronales artificiales. *Caldasia.* **26**: 151-160.
- Henriquez C. (2003). *Utilización de los macroinvertebrados bentónicos asociados a macrofitas Típha domingensis como indicadores de la polución orgánica en lagunas costeras*. VI Congreso de Ecología do Brasil, Fortaleza. 11pp.
- Hilsenhoff W. (1988). Rapid field assesment of organic pollution with a family level biotic index. *J. N. Am. Benthol. Societ.* **7**: 65- 68.
- Hwang H., Fisher S. & Landrum P. (2001). Identifying body residues of HCBP associated with 10-d mortality and partial life cycle effects in the midge, Chironomus riparius. *Aquat. Toxicol.* **52**: 251-267.
- Hynea R. & Maher W. (2003). Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* **54**: 366-374.
- Jara C. (2002). *Evaluación de la existencia de insectos bioindicadores de la calidad del agua en zonas rítrónicas y potámicas de tres ríos de la zona semiárida de Chile*. Memoria de título entregada

- a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, para optar al Título Profesional de Biología mención en Medio Ambiente. 30 pp.
- Karr J. (1991). Biological integrity: a long-neglected aspect of water resource management. *Ecology Applic.* **1**: 66-84.
- Leiva J. (2004). *Macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores de calidad de agua en la Cuenca del estero Peu Peu Comuna de Lautaro IX Region de la Araucania*. Tesis presentada a la facultad de Ciencias de la Universidad Católica de Temuco para optar al Grado de Licenciado en Recursos Naturales. Temuco, Chile. 120pp.
- Lugo M. & Fernández A. (1994). Cambios en composición y diversidad de la entomofauna del río Guey, Parque Nacional Henri Pittier, Edo. Aragua, Venezuela. *Boletín de Entomol. Venez. N. S.* **9**: 25 - 32
- Mandaville S. (2002). *Benthic Macroinvertebrates in Freshwaters-Taxa Tolerance Values, Metrics, and Protocols*. Soil y Water conservation society of Metro Halifax. Master homepage: <http://chebucto.ca/science/SWCS/SWCS.html>. Revisado en abril del 2005.
- Mason W., Fremling C. & Nebeker A. (1999). *Aquatic insect as indicators of environmental quality*. National Biological Service Southeastern Biological Science Center. Master homepage: <file:///C:/Documents%20and%20Settings/Siragon/Mis%20documentos/Seminario%20I/Aquatic%20Insects%20As%20Indicators%20of%20Environmental%20Quality.htm>. Revisado en abril del 2006.
- Mattingly K., Beaty B., Mackie R., McGraw M., Carlson J. & Rayms-Keller A. (2001). Molecular cloning and characterization of a metal responsive *Chironomus tentans* alpha-tubulin cDNA. *Aquat. Toxicol.* **54**: 249-260.
- McGavin G. (2001). *Entomología Esencial*. Editorial Ariel ciencia. Barcelona, España. 355pp.
- Minshall R., Sedell R. & Cushing E. (1985) Stream ecosystem theory: a global perspective. *J. N. Am. Benthol Society.* **7**: 263 – 288.
- Mohammad B., Garza R., Garza V. & Landeros J. (2005). Los indicadores biológicos en la evaluación de la contaminación por agroquímicos en Ecosistemas acuáticos y asociados. *CUICYT.* **2**: 4-17.
- Neumann M., Baumeister J., Liess M. & Schulz R. (2003a). An expert system to estimate the pesticide contamination of small streams using benthic macroinvertebrates as bioindicators Part 1: The database of LIMPACT. *Ecological Indicators.* **2**: 379-389
- Neumann M., Baumeister J., Liess M. & Schulz R. (2003b). An expert system to estimate the pesticide contamination of small streams using benthic macroinvertebrates as bioindicators. II. The Knowledge base of LIMPACT. *Ecological Indicators.* **2**: 391-401
- Niemi G., Wardrop D., Brooks R., Anderson S., Brady V., Paerl H., Rakocinski C., Brouwer M., Levinson B. & McDonald M. (2004). Rationale for a New Generation of Indicators for Coastal Waters. *Environ Health Perspect.* **112**: 979–986.
- Relvea C., Minshall W. & Danhy R. (2000). *Stream insects as bioindicators of fine sediment*. Water Environment Federation. Watershed Management 2000 Conference. 23pp.
- Riss W., Ospina R. & Gutierrez J. (2002). Establecimiento de valores de bioindicación para macroinvertebrados acuáticos de la sabana de Bogotá. *Caldasia.* **24**: 135-156.
- Rodriguez Capítulo, A. (1999). Los macroinvertebrados como indicadores de calidad de ambientes lóticos en el área pampeana. en Simposios IV Cong. Arg. de Entomología. Mar del Plata. *Rev. Soc. Ent. Argentina.* **58**: 208-217.
- Rodriguez Capítulo, A., Tangorra, M. y Ocón, C., (2001). Use of Benthic macroinvertebrate to assess the biological status of pampean streams in Argentina. Aquatic Ecology. 2001 Kluwer Academic Publishers. Belgium. *Aquatic Ecology, © Kluwer Academic Publishers.* **35**: 109-119
- Roldán G. (2003). *Bioindicación de la calidad del agua en Colombia*. Editorial Universidad de Antioquia. Colombia. 170pp.

- Rosemberg D. & Resh V. (1993). Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrate. *Publicación*. **420**: 330-354.
- Saiz S., Frances J. & Imaz X. (1996). Uso de bioindicadores en la evaluación de la contaminación de la ría de Bilbao. Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco, Bilbao. *Environ. Monitor. Assess.* **56**: 305-330.
- Segnini S. (2003). El uso de los macroinvertebrados bentónicos como indicadores de la condición ecológica de los cuerpos de agua corriente. *Ecotropicos*. **16**: 45-63.
- Sheibler E. (2003). *Macroinvertebrados bentónicos como indicadores de calidad de agua en el río Mendoza*. Trabajo especial de grado para optar al título de biólogo. Chile. 43pp.
- Staff de Georgia Adopt-A-Stream (2004). *Manual de Monitoreo Biológico y Químico en Arroyos*. Georgia Adopt-A-Stream. Department of Natural Resources. Environmental Protection Division. 64pp.
- Toro J., Schuster J., Kurosawa J., Araya E. & Contreras M. (2003) *Diagnóstico de la calidad del agua en sistemas lóticos utilizando diatomeas y macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores del río Maipú (Santiago: Chile)*. Sociedad Chilena de Ingeniería Hidráulica. XVI Congreso Chileno de Ingeniería Hidráulica. 11pp.
- Watts M., Pascoe D. & Carroll K. (2001). Chronic exposure to 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A-effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate *Chironomus riparius* (Diptera:Chironomidae). *Aquat. Toxicol.* **55**: 113-124.
- Weigel B., Henne L. & Martinez L. (2002). Macroinvertebrate-based index biotic integrity for protection of stream in westcentral Mexico. *J. N. Am. Benthol. Society*. **21**: 686-700.
- Zúñiga de Cardoso M., Rojas A. & Caicedo G. (1993). Indicadores ambientales de calidad de agua en la Cuenca del río Cauca. *Asociación de Ingenieros Sanitarios de Antioquia Medellín, Colombia*. **2**: 17-28.

Recibido el 18/03/2008
Aceptado el 27/06/2008

Artículos Originales //

Enfermedad de Chagas en el estado Anzoátegui, Venezuela: Registro de un caso agudo y caracterización parasitológica y molecular del aislado

Antonio Morocoima^{1,2}, Enma J. Tineo Brito^{2,3}, Elizabeth Ferrer^{4,5*}, Leidi Herrera⁶ & Melida Nuñez³

Se describe un caso agudo de enfermedad de Chagas en un preescolar de sexo masculino, de 6 años de edad, procedente del caserío Las Lajas, municipio Sotillo, estado Anzoátegui, Venezuela. Clínicamente, a la inspección y palpación, presentó eritema y edema bipalpebral derecho, con adenomegalia y nódulo satélite que sugiere el clásico signo de Romaña. También, presentaba lesión cutánea plana eritematosa entre el borde externo del recto abdominal izquierdo y la cicatriz umbilical, compatible con chagoma de inoculación. Además, se detectó hepatoesplenomegalia y fiebre de 38 y 39°C. A la auscultación se escuchó soplo mesosistólico paraesternal. El tratamiento con Clindamicina no fue resolutorio, por lo cual se procedió a investigar la presencia del agente causal en sangre, mediante exámenes directos e indirectos, serología y técnicas moleculares. El estudio parasitológico comprobó la presencia de *Trypanosoma cruzi*, que resultó de moderada virulencia en sangre, en modelos murinos, con amplio espectro de órganos invadidos especialmente células musculares de los tres tipos: esqueléticas cardíacas y lisas. El aislado fue compatible con los referentes moleculares del linaje TcI, el de más amplia distribución en Venezuela. Los resultados indican que hay transmisión activa de la enfermedad de Chagas en el estado Anzoátegui, lo cual amerita más investigaciones.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Signo de Romaña, Linaje de *T. cruzi*, estado Anzoátegui, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), el cual

es transmitido por insectos hematófagos (Hemíptera, Reduviidae, Triatominae). Los tripomastigotes metacíclicos infectantes salen en las deyecciones del vector e ingresan al organismo, a través del orificio de la picadura, escoriaciones de la piel o atravesando la mucosa ocular, nasal u oral de mamíferos incluyendo al hombre. Habitualmente *T. cruzi* invade principalmente los tejidos musculares cardíaco y lisos, y nervioso, causando miocardiopatía chagásica, adenitis y disfunción de placa motora en vísceras profundas (Brener *et al.*, 2002).

En el presente trabajo se presenta un caso clínico de un preescolar con síndrome agudo compatible con enfermedad de Chagas, procedente del estado Anzoátegui, considerado como una entidad de media a baja endemicidad con una prevalencia de 9% (MPPS, 2007). Se describe el caso, se confirma la etiología por

- 1 Centro de Medicina Tropical de Oriente, Universidad de Oriente (UDO) Núcleo Anzoátegui, Barcelona, estado Anzoátegui, Venezuela.
- 2 Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente (UDO) Núcleo Anzoátegui, Barcelona, estado Anzoátegui, Venezuela.
- 3 Hospital Universitario "Dr. Luis Razetti", Barcelona, edo. Anzoátegui, Venezuela.
- 4 Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Aragua, Maracay, estado Aragua, Venezuela
- 5 Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED) Universidad de Carabobo Sede Aragua, Maracay, estado Aragua, Venezuela.
- 6 Instituto de Zoología Tropical (IZT), Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela.

*Autor de correspondencia: elizabeth.ferrer@gmail.com

T. cruzi y se determina el comportamiento biológico y molecular del aislado parasitario. Se discuten las características e implicaciones del hallazgo.

Examen físico

Se realiza examen físico a preescolar masculino de 6 años, procedente del caserío Las Lajas, vía El Rincón, municipio Sotillo, estado Anzoátegui, con sintomatología de eritema y aumento de volumen bpalpebral (Fig 1). Inicialmente el paciente fue referido a un ambulatorio y tratado en primera fase con antibiótico oral sin mejoría, referido posteriormente al Hospital Universitario “Dr. Luís Razetti” de Barcelona, donde ingresó con el presunto diagnóstico de celulitis periorbitaria de ojo derecho y fue tratado con oxacilina sódica endovenosa. Al examen físico el niño presentó limitación de la apertura palpebral, edema con rubor y calor, de consistencia firme, no doloroso, que se extendía hasta el arco cigomático, sin afectación de conjuntiva bulbar, córnea y movimientos oculares. Se apreciaba secreción serosa. Al reconocimiento se observó también adenomegalia en ángulo mandibular derecho, soplo mesosistólico paraesternal medio izquierdo II/VI, lesión plana eritematosa a nivel del borde externo del recto abdominal izquierdo con cicatriz umbilical compatible con chagoma de inoculación. Otros signos y síntomas encontrados fueron; hígado debajo del borde costal derecho, no doloroso y bazo grado II/IV, con un incremento de edema y fiebre de 38 y 39 °C. Tratamiento con clindamicina no resolutorio y posterior ganglio satélite y esplenomegalia (grado III/IV).

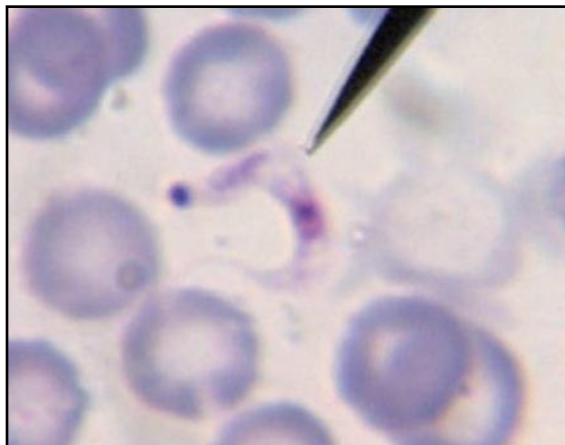
Fig. 1. Fotografía del Preescolar de 6 años del estado Anzoátegui, con signo de Romaña.



Diagnóstico

Métodos parasitológicos: Los métodos parasitológicos directos tales como; examen de sangre al fresco, extendido de sangre periférica coloreado con Giemsa (Fig. 2) y técnica de Strout, así como los métodos parasitológicos indirectos, xenodiagnóstico artificial y hemocultivo, permitieron evidenciar las formas evolutivas características de *T. cruzi*.

Fig. 2. Forma tripomastigota sanguícola de *Trypanosoma cruzi* en fotografía de observación microscópica del extendido de sangre periférica coloreado con Giemsa. Aumento 100 X.



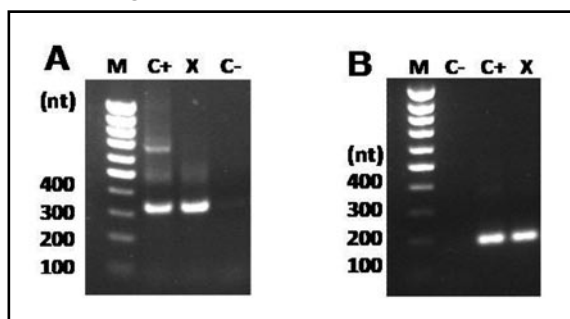
Métodos inmunológicos: Se realizó la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* mediante las técnicas de hemaglutinación indirecta (Winner Laboratorios S.A.I.C) y ELISA (SmartTest) realizadas en el Centro de Medicina Tropical de la Escuela de Medicina de la Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, resultando estas dos técnicas positivas. Se evidenció tanto IgM como IgG.

Métodos especializados y auxiliares: Se le realizó ecosonografía abdominal donde se evidenció hepatoesplenomegalia. La evaluación cardiológica mediante electrocardiograma y ecocardiograma, descartó afectación miocárdica aguda. La hematología completa del paciente mostró conteo de glóbulos blancos y recuento diferencial dentro de límites normales para su edad.

Métodos moleculares: Se realizaron técnicas de diagnóstico molecular del aislado parasitario mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en la Sección Parasitología Molecular del

Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Aragua. Se realizó la detección de ADN satélite de *T. cruzi* según Moser *et al.*, (1989), empleando los cebadores específicos TCZ1 (cebador directo) 5' CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT-3' y TCZ2 (cebador reverso) 5'-CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3', los cuales permitieron la amplificación de una región repetida de 188 pares de bases (pb) del ADN satélite de *T. cruzi* (Fig. 3). Además se realizó la detección de ADN de minicírculo de kinetoplasto de *T. cruzi* según Wincker *et al.*, empleando los cebadores específicos: 121 (cebador directo) 5'-AAATAATGTACGGGTGAGATGCATGA-3' y 122 (cebador reverso) 5'-GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT-3', los cuales permitieron la amplificación de una banda de 330 pb característica del ADN de minicírculo (Fig. 3).

Fig. 3. PCR para diagnóstico. A) Amplificación de ADN de kinetoplasto de *Trypanosoma cruzi* por PCR, B) Amplificación de ADN satélite de *T. cruzi* por PCR. (M) marcador de tamaño del fragmento de ADN en nucleótidos (nt), (C+) Control positivo ADN extraído de *T. cruzi* Dm28c en cultivo, (X) ADN extraído de triatomino alimentado con sangre del paciente (C-) Control negativo, mezcla de PCR sin ADN.



Tratamiento

Se le administró al paciente benznidazol a una dosis de 5 a 7 mg por kg peso/día, dividido en dos dosis por día, por 90 días, la cual fue bien tolerada, no observándose ningún efecto adverso. La respuesta terapéutica al benznidazol se verificó al décimo día, al presentar el paciente mejoría del complejo oftalmoganglionar y al no encontrar formas parasitarias en varias visualizaciones de examen de sangre al fresco y a través del método de Strout. Se realizaron controles de hematología completa, plaquetas y química sanguínea.

Caracterización del aislado parasitario

La caracterización parasitológica del aislado se realizó mediante los parámetros de Barretto (1965) y de la OMS (1986). Para ello se extrajo 20 mL de sangre venosa periférica al paciente, los cuales fueron usados en la técnica de xenodiagnóstico artificial (Cedillos *et al.*, 1982), alimentando hasta la repleción 15 ninfas sanas de III y IV estadio de *Rhodnius prolixus* criados en el laboratorio, con examen regular de las heces a los 15 y 30 días post ingurgitación. Se realizó disección del intestino completo de los insectos mezclando el material fecal con solución salina al 0,85% para ser observado al microscopio óptico y para su cuantificación según el método de Brener modificado (Brener, 1962).

El material fecal fue inoculado intraperitonealmente a razón de 200 tripomastigotes metacíclicos/gr de peso del animal en lotes de 5 ratones hembras de la cepa NMRI isogénica (12 gramos de peso corporal promedio). Se determinó periodo pre-patente y nivel de parasitemia mediante el examen directo de la sangre de la vena de la cola. Muestras de necropsias de corazón, hígado, bazo, colon, duodeno, cerebro, pulmón, riñón, piel, músculo esquelético, ganglios linfáticos, diafragma, estómago, esternón, glándula suprarrenal, vejiga, lengua, páncreas y tejido adiposo, fueron tomadas de los animales con las más altas parasitemias (sacrificados según el Código de Bioética y Bioseguridad de FONACIT: www.fonacit.gob.ve).

El periodo pre-patente, en el modelo murino fue de 8 días post-inoculación con niveles máximos de parasitemia de $3,0 \times 10^5$ tripomastigotas/mL de sangre, revelando una virulencia media en sangre. Se observó un rango amplio de invasión tisular con 11 tejidos de 19 evaluados con pseudoquistes de amastigotas principalmente en células cardíacas, musculatura esquelética y lisa (Tabla I, Fig. 4 y 5).

La amplificación del espaciador no transcrito del gen de miniexón y de la fracción 3' del ADN ribosomal 24S α , mediante PCR según Souto *et al.* (1996) permitió identificar el aislado como TcI, evidenciándose la presencia de una banda de 350 pb y 110 pb, respectivamente (Fig. 6).

DISCUSIÓN

El examen físico del paciente y síntomas tales como fiebre, hepatomegalia y el signo de Romaña,

Tabla I. Hallazgos histotrópicos de los tejidos de ratones de la cepa NMRI, inoculados con el aislado de *Trypanosoma cruzi* obtenido del paciente.

Órganos y tejidos	Presencia de pseudoquistes
Corazón	+++
Músculo esquelético	++
Estómago	++
Intestino delgado	++
Intestino grueso	+
Páncreas	+
Hígado	+
Esternón	+
Pulmón	+
Riñón	+
Lengua	+
Diafragma	-
Piel	-
Bazo	-
Glándula suprarrenal	-
Vejiga	-
Cerebro	-
Ganglio	-
Tejido adiposo	-

Grado de histotropismo	Nº de Pseudoquistes/50 campos de 400X
- = Parasitismo ausente	- = 0
+ = Parasitismo escaso	+ = 1 - 10
++ = Parasitismo moderado	++ = 10 - 30
+++ = Parasitismo abundante	+++ = 30 - 60
++++ = Parasitismo intenso	++++ = > 60

Fig. 4. Pseudoquiste en biopsia de tejido cardíaco de ratón de la cepa NMRI, inoculado con el aislado de *Trypanosoma cruzi* obtenido del paciente, coloración Hematoxilina-Eosina, aumento 100X.

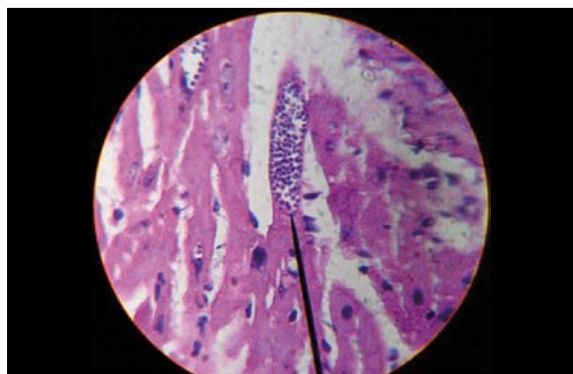


Fig. 5. Pseudoquiste en corte histológico de pelvis renal de ratón de la cepa NMRI, inoculado con el aislado de *Trypanosoma cruzi* obtenido del paciente, coloración Hematoxilina-eosina, aumento 100X.

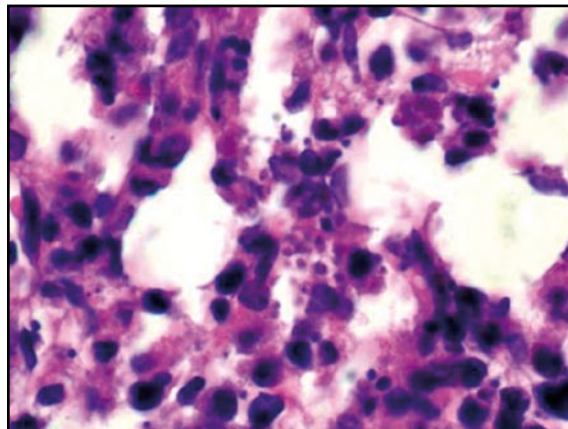
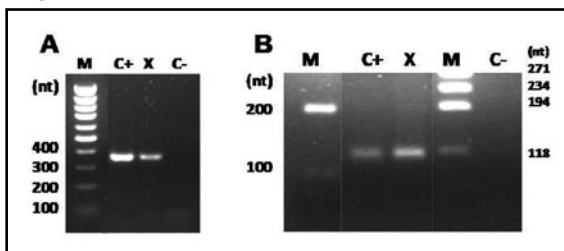


Fig. 6. PCR para caracterización de aislados de *Trypanosoma cruzi*. A) Amplificación de ADN de miniexón de *T. cruzi* por PCR, B) Amplificación de ADN ribosomal 24S a por PCR. (M) marcador de tamaño del fragmento de ADN en nucleótidos (nt), (C+) Control positivo, ADN extraído de *T. cruzi* Dm28c en cultivo, (X) ADN extraído de triatmino alimentado con sangre del paciente, (C-) Control negativo, mezcla de PCR sin ADN.



permitieron sospechar que se estaba frente a un caso agudo de enfermedad de Chagas.

El examen de sangre al fresco, extendido de sangre periférica coloreado con Giemsa y la técnica de Strout, evidenciaron la presencia de hemoflagelados con morfología típica para *T. cruzi*, en sangre. El Xenodiagnóstico artificial y hemocultivo de sangre obtenida del paciente con recuperación de metacíclicos infectivos en heces de los triatominos y el crecimiento de estadios polimorficos en medio de cultivo fueron confirmatorios del diagnóstico parasitario, demostrándose en este caso humano, una elevada parasitemia, donde los métodos parasitológicos resultaron adecuados para el diagnóstico.

Al menos dos de las pruebas inmunológicas recomendadas por el Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS, 2007), para confirmar casos de enfermedad de Chagas, hemaglutinación indirecta y el ensayo inmunoenzimático (ELISA), resultaron positivas. Además, por ELISA se evidenció tanto IgG como IgM, esta última característica de los procesos en fase aguda.

Las técnicas moleculares permitieron evidenciar la presencia de secuencias de ADN específico de *T. cruzi*, tales como ADN satélite y ADN de minicírculo de kinetoplasto, en triatomíneos alimentados con sangre del paciente, lo que permitió confirmar el diagnóstico parasitológico a través de pruebas moleculares.

Los parámetros parasitológicos de este aislado en modelo murino, con un período pre patente corto nivel medio de virulencia en sangre y un amplio espectro de invasión tisular, concuerdan con otros aislados de la región (de vectores, humanos y otros mamíferos) reveló que de no haber sido tratado el paciente podría este ser a la vez un portador sintomático en riesgo de muerte y un excelente reservorio actuante en la transmisibilidad (dada la considerable parasitemia) de un inminente foco de transmisión activa (Morocoima, 2002).

Es de hacer notar que en infecciones experimentales este aislado mostró un tropismo hacia cálice renal (Fig. 5), lo cual resulta novedoso ya que los registros de donde se involucra a *T. cruzi* y riñón se circunscriben a transmisiones a través de donación las cuales mantienen en dudas si es a través del órgano o de fluidos que lo acompañan en su inserción (Riarte *et al.*, 1999).

La presencia de TcI, confirma el hecho de que éste es uno de los linajes que se presentan en mayor frecuencia en áreas endémicas de Venezuela en humanos (Añez *et al.*, 2004) y en triatomíneos vectores (Felicangeli *et al.*, 2003; Carrasco *et al.*, 2005).

La casa del niño era de zinc con piso de tierra, se revisó todas las paredes de zinc, enseres, colchones, etc., no observándose infestación triatomínica en la vivienda. Alrededor de la vivienda había palmas de cocos, ecótopo natural por excelencia para triatomíneos en la región. Otras formas de transmisión, como por ejemplo transmisión oral por contaminación de alimentos y enseres, descrita en ambientes cerrados,

tal como el brote urbano en Chacao-Caracas (Alarcón de Noya, 2008), no debe descartarse. Se fumigó la casa y se les realizó serología a todos sus familiares resultando todos negativos. Sin embargo, desde el punto de vista epidemiológico, se hace necesario un examen exhaustivo por diferentes técnicas, de todos los miembros del núcleo familiar y del entorno e interior de la vivienda para determinar los factores de riesgo existentes.

Los resultados indican que a pesar de que las estadísticas institucionales colocan al estado Anzoátegui con un 9% de prevalencia (MPPS, 2007) en la infección Chagásica, la existencia de casos agudos y transmisión activa es un evento que requiere investigarse para tomar las adecuadas medidas de control.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Servicio de Pediatría e Inmunología del Hospital Luis Razetti y a la familia del niño objeto de este estudio, a quienes preservamos su identidad. Este trabajo fue financiado por los proyectos FONACIT G-2005-000406, CDCH-UCV PG 03-005609-2004 y Proyecto LOCTI-UC-Administradora 0220.

Chagas disease in Anzoátegui state, Venezuela: Detection of an acute case and parasitological and molecular characterization of the parasite isolate

SUMMARY

An acute case of Chagas disease in a preschool male, 6 years old, from the village of Las Lajas, municipality of Sotillo, state of Anzoátegui, Venezuela, is described. Clinically on the inspection and palpation, he presented right bipalpebral erythema and oedema with a subsequent satellite node, suggesting the classical Romana sign. He also had a flat erythematous lesion between the outer edge of the left rectus abdominis and the umbilical scar, compatible with a chagoma of inoculation. Hepatoesplenomegaly was also detected. The patient had fever of 38°C and 39°C. On auscultation, parasternal mesosistolic blow was heard. As treatment with Clindamycin was not resolving, we decided to investigate the presence of causal agent in blood, by means of direct and indirect methods, serology and molecular techniques. The parasitological study demonstrated the presence

of *Trypanosoma cruzi*, which showed moderate virulence in blood, murine models, with broad spectrum of colonized organs, especially cardiac, skeletal, smooth muscle cells and atypical invasion of kidneys. The molecular characterization of isolates showed a pattern compatible with TcI lineage, the most distributed in Venezuela. These results indicate that active transmission of Chagas disease in the state of Anzoátegui persists and more investigations are required.

Key words: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, Romanha sign, lineage of *T. cruzi*, Estado Anzoátegui, Venezuela.

REFERENCIAS

- Alarcón de Noya B. (2008). Enfermedad de Chagas en Caracas. *Salus*. **12(1)**: 4-5.
- Añez N., Crisante G., da Silva F. M., Rojas A., Carrasco H., Umezawa E.S., *et al.* (2004). Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. *Trop. Med. Int. Health*. **9**: 1319-1326.
- Barretto M. P. (1965). Tripanosomas semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação com o agente etiológico da Doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **7**: 305-315.
- Brener Z. (1962). Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **4**: 389-396.
- Brener Z., Andrade Z. & Barral-Netto M. (2002). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2ª edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, Brasil.
- Carrasco H. J., Torrellas A., Garcia C., Segovia M. & Feliciangeli M. D. (2005). Risk of *Trypanosoma cruzi* I (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) transmission by *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) in Caracas (Metropolitan District) and neighboring States, Venezuela. *Int. J. Parasitol.* **35**: 1379-1384.
- Cedillos R. A., Torrealba J. W., Tonn, R. J., Mosca W. & Ortégón A. (1982). El xenodiagnóstico artificial en la Enfermedad de Chagas. *Bol. Of. San. Panamer.* **93**: 240-249.
- Feliciangeli M. D., Carrasco H., Patterson J. S., Suarez B., Martínez C. & Medina M.. (2004). Mixed domestic infestation by *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 and *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811, vector incrimination, and seroprevalence for *Trypanosoma cruzi* among inhabitants in El Guamito, Lara State, Venezuela. *Am J. Trop. Med. Hyg.* **71**: 501-505.
- MPPS (2007). *Guía para el Diagnóstico, Manejo y Tratamiento de Enfermedad de Chagas en fase Aguda a nivel de los Establecimientos de Salud*. Primera Edición.
- Morocoima A. (2002). *Caracterización parasitológica y molecular de aislados de Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi obtenidos del estado Anzoátegui*. Trabajo de grado de Maestría. Postgrado Nacional de Parasitología, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Moser D., Kirchhoff L. & Donelson J. (1989). Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA Amplification Using the Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 1477-1482.
- OMS (1986). *Report of a meeting on the feasibility of analytical epidemiological studies on Chagas disease: guidelines for a standard protocol*. Ginebra.
- Riarte A., Luna C., Sabatiello R., Sinagra A., Schiavelli R., De Rissio A., *et al.* (1999). Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience, 1989-1996. *Clin. Infect. Dis.* **29**: 561-567.
- Souto R. P., Fernandes O., Macedo A. M., Campbell D. A. & Zingales B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **83**: 141-152.
- Wincker P., Britto C., Pereira J.B., Cardoso M.A., Oelemann W. & Morel C.M. (1994). Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**: 771-777.

Recibido el 09/07/2007
Aceptado el 19/09/2008

Anomalías morfológicas y estructurales en fetos de ratones con infección aguda experimental por *Trypanosoma cruzi*

Mary Carmen Pérez¹, Maritza Alarcón^{1*}, Loredana Goncalves², Ana Lugo de Yarbuh¹, Elio Moreno¹, Sonia Araujo¹ & Juana Villarreal³

El presente estudio muestra el desarrollo de fetos de ratones hembras NMRI inoculadas con la cepa M/HOM/BRA/53/Y de *Trypanosoma cruzi* y preñadas durante la fase aguda de la infección. Altos niveles de parasitemias fueron observados en las ratonas con 30 días post-infección y 20 días de gestación, en comparación con las detectadas en los ratones vírgenes e infectadas con *T. cruzi*. En 3 de los fetos (15%) provenientes de dos madres infectadas/gestantes con altas parasitemias, se observaron signos de anomalías congénitas morfológicas y estructurales músculo-esqueléticas. Presentándose en uno de los fetos la formación de dos protuberancias, una sobre el lado dorsal del cuerpo y la otra en la base de la pata inferior izquierda, en otro de los fetos, la pata derecha se desarrolló sobre el lado derecho de la cara y en un tercer feto se formó una protuberancia en la pata anterior izquierda a nivel de la región subescapular. El estudio histopatológico con hematoxilina y eosina de los tejidos muscular esquelético y cardíaco, mostró en el 10% (2/20) de los tejidos fetales, intenso infiltrado celular mononuclear con predominio de linfocitos, macrófagos o histiocitos y monocitos entre las fibras musculares y cardíacas, con discreta miositis y miocarditis. Con la técnica de peroxidada anti peroxidada se observaron abundantes depósitos antigénicos, tanto en placenta como en músculo esquelético de los fetos con alteraciones morfológicas. En los ratones infectadas/gestantes los fetos presentaron reducción del peso corporal y retardo en el crecimiento fetal, así como reducción en el número de fetos de 10 en comparación con 14 fetos de mayor tamaño y aspecto normal desarrollados en las ratonas sanas preñadas.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, preñez, ratón, anomalía morfológica fetal.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana se adquiere en las zonas rurales endémicas mediante la transmisión vectorial del *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909), a través de contaminación con las excretas postprandiales de numerosas especies de triatominos hematófagos (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) contentivas de tripomastigotes metacíclicos (Kollien & Schaub, 2000). Además de esta vía de transmisión mediada por el vector, otras vías alternas han sido consideradas tales como, las transfusiones sanguíneas y trasplantes

de órganos, infecciones accidentales en laboratorios, transmisión sexual, vía oral y por la vía congénita o transplacentaria (Días & Brener, 1984; Becker, 1975; Amato Neto *et al.*, 2000; Cardoso *et al.*, 2005; Bittencourt, 1992; Nilo *et al.*, 2005).

La infección congénita con *T. cruzi* ocurre tanto en humanos como en animales experimentales, con mayor riesgo de transmisión durante la fase aguda por la gran cantidad de tripomastigotes circulantes en la sangre periférica. Sin embargo, a pesar de las altas tasas de prevalencia de *T. cruzi* en mujeres gestantes en América del Sur, solo una pequeña proporción de los niños nacidos de estas madres infectadas desarrollan la infección con signos clínicos y síntomas compatibles con la fase aguda (Carlier & Torrico, 2003).

Los estudios en animales experimentales han reforzado el conocimiento sobre la interacción

¹ Laboratorio de Parasitología Experimental (LAPEX).

² Laboratorio de Inmunología de Parasitosis (LABINPAR), Depto. de Biología, Facultad de Ciencias.

³ Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de los Andes. Mérida 5101, Venezuela.

*Autor de correspondencia: amaritza@ula.ve

materno-fetal, por *T. cruzi*, un efecto es el retardo en el crecimiento fetal (peso/talla), que puede ser asociado o no a la infección congénita, aun con evidentes parasitemias en las madres gestantes (Andrade, 1982). Durante el embarazo la madre desarrolla una respuesta inmune supresora, por lo que la transferencia de antígenos de *T. cruzi* al feto, podría influir en la capacidad de la progenie de responder a la infección, por modular su sistema inmunológico (Carlier & Truysen, 1999).

La anatomía patológica de la infección congénita ha sido verificada por numerosas investigaciones tanto en la placenta como en el producto de la gestación, en este sentido la patología de la infección fetal se ha relacionado con mortinato, abortos, lesiones reticuloendoteliales y del músculo esquelético, corazón, piel, esófago e intestino (Bittencourt, 1976; Freilij & Altcheh, 1994) y asociada a manifestaciones clínicas específicas y no específicas (Zaidenberg, 1998). En este sentido, es de particular interés reconocer la virulencia, patogenicidad y procedencia de los parásitos que producen infecciones intrauterinas con consecuencias patológicas importantes, por cuanto la infección fetal puede producirse en etapas tempranas de la gestación (Alarcón *et al.*, 2006). Algunos autores han sugerido que las lesiones causadas en la placenta y en los fetos depende de la heterogeneidad de las cepas de *T. cruzi*, lo cual juega un papel muy importante en la transmisión congénita (Sala *et al.*, 2006). Los niños recién nacidos que sufrieron infección intrauterina presentaron diferentes grados de morbilidad y compromiso del estado general, relacionado con hipotonía muscular, fiebre y hepatoesplenomegalia. En otros casos la patología reveló cuadros de insuficiencia cardíaca, meningoencefalitis con crisis convulsivas, microcefalia y en niños con infección congénita, las manifestaciones clínicas tardías fueron, principalmente, hepatoesplenomegalia e insuficiencia cardíaca, sin embargo luego de diez años de seguimiento no se observaron secuelas cardiovasculares (Feilij & Altchet, 1994; Pehrson *et al.*, 1982).

El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar los fetos de ratones de la cepa NMRI con infección chagásica aguda desde el punto de vista morfométrico, histopatológico e inmunocitoquímico para conocer potenciales anomalías causadas por el parásito, en la etapa fetal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa de Trypanosoma cruzi

Se utilizaron tripomastigotes metacíclicos de la cepa M/HOM/Bra/53/Y de *T. cruzi* (Pereira da Silva & Nussenzweig 1953), mantenidos mediante pasajes sucesivos en medio de cultivo NNN, en ratones NMRI isogénicos y en ninfas de *Rhodnius prolixus* criadas en laboratorio y comprobadamente sanas.

Infección experimental de las ninfas de R. prolixus

Preparación del inóculo de *T. cruzi*. ninfas de V estadio de *R. prolixus*, criadas en laboratorio y comprobadamente sanas, fueron alimentadas hasta la repleción sobre ratones con altas parasitemias.

A los 30 días post-ingesta sanguínea, las ninfas fueron alimentadas nuevamente sobre ratones sanos, las deyecciones fueron revisadas para la cuantificación de los parásitos (Brenner, 1962). El inóculo fue ajustado a 22×10^3 tripomastigotes metacíclicos en 5 μ L de suspensión.

Infección experimental y apareamiento

Un total de 24 ratones hembras NMRI (*Mus musculus*) de un mes de nacidas y con un peso promedio de 20 g, fueron separadas en 4 grupos de 6 ratones cada uno: infectadas y preñadas en fase aguda de la infección (IP), vírgenes e infectadas (VI) (control infectado), sanas vírgenes (SV) (control sano) y sanas preñadas (SP) (control gestante). 12 ratones fueron infectados con 22×10^3 tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* por vía intraperitoneal (ip). La parasitemia fue estimada a partir de los 5 días post-inoculación (pi) en 5 μ L de sangre extraída de la cola de cada ratón (Brenner, 1962). Los 12 ratones restantes fueron inyectados con 0,05 mL de solución salina por la vía ip. El contenido vaginal de 6 de los ratones infectados con *T. cruzi* (IP) y de 6 ratones sanas (SP) fue revisado y la presencia de células nucleadas y epiteliales cornificadas en el moco vaginal, comprobó que se encontraban en proestro o estro del ciclo estral (Waynforth & Flecknell, 1992), luego fueron colocadas en jaulas individuales en una relación 2 hembras:1 macho durante 3 días y una vez comprobada la presencia de espermatozoides en el frotis del contenido vaginal, fueron separadas de los machos y mantenidas con Ratarina® y agua ad libitum.

Extracción de los fetos

Los ratones infectados (IP) y los sanas preñadas (SP) a término de su gestación fueron sacrificados con éter dietílico y después de la necropsia los fetos fueron extraídos de cada uno de los sacos uterinos, a través de una incisión longitudinal del saco uterino, luego se lavaron con solución fisiológica y el corazón y fragmentos de músculo esquelético fueron extraídos a cada feto, fijados en formalina neutra al 10%, deshidratados en alcohol isopropílico, alcohol-acetona 1:1, acetona-xilol 1:1 y xilol, xilol-paraplast 1:1 a 60°C durante 12 hr, impregnados con Paraplast (Monoject Scientific, St. Louis, MO. USA) a 56°C por 12 hr, cortados en secciones de 7 µm de espesor con un microtomo Spencer y coloreados con Hematoxilina y Eosina (HE) (Sigma, St. Louis. USA). La detección de restos antigénicos de *T. cruzi* fue realizada mediante la utilización de la técnica de peroxidasa anti-peroxidasa (PAP). Los cortes de tejidos fetales desparafinados se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol por 30 minutos y con suero normal de cabra al 30% en PBS. Las muestras se incubaron 1 hora con suero anti-*T. cruzi* producido en conejo diluido 1:300 en PBS a pH 7,2, 45 minutos con anti-IgG de conejo producido en cabra conjugado a peroxidasa (HRP) diluido 1:500 en PBS, 45 minutos con solución reveladora (una pastilla de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) y una de urea en 5 mL de agua deionizada) y contracoloradas con Hematoxilina de Mayer durante 1 hora. Finalmente se cubrieron con glicerina tamponada y fueron observadas al microscopio óptico con objetivo de 40X.

El manejo de los animales experimentales se llevó a cabo siguiendo el protocolo para el manejo de animales de experimentación del Comité de Bioética y Seguridad de FONACIT (www.fonacit.gob.ve) en su capítulo 2.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías y un Test de Tukey con un nivel de significancia del 95% para estudiar diferencias significativas en las parasitemias registradas para los ratones infectados/gestantes y vírgenes/infectados según Box *et al.* (2005).

RESULTADOS

Evaluación de la parasitemia. Los valores más altos de parasitemia $58,94 \pm 26,5$ trips/mm³ de

sangre, fueron observados en los ratones infectados/gestantes (IP) a los 14 días pi y 4 días de gestación, con disminución a $25,62 \pm 7,71$ trips/mm³ de sangre a los 30 días pi y 20 días de gestación, tiempo en el cual se sacrificaron los ratones para la extracción de los fetos. En el grupo de ratones vírgenes/infectados (VI) el valor más alto de parasitemia de $52,30 \pm 21,14$ trips/mm³ de sangre fue observado a los 30 días pi (Fig. 1). La comparación entre las parasitemias de los ratones infectados/gestantes y los ratones vírgenes infectados con *T. cruzi* reveló diferencias estadísticamente significativas ($P=0,023$).

Características morfológicas específicas de los fetos. De 20 fetos a término de su desarrollo intrauterino en los ratones (IP) con *T. cruzi*, 3 (15%) de ellos desarrollaron alteraciones morfológicas corporales. En dos de estos fetos provenientes de una misma madre IP, uno de ellos presentó la formación de dos protuberancias, una sobre la porción dorsal posterior del cuerpo a nivel de la columna vertebral y la otra en la base de la pata inferior izquierda (Fig. 2A), en el otro feto se desarrolló la pata superior derecha sobre el lado derecho de la cara (Fig. 2B). En un feto proveniente de otra madre del mismo grupo IP, se observó el desarrollo de una protuberancia de la pata superior izquierda a nivel de la región subescapular (Fig. 2C).

En estas madres IP se observó una reducción tanto en el tamaño corporal como en el número de fetos, registrándose en el útero de las 6 madres infectadas (14, 6, 12, 12, 9 y 10 fetos) un promedio de 10 fetos/

Fig. 1. Cinética de los niveles de parasitemias $\pm$ D.E. detectadas en los ratones gestantes infectados y en ratones vírgenes infectados, ambas en fase aguda producida por *Trypanosoma cruzi*, cepa Y.

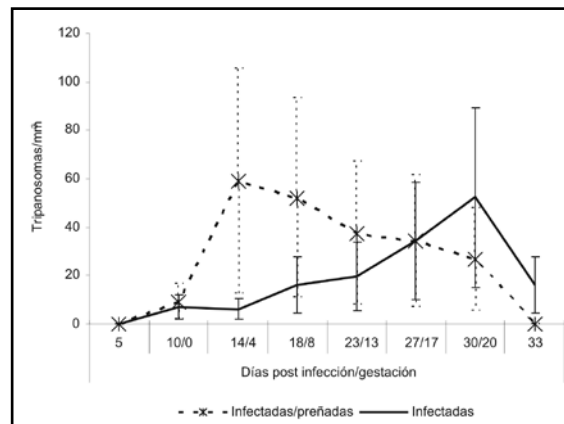
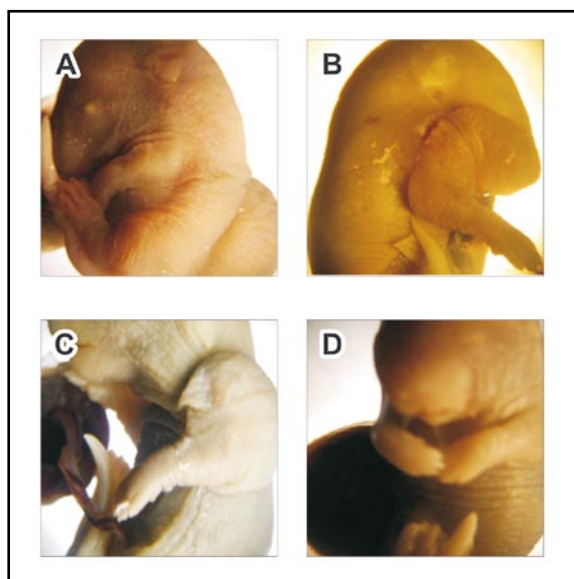


Fig. 2. Fetos de ratones NMRI con 30 días de infección con *Trypanosoma cruzi* y 20 días de desarrollo intrauterino que muestran: A) Feto con formación de dos protuberancias: una sobre la porción dorsal posterior del cuerpo a nivel de la columna vertebral y la otra en la base de la pata superior izquierda, B) desarrollo de la pata superior derecha sobre el lado derecho de la cara (→); C) desarrollo de una protuberancia de la pata superior izquierda en la región subescapular; D) feto de ratón sano gestante con crecimiento y desarrollo intrauterino de aspecto normal (400X).



madre, mientras que en las madres sanas se observó un promedio de 14 fetos/madre con crecimiento y desarrollo intrauterino de aspecto normal. (Fig. 2D). Las malformaciones fueron observadas en uno de 6 fetos de una madre IP y en dos fetos de otra madre IP de la cual obtuvimos 10 fetos, cabe destacar que ambas madres presentaron los mayores valores de parasitemias a los 14/4 y 18/8 días pi/gestación. (Tabla I).

Estudio Histopatológico. En los tejidos cardíaco y muscular esquelético del 10% (2/20) de los fetos provenientes de las madres con infección chagásica aguda, se observó infiltrados celulares linfocitarios, macrófagos y monocitos entre las fibras musculares cardíacas y esqueléticas respectivamente, todo ello sin parasitismo tisular evidente a microscopia de luz (Fig. 3).

Estudio Inmunocitoquímico mediante la técnica PAP: En las secciones de placenta y músculo esquelético de los fetos de madres infectadas,

Fig. 3. A) Corte histológico de corazón de feto de ratón con infección chagásica aguda y 20 días de desarrollo intrauterino que muestran infiltrado linfocitario focalizados entre las fibras cardíacas y próximos a los vasos sanguíneos con destrucción del tejido cardíaco (sin presencia de parásitos a la microscopia de luz). B y C) Cortes de tejido muscular esquelético fetal que muestran intenso infiltrado de células inflamatorias constituidas por macrófagos, linfocitos y monocitos, sin presencia de parásitos (→) (H-E. 400X, 1000X).

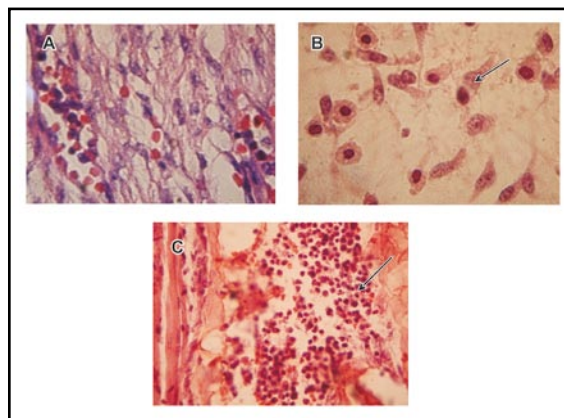


Fig. 4. Secciones histológicas de músculo esquelético de fetos de madres infectadas con la cepa Y de *Trypanozoma cruzi*, en las que se observan intensos depósitos antigénicos e infiltrado linfocitario entre las fibras musculares acompañado de daño tisular (A, B y C), sección de placenta de ratón infectada con depósitos antigénicos focalizados en el estroma (D) (PAP, 400X) (todo en ausencia de parásitos a la microscopia de luz).

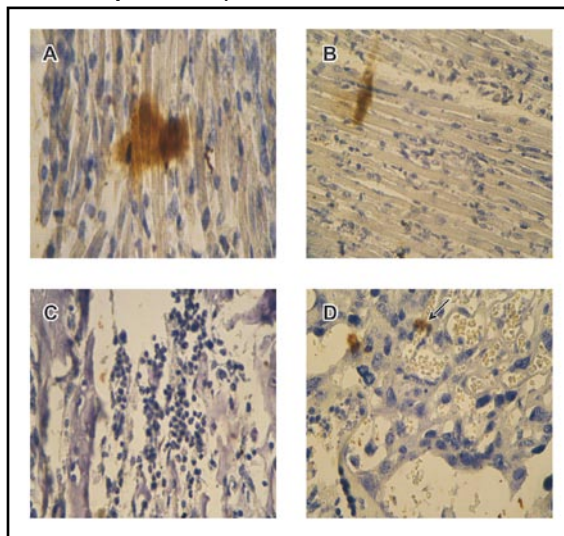


Tabla I. Número de fetos nacidos de madres sanas y de madres infectadas.

Madre N°	Número de fetos de madres sanas	Número de fetos de madres infectadas	
		Sin malformaciones aparentes	Con malformaciones
1	14	14	0
2	14	5*	1
3	13	12	0
4	14	12	0
5	14	9	0
6	14	8*	2

* Madres con altas parasitemias

con alteraciones morfológicas, fueron observados apreciables depósitos antigénicos de *T. cruzi* focalizados entre y sobre las fibras musculares, así como a nivel del estroma (Fig. 4).

DISCUSIÓN

En este estudio, empleando ratones hembras NMRI infectadas con la cepa Y de *T. cruzi*, observamos por medio de la técnica PAP depósitos antigénicos de *T. cruzi* en las secciones de placenta y de músculo esquelético de los fetos que presentaron alteraciones morfológicas y estructurales, confirmando de esta manera la liberación de proteínas y el paso del parásito por los tejidos fetales, aún cuando no se detectaron parásitos en las secciones tisulares estudiadas. Los resultados también revelaron la existencia de una relación directa entre el compromiso inflamatorio de la placenta y la infección fetal; resultados similares a los encontrados por Moreno *et al.* (2005), quienes observaron el infiltrado inflamatorio y depósitos antigénicos en las secciones de placentas y úteros de ratas Wistar crónicamente infectadas y con reactivación de la infección durante la gestación. Más recientemente Badra *et al.* (2008) observaron transmisión placentaria en ratones infectados con una cepa de *T. cruzi* aislada de murciélagos con cambios histopatológicos y presencia de nidos de amastigotes en úteros y placentas de los ratones durante la fase aguda de la infección, así como la presencia de nidos de amastigotes en el músculo esquelético fetal, confirmando la transmisión transplacentaria.

Los estudios de Id Boufker *et al.* (2006) haciendo seguimiento de embriogénesis in vivo e in vitro de ratones BALB/c experimentalmente infectados, han determinado que la infección aguda

por *T. cruzi* induce infertilidad, a pesar de que la ovulación, fertilización y primera división del cigoto, no se ve afectada ni demorada, sin embargo del estado de dos células a la fase de blastocisto se produce una desaceleración celular, no alcanzándose la fase de ocho células, por lo que en el desarrollo embrionario se produce un número insuficiente de blastómeros y otros degeneran. Estos y otros eventos estarían produciendo irregularidades en los procesos de diferenciación celular, crecimiento y desarrollo fetal, como lo observado en 3 (15%) de los fetos de ratones infectados, en los cuales se observaron diferencias en la fecundidad relacionada con una disminución en el número de fetos en comparación con los ratones sanos gestantes, los cuales mostraron un mayor número de fetos con tamaño corporal y desarrollo normal. En otras investigaciones Solana *et al.*, (2000) trabajando con ratones C3H/HeN infectados con las cepas RA y K98 determinaron diferencias en la fecundidad, en la producción de abortos y en la presencia parasitaria en las crías, afirmando que la cepa de *T. cruzi*, sería un factor determinante en los distintos aspectos de la infección congénita.

Las manifestaciones clínico patológicas y la infección fetal por *T. cruzi* pueden producirse tanto en etapas tempranas como tardías de la gestación, por lo que no existe ningún período exento del riesgo, de tal forma que se han reportado diversos patrones clínicos y datos sobre morbilidad y mortalidad en recién nacidos de madres con infección aguda, crónica y con recrudescencia de la infección crónica por efecto de la gestación. Por lo tanto la enfermedad de Chagas congénita puede resultar de un complejo equilibrio entre la respuesta inmune materna, factores placentarios, y las características de la cepa (Torrico *et al.*, 2004; Burgos *et al.*, 2007; Brutus *et al.*, 2008).

En el modelo experimental de infección congénita empleado, los tejidos cardíaco y muscular esquelético fetales, desarrollaron un proceso inflamatorio, inducido probablemente por la infección chagásica aguda de la madre, ocasionando anomalía tisular en los fetos, con características de una miocarditis y miositis, tal como se han detectado en recién nacidos con infección intrauterina, en los cuales es frecuente observar insuficiencia cardíaca o meningoencefalitis con crisis convulsivas, cardiomegalia, derrame pleural, taponamiento cardíaco y elevada mortalidad (Saleme *et al.*, 1971).

Por otro lado y en relación con la enfermedad de Chagas experimental y los defectos congénitos, la progenie puede provenir de madres que durante el embarazo se encuentran con una infección clínica, subclínica, reactivación, reinfección o una infección crónica latente y cada una de estas situaciones puede ser infectante para el recién nacido. En este sentido, la transmisión al feto puede ocurrir por la vía transplacentaria en el 10% de las portadoras en fase aguda o crónica de la infección materna, sin embargo aún se desconocen los factores que protegen a la gran mayoría de los hijos de madres infectadas con *T. cruzi*, los cuales nacen libres de la infección anomalías morfológicas, estructurales, funcionales o moleculares irreversibles, las cuales provocan una amplia variedad de patologías en los fetos. Los resultados del presente estudio evidenciaron manifestaciones clínicas con retraso en el crecimiento corporal intrauterino y signos de anomalías congénitas musculoesqueléticas severas en 3 (15%) fetos, en los cuales se produjeron alteraciones en la organización celular y en la maduración de sus sistemas, durante el período de gestación, cuando los fetos se encuentran con un sistema inmunológico inmaduro y una carga hormonal circulante en el feto de madres con infección chagásica aguda (Villaruel & Reyes, 2004). Otras investigaciones en humanos y ratas han sugerido que la reducción en el peso corporal y en el tamaño fetal atribuidas a la infección materna por *T. cruzi*, es provocada por la disminución en la absorción de alimentos, así como a las lesiones placentarias que afectan la transferencia de nutrientes de la madre al feto (Mjehdi *et al.*, 2002).

Finalmente concluimos que la enfermedad de Chagas congénita constituye por su importancia epidemiológica la tercera vía de transmisión del *T. cruzi*

al hombre. La incidencia de la transmisión vertical de *T. cruzi*, en los países de América Latina depende de factores epidemiológicos así como de la tasa de seroprevalencia, diferencias genéticas, inmunológicas y nutricionales de las madres gestantes con infección chagásica, sin embargo aún se desconocen los factores que condicionan la infección transplacentaria, al observarse que solo una pequeña proporción de los hijos de madres chagasicas adquieren la infección por esta vía (García *et al.*, 2001; Feliciangeli *et al.*, 2007; CLAP-OPS/OMS, 2007; Brutus *et al.*, 2008).

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico y Tecnológico de la Universidad de los Andes, Proyecto: C-1476-07-03-B.

Morphological and structural anomalies in fetuses of mice with acute experimental infection by *Trypanosoma cruzi*

SUMMARY

The present study shows the development of the fetuses from pregnant female mice NMRI inoculated with M/HOM/BRA/53/Y *Trypanosoma cruzi* strain. The infection revealed the highest levels of patent parasitemia in mice with 30 days post-infection and 20 days of pregnancy in comparison with infected unmated mice. Three fetuses (15%) from two infected mice with high levels of parasitemia, showed morphological and structural muscular-skeletal congenital anomalies. Two protuberances were observed, one on the dorsal side of the body, and the other on the left footpad base. In another fetus his right footpad came out from the right part of his face and in the 3rd one it was observed a lump in the left leg, above the level subscapular region. The histopathological study with hematoxylin-eosin staining of skeletal muscle and cardiac tissue, showed in 10% (2/20) of the mice, inflammatory infiltrate with lymphocytes, macrophages and monocytes into muscular and cardiac fibers, with discrete myositis and myocarditis. Peroxidase anti-peroxidase staining showed *T. cruzi* antigens in placenta and skeletal muscle of the fetuses with morphological alterations. In the pregnant mice, fetuses also showed both, loss of weight and growth retardation, as well as reduction

of the number of fetuses to 10 in comparison with 14 fetuses in normal and healthy pregnant mice.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, pregnancy, mice, fetal morphological anomalies

REFERENCIAS

- Alarcón M., Lugo de Yarbub A., Moreno E., Payares G., Araujo S. & Colmenares M. (2006). Presencia de *Trypanosoma cruzi* en tejidos de ratas Wistar infectadas experimentalmente y sus fetos. *Bol. Malarial. Salud Amb.* **46**: 137-148.
- Amato Neto V., Lopes M., Setsu E., de Sousa R & Pinto Dias J. (2000). Outras formas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Pat. Trop.* **29**: 115-129.
- Andrade SG. (1982). The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **76**: 123-128.
- Badra E. S., Sala M. A., Lopes R. A., Prado J. C. Jr., Albuquerque S., Zucoloto S. & Carraro-Abraham A. A. (2008) Histopatological Changes in the placental and fetuses of mice infected with *Trypanosoma cruzi* isolated from the Myotis nigricans bat. *J. Comp. Pathol.* **139**: 108-112.
- Becker P. (1975). Molestia de Chagas aguda accidental. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **17**: 187-198.
- Bittencourt A. L. (1976). Congenital Chagas' disease. A review. *Am. J. Dis. Child.* **130**: 97-102.
- Bittencourt A. L. (1992). Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **34**: 403-408.
- Box G. E., Hunter J. S. & Hunter W. G. (2005). *Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery*. 2ª edición, Ed. John Wiley & Sons. N.Y., USA.
- Brener Z. (1962). Observações sobre a imunidade a superinfecções em camundongos experimentalmente inoculados com *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratamento. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **4**: 119-123.
- Brutus L., Schneider D., Postigo J., Romero M., Santallab 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.
- Burgos J., Altchet J., Bisio M., Duffy T., Valadares H., Seidenstein M. et al. (2007). Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Inter. J. Parasitol.* **37**: 1319-1327.
- Cardoso A., Lescano S., Gakiya E., Santos S. & Amato Neto V. (2005). Avaliação da sobrevivência do *Trypanosoma cruzi* na cana de açúcar utilizada no preparo do caldo. *Parasitol. Latinoam.* **60**: 211-215.
- Carlier Y. & Truysens C. (1999). Influence of maternal infection on offspring resistance towards parasites. *Parasitol. Today.* **11**: 94-99.
- Carlier Y. & Torrico F. (2003). Congenital infection with *Trypanosoma cruzi* from mechanism of transmission to strategies for diagnosis and control. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **36**: 767-771.
- Chagas C. (1909). Nova trypanosomiasis humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. *N.Gen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **1**: 139-218.
- CLAP-OPS/OMS (2007). *Informe de la Consulta Técnica sobre Información, Educación y Comunicación (IEC) en Enfermedad de Chagas Congénita*. Montevideo, Uruguay.
- Dias J. & Brener S. (1984). Chagas' disease and blood transfusion. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **79**: 138-147.
- Feliciangeli M. D., Sánchez-Martín M. J., Suárez B., Marrero R., Torrellas A., Bravo A. et al. (2007). Risk factors for *Trypanosoma cruzi* human infection in Barinas state, Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **76**: 915-921.
- Freilij H. & Altcheh J. (1994). Chagas congénito pp. 267-278. En: *Enfermedad de Chagas*. Eds. Storino R. & Milei J. Ed. Mosby Doyma, Buenos Aires.
- Fretes R. & Fabro S. (1995). In vivo and in vitro analysis of lysosomes and acid phosphatase activity in human chagasic placenta. *Exp. Mol. Pathol.* **63**: 153-160.

- García A., Bahamonde I., Verdugo S., Correa J., Pastene O., Solara A., *et al.* (2001) Infección transplacentaria por *Trypanosoma cruzi*: Situación en Chile, *Revista médica de Chile*, **129**: 329-331.
- Guarner J., Bartlett J., Zaki S., Colley D., Grijalva M. & Powel M. (2001) Mouse model for chagas disease: immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**: 152-158.
- Id Boufker H., Alexandre H., Carlier Y. & Truysens C. (2006). Infertility in murine acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with inhibition of pre-implantation embryo development. *Am. J. Pathol.* **169**: 1730-1738.
- Kollien A. H. & Schaub G. A. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasit. Today*. **16**: 381-387.
- Mjihdi A., Lambot M. A., Stewart I. J., Detournay O., Noel J., Carlier Y. & Truysens C. (2002). Acute *Trypanosoma cruzi* infection in mouse induces infertility or placental parasites invasion and ischemic necrosis associated with massive fetal loss. *Am. J. Pathol.* **161**: 673-680.
- Moreno E., Méndez M., Alarcón M., Araujo S., & Lugo-Yarbuh A. (2006). Reactivación de la infección chagásica en ratas Wistar gestantes. *Kasmera*. **33**: 51-63.
- Moreno E., Araujo M., Alarcón M., Lugo de Yarbuh A., Araujo S. & Borges R. (2006). Efecto de la infección chagásica aguda en ratas wistar gestantes. *Rev. Cient. FCV. Universidad del Zulia (LUZ)*. **5**: 506-516.
- Nilo M., Alvarado J., Ramírez M. & Espejo E. (2005). Hallazgo de tripomastigotes en estudio citoquímico de líquido amniótico. *Parasitol. Today*. **24**: 49-51.
- Pehrson P., Walhgren M. & Bengtsson N. (1982). Intracranial calcification probably due to congenital Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **3**: 449-452.
- Pereira da Silva L. H. & Nussenzweig V. (1953). Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Fol. Clin. Biol.* **20**: 191-207.
- Pehrson P., Walhgren M. & Bengtsson N. (1982) Intracranial calcification probably due to congenital Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **3**: 449.
- Sala M., Lopes R., Carraro A. & Meneguette C. (2006) Efecto de La infección aguda por diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* sobre el crecimiento intrauterino de fetos de ratón. *Parasitol Latinoam.* **61**: 69-73.
- Saleme A., Yanicelli G. & Iñigo L. (1971). Enfermedad de Chagas-Mazza en Tucumán. *Arch. Arg. Ped.* **69**: 162.
- Solana M. E., Celentano A. M., Tekiel V., Jones M. & Gonzalez Cappa S. M. (2000). *Trypanosoma cruzi*: Effect of parasite subpopulation on murine pregnancy outcome. *J. Parasitol.* **88**: 102-106.
- Torrico F., Alonso Vega C., Suarez E., Rodriguez P., Torrico M. C., Dramaix M., Truysens C. & Carlier Y. (2004). Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **70**: 201-209.
- Truysens C., Herman E., Alonso Vega C., Rodríguez P., Vekemans J., Torrico F. & Carlier Y. (2005). Respuesta inmune en neonatos no infectados nacidos de madres infectadas con *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **38**: 96-100.
- Villarreal J. & Reyes A. (2004). *Síndrome de TORCH. Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. Ed. Banfi A., Ledermann W., Cofré J., Cohen J. & Santolaya M. E. 3ª edición. 312-324.
- Waynforth H. & Flecknell P. (1992). Experimental and surgical technique in the rat. *Academic Press Limited. London*. **6**: 119-124.
- Zaidenberg M. (1998). *Enfermedad de Chagas congénita. Temas de zoonosis y enfermedades emergentes*. En: Resúmenes del 2º Congreso Argentino de Zoonosis, Asociación Argentina de Zoonosis, Buenos Aires. p. 114-148.

Recibido el 09/07/2007
Aceptado el 19/09/2008

Susceptibilidad de *Trypanosoma cruzi* a diferentes venenos de serpientes de Costa Rica

Amparo Castillo-Vigil¹, Randall Loaiza¹, Rodrigo Zeledón^{1*}, Bruno Lomonte², Andrea Urbina¹ & Berta Valverde³

Se evaluaron los efectos tóxicos de los venenos de cinco serpientes costarricenses en cuanto a su capacidad tripanocida contra dos cepas de *Trypanosoma cruzi* y sus efectos en cuanto a los mecanismos de muerte celular. Los venenos de *Bothrops asper*, *Bothriechis schlegelii*, *Crotalus durissus durissus*, *Atropoides nummifer* y *A. picadoi*, mostraron actividad tripanocida contra las formas de epimastigoto, amastigoto y tripomastigoto. Los venenos de *B. asper* y de *A. nummifer* presentaron la más alta citotoxicidad para las células Vero. Los de *B. asper* y *B. schlegelii* presentaron la más alta actividad en los epimastigotos de la cepa CL, mientras que los venenos de *B. asper* y el de *A. nummifer* fueron más eficientes contra los epimastigotos de la cepa Jennifer. El veneno de *B. schlegelii* produce un efecto proliferativo en las células Vero; mientras que el de *C. d. durissus* produce el mismo efecto en los epimastigotos de la cepa CL, ambos a la concentración de 2,5 µg/mL. Los valores de CI_{50} mostraron que se requieren menores cantidades contra los amastigotos en relación con los epimastigotos. Los venenos de *B. asper* y *B. schlegelii* presentan la más alta actividad contra los amastigotos de ambas cepas. Con los tripomastigotos sanguíneos de la cepa GA, los cinco venenos ocasionaron una disminución de la motilidad en los diferentes tiempos de exposición, pero el veneno de *A. nummifer*, en las concentraciones más bajas, mostró una actividad más marcada en comparación con los otros venenos. En cuanto a los efectos de los venenos, mediados por los grados de apoptosis, necrosis o proliferación celular, se observó que estos fenómenos se presentan y tienen relación con el tipo de veneno, su concentración y el tiempo de exposición.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, veneno de serpiente, efecto tripanocida, muerte celular, Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

Los venenos de serpientes son identificados como una fuente rica de enzimas de origen natural, de las cuales algunas son muy importantes desde el punto de vista médico y han tenido un marcado uso en farmacología. La composición variada de estos venenos se basa en un complejo de péptidos y proteínas, además de bajas concentraciones de carbohidratos, lípidos, aminoácidos libres, citratos e iones metálicos (Fry & Wuster, 2004). Un ejemplo de su utilización en farmacología, es el Captopril® droga antihipertensiva

derivada de péptidos potenciadores de la bradicinina presentes en el veneno de *Bothrops jararaca* (Ferreira, 1965; Fernández *et al.*, 2004; Hayashi & Camargo 2005). También existen componentes en el veneno de la serpiente de cascabel de América del Sur (*Crotalus durissus terrificus*), los cuales presentan propiedades analgésicas, de un gran interés en la industria farmacéutica (Giorgi *et al.*, 1993).

Hay pocos estudios con venenos de serpiente para probar su actividad antiparasitaria. La acción tripanocida ha sido observada con los venenos de *Bothrops jararaca*, *Cerastes cerastes*, *Naja haje* y *Eristocophis macmahoni*, principalmente contra *Trypanosoma brucei* y *T. cruzi* (Fernández-Gómez *et al.*, 1994; Coura & de Castro 2002; Gonçalves *et al.*, 2002; Merkel *et al.*, 2007).

Se ha reportado que el veneno de *Bothrops moojeni* presenta actividad anti-*Leishmania*, induciendo

¹ Laboratorio de Zoonosis, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Costa Rica

² Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

³ Laboratorio de Estudios Especializados, Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera, Caja Costarricense del Seguro Social, San José, Costa Rica.

*Autor de correspondencia: rodrigozeledon@ice.co.cr

muerte celular por estrés oxidativo. En este caso, el componente responsable fue identificado como L-amino oxidasa (LAO) (Tempone *et al.*, 2001). El veneno de *B. jaracara* provoca un proceso de muerte celular programada en epimastigotos de *T. cruzi*, similar a la apoptosis de metazoarios; además, inhibe la multiplicación del parásito por la interrupción del potencial mitocondrial que causa daño al cinetoplasto. También, inhibe el crecimiento de promastigotos y amastigotos de cepas de *Leishmania* spp. (Gonçalves *et al.*, 2002; Deolindo *et al.*, 2005).

El objetivo de este estudio fue determinar y caracterizar comparativamente los posibles efectos antiparasitarios de cinco venenos de diferentes especies de serpientes de Costa Rica en las diversas etapas evolutivas de *T. cruzi*. Además, se evaluó el grado y tipo de alteración celular producidos por los venenos.

MATERIALES Y METODOS

Cepas de T. cruzi y venenos

Tres cepas de *T. cruzi* fueron utilizadas: Cepa Jennifer, aislada en el 2003, de una niña costarricense de seis años en la fase aguda de la enfermedad de Chagas; Cepa GA, aislada en 1998 de un adulto costarricense también en fase aguda y la cepa brasileña CL-transgénica, donada al Laboratorio por Celeste Vega y Miriam Rolón, de la Universidad Complutense de Madrid, España. Los epimastigotos se mantuvieron a 28°C en medio LIT suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Los amastigotos fueron mantenidos en cultivos de células Vero (Lizardi *et al.*, 1990). Los tripomastigotos sanguíneos fueron obtenidos de ratones Balb/c infectados con la cepa GA y mantenidos en solución de Locke.

Los venenos liofilizados de *Bothrops asper*, *Bothriechis schlegelii*, *Crotalus durissus durissus*, *Atropoides nummifer* (= *Bothrops nummifer*) y *A. picadoi* (= *B. picadoi*) fueron donados por el Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica. Las soluciones de venenos (2 mg/mL) fueron preparadas en agua estéril y antes de ser utilizadas fueron filtradas por membranas Millipore de 0,22 µm.

Cultivos celulares

Las células Vero se cultivaron en el medio "Minimal Essential Medium" de Dulbecco (DMEM,

Sigma- Aldrich) suplementado con 10% SFB, 200 µM de HEPES, bencilpenicilina (200 U/mL), y estreptomycin (150 U/mL).

Ensayo de citotoxicidad celular

En una placa de 96 pocillos de fondo plano, se agregaron 100 µL de la suspensión de células Vero (4 x 10⁵ células/mL), se incubaron por 12 horas a 37°C y luego fueron tratadas con las diferentes concentraciones de venenos de serpiente (2,5- 40 µg/mL) por 24 horas (Sánchez *et al.*, 2002). Cada muestra fue ensayada por triplicado, en tres diferentes experimentos. La viabilidad celular fue cuantificada utilizando el método de reducción de sales de bromuro de tretazolio (MTT). Se usaron 5 mg/mL de MTT y 2 mM de metasulfato de fenazina (PMS) para incrementar la sensibilidad y la reducción del formazan. La solución MTT/PMS fue agregada en cada pocillo e incubada por 45 minutos; el sobrenadante fue extraído y los cristales de formazan que quedaron en la placa se disolvieron con 100 µL de DMSO. La absorbancia fue determinada en un lector de microplacas de Elisa (Thermo LabSystems) a 540 nm (Mosmann, 1983).

Ensayo de susceptibilidad de epimastigotos de T. cruzi

La suspensión de epimastigotos a una concentración 1x10⁶ células/mL, fue adicionada en una placa de cultivo de 96 pocillos, la cual fue incubada por 72 horas a 28°C en una incubadora de 5% de CO₂. Se utilizaron las concentraciones de 2,5; 5; 10; 20 y 40 µg/ mL de los venenos, que fueron preparadas en diluciones seriadas. Los epimastigotos de las cepas Jennifer y CL se cuantificaron mediante la técnica de reducción de MTT/PMS. Las concentraciones que causaban el 50% de inhibición de crecimiento (CI₅₀) fueron estimadas en porcentaje, mediante el cálculo de la cantidad de parásitos para cada concentración de veneno; los parásitos sin venenos fueron considerados como 100% de crecimiento. Cada uno de los ensayos fue realizado en triplicado.

Ensayos de susceptibilidad de amastigotos de T. cruzi

A cada pocillo se agregaron 100 µL de la suspensión de células Vero, las que se colocaron en una incubadora de 5% de CO₂, por 8 horas a 37°C. Se realizaron dos lavados con PBS para remover

células no adheridas, se procedió a infectar las células con una suspensión de tripomastigotos tomados del sobrenadante de células Vero infectadas por seis días. La concentración se ajustó a un valor tal que existiera una relación de veinte parásitos por cada célula, y se incubó por 4 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ (Neva *et al.*, 1961). El número de parásitos intracelulares se determinó indirectamente por conteo de los tripomastigotos libre en una cámara de Neubauer (Hyde & Dvorak, 1973). Cada ensayo se realizó por triplicado.

Ensayo in vitro con tripomastigotos sanguíneos

Los tripomastigotos de la cepa GA se obtuvieron de la sangre de ratones Balb/c infectados, luego se adicionaron 25 µL de una suspensión con 1x10⁶ tripomastigotos/mL a cada pocillo, 25 µL de solución de Locke, y 25 µL de medio suplementado con las concentraciones de veneno a 3x. Como control negativo se utilizaron parásitos en solución de Locke. La motilidad y el número de parásitos se estimaron en un microscopio invertido a una magnificación de 400x, utilizando el siguiente criterio: (-) parásitos sin motilidad; (+) algunos con motilidad lenta; (++) motilidad lenta; (+++): con motilidad lenta y rápida (++++): motilidad normal. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Ensayo de viabilidad celular por la medición de deshidrogenasa láctica (DHL) de la cepa CL

El ensayo cuantitativo de citotoxicidad relacionado con la DHL citosólica de epimastigotos de *T. cruzi*, fue realizado extrayendo el sobrenadante a la 24, 48 y 72 horas después de ser expuesto, con la concentración correspondientes a la CI₅₀. La suspensión de parásitos en solución de Locke fue incubada con 0,1% de Triton X-100 y los parásitos en solución de

Locke solos, se utilizaron como 100% de LDH y LDH basal, respectivamente (Lomonte *et al.*, 1999). Cada muestra fue analizada por triplicado.

Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Las alícuotas de los epimastigotos se agregaron en tubos plásticos y se centrifugaron a 3000 g. Luego se lavaron una vez con PBS y se suspendieron en 500 µL de solución permeabilizante de yoduro de propidio (IP) con 0,008 % de Igepal (Sigma) por 30 min (Mora *et al.*, 2005). Se usó un citómetro de flujo FACScalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA) y se analizaron 15000 eventos del ciclo celular.

Análisis estadísticos

Los resultados se expresan en valores promedio ± DS y se compararon utilizando la ANOVA y la prueba de Tukey para la prueba de significancia, y una prueba no paramétrica, Kruskal-Wallis ANOVA (Mora *et al.*, 2005).

RESULTADOS

Los valores de CI₅₀ para los cinco venenos de serpiente en los ensayos de citotoxicidad para células Vero, en epimastigotos y en amastigotos se pueden observar en el Tabla I. En la Fig. 1 puede verse el efecto sobre células Vero y epimastigotos de dos cepas a las 24 y 72 horas respectivamente.

Los venenos de *B. asper* y de *A. nummifer* presentaron la más alta citotoxicidad para las células Vero. Los venenos de *B. asper* y *B. schlegelii* presentaron la más alta actividad en los epimastigotos de la cepa CL, mientras que los venenos de *B. asper*

Tabla I. CI₅₀ de venenos de serpientes (µg/mL) contra células Vero (24 h), epimastigotos (72 h) y amastigotos (6 días) de *Trypanosoma cruzi*, con las cepas Jennifer y CL.

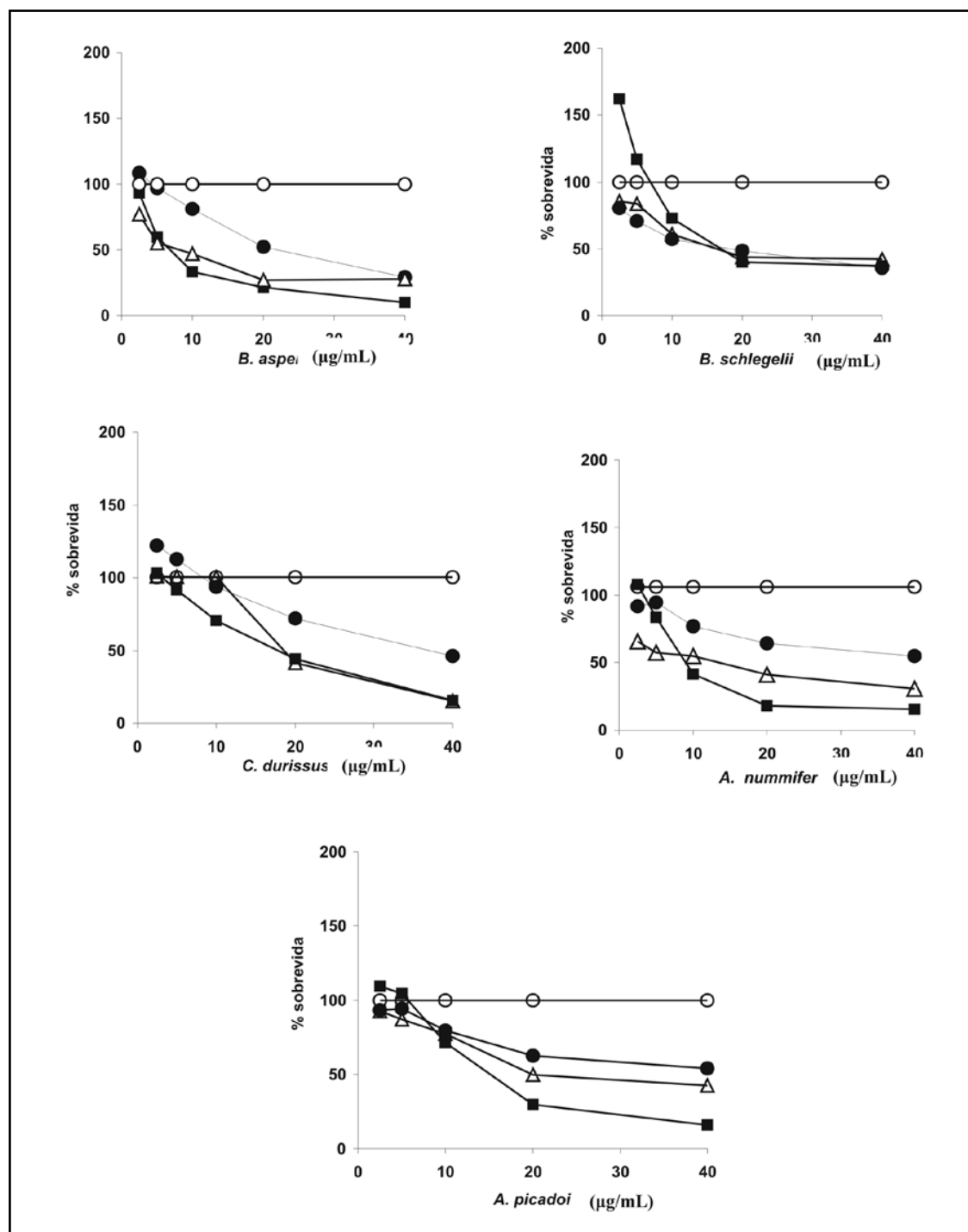
Venenos	Células Vero	Epimastigotos		Amastigotos	
		Jennifer	CL	Jennifer	CL
<i>B. asper</i>	11±3*	10±7*	25±6*	1±0,9	3±2
<i>B. schlegelii</i>	23±10	21±8*	22±5*	1±0,7	1,4±1
<i>C. durissus</i>	18±5	20±6*	39±15	4±1	6±3
<i>A. nummifer</i>	15±4*	11±6*	57±9	6±2	7±3
<i>A. picadoi</i>	16±4*	27±4	60±19	3±1	47±9

CI₅₀: Concentración que inhibe el crecimiento del 50% de los parásitos

Los valores corresponden al promedio ± DE de 3 experimentos independientes

* Valores con diferencias significativas en comparación con el control ($P<0,05$)

Fig. 1. Efectos de los venenos de serpiente en el crecimiento de células Vero y en los epimastigotos de *Trypanosoma cruzi* (cepas, Jennifer y CL). (■) Células Vero (24 h); (●) Cepa CL (72h); (Δ) Cepa Jennifer (72 h), (○) Control.



y *A. nummifer* presentaron más actividad en los epimastigotos de la cepa Jennifer. Estos venenos resultaron más activos ya que se requirió una menor cantidad para inhibir la mitad de los epimastigotos. Además, se pueden observar diferencias estadísticas para los epimastigotos de ambas cepas: el CI_{50} para el veneno de *A. nummifer*, para la cepa Jennifer fue de 11 ± 6 y para la CL de 57 ± 9 ($P < 0,01$); el CI_{50} para el veneno de *A. picadoi*, para la cepa Jennifer fue de 27 ± 4 y para la CL 60 ± 19 ($P < 0,01$).

El veneno de *B. schlegelii* en una concentración de $2,5 \mu\text{g/mL}$ produjo un incremento de la reducción de XTT cuando se incubó por 24 horas, lo que nos indica efectos proliferativos en las células Vero (Fig. 1); también se observa el mismo efecto en los epimastigotos de la cepa CL con el veneno de *C. d. durissus* (Fig.1).

Los valores de CI_{50} para la forma de amastigoto revelaron, en general, una más alta actividad de los venenos en las cepas estudiadas en comparación con las formas de epimastigotos. Esta mayor actividad se observó con todos los venenos estudiados, excepto en el caso del veneno de *A. picadoi* que mostró que la cepa CL posee mayor resistencia en comparación con la cepa Jennifer ($P < 0,01$). Los venenos de *B. asper* y *B. schlegelii* presentaron la más alta actividad contra los amastigotos. No se observan diferencias significativas entre los venenos de *B. asper*, *B. schlegelii*, *C. d. durissus* y *A. nummifer* contra la forma de amastigoto de ambas cepas.

Con los tripomastigotos de la cepa GA, los cinco venenos ocasionaron una disminución en la motilidad en diferentes tiempos de exposición. El veneno de *B. schlegelii* mostró una actividad alta, seguido del veneno de *B. asper* principalmente en las concentraciones de 10; 20 y $40 \mu\text{g/mL}$. El veneno de *A. nummifer*, en las concentraciones más bajas ($2,5$ y $5 \mu\text{g/mL}$), produjo un efecto tardío después de las 2 horas de exposición. El veneno de *A. picadoi* decrece la motilidad a altas concentraciones mientras que con las más bajas los efectos fueron menores. El veneno de *C. d. durissus* presentó, en general, una actividad más baja (Fig. 2).

En cuanto a los efectos de los venenos, mediados por los grados de apoptosis, necrosis o proliferación celular, se pudo observar que estos fenómenos se presentan y tienen relación con el tipo

de veneno, su concentración y el tiempo de exposición, con la CI_{50} , para la cepa CL.

Se pudo verificar que estos venenos inducen una disrupción de la membrana plasmática en los epimastigotos, la cual es dependiente de la dosis y el tiempo de exposición. El único veneno que mostró un efecto necrótico más marcado ($338 \pm 10 \text{ U/L}$ vs. 241 ± 9 del control positivo), una hora después de iniciado el experimento, fue el de *B. asper*. Este veneno, fue capaz de producir apoptosis luego de 24 horas y puede ocasionar una toxicidad muy alta a las 48 horas induciendo tanto necrosis como apoptosis (Tabla II). En muchas de las células que lograron sobrevivir, fue capaz de activar mecanismos de reparación que produjeron un pequeño aumento, aunque significativo, en cuanto a la proliferación celular a las 48 y 72 horas (Tabla III).

El veneno de *B. schlegelii* de menor efecto necrótico que el veneno de *B. asper*, causa apoptosis desde las 24 horas que aumenta a las 72 horas de exposición (83%) (Tabla II). Los parásitos no pudieron recuperarse debido a que su membrana estaba comprometida ante el daño provocado por este veneno, ya que tanto en la fase G0/G1 como en la de proliferación había muy pocos parásitos (Tabla III).

El veneno de *C. d. durissus* tuvo mayor efecto necrótico a las 48 horas, pero fue capaz de producir apoptosis desde las 24 horas de exposición, y a las 72 horas aumentó en gran medida su actividad apoptótica (Tabla II); además, una cantidad más alta de parásitos en comparación con el control entró en la fase G0/G1 (24 h), pero el daño fue tan fuerte que los parásitos no pudieron entrar en la fase de proliferación (Tabla III).

El veneno de *A. nummifer* fue uno de los venenos que causó necrosis desde las primeras horas de observación y comenzó a producir apoptosis en mayor grado a las 24 horas. A las 48 horas, fue capaz de inducir a cierta cantidad de parásitos a que logaran entrar en la fase de proliferación, la cual decrece a las 72 horas y en ese momento tanto la apoptosis como la necrosis fueron casi totales (Tablas II y III).

El veneno de *A. picadoi* también resultó muy tóxico produciendo necrosis y apoptosis; su acción se incrementó después de las 24 horas y la proliferación y la fase G0/G1 fueron muy bajas (Tablas II y III).

Tabla II. Producción de necrosis y apoptosis en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (cepa CL) utilizando los valores de CI_{50} para medir la producción de DHL y la citometría de flujo.

Tiempo (Horas)	24			48			72		
Venenos	Viabilidad %	Necrosis U/l	Apoptosis %	Viabilidad %	Necrosis U/l	Apoptosis %	Viabilidad %	Necrosis U/l	Apoptosis %
<i>B. asper</i>	13±15*	487±15*	6,5±0,1*	20±8*	494±13*	19±0,8*	15±12*	172±14	9.7±0.1*
<i>B. schlegelii</i>	14±6*	154±4	6,3±0,1*	18±6*	311±12*	14±0,4*	19±9*	175±3	83±1.4*
<i>C. durissus</i>	20±10*	160±12	5,8±0,02*	20±5*	340±9	17,4±0,5*	17±3*	158±7	74±7*
<i>A. nummifer</i>	13±9*	257±9	3,9±0,03*	15±8*	357±11	5,6±0,1	20±11*	177±12	85±4*
<i>A. picadoi</i>	21±5*	308±1*	18±0,1*	112±16	288±13	23±2*	50±9*	167±9	92±4*
Control Neg.	0	-	2,3±0,03	0	-	7,8±0,6	0	-	1.7±0.1
Control Pos.	100±5	164±5	-	100±10	344±6	-	100±8	171±3	-

U/L = Actividad de la enzima DHL en Unidades por litro.

* Valores mayores con diferencias significativas en comparación con el control ($P<0,05$)**Tabla III. Epimastigotos de CL en las fases G0/G1 y en la Fase de Proliferación después de la exposición con la CI_{50} de diferentes venenos de serpiente**

Tiempo (Horas)	24		48		72	
Venenos	G0/G1 %	Fase de proliferación %	G0/G1 %	Fase de proliferación %	G0/G1 %	Fase de proliferación %
<i>B. asper</i>	72±1	24,2±1,9	62±1,4**	19±1,5*	34±0,9**	21±1,5*
<i>B. schlegelii</i>	79±1,2*	24±0,6	64±1,5**	22±0,4*	9±0,9**	3±0,4**
<i>C. durissus</i>	68±0,82	26±0,31	72±2,8	11±0,5**	16±0,3**	5±0,5**
<i>A. nummifer</i>	75±1,73	22±0,39**	74±1,4	21±0,02*	10±1,3**	0,7±0,02**
<i>A. picadoi</i>	67±1,5**	14±0,3**	67±3,4	7±0,04**	5±0,8**	0,2±0,04**
Control Neg.	72±1,3	26±2	76±1,8	16±2	48±0,9	19±2

* Valores mayores con diferencias significativas en comparación con el control ($P<0,05$)** Valores menores con diferencias significativas en comparación con el control ($P<0,05$)

DISCUSIÓN

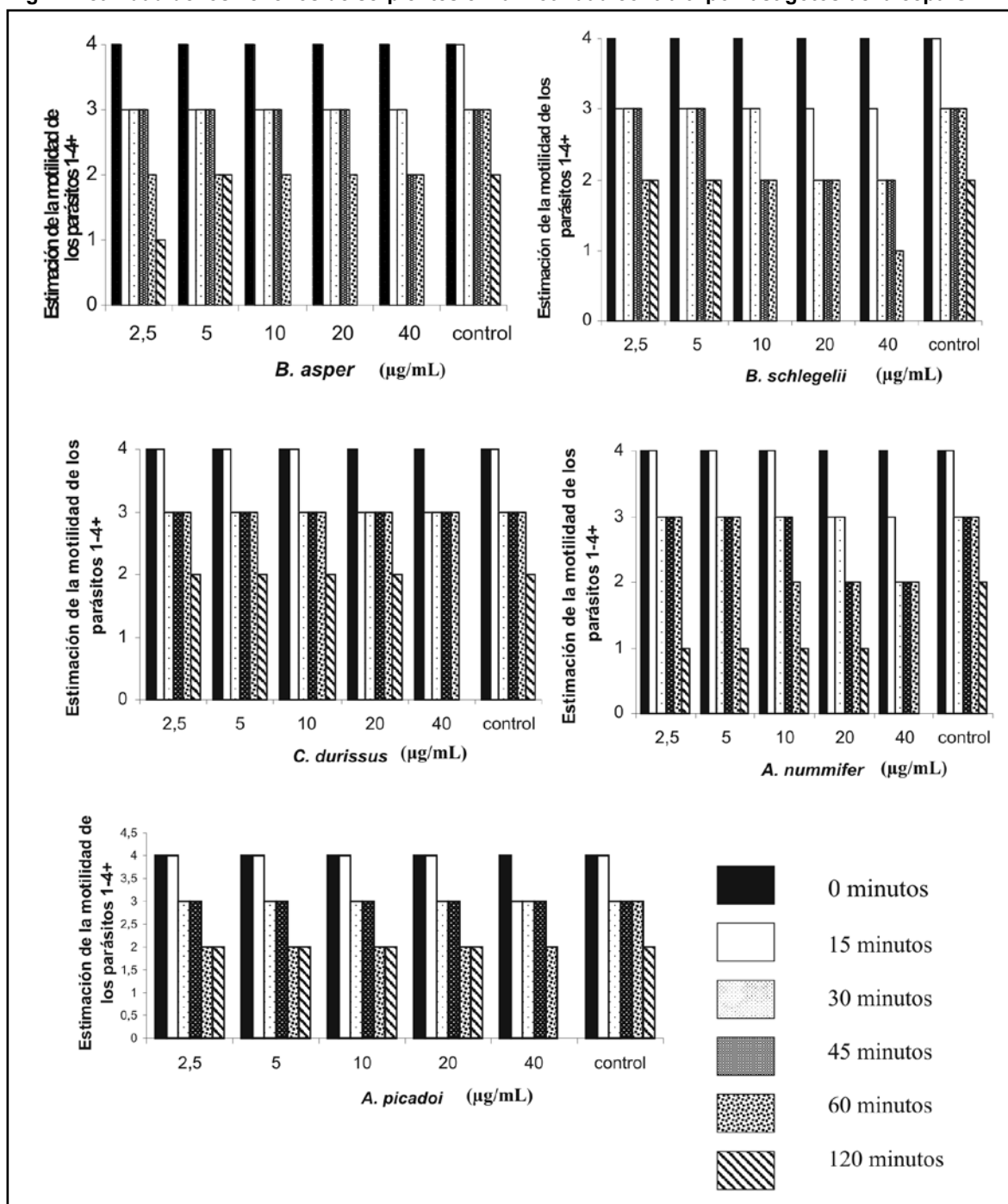
Se presentaron diferencias significativas entre los valores de la CI_{50} obtenidos para las células Vero, y para las formas de epimastigotos y de amastigotos, lo que nos indica que existen mecanismos diferentes en cuanto al modo de acción y a la toxicidad de estos venenos contra las membranas de *T. cruzi* y de las células Vero debido a los diferentes componentes de membranas. Por ejemplo, miotoxinas Lys49 tienen diferentes actividades debido probablemente a su interacción con sitios efectores en la membrana con la región C-terminal y con regiones hidrofóbicas; además, tienen la capacidad de provocar un desbalance en las

membranas biológicas, al provocar el influjo de iones que causan alteraciones intracelulares y muerte celular (Lomonte *et al.*, 2003).

En el caso de los epimastigotos, los venenos más activos fueron los de *B. schlegelii* y *B. asper* con la cepa CL, mientras que con la cepa Jennifer lo fueron los venenos de *B. asper* y de *A. nummifer*, probablemente debido a diferentes susceptibilidades de las cepas en presencia de varios tipos del veneno (Croft & Brun, 2003).

El valor de CI_{50} para *B. jararaca* (10 µg/mL) para la cepa Y de *T. cruzi* fue similar al valor obtenido

Fig. 2. Actividad de los venenos de serpientes en la motilidad contra tripomastigotos de la cepa G



para los venenos de *B. asper* y *A. nummifer* al usar los epimastigotos de la cepa Jennifer (Deolindo *et al.*, 2005). Esto sugiere que podría existir un efecto común entre estos tres venenos. En el caso de epimastigotos, la cepa CL fue más resistente para todos los venenos en comparación con la Jennifer.

En cuanto a los amastigotos, todos los venenos fueron muy activos para ambas cepas, con excepción del veneno de *A. picadoi* en el caso de la cepa CL. Los valores de CI_{50} obtenidos con los cinco venenos en la forma de amastigoto de *T. cruzi* fueron menores en comparación con la CI_{50} con la forma de

epimastigoto, para el veneno de *B. jararaca*, aunque guardan una similitud con la CI_{50} del veneno de *C. cerastes* (Deolindo *et al.*, 2005; Fernández Gómez *et al.*, 1994).

Por otra parte, los venenos de serpientes más prometedores en contra de amastigotos, son los de *B. asper* y *B. schlegelii*, debido a su actividad con ambas cepas estudiadas, ya que también demostraron que la toxicidad fue mayor para amastigotos en comparación con las células Vero.

Los tripomastigotos sanguíneos de la cepa GA mostraron aglutinación después de 2 horas (20 y 40 μ L/mL) con todos los venenos. El veneno de *B. jararaca* produce este efecto después de 24 horas con una concentración de 20 μ g/mL. En otro estudio se demuestra que el veneno *C. cerastes*, inhibe el crecimiento de tripomastigotos sanguíneos, y de amastigotos con una concentración de 10 μ g/mL (Fernández Gómez *et al.*, 1994).

Los venenos de *B. schlegelii* y *B. asper* presentaron una acción rápida contra los tripomastigotos sanguíneos disminuyendo su movimiento, principalmente en concentraciones más altas, mientras que el veneno de *A. nummifer*, en las concentraciones más bajas, mostró una actividad marcada en comparación con los otros venenos. Esto convierte a este veneno en el mejor candidato para el desarrollo de una futura droga tripanocida contra la forma de tripomastigoto sanguíneo. Al comparar las actividades del veneno de *A. nummifer* con el veneno de *C. cerastes*, a una concentración de 2,5 μ g/mL, se observa que se comportan en forma similar durante los primeros 30 minutos (Fernández Gómez *et al.*, 1994).

El veneno de *B. asper* fue uno de los que presentó más actividad en todas las pruebas. Cuando los mecanismos de muerte fueron evaluados se nota que la necrosis compromete la membrana desde la primera hora de exposición, pero se da la combinación apoptosis/necrosis en los siguientes tiempos, debido probablemente a las fosfolipasas PLA2 del veneno (Mora *et al.*, 2005).

Los venenos de *B. schlegelii*, *C. d. durissus*, *A. nummifer* comprometen la membrana de los epimastigotos desde la primera hora de observación, siendo la necrosis el mecanismo de

muerte predominante; la población que logra sobrevivir presenta una apoptosis tardía, afectando el ciclo celular normal.

Los venenos de *B. schlegelii*, *A. nummifer* podrían presentar las fosfolipasas que inducen a la proliferación celular. Una cantidad pequeña de las concentraciones más bajas del veneno promovieron la proliferación de las células Vero y de los epimastigotos de *T. cruzi*. Se ha dicho que las fosfolipasas (PLA2) están asociados a proliferación de líneas celulares, como son las fosfolipasas obtenidas de *B. asper* y *Agkistrodon blomhoffi*. También el veneno entero de *Crotalus durissus collilineatus* aumenta la proliferación de los promastigotos de *Leishmania amazonensis* (Mora *et al.*, 2005; Passero *et al.*, 2007).

El veneno de *A. picadoi* es uno de los venenos más tóxicos que destruye la membrana de los epimastigotos provocando necrosis y apoptosis muy altas, no dando oportunidad a que se recuperen los epimastigotos y que estos puedan proliferar.

Es importante destacar que nuestros estudios podrían considerarse preliminares ya que se utilizaron venenos enteros y sería necesario llevar a cabo el fraccionamiento de los componentes de aquellos con mayor actividad tripanocida. Las diversas fracciones activas del veneno se deben probar independientemente tanto in vitro como en modelos animales y proceder a su modificación química, una vez conocida la molécula activa, para mitigar sus propiedades tóxicas o sus posibles efectos secundarios en el hospedero. Otro detalle es que para elaborar una droga en el futuro, es importante que no contenga el componente responsable de la proliferación celular ya que se demuestra que los venenos costarricenses también pueden inducir proliferación en los epimastigotos de *T. cruzi*, como se había demostrado en estudios anteriores en *Leishmania* spp. y en células linfoides, lo que podría suceder con las demás formas del parásito.

AGRADECIMIENTOS

Al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD), por la beca para estudios de Maestría otorgada a la autora principal, al personal del Laboratorio de Zoonosis de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica y a la Dra. Cecilia Díaz por su colaboración en los análisis de apoptosis y ciclo celular.

Susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to different Costa Rican snake venoms

SUMMARY

The trypanocide effect of venoms from five Costa Rican species of snakes was evaluated against two strains of *Trypanosoma cruzi* and their cellular toxic effects were likewise observed. The venoms of *Bothrops asper*, *Bothriechis schlegelii*, *Crotalus durissus durissus*, *Atropoides nummifer* and *A. picadoi* showed evident trypanocide action against epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes. The venoms of *B. asper* and *B. schlegelii* were shown to be the most active against the epimastigotes of the CL strain, whereas those of *B. asper* and *A. nummifer* were more effective against the epimastigotes of the Jennifer strain. The venoms of *B. schlegelii* and *C.d. durissus*, at the lowest concentrations of 2.5 µg/mL, were able to trigger a proliferative effect on Vero cells and epimastigotes of the CL strain, respectively. The IC₅₀ values showed that lower amounts of venoms are necessary in order to inhibit amastigotes as compared to epimastigotes. The venoms of *B. asper* and *B. schlegelii* exhibited the highest activity against amastigotes of both *T. cruzi* strains. All venoms were able to arrest motility of blood trypomastigotes of the GA strain at different times and the most active in this case was *A. nummifer* venom. The toxic effects of the venoms measured by the degree of apoptosis, necrosis and cell proliferation that they produced showed that all these events occur and are related to the type of venom, its concentration and exposure time.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, snake venom, trypanocidal action, cell death, Costa Rica.

REFERENCIAS

- Chiari E. & Camargo E. P.(1984). Culturing and cloning of *Trypanosoma cruzi*.p.23-26. En: *Genes and Antigens of Parasites*. A Laboratory Manual (C.M. Morel ed.) 2nd. Ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.
- Coura J. R. & Castro S. A.(2002). Critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **97**: 3-24.
- Croft S. L. & Brun R. (2003). In vitro and in vivo models for the identification and evaluation of drugs against *Trypanosoma* and *Leishmania* spp. 185-192. En: *Drugs against parasitic diseases: R and D methodologies and issues. Discoveries and drug development*. UNDP/ World Bank / WHO. Special Programmed for Research and Training in Tropical Disease (TDR).
- Deolindo P., Texeira-Ferrer A., Melo E., Arnouldt A., De Souza W., Alves E. & Damatta R. (2005). Programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **100**: 33-38.
- Fernández J., Neshich G. & Camargo A. (2004). Using bradikinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs. *Gen. Molec. Res.* **3**: 554-563.
- Fernández-Gómez R., Zerrouk H., Sebti F., Loyens M., Benslimane A & Ouassii A. (1994). Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum* by different venoms: Preliminary identification of proteins from *Cerastes cerastes* venom which interact with the parasite. *Toxicon*. **32**: 875-882.
- Ferreira S. H. (1965). A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Br. J. Pharmacol.* **24**: 163-169.
- Fry B. G. & Wuster W. (2004). Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analyses of toxin sequences. *Mol. Biol. Evol.* **21**: 870-883.
- Giorgi R., Bernardi M. M. & Cury Y. (1993). Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*. **31**: 1257-65.
- Gonçalves A. R., Soares M. J., DE Souza W., Damatta R. A. & Alves E. W. (2002). Ultrastructural alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom. *Parasitol. Res.* **88**: 598-602.
- Hayashi M. & Camargo A. (2005). The bradikinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. *Toxicon*. **45**: 1163-70.

- Hyde T. P. & Dvorak J. A. (1973). *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. Quantitative analysis of the penetration phase. *Exper. Parasitol.* **34**: 284-294.
- Lizardi K., Urbina J. & DE Souza W. (1990). Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 2097-2105.
- Lomonte B., Angulo Y., Rufini S., Cho W., Giglio J., Ohno M., Daniele J., Geoghegan P. & Gutierrez J.M. (1999). Comparative study of the cytotoxic activity of myotoxic phospholipases A2 on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. *Toxicon.* **37**: 145-158.
- Lomonte B., Angulo Y. & Calderón L. (2003). An overview of Lys-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon.* **42**: 885-901.
- Merkel P., Beck A., Muhammad K., ALI S., Schönfeld C., Wolfgang V. & Duszenko M. (2007). Spermine isolated and identified as the major trypanocidal compound from the snake venom of *Eristocophis macmahoni* causes autophagy in *Trypanosoma brucei*. *Toxicon.* **50**: 457-469.
- Mora R., Valverde B., Diaz C., Lomonte B. & Gutiérrez J.M. (2005). A Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops asper* snake venoms induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. *Toxicon.* **45**: 651-660.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **65**: 55-63.
- Neva F.A., Malone M.F. & Myers B.R. (1961). Factors influencing the intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **10**: 140-149.
- Passero L., Tomakane T., Corbett C., Laurenti M. & Toyama H. (2007). Comparative studies of the antileishmanial activity of the three *Crotalus durissus* spp. Venoms. *Parasitol. Res.* **101**: 1365-1371.
- Sánchez G., Cuellar D., Zulantay I., Gajardo M., Gonzalez G., *et al.*, (2002). Cytotoxicity and trypanocidal activity of nifurtimox encapsulated in ethylcyanoacrylate nanoparticles. *Biol. Res.* **35**: 39-45.
- Tempone A. G., Andrade J. R. H. F., Spencer P. J., Lourenço C. O., Rogero J. R. & Nascimento N. (2001). *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* **280**: 620-624.

Recibido el 26/09/2008
Aceptado el 24/10/2008

Reactividad alérgica a *Anisakis simplex* y su asociación con asma bronquial en niños escolares del estado Nueva Esparta, Venezuela

Franca Puccio^{1,2*}, Domenico Cifarelli¹, Frank Blanco¹, Elianska López¹, Luís Sarmiento³, Rodrigo Ordaz⁴, Ivonne Figueroa⁴, Arnaldo Capriles⁵, Isabel Hagel¹, Maria Cristina Di Prisco^{1,5}, Maria Elena Roque¹, Lisette Machado¹ & Maria Elena Ghezzi¹

La reactividad alérgica frente a *Anisakis simplex* se ha convertido en un problema de salud pública en muchos países del mundo. En Venezuela, se ha reportado la presencia de mamíferos marinos infectados y se ha evidenciado la presencia del parásito en pescados de consumo masivo procedentes de las zonas costeras de oriente y occidente del país. No obstante, la importancia de este helminto en el desarrollo y severidad de patologías alérgicas no ha sido evaluada en el país. El objetivo de este estudio fue evaluar la reactividad alérgica al *An. simplex* en un grupo de 144 niños del estado de Nueva Esparta, así como su posible relación con la severidad de asma bronquial y rinitis alérgica. Todos los niños fueron evaluados utilizando un cuestionario socioeconómico validado y modificado de Graffar y un cuestionario validado según los criterios de ARIA (International Consensus Report) para rinitis alérgica, GINA (WHO/NIH Global Initiative for Asthma) para asma bronquial y Hannifin para dermatitis atópica, respectivamente. Se realizaron encuestas para evaluar las principales fuentes de alérgenos a los cuales se expone la población de estudio. Se realizó la evaluación física de los niños y se practicaron pruebas cutáneas, así como pruebas de funcionalismo pulmonar. Encontramos un alto porcentaje (45%) de niños con pruebas de piel positiva al *An. simplex*. Se observó una mayor prevalencia y severidad, de asma y rinitis en aquellos niños con pruebas de piel positivas a *An. simplex*. Dado que ha sido previamente reportada la reactividad cruzada entre *Ascaris lumbricoides* y *An. simplex*, es importante considerar que la alta reactividad encontrada frente al *An. simplex* pueda deberse a la co-infección por *Ascaris*. De igual forma, la sensibilización frente a *An. simplex*, ya sea específica o por reactividad cruzada existe, lo que sugiere que las autoridades locales deben considerar ciertas medidas preventivas, para evitar el consumo de pescados crudos o posiblemente parasitados con este helminto, que podrían exacerbar la patología respiratoria.

Palabras clave: Alergia, *Anisakis simplex*, niños venezolanos.

INTRODUCCIÓN

Anisakis simplex, es un parásito helminto, descrito por Rudolphi en 1809. Está incluido en el Phylum Nematoda, clase Rhabditea, orden Ascaridida,

superfamilia Ascaridoidea, familia Anisakidae (Gibson, 1983).

Este helminto parasita principalmente las vísceras y músculos de peces y cefalópodos (pulpo, calamar, sepia), siendo los mamíferos marinos como: ballenas, delfines, focas y leones marinos sus huéspedes definitivos. Su ciclo biológico es complejo, y se inicia cuando los huevos, expulsados al mar, siguen su desarrollo hasta el tercer estadio larvario (L3). Estas larvas son ingeridas por pequeños crustáceos y constituyen el alimento de peces y cefalópodos que son a su vez, depredados por los mamíferos marinos. La L3 se asienta en el estómago de los mamíferos marinos

1 Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela. MPPS.

2 Universidad Central de Venezuela. Facultad de Medicina, Escuela de Nutrición y Dietética.

3 Universidad Central de Venezuela. Facultad de Medicina. Escuela "J. M. Vargas". Cátedra de Inmunología.

4 FUNDASNE, Porlamar, estado Nueva Esparta..

5 Hospital San Juan de Dios.

*Autor de correspondencia: puccio.franca@gmail.com

donde sufre varias mudas hasta alcanzar el estado adulto. El ciclo biológico se cierra con la expulsión de los huevos del parásito al mar con las heces de los mamíferos (Audicana, 2000).

En el hombre la infección ocurre de forma accidental, en el que las larvas del tercer estadio de desarrollo pueden producir dos cuadros clínicos bien diferenciados: la anisakidosis, al ingerir pescados o cefalópodos parasitados: crudos o poco cocinados, (Domínguez Ortega & Martínez-Cócer, 2000; López-Serrano *et al.*, 2000) que puede presentarse con sintomatología gástrica e intestinal, y suele causar, intenso dolor abdominal, náuseas, vómitos y diarreas, horas después de la ingesta del parásito; y la alergia a *An. simplex*. Esta es una reacción de hipersensibilidad tipo I que se produce en sujetos previamente sensibilizados frente a antígenos del parásito, tras la ingesta de pescados o cefalópodos contaminados (Audicana, 2000).

La alergia frente a *An. simplex* se ha convertido en un problema de salud pública en muchos países asiáticos y europeos en donde el consumo de pescado crudo, poco cocido o almacenado a la vinagreta, es rutinario. Por este motivo en algunos países europeos, las pruebas alérgicas para el diagnóstico de la reactividad frente a *An. simplex*, se usan de manera rutinaria en las consultas especializadas y existen una serie de medidas preventivas y regulaciones para minimizar o evitar la contaminación de los pescados de consumo humano. (Kasuya *et al.*, 1990; Audicana, 2000; Kimura *et al.*, 1999; Rodero *et al.*, 2000; Buendía, 2000).

En Venezuela se ha reportado la presencia de mamíferos marinos infectados tales como: manatíes, nutrias y delfines, así como de numerosas aves piscívoras a lo largo de las diferentes ciénagas, ensenadas, lagos, lagunas y deltas de la costa venezolana (Windevoxhel, 2001). Recientemente, se ha evidenciado la presencia del parásito en pescados de consumo masivo procedentes de las zonas costeras de oriente y occidente del país. (Banda *et al.*, 2005). No obstante, la reactividad alérgica frente a *An. simplex* y su posible asociación con el desarrollo y la severidad de patologías alérgicas no ha sido previamente evaluada.

Dado que previamente se ha demostrado que el Estado Nueva Esparta presenta una alta

prevalencia de asma bronquial en la población infantil (Figuerola, 1988; Hagel *et al.*, 2001) y que esta es una Isla en donde el pescado es considerado como uno de los alimentos mas importantes (Hurtado *et al.*, 2004) y su consumo es frecuente desde etapas muy tempranas del crecimiento, nos motivamos en demostrar la presencia del parásito en pescados provenientes del Estado Nueva Esparta y evaluar la reactividad alérgica frente al parásito en niños escolares, así como su posible relación con la exacerbación de la patología alérgica.

El objetivo de este estudio fue evaluar la reactividad alérgica frente a *An. simplex* en un grupo de 144 niños del estado de Nueva Esparta y relacionarla con la posible severidad de asma bronquial y rinitis alérgica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Grupo de Estudio

Realizamos un estudio transversal en un grupo no seleccionado de 144 niños en edad escolar (6 a 12 años) provenientes de diferentes comunidades del estado Nueva Esparta.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Biomedicina, Caracas, Venezuela. Previo a la participación de los niños en el estudio, se informó las características de la evaluación y se exigió la presencia y firma del consentimiento informado por los padres y/o representantes.

Evaluación clínica

Todos los niños fueron evaluados utilizando un cuestionario socioeconómico validado y modificado de Graffar y un cuestionario validado según los criterios de ARIA (International Consensus Report) para rinitis alérgica, GINA (WHO/NIH Global Initiative for Asthma) para asma bronquial y Hanifin & Rajka (1980) para dermatitis atópica, respectivamente. Se realizaron encuestas para evaluar las principales fuentes de alérgenos a los cuales se expone la población de estudio. Adicional a la realización de la historia clínica especializada en enfermedades alérgicas, se realizó la evaluación física de los niños.

A todos los niños se les realizó una evaluación hematológica utilizando un contador automatizado

(Beckman Coulter) y un examen de heces seriadas para la detección de huevos y parásitos presentes.

Adicionalmente se midió la función pulmonar utilizando un espirómetro portátil (Microloop, Micromedical). Según los lineamientos de la ATS (American Thoracic Society) Y ERS (European Respiratory Society). Se utilizaron los valores de referencia Knudson *et al.* (1983), y se determinaron los siguientes parámetros: La capacidad vital forzada (FVC), el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1), el flujo espiratorio pico (PEF) y los flujos espiratorios forzados: FEF 25, FEF 50, FEF 25-75. Se calculó la relación VEF1/CVF, previo y posterior a la utilización de broncodilatador.

Aquellos niños con la relación FEV1/FVC menor o igual a 75 y/o la variación pre y post broncodilatador del VEF1, igual o mayor del 12%, síntomas respiratorios sugestivos con dos o más manifestaciones clínicas, antecedentes personales o familiares de asma, y/o pruebas de piel positivas, y/o niveles elevados de IgE total fueron considerados como asmáticos en este estudio.

Se practicaron pruebas cutáneas con una batería extractos de alimentos comunes, alérgenos inhalantes y parasitarios.

Pruebas cutáneas

Se realizaron pruebas cutáneas con algunos extractos alergénicos comerciales como mezclas de hongos comunes (*Aspergillus fumigatus*, *Alternaria* sp, *Candida albicans*), mezcla de insectos comunes (*Aedes communis*, *Culex pipens*), *Blatella germanica*, *Periplaneta americana*, epitelios de perro y gato, alimentos comunes como: leche, huevo, soya, carne de cerdo, de vacuno, pescados, naranja, tomate, harina de trigo, cacao y con un extracto parasitario de *An. simplex* (ALK-BELLO); y otros elaborados en nuestro laboratorio siguiendo estrictos criterios internacionales de producción, como el *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*, *Blomia tropicalis*, y *Ascaris lumbricoides* (Lynch *et al.*, 1983; Puccio *et al.*, 2004).

Estas consistieron en la colocación de una pequeña gota del extracto alergénico sobre la piel del antebrazo del paciente, a través de la cual se realizó una pequeña escarificación y se esperó de 15 a 20 minutos,

para posteriormente evaluar y medir el diámetro de la pápula y el eritema. Esta medida se comparó con los respectivos controles positivo de histamina y negativo el cual consiste en la solución en la que se encuentran diluidos los alérgenos. Aquellas pápulas mayores o iguales a 3 mm se consideraron positivas.

Detección de parásitos en pescados provenientes del estado Nueva Esparta

Para comprobar la presencia de parásitos en pescados de consumo provenientes del estado Nueva Esparta, se realizó una inspección parasitológica de un grupo de 6 lisas (*Mugil curema* o *Mugil incilis*). Para lo que se siguieron los métodos descritos por Bandes *et al.* (2005) y por la Food and Drug Administration (United States) (FDA/USA, 2001). En las vísceras de los pescados, procesadas por separado, se aplicaron los métodos de compresión y transluminiscencia directa con luz blanca, ruptura mecánica, sedimentación y digestión con solución de pepsina y HCl al 37% a 37°C, por 2 a 3 horas en agitación. Los nemátodos colectados se lavaron con solución salina 0,9 % y se conservaron en etanol al 70%. Para la observación microscópica, se colocaron las larvas en solución de lactofenol para lograr el aclaramiento de las estructuras internas. La identificación de género se realizó, tomando en cuenta el tamaño, color, presencia de diente perforador, presencia de un mucrón, abertura del poro excretor y las características del aparato digestivo (Myers, 1975; Jackson, 1978), separándose los parásitos en aquellos pertenecientes a los géneros: *Contracaecum* sp., *Pseudoterranova* sp. y *Anisakis* sp.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando los programas de Graphpad, Instad. Para establecer las comparaciones se utilizó la prueba exacta de Fisher. Los resultados se expresaron en porcentajes, valor de P, riesgo relativo y nivel de significancia estadística para cada parámetro.

RESULTADOS

Evaluación Clínica

Al evaluar las manifestaciones clínicas encontramos una prevalencia de rinitis alérgica sola o combinada con otras patologías en el 42,54%, de asma bronquial en el 49,25% y de dermatitis atópica

en el 8,21%. Otras patologías de origen alérgico como: alergia alimentaria, medicamentosa, urticaria, entre otras, se presentaron en un 13,43% de los niños. La presencia de infecciones agudas como: rinofaringitis aguda, rinitis infecciosa, adenoiditis, sinusitis, otitis, faringitis y bronquitis representó el 28,98% de los casos y las parasitosis el 27,53% de los niños evaluados.

De los niños parasitados, el 36% presentaba *Blastocystis hominis*, el 29% huevos de *A. lumbricoides*, y el 21% huevos de *Trichuris trichiura* y el 14% quistes de *Giardia lamblia*.

Cabe destacar que en el interrogatorio clínico de antecedentes personales, el 68% de los padres manifestaba que el niño había tenido diversos episodios previos de parasitosis y que utilizaban tratamiento antiparasitario con albendazol por lo menos 1 vez al año.

Al evaluar la severidad de la patología alérgica de acuerdo a la clasificación descrita por AIRA para rinitis alérgica y GINA para el asma bronquial, encontramos que un 49% de los niños atópicos presentaban rinitis intermitente y un 7% rinitis persistente, y el 61% presentaba asma intermitente y el 10% asma persistente.

Se determinaron los principales alérgenos frente a los cuales los niños presentaron positividad en pruebas cutáneas. En la Fig. 1 se muestra el porcentaje de niños con pruebas de piel positivas frente a los diferentes alérgenos evaluados, encontrándose un alto porcentaje (45%) de niños con pruebas de piel positiva frente al extracto de *An. simplex*. Esta duplica el porcentaje de positividad en relación a los alérgenos más comunes, como son los ácaros (22,73%), *Blomia tropicalis* (21,21%) e incluso la positividad al *A. lumbricoides* (25,64%) (Lynch *et al.*, 1983; Puccio *et al.*, 2004; Hagel *et al.*, 2007).

Asociación entre manifestación clínica y positividad en prueba cutánea

El 97% de los niños positivos en pruebas cutáneas frente al *An. simplex*, presentaron enfermedades alérgicas respiratorias y un 61% de los niños negativos al helminto de pescados, presentaron estas patologías. Siendo estas diferencias estadísticas, extremadamente significativas con un valor de $P < 0,0001$ y un riesgo relativo de 8,52 al aplicar Fisher con un intervalo de confianza del 95%.

Un alto porcentaje de niños positivos al *An. simplex* presentaron rinitis y/o asma combinada encontrándose diferencias estadísticamente significativas al comparar con los niños negativos (Tabla I). En los niños sin patología respiratoria encontramos un mayor porcentaje de negatividad en pruebas cutáneas frente al *An. simplex*.

Posteriormente, se procedió a determinar la severidad de la patología respiratoria comparándola con el resultado de la prueba cutánea frente al *An. simplex*. Encontramos un mayor porcentaje de niños con rinitis intermitente y asma persistente en los que resultaron positivos en prueba cutánea frente a *An. simplex*, con diferencias estadísticamente significativas (Tabla II).

Presencia de parásitos de la familia Anisakidae en pescados del estado Nueva Esparta

En las 6 lisas (*M. curema*) evaluadas provenientes del Estado Nueva Esparta se encontraron parásitos de la Familia Anisakidae, tanto en vísceras como en el espinazo. De estos parásitos el 52% pertenecían a la especie *Anisakis* sp., 32% a *Pseudoterranova* sp. y 16% a *Contracaecum* sp.

Tabla I. Comparación entre el resultado de la prueba cutánea frente a *Anisakis simplex* y la presencia de enfermedades respiratorias en los niños escolares del estado Nueva Esparta.

Patología	Positivos <i>An. simplex</i> (N=60)	Negativos <i>An. simplex</i> (N= 72)	Valor Significancia* <i>P</i>	Riesgo Relativo
Asma sola	15	22	0,56 NS	0,855
Rinitis sola	17	5	0,0018*	1,977
Asma + Rinitis	26	17	0,0247*	1,583
Ninguna patología	2	28	<0,0001*	0,1172

*Nivel de significancia estadística entre los niños positivos y negativos al aplicar la prueba exacta de Fisher con un intervalo de confianza del 95%.

Tabla II. Comparación entre el resultado de la prueba cutánea frente a *Anisakis simplex* y la severidad de la patología respiratoria en los niños escolares del estado Nueva Esparta.

Patología	Positivos <i>An. simplex</i> (N=60)	Negativos <i>An. simplex</i> (N= 72)	Valor Significancia* P	Riesgo Relativo
Asma Intermitente	32	37	0,86 NS	1,04
Asma Persistente	9	2	0,023 *	1,941
Rinitis Intermitente	36	21	0,0004 *	1,974
Rinitis Persistente	5	1	0,092 NS	1,9

*Nivel de significancia estadística entre los niños positivos y negativos al aplicar la prueba exacta de Fisher con un intervalo de confianza del 95%.

DISCUSIÓN

Dada la alta reactividad alérgica a *An. simplex*, en otros países del mundo (López-Serrano *et al.*, 2000; Rodero *et al.*, 2000, Fernández de Corres *et al.*, 1996; Moneo *et al.*, 2000), adicionado a la evidencia, que en Venezuela se ha reportado la presencia de mamíferos marinos infectados tales como: manatíes, nutrias y delfines, así como de numerosas aves piscívoras a lo largo de las diferentes ciénagas, ensenadas, lagos, lagunas y deltas de la costa venezolana (Windevoxhel, 2001), y que se ha detectado la presencia del parásito en diversas especies de pescados de consumo masivo a nivel nacional, distribuidos ampliamente en las costas venezolanas, durante todo el año (Bandes *et al.*, 2005), nos propusimos evaluar por primera vez la reactividad alérgica frente a *An. simplex* en niños escolares provenientes del Estado Nueva Esparta en donde en trabajos previos se ha demostrado un alto porcentaje de enfermedades alérgicas respiratorias como el asma bronquial (Figueroa, 1988; Hagel *et al.*, 2001).

Inicialmente corroboramos la parasitación de pescados provenientes del Estado Nueva Esparta. Evaluamos 6 pescados de lisa (*M. curema* o *M. incilis*). Estas especies junto con el Lebranche (*Mugil liza*), son los pescados en los que previamente, se ha reportado un alto porcentaje de parasitación por *Anisakis* sp. En todos los pescados evaluados, encontramos la presencia de parásitos de la familia Anisakidae, incluidos los géneros *Pseudoterranova* sp., *Contracecum* sp. y *Anisakis* sp., similar a lo reportado por Bandes *et al.*, (2005) en pescados de consumo masivo procedentes de diferentes zonas costeras del oriente y occidente del país y recolectados del mercado mayor de Coche, Caracas, Venezuela.

Por otra parte, en encuestas de consumo realizadas en el estado Nueva Esparta, se ha reportado

que el consumo familiar de carnes de pescados frescos es de 55,48 g por persona al día (Fundacredesa, 1990). Por ser una población isleña, el consumo de pescados y moluscos se acostumbra desde etapas muy tempranas de la infancia (Datos aportados por representantes de los niños).

Las enfermedades alérgicas respiratorias se encuentran con una prevalencia importante en diversas zonas y sectores venezolanos (Lynch *et al.*, 1983; ISAAC Venezuela, 2003). Como ejemplo, tenemos el caso del estado Nueva Esparta, que ha sido considerado como uno de los estados del país con mayor presencia de asma bronquial (Figueroa, 1988; Hagel *et al.*, 2007). El desarrollo de esta patología, no ha sido asociado específicamente con algún alérgeno ambiental. Aun cuando, se ha reportado la presencia de ácaros como *D. pteronyssinus* y *Blomia tropicalis* en muestras de polvo casero de hogares del estado Nueva Esparta (Figueroa, 1990). Pero por otro lado, si se ha relacionado con la infección por el parásito *A. lumbricoides* (Hagel *et al.*, 2007).

En los resultados de pruebas cutáneas de los niños atópicos del estado Nueva Esparta, encontramos una alta reactividad frente al *An. simplex*, siendo mayor incluso que alérgenos importantes como son los ácaros del polvo casero (Arruda *et al.*, 1991) e insectos como *P. americana* (Sánchez *et al.*, 2003). En este estudio el porcentaje de positividad en prueba cutánea frente al *A. lumbricoides* fue de un 25,64%. Se observó una mayor prevalencia de asma y rinitis en aquellos niños con pruebas de piel positivas a *An. simplex*. De igual manera, es importante resaltar que el mayor porcentaje de niños sin patología respiratoria, eran negativos en pruebas de piel al *An. simplex*. La mayor severidad de la patología alérgica (asma y/o rinitis), se observó en aquellos niños positivos al helminto de pescados (Tabla II).

Esta alta positividad encontrada frente a *An. simplex*, podría estar asociada a una gran ingesta de pescados y cefalópodos contaminados en la zona o a la presencia de reactividad cruzada con otros parásitos helmintos que son endémicos en la zona, ya que como se ha comentado anteriormente, en estudios realizados en pacientes provenientes del estado Nueva Esparta, la hiperreactividad bronquial se ha asociado con la presencia de parasitosis producida por *A. lumbricoides*, cuya prevalencia puede ser alta en sectores de bajo nivel socioeconómico de la población de la Isla (Hagel *et al.*, 2007). Adicionalmente, trabajos realizados en Venezuela, en pacientes asmáticos crónicos provenientes de zonas donde las parasitosis intestinales son endémicas, utilizando pruebas de provocación bronquial con extracto de *A. lumbricoides* parcialmente purificado aportaron fuertes evidencias de la participación de los antígenos parasitarios en la hiperreactividad bronquial (Lynch *et al.*, 1992).

En nuestro estudio el 27,53% de los niños evaluados presentaban parasitación, de éstos el 29% presentaba parasitación por *A. lumbricoides*, y el 68% de los niños reporta en el interrogatorio clínico haber sido desparasitado al menos dos veces al año. Adicionalmente, el porcentaje de positividad a *A. lumbricoides* en prueba cutánea fue del 25,64%.

Es importante resaltar que la prevalencia de *A. lumbricoides* en el grupo de estudio, es menor que la reportada anteriormente en otras comunidades del mismo Estado, probablemente esto se deba al alto uso de medicamentos antihelmínticos que reportan los representantes de los niños. No obstante, en estas zonas endémicas, es importante considerar el alto riesgo de reinfección al que se encuentran expuestos los niños (MSDS, Informe Técnico 2003).

Ha sido previamente reportada la reactividad cruzada entre *Ascaris* sp y *An. simplex* (Hwang *et al.*, 2003) así como con ácaros como *D. pteronyssinus* (Bernardini *et al.*, 2005). Entre algunas de las causas de la presencia de reacciones cruzadas, resalta un antígeno de 14 kDa que ocasiona reactividad cruzada entre *An. simplex*, *Ascaris suum*, *A. lumbricoides* y *Toxocara canis*, en animales experimentales (Hwang *et al.*, 2003; Perteguer *et al.*, 2003). Asimismo, la tropomiosina o Anis 3, es una de las principales proteínas causantes de reacciones cruzadas, encontrándose incluso reactividad con ácaros como *D. pteronyssinus*, considerado como una de las principales fuentes alérgicas inhalantes a

nivel mundial (Bernardini *et al.*, 2005). No obstante, existen también otras proteínas como la Anis 1, Anis 4 y Anis 5 que tienen un reconocimiento específico.

En la población de estudio encontramos una alta reactividad cutánea frente a *An. simplex*, así como una asociación entre la presencia y severidad de la patología respiratoria con la positividad en pruebas cutánea al parásito. De igual forma, evidenciamos la parasitación de algunas especies de pescados de consumo provenientes del Estado Nueva Esparta. Es importante resaltar que en estas poblaciones en donde existe una cultura de ingesta de pescado desde la infancia, y son zona endémicas de parásitos helmintos, es probable que el consumo de pescado y moluscos contaminados, desde tempranas edades sensibiliza para aumentar la elevada reactividad frente a *A. lumbricoides* o que sea la parasitación por *Ascaris*, lo que predispone a sensibilizarse frente a *An. simplex*. De igual forma, la sensibilización frente a *An. simplex*, ya sea específica o por reactividad cruzada existe y debe considerarse ciertas medidas preventivas para evitar el consumo de pescados crudos o posiblemente parasitados con este helminto que exacerban la patología respiratoria.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la asistencia técnica de los Tec. Emperatriz Mata y Nelson Vásquez así como de la Sra Omayra Amundaray y el soporte estadístico del Dr. Rafael Borges del Instituto de Biomedicina.

Este trabajo fue financiado por el Proyecto FONACIT G2005000374.

***Anisakis simplex* allergic reactivity and its association with bronchial asthma in scholar children from Nueva Esparta state, Venezuela**

SUMMARY

Allergic reactivity to *Anisakis simplex* has become in a health problem in many parts of the World. In Venezuelan coasts, it has been found infecting marine mammals and also different parasites fishes commonly consumed by human. However, the association of this helminth with the development and severity of allergic reactivity has not been previously evaluated in Venezuela. The aim of this study was to evaluate the allergic reactivity to *An. simplex* in a

group 144 children from Nueva Esparta, state, and its possible relation with bronchial asthma and rhinitis allergic severity. All children were evaluated using a validated socioeconomic questionnaire modified by Graffar, and a validate questionnaire according to ARIA (International Consensus Report) for allergic rhinitis, GINA (WHO/NIH Global Initiative for Asthma) for bronchial asthma and Hannifin for atopic dermatitis. Surveys were performed in order to evaluate the main sources of allergens to which the study population exposes itself. Children physical evaluation and skin prick test were performed, as well as pulmonary function test. We found a high percentage (45%) of children with positive skin prick test to *An. simplex*. Moreover, a greatest prevalence and severity of asthma and rhinitis, was observed in those children with positive skin prick test to *An. simplex*. Since it has been reported the presence of the crossed reactivity between *Ascaris lumbricoides* and *An. simplex*, it's important to consider that the high reactivity found to *An. simplex* might be due to the Co-infection with *A. lumbricoides*. Nevertheless, the sensibilization to *An. simplex*, due by specific or by crossed reactivity exists, and it should be considered by local health authorities in order to prevent the exacerbation of the respiratory pathologies mediated by the consumption of fresh fishes potentially infected.

Key words: Allergy, *Anisakis simplex*, Venezuelan children.

REFERENCIAS

- ARIA (International Consensus Report) (1992). **10**: 1398.
- Arruda L. K., Rizzo M. C. & Chapman M. D. (1991). Exposure and sensitisation to dust mite allergen among asthmatics Children in Sao Paulo, Brazil. *Clin. Exp. Allergy*. **21**: 433-439.
- Audicana M. T. (2000). *Anisakis*: su papel en la anafilaxia. *Alergol. Inmunol. Clin.* **15** (Núm. Ext. 2): 65-96.
- Bandes A., Selgrad S., Ríos M. & Salas H. (2005). Nemátodos de la Familia Anisakidae en el pescado que se expende para el consumo humano en Caracas, Venezuela. *INHRR*. **36**: 44-71.
- Bernardini R., Mistrello G., Novembre E., Roncarolo D., Zanotta S., Lombardi E., et al. (2005). Cross-reactivity between IgE-binding proteins from *Anisakis simplex* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Int.J.Immunopathol.Pharmacol.* **18**: 671-675.
- Buendía E. (2000) ¿Cuándo se producen reacciones alérgicas por *Anisakis simplex*?. *Alergol. Inmunol. Clin.* **15**: 221-222.
- Domínguez Ortega J. & Martínez-Cócerca C. (2000). Guía de actuación en patología producida por *Anisakis*. *Alergol. Inmunol. Clin.* **15**: 267-272.
- Fernández de Corres L., Audicana M. T., del Pozo M., Muñoz D., Fernández E., Navarro J. A. et al. (1996). *An. simplex* induces not only anisakiasis: report of 28 cases of allergy caused by this nematode. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* **6**: 315-319.
- Figueroa I. (1988). Incidencia de enfermedades alérgicas en el estado Nueva Esparta. *Rev. Soc. Venez. Alergia Asma Inmunol.* **9**: 9-13.
- Figueroa I. (1990). Estudio sobre el polvo casero realizado en el estado Nueva Esparta. *Rev. Soc. Venez. Alergia Asma Inmunol.* **7**: 33-35.
- FUNDACREDESA. (1990). *Estudio Nacional de Crecimiento y Desarrollo Humanas de la República de Venezuela*. Proyecto Venezuela, Región Nororiental Volumen I.
- Gibson D. I. (1983). The systematics of ascaridoid nematodes. A current assessment. Pp. 321-338. En: *Concepts in nematode systematics*. Eds. Stone, A.R., Platt, M & Khalil, L.F., Academic Press, London, U.K.
- GINA (Global Initiative for Asthma) (2007). *Global strategy for asthma management and prevention*. Available from: <http://www.ginasthma.org>
- Hagel I., Salgado A., Rodríguez O., Ortiz D., Hurtado M., Puccio F. et al. (2001). Factores que influyen en la prevalencia e intensidad de las parasitosis intestinales en Venezuela. *Gac. Med. Caracas*. **109**: 82-90.
- Hagel I., Cabrera M., Hurtado M. A., Sánchez P., Puccio F., Di Prisco M. C. et al. (2007).

- Infection by *Ascaris lumbricoides* and bronchial hyper reactivity: An outstanding association in Venezuelan schoolchildren from endemic areas. *Acta Tropica*. **103**: 231-241.
- Hanifin J. M. & Rajka G. (1980). Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm. Venereol.* **92**: 44-47.
- Hurtado M., Hagel I., Araujo M., Rodríguez O.L. & Palenque M. (2004). Creencias y prácticas alimentarias e higiénicas en madres, según el estado nutricional de su hijo. *An. Venez. Nutr.* **17**: 42-56.
- Hwang Y. K., Kim J. S., Lee J. B., Joo K. H., Lee J. S. & Cho S. W. (2003). Human anisakiasis: diversity in antibody response profiles to the changing antigens in larval excretions/secretions. *Parasite Immunol.* **25**: 1-7.
- ISAAC Venezuela (2003). Datos epidemiológicos sobre la prevalencia del asma en Venezuela. *Rev. Soc. Venez. Alergia Asma Inmunol.* **5**: 33-42.
- Jackson G., Bier J., Payne W., Gerding T. & Knollenberg W. (1978) Nematodes in fresh market fish of the Washington, D.C. area. *J. Food Prot.* **41**: 613-620.
- Kasuya S., Hamano H. & Izumi S. (1990). Mackarel-induced urticaria and *Anisakis*. *Lancet*. **335**: 665.
- Kimura S., Takagi Y. & Gomi K. (1999). IgE response to *Anisakis* compared to seafood. *Allergy*. **54**: 1225-1226.
- Knudson R.J., Lebowitz M.D., Holberg C.J. & Burrows B. (1983) Changes in the normal maximal expiratory flow-volume curve with growth and ageing. *Am. Rev. Respir. Dis.* **127**: 725-734.
- López-Serrano M. C.; Alonso-Gómez A., Moreno-Ancillo A., Daschner A. & Suárez J. (2000) Anisakiasis gastro-alérgica: Hipersensibilidad inmediata debida a parasitación por *An. simplex*. *Alergol. Inmunol. Clin.* **15**: 230-236.
- Lynch N. R., Di Prisco M. C. & Soto J. M. (1983). Diagnosis of atopic conditions in the tropics. *Ann. Allergy*. **51**: 547-555.
- Lynch N. R., Isturiz G., Sánchez Y., Pérez M., Martínez A. & Castes M. (1992). Bronchial challenge of tropical asthmatics with *Ascaris lumbricoides*. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* **2**: 97-105.
- Moneo I., Caballero M. L. & Jiménez S. (2000). Immunodetection of specific IgE (immunoblotting) in a prevalence study of *Anisakis simplex* sensitisation in Spain. *Alergol. Inmunol. Clin.* **15**: 255-261.
- MSDS (2003). *Programa de Control de Parasitosis Intestinales en Venezuela, Informe Técnico 1990-2000*. Dirección General de Salud Ambiental y Contraloría Sanitaria, Maracay.
- Myers B. J. (1975) The nematodes that cause anisakiasis. *J. Milk Food Technol.* **38**: 774-782.
- Peteguer M. J., Cuellar C., Guillen J. L., Aguila C., Fenoy S., Chivato T. *et al.* (2003). Cross-reactivity between *Anisakis simplex* sensitization and visceral larva migrans by *Toxocara canis*. *Acta Tropica*. **89**: 85-89.
- Puccio F., Noya O., Noda A., Hagel I. & Lopez E. (2004) Importance of including *Blomia tropicalis* for a routine diagnosis of Venezuelan allergic patients. *Allergy*. **59**: 753-7.
- Rodero M., González M. L, Esteban M. I. & Cuellar C. (2000) Estandarización biológica del extracto alérgico de *Anisakis simplex*. *Alergol. Inmunol. Clin.* **15**: 299-306.
- Sánchez B., Capriles H., Caballero F. & Fernández C.E. (2003) Mite and cockroach sensitization in allergic patients from Caracas, Venezuela. *Ann Allergy Asthma Immunol.* **90**: 664-668.
- Windevoxxhel N. (2001). *Costas del Caribe de Colombia-Venezuela*. The Nature Conservancy/ World Wildlife Fund. University of Rhode Island, Miami. www.wetlands.org.

Recibido el 12/08/2008
Aceptado el 21/10/2008

Valoración de la calidad del diagnóstico malárico. Red de vigilancia, municipio Cajigal, estado Sucre, Venezuela

Mayira Sojo-Milano¹, José Luis Cáceres García² & Eliecer Sojo-Milano³

El Programa Nacional de Control de la Malaria en Venezuela, a través de su Laboratorio de Referencia realiza actividades formativas y evaluativas que buscan garantizar la calidad del diagnóstico microscópico de la malaria desde las unidades epidemiológicas básicas, geopolíticamente municipios, en tanto que la definición de caso de malaria en el país depende de la confirmación parasitológica del evento. Siguiendo la actividad rutinaria que desarrolla el Laboratorio de Referencia sobre evaluación de microscopistas ya formados, se realizó un estudio descriptivo con el objetivo de valorar la calidad de la red de vigilancia de malaria, en su componente de diagnóstico microscópico. El área de estudio fue el Municipio Cajigal, en el foco malárico oriental. Se aplicaron pruebas teóricas estandarizadas para medir el nivel de conocimientos y pruebas prácticas, para calcular el nivel de concordancia del diagnóstico con el Laboratorio de Referencia. A partir de esta actividad, detectadas las necesidades, se realizó un refrescamiento mínimo. Se incluyeron observaciones sobre calidad de ambientes de trabajo y de microscopios. De los ocho participantes evaluados, ninguno aprobó la prueba teórica y sólo se hizo diagnóstico correcto en 50% del examen práctico. Los resultados indican que se ha desatendido el nivel de desempeño del microscopista local, personal clave para el éxito del sistema de vigilancia de la malaria en Venezuela.

Palabras clave: Diagnóstico, malaria, microscopista, red de vigilancia, valoración.

INTRODUCCIÓN

El Programa Control de la Malaria en Venezuela tiene como norma, hacer evaluación de la calidad del diagnóstico parasitológico de esta endemia, al revisar el total de láminas diagnosticadas como positivas y diez por ciento de los diagnósticos negativos realizados en todo el territorio. Dicho trabajo es efectuado en el Laboratorio Central del Programa con sede en Maracay, por microscopistas expertos. Inmediatamente después de recibido el material y en un plazo no mayor de un mes, los resultados y sugerencias se hacen llegar a las regiones para sus respectivos controles de Centros Diagnósticos y de su personal. Este proceso se inicia

cuando el nivel local, como parte del informe mensual de cada Unidad Operativa de Campo (Demarcación), envía el material hematológico requerido a su sede regional, nivel que a su vez debe realizar un primer control de calidad (Cáceres *et al.*, 2006). Adicionalmente, el Laboratorio Central realiza y certifica el entrenamiento de microscopistas, así como la evaluación de los microscopistas formados, todo lo cual completa la estrategia de mantener un nivel óptimo del componente diagnóstico del sistema de vigilancia.

En áreas selváticas, mineras y agrícolas, distantes de los laboratorios regionales, las condiciones para la toma y diagnóstico de las muestras en la mayoría de los casos se tornan difíciles. Por una parte, el uso reiterado de láminas con diagnóstico negativo anterior, recicladas y lavadas, las fallas técnicas sobre la cantidad de sangre en gota gruesa y extendido, fijación de la gota y mal desfibrinación de la misma y por otra parte la preparación de colorantes vencidos o una sola preparación diaria para la jornada de trabajo, con agua sin determinación de sus cualidades físico-químicas,

¹ Mayira Sojo-Milano, MSc. Malariólogo Investigador y Docente. Dirección General de Salud Ambiental-Ministerio del Poder Popular para la Salud de Venezuela.

² José Luis Cáceres García, Docente-Investigador, Departamento de Salud Pública, Universidad de Carabobo, Sede Aragua.

³ Eliecer Sojo-Milano, MSc. Docente. Fundación Venezolana para la Investigación Multidisciplinaria, FUNINVEST.

*Autor de correspondencia: jolucag@cantv.net

dificultan la calidad y coloración de la muestra, lo cual está en relación directa con el acierto en la observación microscópica (Cáceres *et al.*, 2006).

En el estado Sucre, el sistema de salud se desagrega en Municipios Sanitarios, como unidades geopolíticas y epidemiológicas básicas. Al igual que en el resto del país, el diagnóstico de la malaria es realizado, en su gran mayoría, por personal obrero o empleado denominado “microscopistas de malaria”, con un nivel de instrucción medio, entrenados en cursos teórico-prácticos por el Laboratorio Central o en los Laboratorios Regionales, por un tiempo no menor de tres meses. Profesionales bioanalistas e inspectores de salud pública practican también el diagnóstico microscópico a nivel local y regional (Cáceres *et al.*, 2006).

Hasta la semana epidemiológica número 37 (09 al 15 de septiembre) de 2007, en el estado Sucre fueron diagnosticados 1.096 casos de malaria. La Incidencia Parasitaria Anual (IPA), calculada sobre la base del acumulativo de casos hasta dicha semana, se sitúa en 1,8 por un mil habitantes, es decir, 2 personas de cada un mil habitantes han contraído malaria en el estado, considerando población a riesgo a los residentes de los municipios con transmisión malárica actual según reportes epidemiológicos (Cáceres & Vela, 2003). La fórmula parasitaria es casi exclusivamente a *Plasmodium vivax* (99,9%).

Según la Unidad de Estadísticas de la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica (Ministerio del Poder Popular para la Salud, 2007), en el estado Sucre, durante 2007 fueron examinadas un promedio semanal de 2.811 láminas de gota gruesa y extendido (rango 1.643-3.747). La Demarcación “A” (donde, junto a otros cuatro municipios, se ubica Cajigal) aporta en promedio 48% (rango 40,2- 56,3%) de esas láminas. A su vez, Cajigal diagnostica en promedio 53% de las láminas de dicha Demarcación (rango 39,7-61,7%), lo cual representa aproximadamente un tercio de las láminas examinadas en la entidad. El reporte mensual del Laboratorio Central, registra entre los meses de enero y agosto de 2007, un acumulativo de 4.279 láminas reexaminadas, provenientes del estado Sucre, observando 13 errores de diagnóstico, donde se destaca resultados positivos a infecciones por *P. vivax*, siendo parasitológicamente negativos (Tabla I).

Enfocando la calidad de los sistemas y servicios de salud, como elemento que aporta al perfil de riesgo local para malaria, se planteó el objetivo de evaluar la calidad del diagnóstico microscópico local, esto, con base en observación y documentación de la actividad rutinaria desarrollada por el Laboratorio Central de Referencia sobre microscopistas ya formados. El nivel geográfico al cual fue desarrollado el estudio hizo una aproximación sobre la calidad de la red de vigilancia de malaria en el municipio Cajigal.

Tabla I. Calidad del diagnóstico malárico (estado Sucre, 2007).

Reporte Sucre		Laminas Reexaminadas Con Diagnostico Correcto		Laminas Reexaminadas Con Diagnostico Incorrecto		Total Reexaminadas
MES (2007)	Láminas de	Positivo	Negativo	Enviado	Reexaminado	
Enero	Sept 2006	91	266	1 <i>P. vivax</i>	1 Mixta (Pv+Pf)	358
Febrero	Sept 2006	68	191	-	-	259
Abril	Enero 2007	106	537	1 Mixta 1 Negativo	1 <i>P. falciparum</i> 1 <i>P. vivax</i>	645
Mayo	Enero 2007	58	165	2 Negativo 1 <i>P. vivax</i>	2 <i>P. vivax</i> 1 Negativo	226
	Febrero 2007	101	439	3 Negativas	3 <i>P. vivax</i>	543
	Marzo 2007	93	676	1 Negativa	1 <i>P. vivax</i>	770
Julio	Abril 2007	69	577	1 <i>P. vivax</i> 1 Negativa	1 Negativa 1 <i>P. vivax</i>	648
Agosto	Mayo 2007	62	767	1 Negativa	1 <i>P. vivax</i>	830
Total		648	3618	13	13	4279

Fuente: Laboratorio Central Maracay.

METODOLOGÍA

Área de estudio

Cajigal, con 389 kilómetros cuadrados de superficie y aproximadamente 20.000 habitantes, distribuidos en tres parroquias, es el primer municipio malárico del estado Sucre, aportando 26,6 por ciento de la casuística malárica del estado en el período 1997-2006. En el Municipio, la red asistencial se compone de 1 Ambulatorio Urbano y 7 Ambulatorios Rurales, y contabiliza 9 centros de diagnóstico de malaria.

Procedimientos

En la evaluación participaron microscopistas formados entre 1999 y 2004 (rango de 2,5 a 8 y mediana de 7 años de experiencia práctica) ubicados en 7 localidades (Bohordal, Río Seco, Yaguaraparo, Chorocho, Quebrada de la Niña, Cachipal y El Paujil). Fueron evaluados los conocimientos y prácticas sobre diagnóstico parasitológico en ocho de los once microscopistas responsables del diagnóstico malárico en el municipio, sus ambientes de trabajo y el estado de los microscopios a su cargo. Durante dos semanas del mes de septiembre de 2007, siguiendo el protocolo para evaluación de microscopistas previamente entrenados, dos microscopistas expertas del Laboratorio Nacional de Referencia realizaron:

1. Aplicación de una prueba de conocimiento sobre el diagnóstico parasitológico de malaria: Prueba Teórica, contentiva de veinte (20) frases u oraciones básicas sobre el diagnóstico de la enfermedad, mediante un instrumento estandarizado por el equipo del Laboratorio Central en Maracay. Las respuestas consistían en completar el enunciado de dichas expresiones. Esta prueba fue realizada antes y después de la sesión práctica de diagnóstico. La calificación máxima era 20 puntos y la mínima aprobatoria, 14 puntos.
2. Ejercicios de Diagnóstico: A cada participante se le practicaron dos Evaluaciones Prácticas (inicial y final) y un ejercicio diagnóstico, debiendo responder en cada uno, por el resultado parasitológico de diez (10) láminas con su respectiva gota gruesa y extendido, preparadas con fines docentes en el Laboratorio Central. Cada grupo de láminas, tanto de las evaluaciones como de ejercicios diagnósti-

cos contenía: tres láminas positivas a *Plasmodium vivax*, tres positivas a *Plasmodium falciparum*, una a *Plasmodium malariae*, una a infección mixta *P. vivax*, *P. falciparum* y dos láminas negativas.

3. Refrescamiento teórico y práctico mínimo al grupo de microscopistas locales, con base en las necesidades detectadas en las pruebas teóricas y prácticas, para establecer la referencia entre el antes y el después de esas evaluaciones.
4. Observación directa de ambientes de trabajo para realizar el diagnóstico microscópico y de los microscopios asignados para ello.
5. Cierre del proceso evaluativo, facilitando a los participantes una Guía para Diagnóstico de Malaria elaborada por el Laboratorio Central, para facilitar el estudio individual.

El tratamiento estadístico de la información comprendió establecer frecuencias absolutas y relativas, contrastando los conocimientos teóricos expuestos por los participantes con respecto a los formales, y comparando el diagnóstico dado por ellos con el del Laboratorio de Referencia, sobre láminas preparadas con propósitos académicos (positivas a todas las especies de Plasmodio, incluyendo láminas con bajas densidades parasitarias, y láminas negativas).

Los errores observados en las evaluaciones de muestras hemáticas para malaria son categorizados en: errores de “diagnóstico”, cuando una lámina siendo positiva o negativa en el nivel evaluado, resulte negativa o positiva en el nivel evaluador y error de “especie”, cuando no presenta concordancia con el diagnóstico positivo de especie reportado por el laboratorio de referencia (Gutiérrez & Arróspide, 2003). Para medir la concordancia entre los resultados de los diagnósticos practicados en el nivel municipal y los realizados en el nivel central, se expresó la fiabilidad por medio del índice k (kappa), el cual constituye un avance en relación con la tasa general de concordancia porque es un indicador de concordancia ajustada, que toma en cuenta la concordancia casual. El índice k representa la proporción de concordancia además de la esperada por casualidad y su valor varía de “-1” (desacuerdo total) a “+1” (concordancia total). El cero indica lo mismo que las lecturas hechas por casualidad, observándose valores de: $<0,00$ = “mala”, $0,00-0,20$ = “pobre”, $0,21-0,40$ = “sufrible”, $0,41-0,60$ = “regular”, $0,61-0,80$ = “buena”, $0,81-0,90$ = “óptima” y $1,00$ = “perfecta” (OPS/OMS, 1999).

RESULTADOS

En la Prueba Teórica inicial de conocimiento sobre el diagnóstico parasitológico de la malaria, de los ocho participantes que la presentaron, ninguno aprobó y sólo dos calificaron por encima de 10 puntos, obteniendo el grupo un promedio de 7,5 puntos sobre 20. Al realizar la misma prueba luego del refrescamiento de los conocimientos, todos los participantes calificaron al menos con 10 puntos, y uno aprobó, elevando el promedio grupal a 12 puntos (Tabla II).

En la Evaluación Práctica inicial, sólo dos participantes obtuvieron la nota mínima aprobatoria (14 puntos) y el promedio grupal fue de 11, considerado “bajo”. Posteriormente, sólo un microscopista aprobó la Evaluación Práctica final y el promedio de los participantes continuó en 11 puntos (Tabla II).

En todos los ambientes, las condiciones resultaron inadecuadas para realizar trabajo de laboratorio e igualmente, en todos los casos, los microscopios requerían mantenimiento, presentando características inaceptables para realizar diagnóstico en ellos, indicando falta de mantenimiento adecuado. Otro aspecto que se registró como parte de la dinámica de diagnóstico local, fue la duplicidad de funciones del microscopista, con desempeño paralelo en enfermería, en 63% de los casos (Tabla II).

En total, los ocho participantes diagnosticaron 18 lotes (180) láminas, de las cuales se hizo “diagnóstico correcto” en 90 (50%).

En la evaluación realizada en Cajigal, del total de errores, 57% (51/90) fueron de “diagnóstico” y 43% (39/90) de “especie”. Los errores de “diagnóstico” se

Tabla II. Valoración de la calidad del diagnóstico de Malaria en la red de vigilancia del municipio Cajigal, Año 2007.

AÑO 2007

Microscopista	Evaluación				Calidad del Microscopio	Ambiente de Trabajo	Observaciones
	Teórica		Práctica				
	1a	2a	1a	2a			
1	04	16	07	16	Falta de mantenimiento	Espacio reducido, falta de ventilación, silla inapropiada	Se desempeña como Enfermera
2	08	NP	08	NP	Falta de mantenimiento	Silla inapropiada	----
3	12	NP	13	NP	Falta de mantenimiento	Espacio reducido, silla inapropiada	Se desempeña como Enfermera
4	03	11	13	12	Condiciones inapropiadas: oculares rayados, difícil diagnóstico	Sin mesón para trabajar, falta de ventilación, silla inapropiada	Se desempeña como Enfermera
5	12	NP	09	NP	Falta de mantenimiento	Silla inapropiada	----
6	07	11	15	11	Condiciones inapropiadas: oculares rayados, difícil diagnóstico	Espacio reducido, sin agua, luz deficiente, silla inapropiada	Fue entrenado en conteo parasitario
7	08	10	14	09	Condiciones inapropiadas: oculares rayados, difícil diagnóstico	Sin agua, sin ventilación, silla inapropiada	Se desempeña como Enfermera
8	06	10	09	05	Condiciones inapropiadas: oculares rayados, difícil diagnóstico	Sin agua, luz deficiente,	Se desempeña como Enfermera

1ª: Evaluación diagnóstica. 2ª : Evaluación después del entrenamiento

produjeron cuando fueron observadas como negativas: 13% (7/54) de las láminas positivas a *P. vivax*, 44% (24/54) a *P. falciparum*, 61% (11/18) a *P. malariae* y 11% (2/18) de las Infecciones mixtas. En el caso contrario, 8% (3/36) de las láminas negativas fueron diagnosticadas como *P. vivax* (Tabla III).

Según las especies parasitarias, las muestras positivas fueron correctamente diagnosticadas en las siguientes proporciones: *Plasmodium vivax* 68,5% (37/54), *Plasmodium falciparum* 29,6% (16/54), *Plasmodium malariae* 27,8% (5/18) y las Infecciones mixtas 16,7% (3/18). Por su parte, las láminas Negativas tuvieron 80,6% (29/36) de acierto diagnóstico. Es importante resaltar que 4% de las láminas no obtuvo ningún tipo de diagnóstico por los participantes (Tabla III).

Los mayores errores de “especie” se produjeron de la siguiente forma: como *P. vivax* fueron diagnosticadas 22% (12/54) de las láminas positivas a *P. falciparum*, 11% (2/18) de *P. malariae* y 44% (8/18) de las Infecciones mixtas, mientras que 13% (7/54) de las positivas a *P. vivax* fueron diagnosticadas como Infecciones mixtas (Tabla III).

Para el análisis de concordancia, se tomó el total de láminas examinadas por el grupo, presentando concordancia “regular” (0,47) al observar los resultados de las láminas con diagnósticos de *P. vivax*, un valor más bien próximo al límite inferior de 0,41. En el caso de *P. falciparum*, los participantes presentaron concordancia “sufrible” (0,29). Para *P. malariae* y las

láminas negativas, la concordancia fue “sufrible” con 0,22 y 0,39 respectivamente. Cuando los diagnósticos fueron de infecciones mixtas, la concordancia resultó “pobre” (0,20).

Al buscar la “validez” (Beaglehole *et al.*, 1994) de los diagnósticos maláricos realizados en el municipio Cajigal, comparados con el Laboratorio Central como patrón de referencia, se podría mencionar que los microscopistas del nivel local en presencia de láminas positivas distintas a *P. vivax*, están en capacidad de detectar los individuos verdaderamente positivos a esta especie, es decir, diagnosticar correctamente los individuos infectados con *P. vivax* en 69% de los casos.

DISCUSIÓN

Los Programas de Salud representan la forma más estructurada y segura de expresar y canalizar las políticas de salud de un país, así como de medir su oportunidad, pertinencia y alcances. Toda la inversión que pueda hacer un Ministerio de Salud en sus Programas es una demostración de su conocimiento de la dinámica social dentro de la cual estos se desarrollan. Precisamente por estar influenciados por los cambios sociales, estructurales, los sistemas de información que les son propios ameritan una permanente evaluación. Todo programa de control requiere así de la investigación aplicada para completar la información que suministran los sistemas rutinarios de información (WHO, 1994), mismos que definen la vigilancia.

Tabla III. Comparación del diagnóstico de malaria, municipio Cajigal - Laboratorio Central, Año

		Lab. Regional (Participantes)					Errores		
Diagnósticos Parasitológicos		<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	Negativas	Infecc. mixtas	Sin Diagnóstico	Diagnóstico Correcto	De diagnóstico
L A T B. R A L	<i>P. vivax</i>	(37)	1	2	5	7	2	37	7
	<i>P. falciparum</i>	12	(16)	2	22	-	2	16	24
	<i>P. malariae</i>	2	-	(5)	10	-	1	5	11
	Negativas	3	1	1	(29)	-	2	29	7
	Infecc. mixtas	8	4	1	2	(3)	-	3	2
Total		62	22	11	68	10	7	90	51

Diagnosticar a tiempo un caso de malaria puede ser vital para el enfermo, ya que la aparición de complicaciones está muy relacionada con la demora e instauración del tratamiento (Turrientes & López-Vélez, 2000). Dado el riesgo de morir que se presenta en cada caso de malaria a *P. falciparum*, en áreas de transmisión y receptivas a dicha especie, la certeza en el diagnóstico debe ser de ciento por ciento (Cáceres *et al.*, 2006). En la valoración del diagnóstico, junto al plano individual se destaca el de salud pública, por el impacto que una omisión tiene, no sólo sobre la magnitud de la enfermedad, también sobre la administración efectiva de la salud local, vinculando al riesgo biológico, el riesgo para la salud que se deriva del nivel organizacional en los servicios, entendiéndolos dentro de un sistema donde se estructuran procesos de calidad total.

La evaluación del sistema de vigilancia en malaria enfoca los componentes de detección, diagnóstico y tratamiento. Cada uno, con una complejidad técnica y una diversidad metodológica que igualmente se integran a la estratificación de riesgo malárico, donde Castillo-Salgado (1992) incluye los factores relacionados con la estructura y organización de los servicios de salud. Los resultados de la evaluación de los microscopistas del primer municipio malárico del foco oriental en Venezuela muestran una medida clara de cómo estos últimos factores se incluirían en la dinámica epidemiológica y completarían, sin duda, el perfil local de riesgo. Esto debe considerarse, pues si bien la malaria en el estado Sucre y en el municipio Cajigal ha presentado tendencia al descenso durante el periodo 2003-2007, su potencial malarígeno es característico dentro de la historia de la endemia en Venezuela.

Los resultados de concordancia “regular” (0,47) observado para láminas con diagnóstico de *P. vivax*, “sufrible” 0,29, 0,22 y 0,39 respectivamente, para *P. falciparum*, *P. malariae* y láminas negativas y “pobre” (0,20) cuando los diagnósticos fueron de infecciones mixtas, dista mucho de los resultados arrojados en la evaluación practicada a nivel nacional para diagnósticos del año 2003, donde la concordancia general de los errores tipo “diagnóstico” ($k=0,99$) y las especies *P. vivax* y *P. falciparum* ($k=0,98$) fue “óptima” (Cáceres *et al.*, 2006) y de la concordancia perfecta encontrada en los exámenes de gota gruesa realizados a nivel local y sus respectivos controles de calidad llevados a cabo a nivel Central en un estudio sobre eficacia terapéutica de regímenes antimaláricos en Costa Rica y Nicaragua (Bergonzoli & Rivers, 2000)

e igualmente del índice de concordancia de $k=0,94$ obtenido en un estudio de 73 pacientes que tuvieron malaria por *P. vivax* diagnosticada por examen de gota gruesa, cuyas muestras fueron extraídas a partir de venopunción, en la zona endémica de Junín en el Perú (Solari *et al.*, 2002).

En una evaluación de la prueba Optimal en el diagnóstico de las distintas especies de *Plasmodium* en Venezuela, la concordancia hallada en 202 exámenes de gota gruesa entre los niveles Central y Local fue de $k=0,94$ para *P. falciparum* y de 1 o “perfecta” para *P. vivax* (Zerpa *et al.*, 2001).

Se conoce que mediante el examen de gota gruesa es difícil la detección de parasitemias mixtas (Turrientes & López-Vélez, 2000). Mientras que en el país la concordancia entre los resultados de infecciones mixtas (*P. falciparum* y *P. vivax*), es “buena” ($k=0,66$) (Cáceres *et al.*, 2006), en Cajigal el resultado es muy inferior (“pobre” 0,20), lo cual significa que los errores de diagnóstico de infecciones mixtas alcanzan 33,3% (13/39) del total de desaciertos por especie.

En Cajigal, la capacidad de los microscopistas de detectar los individuos verdaderamente positivos a *P. vivax*, es decir, diagnosticar correctamente los individuos infectados con esta especie, está en 69% de los casos, muy por debajo del registro nacional de 99,52% (Cáceres *et al.*, 2006).

El resultado de un examen parasitológico de malaria no admite errores. Los microscopistas del municipio Cajigal, sólo diagnosticaron correctamente 50% de los exámenes de gota gruesa y extendido. Como la incidencia malárica del estado y del municipio es totalmente a *P. vivax*, los microscopistas presentan dicho sesgo diagnóstico, sin dar opción a poder identificar casos de otra especie parasitaria, importados de otros estados. En complemento, los participantes no reconocieron *P. falciparum*, *P. malariae*, infección mixta, ni bajas parasitemias a *P. vivax*, dentro de un área de malaria endémica. En sentido inmediato, los factores que pudieron determinar estos resultados incluyeron láminas reutilizadas hasta 5 veces, el uso de un colorante preparado en otro ambiente, el trabajo en sillas no aptas y, principalmente, la supervisión inadecuada de su trabajo, donde se asume como suficiente su entrenamiento inicial y se desestima la necesidad de actualizaciones. La evaluación mostró necesidad de un nuevo entrenamiento teórico-práctico en microscopía

de la malaria. Sin embargo, más allá de este conjunto obvio, los hallazgos señalaron la necesidad de que la gerencia regional especializada revise sus sistemas de evaluación para garantizar suficiencia cualitativa y cuantitativa de la vigilancia, como componente programático que determina el éxito del control integrado. Los resultados indican que se ha desatendido el nivel de desempeño del microscopista local. Esto no traduce de ninguna manera que este personal deba ser desplazado o reemplazado por bioanalistas, como tal vez pudiera inferirse, pues por más de medio siglo, la figura del microscopista ha sido vertebral dentro del sistema de vigilancia de la malaria en Venezuela.

¿Cuál lugar ocupa dentro de la gestión del Programa Antimalárico de Venezuela la integridad y calidad del nivel técnico de sus ejecutores? ¿Cuál es la inversión que se hace efectivamente en evaluación de nuestros sistemas de salud, verbigracia, malaria? Los microscopistas de Cajigal, participantes en la actualización, manifestaron que desde su entrenamiento, su trabajo no había sido evaluado, ni sus conocimientos habían sido actualizados. Se expone que el municipio recibe mensualmente la visita del microscopista más experto, del nivel regional, quien hace mantenimiento a los microscopios y verifica la calidad del proceso diagnóstico. Sin embargo, las mediciones y observaciones realizadas negaron estos controles. ¿Cuál es la situación de este aspecto en otros municipios del estado Sucre, la entidad donde la inversión bajo los lineamientos del Roll Back Malaria permitió desde el año 2000 prefigurar lo que tal vez sea la red de vigilancia de malaria mejor estructurada del país?

Es importante reiterar que, operativamente, la red básica de vigilancia en malaria conecta los componentes de detección, diagnóstico y tratamiento, independientemente de la diversidad y niveles de actuación de sus participantes. Este principio debe observarse con cuidado donde se trata de promover integración para la participación social en salud haciendo transferencia de responsabilidades a grupos locales, cuando sólo el estado cuenta con el nivel técnico que se requiere para enfocar, ejecutar y evaluar la política de salud pública. Esto tiene sentido para señalar la actividad puntual del entrenamiento en microscopía, no se diga de malaria solamente. La tendencia a masificar estos entrenamientos y hasta los refrescamientos o actualizaciones y a privilegiar el número, sin evaluar rigurosa, sistemática y regularmente los productos locales, en su contexto y dinámica, edifican los riesgos para la salud derivados

de la estructura y los niveles de organización de los servicios. Debería conducir esto a la reflexión, tomando malaria como problema de salud modelo, sobre cuál es el nivel de Investigación (operativa, aplicada) en Sistemas de Salud que se conduce en los estados maláricos para responder por el óptimo funcionamiento del Programa de Control de la Malaria en Venezuela.

AGRADECIMIENTOS

A la Jefatura del Municipio Sanitario Cajigal, en Yaguaraparo, Estado Sucre. Al Laboratorio de Malaria de la Red de Laboratorios y a la Unidad de Estadísticas de la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Dirección General de Salud Ambiental del Ministerio de Salud de Venezuela, en Maracay. Este trabajo fue financiado con recursos otorgados por el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto FONACIT No. 2001002104) y la Fundación Venezolana para la Investigación Multidisciplinaria, FUNINVEST.

Quality assessment of malaria diagnosis malaria surveillance-net Cajigal municipality, Sucre, Venezuela

SUMMARY

The National Malaria Control Programme in Venezuela, through the National Laboratory, performs both training and updating on diagnosis activities in order to guarantee the parasitological diagnosis of malaria from the basic epidemiological units, that is, the municipalities. This becomes a very important guideline, since malaria case definition in Venezuela depends on its parasitological confirmation. Following the routine activity of the National Laboratory of the performance evaluation of formerly trained microscope technicians, a descriptive study was developed to assess the quality of parasitological malaria diagnosis as an element of the malaria surveillance net. The study site was Cajigal Municipality, at the Eastern malaria focus. Standardized theoretical tests were applied to measure knowledge level as well as practical tests to estimate the diagnosis agreement with respect to the National Laboratory. From this activity, taking into account detected needs, a minimal updating was given to participants. Direct observation over working environments and microscopes quality was included. Amongst eight participants, none of them passed the

theoretical test and they gave the “right diagnosis” just 50% of the time on the practical evaluation. Results showed that the performance level of these technicians, key personnel for the malaria surveillance system success in Venezuela, has been neglected.

Key words: Diagnosis, malaria, microscope-technician, surveillance net, assessment.

REFERENCIAS

- Beaglehole R., Bonita R. & Kjellström T. (1994). *Epidemiología básica*. Washington. Organización Panamericana de la Salud.
- Bergonzoli G. & Rivers J. C. (2000). Eficacia terapéutica de diferentes regímenes antimaláricos en la región fronteriza de Costa Rica y Nicaragua. *Rev Panam Salud Pública*. **7**: 366-370.
- Cáceres J. L. & Vela F. (2003). Incidencia malárica en Venezuela durante el año 2002. Reporte Epidemiológico. *Bol. Dir. Mal. San. Amb*. **43**: 53-58.
- Cáceres J. L., Vaccari E., Campos E., Terán E., Ramírez A., Ayala C. & Itriago M. (2006). Concordancia del diagnóstico malárica en Venezuela, año 2003”. *Bol. Mal. Sal. Amb*. **46**: 49-57.
- Castillo-Salgado C. (1992). Epidemiological risk stratification of malaria in the Americas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **87**: 115-120.
- Gutiérrez S. & Arróspide N. (2003). *Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de Malaria*. Serie de Normas Técnicas N° 39. Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú. 112 pp.
- OPS/OMS. (1999). *Métodos de investigación epidemiológica en enfermedades transmisibles*. Escuela de Malariología y San Amb. **1**: 1-11.
- Solari L., Soto A., Mendoza D. & Llanos A. (2002). Comparación de las densidades parasitarias en gota gruesa de sangre venosa versus digitopunción en el diagnóstico de Malaria Vivax. *Rev. Med. Hered*. **13**: 140-143.
- Turrientes M. & López-Vélez R. (2000). *Aspectos prácticos del diagnóstico de laboratorio y profilaxis de la malaria*. Unidad de Medicina Tropical y Parasitología Clínica. Hospital Ramón y Cajal. Madrid. Disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_para/pdf/malaria.pdf
- WHO (1994). *Information systems for the evaluation of malaria control programmes. A practical guide*. WHO. Regional Office for Africa. Brazzaville. AFRO/CTD/MAL/94.3.
- Zerpa N., Pabón R., Gaviria M., Medina M., Cáceres J. L., Baker M. & Noya O. (2001). “Evaluación de la prueba Optimal en el diagnóstico de malaria en Venezuela. *J. Bras. Patología*. **37**: 1-337.

Recibido el 30/11/2007
Aceptado el 27/06/2008

Producción, purificación y caracterización de un anticuerpo anti IgG canino como sonda en el diagnóstico de leishmaniasis visceral canina

Luisana J. Fernandes¹, Marlin T. Matani¹, Olinda Delgado², Melcenia Moreno³ & Martín A. Sánchez^{3*}

La Leishmaniasis Visceral (LV) es una enfermedad parasitaria producida por protozoarios del género *Leishmania*, es endémica en muchos países a nivel mundial y representa un problema de salud pública pudiendo ser fatal si no se diagnostica y trata a tiempo. El perro doméstico es el principal reservorio de leishmanias viscerotropas en el Nuevo Mundo y juega un papel muy importante en la transmisión a humanos. Debido a esto es imperante el diagnóstico temprano de los reservorios, mediante la demostración de anticuerpos específicos en el suero con pruebas sensibles, rápidas y costo - efectivas como la ELISA, Dot-ELISA, MABA e IFI que requieren para su realización de un anticuerpo secundario. En el presente trabajo se produjo un anticuerpo anti-IgG canino conjugado con proteínas reporteras para ser evaluado en las técnicas antes mencionadas. Se demostró una mayor sensibilidad de este anticuerpo conjugado con peroxidasa en las pruebas de MABA y ELISA así como el conjugado con fluoresceína en IFI al comparar con el anticuerpo comercial. El uso de estos conjugados en el diagnóstico de la LV canina mostró ser de gran utilidad y costo efectivos si se considera que los volúmenes a preparar se pueden ajustar a los requerimientos de las diversas técnicas diagnósticas siendo altamente sensibles y económicos en comparación con los comerciales.

Palabras clave: leishmaniasis visceral, Diagnóstico, Serología.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis visceral (LV) representa un grave problema de salud pública, es considerada la tercera enfermedad más importante que ocasiona muerte y años perdidos por discapacidad en la población mundial, precedida por malaria y tuberculosis según datos de la Organización mundial de la salud (Desjeux, 2004).

En Venezuela, desde el año 1997 hasta el 2006 se notificaron 456 casos de leishmaniasis visceral humana (LVH) en 24 estados, de los cuales, 131 (28.7%) correspondían a casos reportados en el estado

Nueva Esparta, con una tasa de incidencia de 32,70 por 100.000 habitantes (Instituto de Biomedicina. Dpto. Informática, 2006). La mortalidad en pacientes con leishmaniasis visceral (LV) fue de 7,85% durante el periodo 1995-2000 (Ortiz *et al.*, 2003).

La leishmaniasis visceral es una zoonosis producida por parásitos del género *Leishmania*, en la cual el perro doméstico constituye el principal reservorio de las especies viscerotropas (*L. infantum/chagasi*) en las Américas (Pinelli *et al.*, 1994). Erróneamente se ha considerado que solo los perros sintomáticos son infectantes para los flebotómicos (vectores del parásito), sin embargo, se ha demostrado que los perros asintomáticos también juegan un papel importante en la transmisión (Moreno & Alvar, 2002), ya que los animales infectados pueden responder ante el parásito con diferentes patrones de reacción, es decir, desarrollar una enfermedad progresiva con desenlace fatal, o ser asintomáticos (Pinelli *et al.*, 1994) con la ausencia de signos clínicos aparentes

¹ Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela,

² Sección de Inmunoparasitología, Instituto de Medicina Tropical,

³ Laboratorio de Biología Celular, Instituto de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas 1010.

*Autor de correspondencia: martinsanchez1@gmail.com

pero potencialmente infectantes en áreas endémicas donde existe la presencia del vector. Existen suficientes evidencias que indican que siendo el principal reservorio del parásito, los perros domésticos infectados probablemente representen la mayor fuente de infección en Venezuela (Torrealba & Torrealba, 1964; Zerpa *et al.*, 2000; Sanchez *et al.*, 2004).

Zerpa *et al.* (2000), en un estudio realizado en varias comunidades en zonas endémicas del estado Nueva Esparta demostraron que el rango de infección en perros domésticos varía entre 21 y 33% de positividad. Por otra parte, estudios epidemiológicos sugieren que la mayoría de los casos de leishmaniasis canina diagnosticados en zonas no endémicas corresponden usualmente a animales que han migrado de las zonas endémicas, constituyendo un alto riesgo de propagación de la enfermedad hacia zonas no endémicas.

En este sentido se hace imperioso el diagnóstico temprano de leishmaniasis visceral en perros tanto en zonas endémicas como en puntos de entrada a zonas no endémicas.

Este diagnóstico se hace mediante la demostración de anticuerpos específicos a antígenos del parásito en el suero con pruebas sensibles como el inmunoensayo ELISA frente a antígeno rK39 específico para las especies de *Leishmania* spp. que causan leishmaniasis visceral (*L. infantum*, *L. chagasi* y *L. donovani*). Una de las limitantes en esta metodología es el costo de los reactivos para la detección de anticuerpos caninos y el requerimiento de la infraestructura de un laboratorio de diagnóstico. Otras pruebas alternativas incluyen la Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo de multidiagnóstico (MABA), por lo que en el presente trabajo se produjo y caracterizó un anticuerpo anti IgG canino conjugado con distintas proteínas reporteras para evaluar su utilidad en las técnicas de detección antes mencionadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inmunógeno

Fracción de IgG de suero obtenido de canino adulto procedente de zona no endémica para leishmaniasis visceral, purificada mediante cromatografía de afinidad en columna de sefaroza CL-

4B acoplada a proteína A de *Staphylococcus aureus* (Sigma- Aldrich, USA).

Producción y purificación de anticuerpo policlonal

El anticuerpo policlonal anti canino fue producido en conejos (*Oryctolagus cuniculus*). El esquema de inmunización consistió en tres (3) inoculaciones con 15 días de intervalo por vía subcutánea e intramuscular a tres (3) conejos hembras de 3 Kg cada uno. Esta inmunización fue realizada con 2 mL de IgG canina purificada (3 mg/mL) en 2mL de adyuvante completo de Freund (ACF) en la primera inoculación y los dos retos posteriores se hicieron con adyuvante incompleto de Freund (AIF), a la misma proporción. Se realizaron sangrados a cada conejo por la vena marginal de la oreja, antes de la primera inoculación del antígeno, para obtener el suero preinmune y luego cada 15 días posterior al segundo reto para obtener el suero inmune; éste fue monitoreado por el método de contra-inmuno electroforesis en gel de agarosa al 1% para evaluar la producción y reactividad del suero de los conejos frente a IgG canina. Se determinó la concentración de proteínas totales en el suero mediante el método colorimétrico Micro-Bradford según instrucciones del fabricante (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratorios, Inc. USA) y de acuerdo a las modificaciones del método original de Bradford introducidas por Simonian & Smith (2006) utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como patrón; las lecturas se realizaron en un lector de microplacas modelo 550 de BIORAD con filtro de 595 nm y la concentración de las proteínas se determinó a partir de las lecturas de absorbancia obtenidas mediante el Software BIORAD "Microplate reader". Las inmunoglobulinas contenidas en el suero diluido en buffer fosfato salino (PBS) a razón de 85 mg/mL fueron purificadas a través de cromatografía de afinidad. Se determinó nuevamente la concentración de proteínas de la fracción IgG purificada y se almacenó a 4°C hasta su posterior uso.

Conjugación con proteínas reporteras

Para la detección de IgG canina bajo las distintas metodologías se procedió a la elaboración de sondas de diagnóstico mediante la conjugación de la fracción IgG de conejo anti IgG canina con biotina (Biotinamidocaproate N-hydroxysuccinimide ester) (Sigma-Aldrich, USA), Peroxidasa de rábano (HRP, Sigma-Aldrich, USA) e Isotiocianato de Fluoresceína (FITC, Sigma-Aldrich, USA).

La biotilación fue realizada según el método de conjugación directa (Hay & Westwood, 2002) mezclando 2 mg/mL de IgG con 2 mg/mL de biotina a 4°C por 18 hrs. Posteriormente se eliminó la biotina libre utilizando membrana de diálisis (6 - 8 kD) contra PBS.

La conjugación a peroxidasa se realizó mediante el método de un solo paso con glutaraldehído (Coligan *et al.*, 1994) de IgG mezclado con 2.5 mg de peroxidasa y glutaraldehído al 0,02% en PBS en agitación constante a temperatura ambiente por 1 hr. La fracción conjugada es separada de la peroxidasa libre a través de cromatografía de exclusión molecular en columna de Sephadex G-200.

Para conjugar el anticuerpo con fluoresceína, se ajustó el pH de la IgG con buffer carbonato pH 8.5 y se procedió a mezclar 1 mg de IgG por cada 100 µg de FITC disuelto en Dimetil-sulfoxido (DMSO, Sigma-Aldrich, USA) a una concentración de 1 mg/mL por 18 hrs a 4°C en agitación constante. El exceso de FITC fue eliminado mediante diálisis contra PBS por 24 hrs.

Caracterización de la sonda

Dot-ELISA:

Se acopló 10 µL de IgG canino purificado a una concentración de 1,6 mg/mL a una membrana de nitrocelulosa de 1 x 2 cm, se bloquearon las membranas con PBS-BSA 0,3% por 30 min, se incubó con 5 mL de la sonda marcada con biotina o peroxidasa en diluciones crecientes en un rango de 1:10 hasta 1:4000, por 30 min a temperatura ambiente. Las membranas sometidas a la sonda biotinilada se incubaron con streptoavidina-peroxidasa (Vector labs, USA) por 15 min a temperatura ambiente. El revelado en ambos casos se realizó con H₂O₂ en presencia del cromógeno 3,3' diaminobenzidina (DAB, MERCK, USA). La positividad se evidenció mediante la formación de un precipitado rojizo en la membrana.

ELISA:

Se determinó la reactividad del anticuerpo anti IgG canino conjugado a peroxidasa mediante un ELISA directo. Se sensibilizó una placa de 96 pozos con 10⁵ parásitos/pozo, empleando promastigotes de *Leishmania infantum/chagasi* fijados a 4°C por 10 min en formalina.

Los lavados entre cada paso se hicieron con PBS-Tween 20 y todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. Se bloquearon las placas con PBS-BSA 0,3% por 1 hr, se incubó con 50 µL de suero canino diluido 1:100 por 1 hr, se agregó el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa en diluciones crecientes desde 1:500 a 1:4000 por 1 hr. Se reveló con H₂O₂ en presencia del cromógeno ortofenilendiamina (OPD, Sigma-Aldrich, USA) en buffer citrato-fosfato pH 5,3, la reacción se detuvo con H₂SO₄ 2,5 N y se analizó en lector de ELISA modelo 550 (BIORAD) a 490nm.

IFI:

Láminas previamente sensibilizadas con promastigotes de *Leishmania infantum/chagasi* (10⁴ p/lámina.) fijados en formalina, fueron incubadas con 30 µL de sueros caninos por 30 min, lavados con solución salina e incubados en oscuridad por 30 min a temperatura ambiente con 30 µL del anticuerpo secundario conjugado con FITC en diferentes diluciones. Luego de tres lavados, las láminas se montaron en glicerol al 10% en PBS y se observaron al microscopio de epi-fluorescencia (Leitz Diaplan).

MABA:

El método de detección de múltiples antígenos se realizó siguiendo los procedimientos descritos por Noya & Alarcón de Noya en 1998, usando como antígenos acoplados a las membranas de nitrocelulosa el rK39 de *L. infantum* y el LB300 de *L. braziliensis* en diferentes diluciones. Se enfrentaron a sueros caninos positivos y negativos para leishmaniasis visceral y posteriormente se agregó el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa en diluciones crecientes desde 1:500 a 1:20000. Se reveló con una solución de Luminol® (Amersham ECL Detection System, UK) y H₂O₂ mediante auto-radiografía en placa fotográfica ECL-Hyperfilm (Amersham ECL Detection System, UK), en oscuridad por 10-30 seg (Noya & Alarcon de Noya, 1998).

RESULTADOS

Se obtuvo un total de 90,2 mL de suero de conejo a una concentración de proteínas totales de 84,9 mg/mL. Luego de la purificación de la IgG de este suero por cromatografía de afinidad se obtuvo un volumen de 48 mL a una concentración de 2,08 mg/mL de IgG purificada.

Caracterización de los conjugados IgG anti canino en las técnicas de inmunodiagnóstico

Al evaluar los distintos conjugados en la ELISA en papel o Dot-ELISA se demostró que el conjugado con biotina permite su resolución óptica a una dilución de 1:1000 mientras que el conjugado con biotina y posterior revelado con peroxidasa permite detectar el antígeno a una dilución 1:4000 (Fig.1).

En la determinación de la eficiencia de ambos conjugados mediante la técnica de ELISA convencional se observó una diferencia significativa en las densidades ópticas entre sueros positivos y negativos con la dilución 1:1000 del conjugado con peroxidasa. En contraste, estas diferencias entre positivos y negativos no se observaron al utilizar el conjugado anti IgG canina marcado con biotina (Tabla I).

Por otra parte, la sonda de diagnóstico IgG anti canina conjugada con fluoresceína mediante la técnica de IFI obtuvo una notable resolución con fluorescencia positiva en diluciones del conjugado que van desde 1:25 hasta 1:100 utilizando un suero canino positivo altamente diluido (1:128) (Fig. 2).

La Fig. 3 muestra los resultados de la técnica de MABA, obtenidos al emplear el conjugado IgG anti canino marcado con peroxidasa y diluido 1:1000 frente a los antígenos rK39 de *L. infantum/chagasi* y Lb300 de *L. braziliensis* en diferentes diluciones. Se observó una fuerte reacción positiva a todas las diluciones del antígeno rK39 al emplear sueros de perros positivos para este antígeno, mientras que con el antígeno Lb300 no hubo reconocimiento en estos sueros. Los sueros de perros negativos para rK39 no reaccionaron ante ningún antígeno.

Con la finalidad de conocer la máxima dilución del conjugado a ser utilizada en este ensayo

para el diagnóstico de LVC, se realizó un MABA empleando sueros caninos positivos y negativos con diferentes diluciones del conjugado y del antígeno rK39. En la Fig. 4 se evidencia reacción positiva con todas las diluciones del conjugado al emplear sueros caninos positivos; incluso con una dilución 1:20000 del conjugado hubo reconocimiento utilizando el antígeno diluido 1:100.

DISCUSIÓN

La técnica de Dot-ELISA resultó ser mas sensible utilizando la IgG anti canina conjugada con biotina al permitir la detección del antígeno a una mayor dilución de en comparación con el conjugado a peroxidasa directamente. La conjugación con biotina puede ser ventajosa ya que tiene la capacidad de amplificar la reacción, permitiendo diagnosticar la enfermedad aún con una baja respuesta inmune humoral mediante técnicas que pueden utilizarse en el campo como el Dot- ELISA. Por otra parte en la metodología convencional de ELISA en microplacas, la utilización directa del conjugado a peroxidasa demostró ser más efectiva en comparación con el empleo de un paso extra de amplificación con biotina.

Esta falta de discriminación entre negativos y positivos puede deberse a uniones inespecíficas entre la biotina y componentes de la placa, o a la gran amplificación proveída por el sistema streptoavidina-biotina-peroxidasa que no permite discernir una diferencia en la reacción colorimétrica con el sustrato. Esta amplificación si bien es ventajosa en una prueba de campo como el Dot –ELISA, donde se requiere evidenciar la reacción a simple vista, resulta innecesaria en una técnica más sensible como el ELISA en la cual altas diluciones del conjugado con peroxidasa permiten el desarrollo de color, pudiendo así discernir entre positivos y negativos al analizarse espectrofotométricamente.

Tabla I. Absorbancias obtenidas en el ensayo ELISA empleando anti IgG canino-HRP y anti IgG canino-biotina diluido 1:1000

Dilución de suero canino	Sueros Caninos Negativos				Sueros Caninos Positivos				Blanco
	1:50	1:100	1:50	1:100	1:50	1:100	1:50	1:100	
Absorbancias Elisa con HRP*	0,419	0,342	0,431	0,379	1,048	0,960	1,140	0,951	0,092
	0,416	0,308	0,405	0,327	1,021	0,873	1,138	0,911	0,100
Absorbancias Elisa con Biotina	0,928	0,851	0,885	0,833	0,932	0,848	0,880	0,804	0,345
	0,922	0,836	0,887	0,824	0,912	0,839	0,891	0,833	0,328

* $P \leq 0.05$ entre positivos y negativos para cada dilución, punto de corte: DO: 0,59. Calculado como 6 D.O Blanco + 2SD

Fig. 1. Dot – ELISA en papel de nitrocelulosa sensibilizado con IgG canina. A: ensayo empleando anti IgG canina conjugada con HRP, B: ensayo empleando anti IgG canina conjugada con biotina.

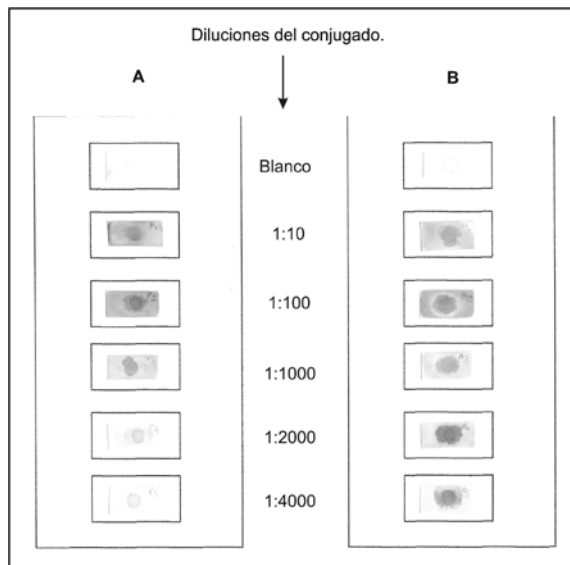


Fig.2. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) empleando anti IgG canina marcada con fluoresceína diluida 1:100 enfrentada a suero canino positivo (A) y negativo (B) diluidos 1:128. Antígeno: Promastigotes de *Leishmania infantum/chagasi*.

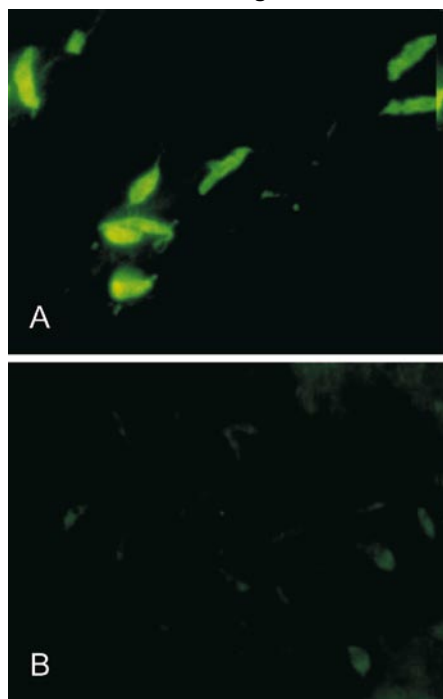


Fig. 3. Inmunoensayo enzimático de múltiples antígenos (MABA). Patrón de reconocimiento de IgG canina empleando el anticuerpo secundario conjugado con HRP diluido 1:1000 y diferentes diluciones del antígeno rk39 y Lb300. Cada tira representa un suero canino (2-6). Control de conjugado (1), Sueros positivos (2-4), sueros negativos (5,6) por ELISA.

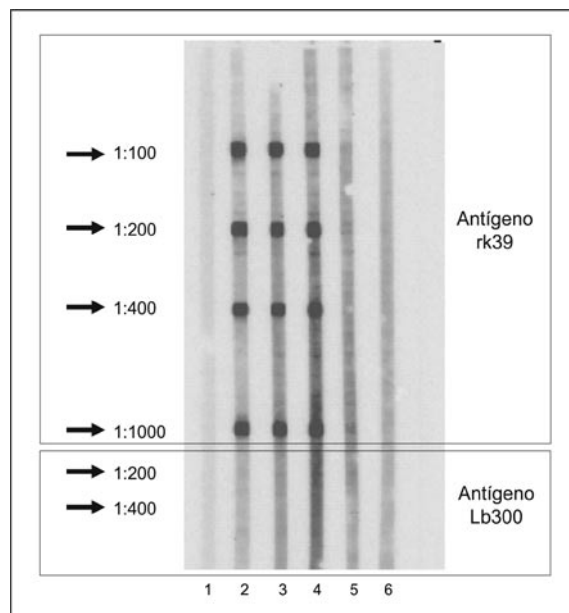
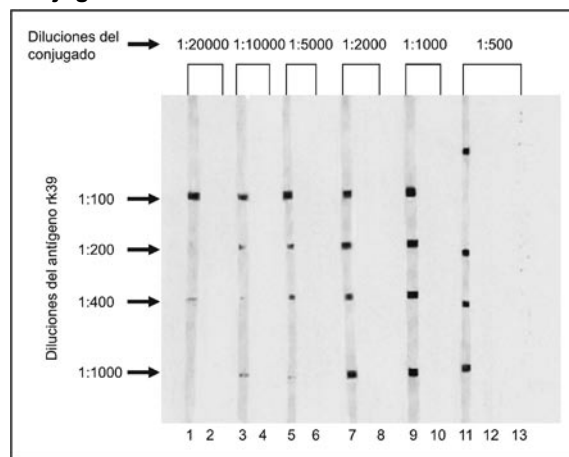


Fig. 4. Sensibilidad del Ac.secundario anti-IgG canina conjugado a HRP (MABA). Patrón de reconocimiento de IgG canina empleando antígeno rk39. Cada tira representa un suero canino (números impares: sueros positivos, números pares: sueros negativos). 13. Control del conjugado.



El anticuerpo anti IgG canino conjugado con FITC demostró ser eficiente en la detección de IgG canina específica para promastigotes de leishmania mediante IFI, demostrando su alta sensibilidad y confirmando su utilidad en el diagnóstico de LVC.

La especificidad del anticuerpo de conejo conjugado por la IgG de suero canino así como su gran avidez fue corroborada con la técnica de MABA al no presentar reacción inespecífica o fondo en las reacciones de los sueros con antígenos de *L. braziliensis* Lb300, y al reaccionar con el antígeno K39 diluido empleando el conjugado a elevadas diluciones como 1:10000 y 1:20000. Estas diluciones del conjugado son superiores a las reportadas por Wide *et al.* (2006) en trabajos similares, utilizando la técnica de MABA para la detección de antígenos de *Plasmodium falciparum* y *Anopheles albimanus* con sueros de conejos donde se empleó un anti IgG de conejo comercial conjugado a peroxidasa (Sigma-Aldrich, USA) a una dilución de 1:4000 (Wide *et al.*, 2006).

El conjugado con peroxidasa producido en este trabajo presenta grandes ventajas para el diagnóstico de LVC, entre ellas: Alta sensibilidad, en vista de que es posible evidenciar una reacción positiva con la máxima dilución de suero canino empleada (1:100); es versátil, por lo que puede ser empleado en diferentes inmunoensayos como MABA, ELISA y dot-ELISA; resulta ser costo-efectivo, debido a que este conjugado puede ser empleado con altas diluciones del mismo (1:1000) en técnicas que no requieren equipos costosos obteniéndose resultados confiables y además, es fácil de almacenar y manipular, lo que permite su uso en estudios de campo dado que la reacción puede ser revelada macroscópicamente por cambios de coloración.

El anticuerpo aquí generado está siendo utilizado en la actualidad como sonda de detección en caninos infectados con *L. infantum/chagasi* del estado Nueva Esparta, para la determinación de la inmunidad o reactividad frente a antígenos de otras zoonosis que pudiesen estar relacionadas o no con la susceptibilidad a leishmaniasis visceral para la determinación de posibles factores de riesgo zoonóticos.

AGRADECIMIENTOS:

Al personal del Bioterio y el Laboratorio de Biología Celular del Instituto de Biomedicina así

como la Sección de Inmunoparasitología del Instituto de Medicina Tropical UCV por su asistencia técnica y al Dr. Oscar Noya por su asistencia en las fotografías de IFI. Este trabajo fue financiado por el FONACIT a través del Proyecto grupal G-2005000375 (MS).

Production and characterization of anti dog IgG antibody as a diagnostic probe in canine visceral leishmaniasis

SUMMARY

Visceral leishmaniasis (VL) is a parasitic disease caused by protozoan parasites of the *Leishmania* genus. Endemic in many countries worldwide, VL represents a serious public health issue and might be fatal if untreated. Infected domestic dogs are the main reservoir of viscerotropic species of *Leishmania* in the New World and plays an important role as source of infection to humans. Early diagnosis of dog reservoirs are therefore required by demonstrating specific serum antibodies against the parasite with rapid, sensitive and cost-effective test like ELISA, Dot – ELISA, IFI and Multiple Antigen Binding Assay (MABA). Here we produce an anti canine IgG antibody and tested it in those assays by conjugating with reporter proteins. Results demonstrated a higher sensitivity of this antibody conjugated with HRP in MABA and ELISA test, as well as conjugated with FITC on the IFI test, when compare to the commercial peroxidase-conjugated antibody. The use of this conjugate on canine VL diagnosis proved to be useful, highly sensitive and cost effective.

Keywords: visceral leishmaniasis, diagnostics, serology.

REFERENCIAS

- Coligan J. E., Kruisbeek A. M., Margulies D. H., Shevach E. M. & Strober W. (1994). *Current protocols in immunology*. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Desjeux P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **27**: 305-18.
- Hay F. C. & Westwood O. M. (2002). *Practical immunology*. Blackwell Publishing.

- Instituto de Biomedicina. Dpto. Informática (2006). *Reporte Anual*. MSDS.
- Moreno J. & Alvar J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* **18**: 399-405.
- Noya O. & Alarcon de Noya B. (1998). The multiple antigen blot assay (MABA): a simple immunoenzymatic technique for simultaneous screening of multiple antigens. *Immunol. Letters.* **63**: 53-56.
- Ortiz R. M., Muñoz S., Lechuga D., del Campo M. & Torres E. (2003). Aspectos epidemiológicos de la leishmaniasis visceral humana y canina en Venezuela. *Pan. Amer. J. Pub. Health.* **13**: 1 - 2.
- Pinelli E., Killick-Kendrick R., Wagenaar J., Bernadina W., del Real G. & Ruitenbergh J. (1994). Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* **62**: 229-35.
- Sánchez M. A., Díaz N. L., Zerpa O., Negrón E., Convit J. & Tapia F. J. (2004). Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **70**: 618-24.
- Simonian M. H. & Smith J. A. (2006). Spectrophotometric and colorimetric determination of protein concentration. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 10: Unit 10 1A.
- Torrealba J. W. & Torrealba J. F. (1964). [Experimental Infection of *Cercopithecus thous* (common fox) with *Leishmania donovani*. Preliminary Note]. *Gac. Med. Caracas.* **72**: 117-8.
- Wide A., Capaldo J., Zerpa N., Pabon R., Noda A., Noya B., Gonzalez J. & Noya O. (2006). Sharing of antigens between *Plasmodium falciparum* and *Anopheles albimanus*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **48**: 327-32.
- Zerpa O., Ulrich M., Negrón E., Rodríguez N., Centeno M., Rodríguez V., Barrios R. M., Belizario D., Reed S. & Convit J. (2000). Canine visceral leishmaniasis on Margarita Island (Nueva Esparta, Venezuela). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **94**: 484-7.

Recibido el 09/04/2008
Aceptado el 24/05/2008

Diferencias en la susceptibilidad a la deltametrina en poblaciones de *Aedes aegypti* de Trujillo, Venezuela

Leslie Álvarez¹, Carmen Castillo¹, Milagros Oviedo^{*1} & Francisco Briceño²

El Dengue es un importante problema de salud pública en Venezuela, donde *Aedes aegypti* es el principal vector. El propósito de este estudio fue determinar el estado de la susceptibilidad a la deltametrina en nueve poblaciones naturales de *A. aegypti* del estado Trujillo, en comparación con la cepa susceptible Rockefeller. Los bioensayos fueron llevados a cabo siguiendo la metodología de la Organización Mundial de la Salud. Las poblaciones Trujillo, Pampán, Pampanito, Flor de Patria, Motatán, Tres Esquinas y Cubita mostraron valores de mortalidades comprendidas entre 89% y 97%, y KDT₅₀ entre 15,7 min y 24,1 min, sugiriendo la posibilidad de resistencia la cual debe ser confirmada. Las poblaciones Monay y Filo fueron susceptibles, con KDT₅₀ de 15,5 y 20,2 min respectivamente, y mortalidades a las 24 horas de 99 y 98%. Estos resultados deben ser considerados al momento de diseñar el programa de control del vector para asegurar la efectividad del mismo.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, susceptibilidad, deltametrina, Trujillo.

INTRODUCCIÓN

Históricamente a nivel mundial, en los programas de control de diversas enfermedades metaxénicas tales como Malaria, Enfermedad de Chagas, Leishmaniasis, Fiebre Amarilla y Dengue entre otras, ha sido incluida la utilización de insecticidas químicos como una herramienta importante y exitosa. Así tenemos que durante mas de 40 años fueron empleados el grupo de los organoclorados, obteniéndose resultados impresionantes a nivel mundial, especialmente con el DDT, pero su uso masivo y propiedades organolépticas trajo como consecuencia el desarrollo de resistencia en diferentes vectores, ocasionando su desplazamiento por otro grupo de químicos, los organofosforados, y los carbamados. Actualmente otras moléculas con actividad insecticida, los piretroides sintéticos, son los más utilizados bien aplicados en superficies, en forma de niebla o en

material como cortinas o mosquiteros logrando además del control una prevención de la enfermedad (Mulla, 1994).

La resistencia a insecticidas ha sido objeto de múltiples estudios a nivel mundial, no solo por ser ejemplo de adaptabilidad de los insectos, sino porque es el principal motivo que favorece la transmisión de muchas enfermedades y por ende debido al fracaso de los programas de control.

En Venezuela, *Aedes aegypti*, responsable de la transmisión del dengue clásico y hemorrágico, ha desarrollado la capacidad de resistir a la acción de diferentes líneas de insecticidas; como los organoclorados DDT y diedrin/BHC (Quaterman & Schoof, 1958; Mouchet, 1967); a los organofosforados, carbamatos y piretroides en las poblaciones de los estados Aragua y Falcón (Georghiou *et al.*, 1987; Mazzarri & Georghiou, 1995; Pérez & Fernández, 2001).

Entre los mecanismos de resistencia, Mazzarri & Georghiou (1995) determinaron aumento de esterasas en *A. aegypti* de Aragua y Miranda resistente al temephos, posteriormente Bisset *et al.*

1 Instituto Experimental "José Witremundo Torrealba". Núcleo Universitario "Rafael Rangel". Universidad de los Andes. Apdo. 214 Trujillo Venezuela.

2 Grupo de Investigación Geociencia Núcleo Universitario "Rafael Rangel". Universidad de los Andes. Estado Trujillo Venezuela.

*Autor de correspondencia: longipalpis@cantv.net

(2001) encuentran resistencia al Temephos en *A. aegypti* procedentes de Apure, resistencia en las cepas Táchira, Miranda y Aragua al clorpirifos y en todas las cepas resistencia al pirimifos metil, demostrando por estudios con sinergistas y pruebas bioquímicas que la resistencia detectada al temephos y clorpirifos estuvo mediada por la alta actividad de esterasas.

En el estado Trujillo, uno de los estados venezolanos con mayor casos de dengue, siendo referenciado por el Boletín Epidemiológico No. 52 del Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) para el año 2007, un total de 2.717 casos (2.632 tipo clásico y 85 de tipo hemorrágico) con una tasa de 39,64/10.000 habitantes, son escasos los estudios realizados para monitorear las resistencia y/o susceptibilidad de *A. aegypti* a los insecticidas utilizados en los programas de control, recientemente Álvarez *et al.*, (2006) encuentran en una cepa de *A. aegypti*, procedente de este estado, resistencia al temephos, principal larvicida utilizado.

Es evidente que *A. aegypti* ha desarrollado resistencia a los insecticidas organofosforados lo cual pudiera ser un factor determinante en el éxito de los programas de control en Venezuela, por lo que en la actualidad se han incorporado los piretroides para su control, pero ya desde 1997 habían reportes de poblaciones resistente a estos químicos por lo que deben ser evaluados antes de su aplicación, además de buscar alternativas como controladores biológicos o reguladores de crecimiento.

Basándonos en estos antecedentes nos propusimos evaluar los niveles de susceptibilidad a la deltametrina en diferentes poblaciones de *A. aegypti* del estado Trujillo, con la finalidad de proporcionar información necesaria para la incorporación o no de este insecticida en los programas de control.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Las poblaciones de *A. aegypti* fueron colectadas en el estado Trujillo, región andina de Venezuela. Se evaluaron nueve cepas de campo procedentes de los municipios Pampan, Pampanito, Motatán, Carvajal y Trujillo.

En la Tabla I se presentan en forma detallada las referencias geográficas para cada localidad e información epidemiológica (casuística por dengue). Las cepas a monitorear fueron identificadas con el mismo nombre de la localidad de donde procedían, las cuales fueron obtenidas colocando ovitrampas en ambiente doméstico y peridoméstico y por búsqueda activa en los principales contenedores de agua como pipas y pipotes.

Como población de referencia fue utilizada la cepa susceptible Rockefeller, donada por el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de San Juan de Puerto Rico. Las colonias fueron establecidas y mantenidas en el insectario del Instituto Experimental “José Witremundo Torrealba” del Núcleo “Rafael Rangel” de la Universidad de los Andes, Venezuela, bajo condiciones controladas de temperatura 26 +/- 2°C y 65 % de humedad relativa.

Los bioensayos se realizaron siguiendo las normas de la Organización Mundial de la Salud para mosquitos adultos (WHO, 1981 y 1998). Cinco grupos de 15 a 20 hembras de 1 a 3 días de emergidas y sin ingesta sanguínea fueron expuestas a papeles impregnados con el insecticidas deltametrina a la dosis diagnóstica sugerida por la OMS de 0,05% colocados en cilindros plásticos de exposición (Kits de la OMS), al igual que un grupo control expuesto a papeles impregnados solo con aceite siliconado. El tiempo de exposición fue de 60 min., durante los cuales se registró el número de insectos caídos a los 10, 15, 20, 30, 40, 50 y 60 min. Luego de este periodo los insectos se transfirieron a cilindros exentos de insecticidas y provistos de un algodón con solución azucarada. Se mantuvieron hasta las 24 horas en condiciones adecuadas de temperatura (23+/- 2°C) y 70% de humedad relativa para registrar la mortalidad.

Las lecturas de los insectos caídos a los diferentes tiempos durante los 60 minutos fueron procesados mediante el programa probit-log (Raymond, 1985) para obtener los KDT₅₀ y KDT₉₅ cuyos valores indican el tiempo en que son derribados el 50% y 95% de mosquitos expuestos al insecticida.

Cuando en el grupo control se registraron mortalidades entre 5 – 20% se utilizó la fórmula de Abbott para corregir la mortalidad de los mosquitos expuestos al insecticida.

Tabla I. Información geográfica y casuística por dengue de las poblaciones de *Aedes aegypti* evaluadas con deltametrina en el estado Trujillo.

Población	Coordenadas	Altitud msnm	Municipio	Casos
Trujillo	9°25'00" N/ 70°25'00" O	800	Trujillo	57
Tres Esquinas	9°25'48" N/ 70°26'51" O	472		
Pampam	9°26'47" N/ 70°28'26" O	480		
Flor de Patria	9°27'17" N/ 70°27'41" O	451	Pampam	115
Monay	9°32'34" N/ 70°27'41" O	451		
Pampanito	9°24'42" N/ 70°29'39" O	361	Pampanito	103
Motatan	9°26'47" N/ 70°28'26" O	480	Motatan	103
Filo	9°19'22" N/ 70°35'14" O	633	Carvajal	59
Cubita	9°21'16" N/ 70°34'25" O	527		

Los resultados de mortalidad fueron analizados basándonos en los criterios sugeridos para tal fin por la WHO (1998) donde:

100% - 98% de mortalidad indica susceptibilidad
 97% -80% de mortalidad indica resistencia a ser verificada y menos de 80% de mortalidad indica resistencia.

Los bioensayos se realizaron tres veces en oportunidades diferentes, con cada una de las nueve poblaciones de campo y la de referencia, con el objetivo de comprobar los resultados obtenidos.

RESULTADOS

En la Fig. 1 se presenta la distribución georeferenciada de las nueve poblaciones de *A. aegypti* monitoreadas en el presente estudio y su relación con la actividad agrícola desarrollada.

De ellas, las localidades Pampán, Monay son áreas reconocidas para el estado como de mayor actividad principalmente en cultivo de frutales, entre los cuales piña (*Annana sativus*) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum*).

Al evaluar las mortalidades ocasionadas por deltametrina al 0,05% en las nueve poblaciones de *A. aegypti* evaluadas, pudimos categorizar las poblaciones Monay y Filo como susceptibles con porcentajes de mortalidad de 99% y 98% respectivamente, y las restantes poblaciones tal como se muestra en la Tabla II, Tres Esquinas, Trujillo, Flor de Patria, Pampanito, Motatan, Pampan y Cubita como resistentes bajo verificación con valores de mortalidades por debajo del 98%. Los porcentajes de mortalidad fueron redondeados a números enteros tomando como criterio si el decimal es igual o mayor a cinco.

Tabla II. Mortalidades encontradas en poblaciones de *Aedes aegypti* del estado Trujillo- Venezuela expuestas a papeles impregnados con Deltametrina al 0,05%.

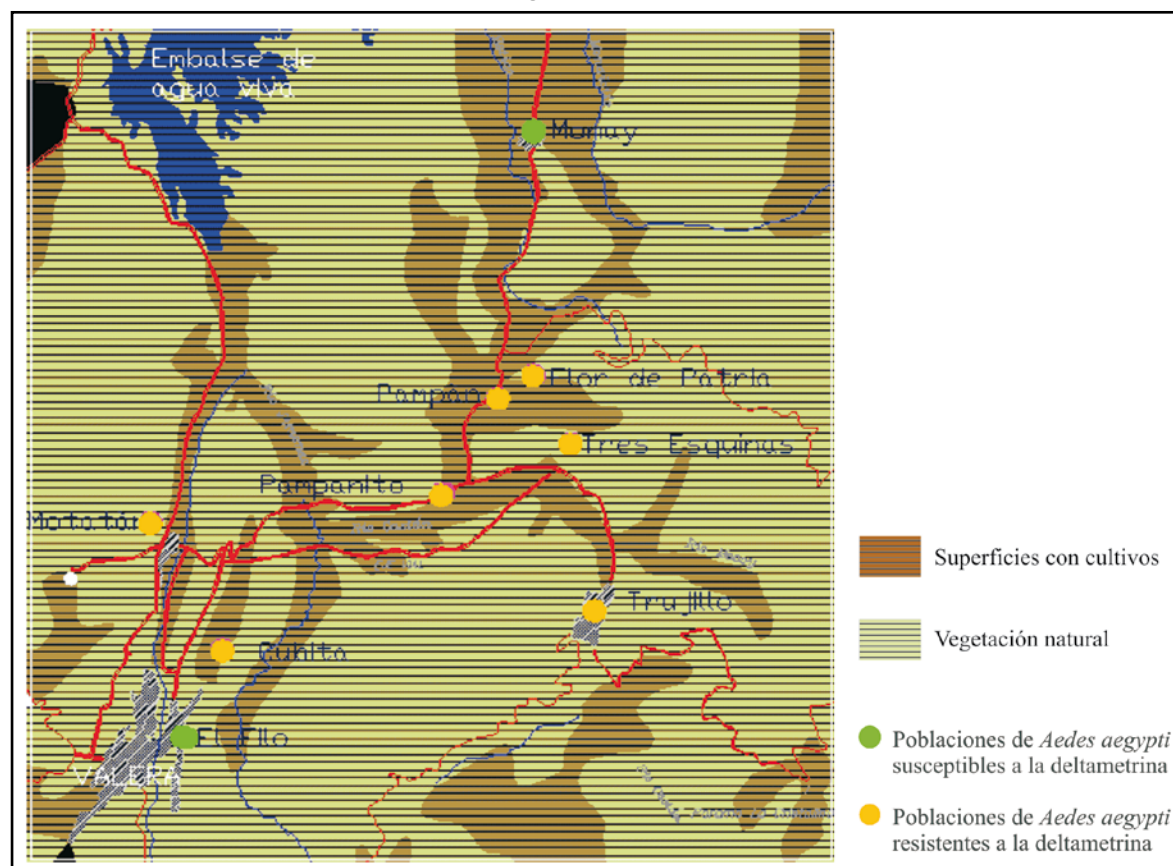
Población	No. de Hembras Expuestas	Mortalidad	Categoría
Trujillo	236	96%	Resistencia Verificable
Tres Esquinas	241	97%	Resistencia Verificable
Monay	260	99%	Susceptible
Flor de Patria	240	94%	Resistencia Verificable
Pampan	180	89%	Resistencia Verificable
Pampanito	200	96%	Resistencia Verificable
Motatán	190	96%	Resistencia Verificable
Filo	242	98%	Susceptible
Cubita	226	89%	Resistente Verificable
Rockfeller	300	100%	Susceptible

Tabla III. Tiempo “Knockdown” (KDT_{50} y KDT_{95}) en poblaciones de *Aedes aegypti* del estado Trujillo con el insecticida Deltametrina 0,05%.

Población	KDT_{50} (IC)	KDT_{95} (IC)	b(+/-DS)
Trujillo	15,7 min (15,2 – 16,1)	22,6 min (21,5 – 22,9)	5,6 (0,56)
Tres Esquinas	23,6 min (23,0 – 24,3)	36,5 min (34,9 – 38,4)	8,7 (0,39)
Monay	15,5 min (14,9 – 16,1)	29,2 min (23,9 – 27,3)	6,0 (0,35)
Flor de Patria	16,6 min (16,0 – 17,3)	33,6 min (33,6 – 36,2)	5,4 (0,26)
Pampan	16,5 min (15,5 – 17,4)	37,5 min (34,4 – 41,4)	4,6 (0,28)
Pampanito	18,2 min (17,4 – 18,9)	38,5 min (36,0 – 41,6)	5,0 (0,23)
Motatan	15,2 min (14,1 – 16,3)	31,2 min (28,4 – 37,6)	5,1 (0,47)
Filo	20,2 min (19,6 – 20,8)	33,1 min (31,5 – 35,1)	7,7 (0,35)
Cubita	24,1 min (23,4 – 24,9)	41,5 min (39,3 – 44,2)	7,0 (0,32)
Rockefeller	15,7 min (15,1- 16,3)	29,6 min (27,7 – 32,0)	6,1 (0,28)

b: Pendiente de la recta de regresión IC: Intervalo de Confianza 95%.

Fig. 1. Distribución georeferenciada de las nueve poblaciones de *Aedes aegypti* monitoreadas con deltametrina al 0,05% en áreas de actividad agrícola.



Fuente: SHT (1996) Plan Maestro de Desarrollo Hidráulico, Agrícola, Agroindustrial y de Manejo de la Cuenca del Río Motatán

En la Tabla III se aprecian los valores de los Tiempo de Knock down 50 y 95 (KDT_{50} y KDT_{95}) y pendientes de las rectas de regresión probit-log para las poblaciones estudiadas. Ligera incongruencia fue encontrada entre los valores de KDT y mortalidad en la población de Motatán, ya que altos valores de KDT indicarían evolución hacia la resistencia, por lo que se esperaría que estos fueran mas altos en las poblaciones resistentes bajo verificación que en las susceptibles, lo que pudiera deberse al rango estrecho entre la susceptibilidad y la baja resistencia encontrada.

Al analizar las pendientes de las rectas de regresión observamos altos valores (mayores o iguales a 6) en las poblaciones susceptibles Rockefeller, Filo y Monay y en las resistentes Tres Esquinas y Cubita indicando un comportamiento homogéneo frente al piretroide evaluado y bajos valores en Trujillo, Flor de Patria, Motatan, Pampan y Pampanito como indicador de heterogeneidad a la respuesta a la deltametrina en estas poblaciones.

DISCUSIÓN

En Venezuela, el estado Trujillo región del occidente, ha sido una de las entidades federales endémicas para protozoosis (Malaria, Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas) y arbovirosis como dengue en sus manifestaciones clásicas y hemorrágicas, por lo que las poblaciones vectoras de estas metaxenias fueron fuertemente presionadas con los diferentes grupos de insecticidas que conformaban los programas de control nacional. Es así como tan tempranamente en la década de los setenta fue reportada una población de *Rhodnius prolixus* resistente al organoclorado Dieldrin (Nocerino, 1976) y recientemente poblaciones larvales de *A. aegypti* resistentes al temephos (Álvarez et al., 2006). Bajo estas premisas y la alta casuística reportada para dengue en los 2 últimos años se planteó la necesidad de contar con alternativas para el control de estas poblaciones, conduciéndonos a determinar los niveles de susceptibilidad a la deltametrina, insecticida actualmente utilizado en Venezuela para el control de poblaciones adultas de *A. aegypti*.

De las nueve poblaciones de *A. aegypti* evaluadas, siete fueron categorizadas como poblaciones resistentes las cuales deben ser verificadas con bioensayos periódicos y estudios in vivo e in vitro de los mecanismos de resistencia, tales como presencia del gen Kdr, responsable de la resistencia cruzada a

DDT y piretroides, y niveles elevados de las enzimas glutatión-s-transferasas y oxidasas de función múltiple que intervienen en la resistencia a estos mismos grupos de insecticidas en *A. aegypti* (Bisset et al., 2001; Bisset, 2002). Una posible explicación a estos hallazgos pudiera ser el hecho de que aunque estas poblaciones no han sido fuertemente presionadas con piretroides, el uso masivo y prolongado en el pasado de organoclorados, principalmente DDT, en la lucha antimalarica, haya seleccionado genes de resistencia presentes para ambos grupos de insecticidas en estas poblaciones aledañas y la aplicación masiva y continua de organofosforados para el control de este vector y plagas agrícolas.

Tal como se muestra en el mapa de distribución geográfica de las poblaciones, estas se encuentran en zonas de producción agrícola del estado Trujillo, pero los municipios de mayor producción agrícola (rubros piña, caña de azúcar y otros frutales) son Pampán y Monay, por lo que los productores utilizan masivamente organofosforados; que si bien no han sido reportados poblaciones resistentes en estas localidades a estos insecticidas, Rodríguez et al. (2003) sostienen que la presión con los mismos pueden generar resistencia a otros grupo de insecticidas, específicamente a los piretroides, principalmente a la deltametrina, insecticida evaluado en este estudio.

En relación a las otras poblaciones evaluadas que resultaron ser resistentes (Pampanito y Flor de Patria) donde la actividad agrícola es menor, geográficamente están próximas a la población de Pampán sin barreras orográficas de tipo relieve, lo cual permitiría el intercambio genético entre ellas, similar a lo que como estaría ocurriendo entre las poblaciones Trujillo y Tres esquinas.

Basándonos en estudios previos realizados de Mazzari & Georghiou (1995), quienes encuentran moderada resistencia en poblaciones adultos de *A. aegypti* de Venezuela a piretroides como permetrina y lambdacialotrina, los resultados encontrados en el presente estudio deben ser considerados a la hora de realizar aplicaciones espaciales de deltametrina para el control de *A. aegypti* en las localidades Tres Esquinas, Flor de Patria, Monay, Pampam, Pampanito y Cubita del estado Trujillo.

Finalmente recomendamos analizar la susceptibilidad de este vector a otros insecticidas para

contar con una alternativa para su control y mantener bajo vigilancia en el terreno las poblaciones de las diferentes localidades del estado Trujillo, en especial aquellas zonas de mayor interés entomológico y sanitario.

Different susceptibility to deltamethrin in *Aedes aegypti* populations from Trujillo state, Venezuela

SUMMARY

Dengue is an important public health problem in Venezuela, where *Aedes aegypti* is the main vector. The purpose of this study was to determine the status of susceptibility to deltamethrin in nine natural populations of *A. aegypti* from Trujillo state compared with the susceptible Rockefeller strain. Bioassays were carried out following the methodology of the World Health Organization. The values of mortalities were found between 89% and 97%, allowing categorize the populations from Trujillo, Pampan, Pampanito, Flor de Patria, Motatan, Tres Esquinas and Cubita as resistant under verification, with values KDT_{50} between 15.7 min and 24.1 min, suggesting the possibility of resistance which must be confirmed and the populations from Monay and Filo as susceptible, with a KDT_{50} of 15.5 and 20.2 min, respectively, and 99 and 98% mortality at 24 hours. These results should be considered when designing programs for vector control to ensure those are effective to control *A. aegypti* populations.

Keywords: *Aedes aegypti*, susceptibility, deltametrina, Trujillo.

REFERENCIAS

- Abbott W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Eco. Entomol.* **18**: 265- 7.
- Álvarez L., Briceño A. & Oviedo M. (2006). Resistencia al temephos en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del occidente de Venezuela. *Rev. Col. Entomol.* **32**: 172- 175.
- Bisset J., Rodríguez M., Molina D., Díaz C. & Soca A. (2001). Esterasas elevadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Aedes aegypti*. *Rev. Cub. Med. Trop.* **53**: 37-47.
- Bisset J. A. (2002). Uso correcto de los insecticidas: Control de la resistencia. *Rev. Cub. Med. Trop.* **54**: 202-219.
- Georghiou G. P., Wirth H., Tran H., Saume F. & Knudsen A. B. (1987). Potential for organophosphate resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Caribbean area and neighboring countries. *J. Med. Entomol.* **24**: 290-294.
- Mazzarri M. B. & Georghiou G. P. (1995). Characterization of resistance to organophosphate, carbamate and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J. Am. Mosq. Con. Assoc.* **11**: 315-322.
- MPPS (2007). Boletín Epidemiológico No. 52 Venezuela.
- Mouchet J. (1967). La resistance aux insecticides chez *Aedes aegypti* et les espèces voisines. *Bull. W.H.O.* **36**: 569-577.
- Mulla, M. 1994. Mosquito Control then, now, and in the future. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* **10**: 574-584.
- Nocerino F. (1976). Susceptibilidad de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculate* a los insecticidas en Venezuela. *Bol. Dir. Mal.* **16**: 276-283.
- Pérez E. E. & Fernandez M. D. (2001). Resistance of *Aedes aegypti* to pyretroides in municipalities of Aragua state, Venezuela. In Clark, G.; Quiroz, M. H. Mosquito Control and Biology in Latin America An Eleventh Symposium. *J. Am. Mos. Con. Assoc.* **17**: 166-180.
- Quaterman K. D., Schoof H. F. (1958). The status of insecticide resistance in arthropods of public health importance in 1956. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **7**: 74-83.
- Raymond M. (1985). Presentation d' un programme d'analyse log-probit pour microordinateur cahiers Orstrom série Entomologie médicale et Parasitologie. **23**: 117-121.
- Rodríguez M. M., Bisset J. A., Díaz C., Soca L. A. (2003). Resistencia cruzada a piretroides en *Aedes aegypti* de Cuba inducido por la selección con el insecticida organofosforado malation. *Rev. Cub. Med. Trop.* **55**: 105-111.

WHO (1981). *Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides*. Unpublished document. WHO/VBC. 81.807. 6 p.

WHO (1998). *Test Procedures of Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vectors, Bio-Efficacy and Persistence of Insecticides on Treated Surfaces*. Unpublished document. WHO/CDC/MAL/98.12.

Recibido el 09/05/2008
Aceptado el 26/09/2008

Fluctuaciones estacionales y temporales de la densidad larvaria de *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) y familias de insectos asociados al hábitat en El Granzón, Parroquia San Isidro, municipio Sifontes del estado Bolívar, Venezuela

Jesús Berti-Moser^{1*}, Julio González-Rivas¹ & Edith Navarro²

Anopheles darlingi Root ha sido considerado en condiciones naturales como el principal vector de la malaria humana en América del sur y también en Venezuela, principalmente en los estados Bolívar y Amazonas, donde se produce el 90% de la malaria del país. Durante un mes (Junio de 1999) se realizaron muestreos en criaderos de mosquitos en siete localidades del área minera de San Isidro municipio Sifontes, estado Bolívar. Los sitios de muestreo fueron clasificados a priori en cuatro tipos de hábitat larvario: quebradas, lagunas, ríos, pantanos (herbáceo o arbóreo). En cada criadero se tomaron 30 muestras con un cucharón para coleccionar larvas de *Anopheles*. Simultáneamente al muestreo de larvas se midieron cuatro variables físico-químicas del criadero: pH, oxígeno disuelto, temperatura y profundidad del criadero. Asimismo, en un criadero de *An. darlingi* (quebrada con sombra), ubicado en la localidad de El Granzón, se llevó a cabo un estudio longitudinal, durante un año entre Julio de 1999 y Junio del 2000. En dicho criadero, se coleccionaron mensualmente larvas de *An. darlingi* e insectos acuáticos asociados. Las correlaciones entre la precipitación acumulada, la abundancia de estos insectos y la abundancia de larvas de *An. darlingi*, se establecieron mediante el análisis no paramétrico de correlación de Spearman (Spearman rank correlation). En el hábitat seleccionado, los resultados del análisis revelaron la presencia de una correlación negativa y significativa entre la abundancia de larvas de *An. darlingi* y la precipitación acumulada el mes anterior a la colecta. En esa misma localidad, la precipitación acumulada el mes anterior a la colecta, se correlacionó positivamente con la abundancia de la familia Naucoridae (Hemiptera). Asimismo, la abundancia de larvas de *An. darlingi* presentó una correlación negativa y significativa con la abundancia de la familia Naucoridae. En este hábitat (quebrada del Granzón), la densidad de larvas *An. darlingi* fue mayor en los meses de menor precipitación, aunque tanto en la época de menor precipitación como en la temporada lluviosa, hubo presencia de larvas de esta especie. Por otro lado, el criadero típico de *An. darlingi*, donde éste presentó su mayor abundancia y hubo presencia de larvas durante todo el año, fue clasificado como "Quebrada con sombra". Esta presentó mucha sombra (90-100%), abundante materia orgánica sumergida o flotante (hojarasca, palitos, hojas, semillas), profundidad promedio de 65,22 cm, un pH promedio de 6,16, contenido medio de oxígeno disuelto de 6,40 g/L y una temperatura promedio del agua de 26°C.

Palabras clave: Fluctuaciones estacionales, *Anopheles*, insectos acuáticos, larvas, hábitat, factores físicoquímicos, Malaria, Bolívar, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

En el continente americano desde la década del 90, se registró una alarmante incremento de la

malaria; desde 1974, la enfermedad aumentó durante 20 años con un registro que pasó de 270.000 casos en 1974 a más de 1.2 millones en 1991, aunque mostró una ligera disminución en 1993 a unos 983.536 casos; sin embargo, éstos igualmente se concentraron en los mismos países y regiones afectadas desde 1974 (OPS, 1994). Brasil registró casi la mitad (48%) de los casos de América; los países andinos (Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela) registraron el 32%; y Centro América, México y el Caribe, 17%. La mayor concentración de casos se ubica generalmente

¹ Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon", Ministerio del Poder Popular para la Salud. Centro de Investigación en Enfermedades Endémicas. Laboratorio Entomológico de Malaria, Av. Las Delicias. Maracay-Venezuela.

² Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Doctorado en Ciencias. Postgrado de Entomología. Maracay, estado Aragua - Venezuela.

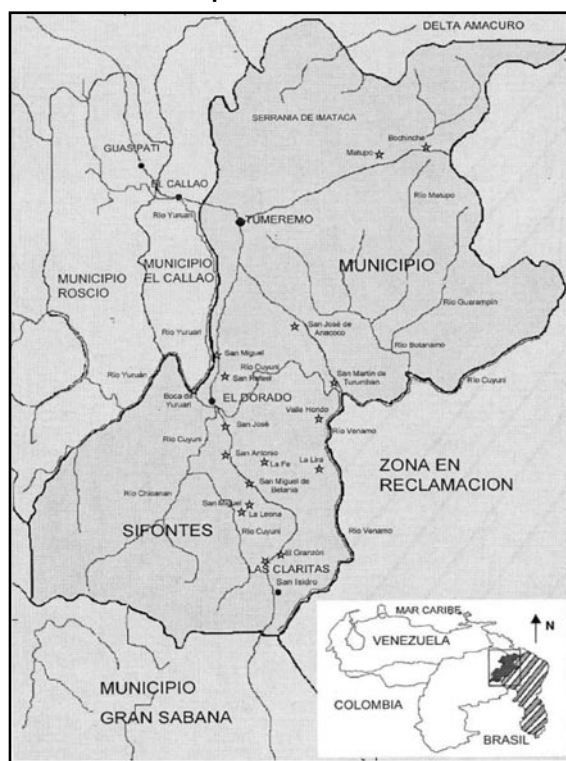
*Autor de correspondencia: jbertimoser@yahoo.com

en la cuenca del Amazonas, donde en 1991 se registró un total de 627.894 casos y un porcentaje de más del 80% de todos los casos de *Plasmodium falciparum* del continente (OMS, 1992). En la década del 2000 la situación es muy similar a la década pasada. En Venezuela, entre 1995 y 2002 solamente el estado Bolívar, produjo un promedio anual de 8.370 casos de malaria [Dirección de Salud Ambiental del Estado Bolívar (DSAEB), 1995-2002]. En el periodo 2003-2007, la casuística anual de malaria en ese estado se incrementó a 25.569 casos, cerrando el último año con 29.420. La mayor parte de estos casos se originaron en el municipio Sifontes, que para el primer periodo señalado promedió 2.918 casos por año y para el último quinquenio 12.527, cerrando en el año 2007 con 13.548 casos, un 46,1% de la malaria del estado Bolívar. (DSAEB, 2007). Actualmente los estados mas afectados, según reporte de la “Semana Epidemiológica 20” del año 2008 (MPPS. Dirección General de Salud Ambiental, 2008), siguen siendo Bolívar y Amazonas, ambos reportaron el 90% de la casuística nacional (Bolívar 72% y Amazonas 18% respectivamente). Según este reporte, los municipios con mayor IPA son: Sifontes (Bolívar, n=136), Sucre (Bolívar, n=104), Cedeño (Bolívar , n=70) y Atabapo (Amazonas, n=25).

La especie *Anopheles (Nyssorynchus) darlingi* Root, es el principal vector de la malaria en la región Neotropical, siendo el responsable del 80% de los casos que ocurren en América (OPS, 1994). Esta especie tiene una amplia distribución geográfica encontrándose en el Sur de México, Belice, Guatemala, el Salvador y Honduras. En Suramérica se distribuye desde el sur de Venezuela hasta el Norte de Argentina (Forattini, 1962). Este mosquito también es considerado como el principal vector en la cuenca amazónica (Zimmerman, 1992; Lounibos & Conn, 2000; Moreno *et al.*, 2002) y también en el foco meridional de malaria en Venezuela, el cual abarca los estados Bolívar y Amazonas, que producen cerca del 84% de la malaria del país (Aché, 1998; Moreno *et al.*, 2000; Magris *et al.*, 2007). En el estado Bolívar, el municipio Sifontes (6° 00' y 7° 54' N; 60° 44' y 61° 39' O) representa el área de mayor incidencia de malaria del estado. En los últimos cinco años esta enfermedad se ha incrementado notablemente en el mismo estado, cerrando el último año con 29.420 casos. La mayor parte de estos casos se originaron en el municipio Sifontes. En este municipio persisten focos de malaria en zonas mineras, caracterizadas por la inestabilidad

de las poblaciones humanas, la precariedad de las viviendas y la exposición permanente a la picada de los mosquitos, lo que eleva el riesgo de contraer la enfermedad. Este municipio abarca una superficie de 24.392 km², con una población de aproximadamente 70.000 habitantes; el mismo limita al norte con el estado Delta Amacuro, al este con Guyana (Zona en Reclamación), al oeste con los municipios El Callao y Roscio y al sur con el municipio Gran Sabana (Fig. 1). La actividad económica principal es la minería, basada en extracción de oro por métodos artesanales o rudimentarios. Desde el punto de vista operativo y de acuerdo a la morbilidad de malaria y su distribución geográfica dentro del municipio, el Servicio de Endemias Rurales de la Dirección de Salud Ambiental del Estado Bolívar (Demarcación de Tumeremo), tiene dividida el área en tres focos: Tumeremo, El Dorado y San Isidro. El foco de Tumeremo incluye los criaderos y localidades ubicados en los alrededores de la capital del municipio (Tumeremo) y el área de Bochínche (Fig. 1). Esta última es un área poco poblada, habitada principalmente por indígenas de la etnia Kariña. Es una zona bastante húmeda, caracterizada por la presencia de grandes bosques primarios y extensos

Fig. 1. Ubicación geográfica del área de estudio y límites del municipio Sifontes del estado Bolívar.



humedales irrigados por el río Botanamo (Fig. 1). El foco El Dorado comprende los criaderos localizados en: El Dorado capital, San Antonio, San Martín de Turunbán, San Miguel, La California, La Leona, El León, Arenales, Valle Hondo, La Fe, La Lira, Boca del Yuruarí, La Trinidad, San Rafael y Río Cuyuní arriba. En esta zona los criaderos están muy relacionados con los ríos Cuyuní, Yuruán, Chicanán y Yuruarí (Fig. 1). El foco “San Isidro” situado al sur del municipio, representa el área de mayor incidencia de todo el municipio y muchas veces del estado Bolívar. En cuanto a humedales, esta zona comprende muchos criaderos naturales influenciados por la quebrada La Amarilla y el río Las Claritas; asimismo existen poblaciones humanas ubicadas en las localidades de Ciudad Dorada, San Isidro (Km 88), Las Malocas, Las Claritas, Tierra Blanca, Las Manacas, El Granzón y Araimatepuy (Fig. 1), todas estas localizadas muy cerca o a lo largo de la carretera troncal 10; además está “Puerto Beco” zona minera muy deforestada, situada en el interior de la selva pluvial, al este de la antigua localidad de “Las Claritas Adentro” (Fig. 1).

En el estado Amazonas, según estudios entomológicos realizados en Ocamo (municipio Alto Orinoco), *An. darlingi* fue la especie mas predominante y con mayor preferencia hematofágica hacia el hombre, con claro comportamiento endofágico y un pico de máxima actividad de picada entre media noche y el amanecer (Magris *et al.*, 2007). En la misma localidad (Ocamo, Alto Orinoco), la incidencia mensual de malaria y el promedio de hembras de *An. darlingi* capturado mensualmente, presentaron una correlación positiva estadísticamente significativa (Magris *et al.*, 2007). Por otro lado, estudios de criaderos realizados en el mismo municipio Alto Orinoco (Rejmánková *et al.*, 1999; Rubio-Palis *et al.*, 2005), demostraron que *An. darlingi* presenta una mayor abundancia larvaria entre julio y octubre; lo cual posiblemente tenga relación con el máximo nivel del río Orinoco, factor muy asociado con la aparición del hábitat de sus larvas, es decir, nuevos criaderos creados cada año al desbordarse el río (Rejmánková *et al.*, 1999, Rubio-Palis *et al.*, 2005). Según estos autores, la correlación entre la precipitación mensual y la densidad de larvas de *An. darlingi* no fue estadísticamente significativa. Esta especie mostró una marcada estacionalidad desapareciendo entre abril y mayo; siendo más abundante entre julio y octubre. La misma presentó el pico de mayor abundancia larvaria en el mes de

septiembre, justamente dos meses después del pico de máxima lluvia (Rubio-Palis *et al.*, 2005; Rejmánková *et al.*, 1999). En un área minera del estado Bolívar (municipio Sifontes), se encontró *An. darlingi* tanto en las lagunas como en cortes de minas de oro (Moreno *et al.*, 2000). En ese estudio *An. darlingi* se presentó a muy bajas densidades en lagunas, quebradas y ríos; pero con mayor abundancia en pozos y cortes de minas (Moreno *et al.*, 2000).

Según Savaje *et al.* (1990), la vegetación del criadero es un factor determinante para la presencia o ausencia de larvas de *Anopheles albimanus* y *Anopheles pseudopunctipennis* de la zona litoral de México. En Venezuela, se señalan factores fisico-químicos del criadero como determinantes para la ocurrencia de *An. pseudopunctipennis* y *Anopheles aquasalis* de la región costera del estado Sucre (Berti *et al.*, 1993; Berti *et al.*, 2004; Grillet *et al.*, 1998), mientras que en los ríos de Belice, se señala la presencia de larvas de la especie *An. darlingi* asociada a acumulaciones de detritus (Rejmánková *et al.*, 2000).

Por lo anteriormente expuesto y dada la importancia que tienen los estudios ecológicos del hábitat larvario de *An. darlingi*, se realizó el presente trabajo en la región minera del municipio Sifontes, con el fin de determinar la influencia de algunos factores ambientales, en la presencia de *An. darlingi* y sus criaderos, así como en la distribución y abundancia de sus larvas. Este estudio permitirá actualizar la información ecológica de *An. darlingi*, contribuyendo a una mejor estratificación de las áreas de riesgo a malaria en la zona; además servirá de base para la realización de futuras actividades de investigación; así como para la implementación de estrategias que permitan la reducción de la población del vector. En ese sentido, se plantearon los siguientes objetivos: 1) Describir el hábitat larvario de *An. darlingi* en función de algunas de sus características fisico-estructurales (ubicación, forma, tamaño, profundidad, sombra presente, etc.), fisicoquímicas (pH, oxígeno disuelto, temperatura del agua, turbidez, etc.) y bióticas (vegetación e insectos acuáticos asociados al criadero); 2) Caracterizar la ocurrencia (presencia o ausencia) y la abundancia temporal o estacional de larvas de *An. darlingi* en El Granzón; y 3) Identificar algunos factores ambientales locales (del hábitat) como la temperatura del agua y la precipitación, asociados con la distribución espacio-temporal de las larvas de *An. darlingi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y descripción del hábitat larvario

En un estudio exploratorio de un mes (del 02 al 29 de junio de 1999), se inspeccionaron los principales criaderos ubicados en aquellas áreas definidas como humedales de las localidades de San Isidro, Las Malocas, Las Claritas, Tierra Blanca, Puerto Beco, Las Manacas, El Granzón y San Miguel de Betania, todas ubicadas en el área del foco "San Isidro". El área de "San Isidro" fue seleccionada como zona de muestreo para la ejecución del estudio transversal de distribución espacial, y El Granzón para realizar el estudio longitudinal de distribución temporal de larvas de *An. darlingi* (Fig. 1); ya que estudios previos (Berti *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 2000), señalan la presencia de esta especie en quebradas y lagunas de dicha localidad. El hábitat larvario seleccionado para el estudio longitudinal sobre larvas de *An. darlingi* fue clasificado como del tipo "Quebrada con sombra"; situada aproximadamente a 200m del caserío El Granzón (6° 12' N, 61° 21' O). El área corresponde a la zona de vida catalogada como Bosque Húmedo Tropical (Ewel *et al.*, 1968), constituido principalmente por una exuberante vegetación caracterizada por la gran altura que alcanzan las especies dominantes, generalmente árboles altos y con presencia de epifitas (especialmente bromeliáceas), vegetación muy diversa típica de las selvas húmedas tropicales (Ewel *et al.*, 1968). El clima de la zona está caracterizado por una alta precipitación mensual, que varía entre 158,6 mm y 395 mm, con un promedio anual acumulado de 3.047,6 mm; la temperatura media anual varía entre 25,6°C y 31,5°C. En el caso del área de la localidad El Granzón, la pluviosidad mensual durante el período de estudio (12 meses) fluctuó entre la máxima de 325,8 mm y la mínima de 38,3 mm.

Diseño del estudio y metodología de colecta de muestras de larvas e insectos acuáticos asociados.

El diseño de estudio fue mediante dos esquemas de muestreo: 1) El estudio exploratorio y transversal (durante cuatro semanas por criadero) aplicado durante un mes, para determinar la abundancia relativa (larvas/30 cucharones) y espacial (entre criaderos); y 2) El estudio longitudinal de 12 meses, para determinar la abundancia relativa (larvas/30 cucharones) estacional y temporal durante un año, con muestreos cada mes en un solo tipo de criadero

(Quebrada) en El Granzón, a fin de comparar la abundancia relativa de *An. darlingi* entre meses y entre estaciones del año.

En cada criadero (estudio exploratorio y transversal), se tomaran al menos 30 muestras de agua (entre 90 y 100 en criaderos muy extensos), para determinar la abundancia relativa de larvas (larvas/muestra) utilizando cucharones de 1 L. de capacidad; estas muestras fueron tomadas en las márgenes de cada criadero. Adicionalmente se registraron las siguientes variables: Tipo de criadero, Temporalidad (permanente, estacional o temporal), Exposición al sol (sombra total, parcial o ninguna), Extensión del criadero (m², km²), Profundidad, Tipo de vegetación (emergente, flotante o sumergida), Oxígeno disuelto, Temperatura y pH del agua.

El criadero estudiado (Quebrada con sombra total) fue visitado y muestreado mensualmente durante el lapso de 12 meses (entre julio de 1999 y junio de 2000). Durante el estudio longitudinal (El Granzón), cada mes se tomaron 30 muestras de agua para determinar la abundancia relativa de larvas (larvas/muestra), utilizando cucharones de 1L. de capacidad; todas las muestras fueron tomadas en las márgenes del criadero. El muestreo se realizó entre las 7:30 y las 13:30 horas. En este periodo de tiempo, se procedió a colectar larvas e insectos acuáticos asociados al criadero. Simultáneamente con estas colectas mensuales, se tomaron muestras del agua a fin de determinar algunas variables físico-químicas, tales como: temperatura, pH y oxígeno disuelto; así como también se registró: profundidad, iluminación (sombra total, parcial o ninguna) y materia orgánica presente.

Las larvas de *Anopheles* colectadas fueron introducidas en viales y se trasladaron al laboratorio, donde después de la identificación fueron contadas y separadas por estadios. Todas las larvas de *An. darlingi* (del primer al cuarto instar) fueron identificadas después de ser fijadas en solución AGA; esto es posible debido a que esta especie es de muy fácil identificación a partir del primer instar larvario. Las larvas de IV instar de las otras especies fueron preservadas en solución AGA, para su posterior identificación mediante claves taxonómicas de Navarro (1996) o desarrolladas hasta la fase de pupa. Las pupas fueron mantenidas en agua del criadero, transportadas vivas al laboratorio y desarrolladas hasta la emergencia

del adulto para su identificación mediante claves taxonómicas de hembras de *Anopheles* (Rubio-Palis, 2000). Las muestras fueron cuantificadas por especie e instar larvario a fin de obtener los respectivos índices de densidad: índice larvario por especie e índice larvario total de *Anopheles*. Todas las variables mencionadas fueron determinadas cada mes en forma simultánea al muestreo larvario. Igualmente se procedió con el muestreo de invertebrados acuáticos, los cuales fueron colectados por medio de redes especiales. Tanto los insectos acuáticos como los copépodos fueron enviados a especialistas de la UCV, Universidad del Zulia y Universidad de Oriente para su respectiva identificación.

RESULTADOS

Según los resultados del estudio exploratorio, la especie de mayor frecuencia y abundancia fue *An. triannulatus*, la misma se presentó en todos los criaderos y localidades estudiadas, excepto en el Río Las Claritas; su mayor frecuencia y abundancia se observó sobre todo en sitios expuestos a pleno sol, como las quebradas de Puerto Beco y San Isidro (Tablas I y II), donde fue muy abundante. *An. triannulatus* fue un poco menos abundante en pantanos (Tierra Blanca) y quebradas con sombra total o parcial (El Granzón y Tierra Blanca). Asimismo, pudo observarse con frecuencia, la presencia de larvas de *An. triannulatus*

Tabla I. Número de individuos por cada especie de *Anopheles* colectada y frecuencia de aparición de las mismas, según el tipo de hábitat larvario en las localidades inspeccionadas del foco "San Isidro" en el municipio Sifontes, estado Bolívar. Del 2 al 29 de junio de 1999. Estudio preliminar o exploratorio.

LOCALIDAD/ TIPO HABITAT	<i>Anopheles darlingi</i>	<i>Anopheles triannulatus</i>	<i>Anopheles argyritarsis</i>	<i>Chagasia bathana</i>	<i>Anopheles eiseni</i>
SAN MIGUEL DE BETANIA QUEBRADA		3 (0,16)		45 (0,75)	
EL GRANZÓN LAGUNA *	38 (0,83)	10 (0,33)		20 (0,66)	
EL GRANZÓN QUEBRADA *	151 (1,00)	96 (1,00)		91 (0,75)	2 (0,08)
TIERRA BLANCA P. ARBÓREO		89 (0,58)		1 (0,08)	1 (0,08)
TIERRA BLANCA QUEBRADA	2 (0,08)	44 (0,33)	1 (0,08)	85 (0,50)	3 (0,08)
TIERRA BLANCA P. HERBÁCEO **		82 (0,75)		13 (0,16)	
LAS MANACAS LAGUNA	8 (0,50)	19 (0,75)	2 (0,13)		
LAS MANACAS QUEBRADA *	14 (0,42)	9 (0,25)		70 (0,83)	1 (0,08)
LAS MALOCAS Río "Las Claritas"				39 (0,92)	35 (0,25)
PUERTO BECO LAGUNA **	2 (0,08)	27 (0,33)		8 (0,08)	
PUERTO BECO QUEBRADA	6 (0,42)	18 (0,83)		1 (0,08)	
PUERTO BECO QUEBRADA **	6 (0,42)	136 (0,83)		10 (0,33)	
SAN ISIDRO QUEBRADA **	6 (0,36)	174 (0,82)		1 (0,09)	

Frecuencia de aparición por criadero (entre paréntesis)

Sin asterisco = sombra parcial; *Con mucha sombra (casi total); **Sin sombra (a pleno sol).

Las Manacas-Laguna = 8 muestras (2/semana)

Resto de habitats = 12 muestras (3/semana)

Tabla II. Valores de pH, temperatura, oxígeno disuelto, profundidad del agua y porcentaje de sombra, según el tipo de hábitat larvario en las localidades visitadas del foco "San Isidro" en el municipio Sifontes, estado Bolívar. Del 2 al 29 de junio de 1999. Estudio preliminar o exploratorio.

LOCALIDAD/ TIPO HABITAT	pH	OXÍGENO DI- SUELTO (g/L)	TEMPERATURA (°C)	PROFUNDIDAD (cm)	SOMBRA (%)
SAN MIGUEL DE BETANIA QUEBRADA	6,23 (6,0 - 7,0)	7,66 (6,2 - 8,4)	25,07 (24,0 - 26,0)	81,66 (40 - 110)	PARCIAL (30 - 60)
EL GRANZÓN LAGUNA *	6,15 (6,0 - 6,5)	5,70 (4,0 - 7,6)	26,57 (24,0 - 28,0)	76,57 (45 - 130)	TOTAL (90 - 100)
EL GRANZÓN QUEBRADA *	6,16 (6,0 - 6,5)	6,40 (5,0 - 8,0)	26,21 (24,0 - 29,0)	65,22 (35 - 110)	TOTAL (90 - 100)
TIERRA BLANCA P. ARBÓREO	5,50 (5,0 - 6,0)	4,77 (2,0 - 8,4)	27,30 (25,0 - 31,0)	64,16 (50 - 90)	PARCIAL (30 - 60)
TIERRA BLANCA QUEBRADA	6,04 (5,5 - 6,5)	5,83 (4,2 - 7,6)	24,92 (24,0 - 26,0)	61,66 (40 - 110)	PARCIAL (30 - 60)
TIERRA BLANCA HERBÁCEO **	5,69 (5,5 - 6,5)	6,60 (4,2 - 10,0)	29,85 (28,0 - 32,0)	38,33 (25 - 55)	NINGUNA
LAS MANACAS LAGUNA	5,85 (5,5 - 6,0)	9,17 (6,2 - 11,8)	27,13 (25,0 - 29,0)	60,00 (30 - 70)	PARCIAL (30 - 60)
LAS MANACAS QUEBRADA *	5,92 (5,0 - 6,5)	5,45 (4,4 - 6,4)	26,20 (24,0 - 28,0)	71,78 (40 - 140)	TOTAL (90 - 100)
LAS MALOCAS Río Las Claritas	6,25 (5,5 - 6,5)	7,30 (5,2 - 9,6)	24,92 (23,0 - 26,0)	84,16 (50 - 120)	PARCIAL (30 - 60)
PUERTO BECO LAGUNA **	6,38 (6,0 - 6,5)	6,64 (5,0 - 8,2)	30,50 (27,0 - 34,0)	72,91 (45 - 160)	NINGUNA
PUERTO BECO QUEBRADA	5,96 (5,5 - 6,5)	5,57 (3,6 - 7,0)	30,00 (27,0 - 35,0)	69,16 (45 - 110)	PARCIAL (30 - 60)
PUERTO BECO QUEBRADA **	6,04 (5,5 - 6,5)	7,28 (4,6 - 8,8)	30,92 (27,0 - 34,0)	48,33 (30 - 70)	NINGUNA
SAN ISIDRO QUEBRADA **	5,88 (5,5 - 6,0)	5,88 (1,4 - 10,4)	27,66 (25,0 - 30,0)	59,54 (25 - 90)	NINGUNA

Rango de valores físico-químicos (entre paréntesis).

Las manacas-laguna = 8 muestras (2/semana). Resto de habitats = 12 muestras (3/semana)

Sin asterisco = sombra parcial. *Con mucha sombra (casi total). **Sin sombra (a pleno sol).

junto con las de *An. darlingi*, salvo en los pantanos de Tierra Blanca, donde esta última nunca fue colectada. No obstante, en sitios expuestos a pleno sol (Puerto Beco y San Isidro), la abundancia de *An. triannulatus* siempre fue mucho mayor que la de *An. darlingi* (Tablas I y II).

Por su parte, *An. darlingi* fue más frecuente y abundante en las quebradas y lagunas con sombra total, particularmente del Granzón y Las Manacas; la misma también está presente en otras quebradas (Puerto Beco y San Isidro) y en otras lagunas (Puerto Beco y Las Manacas), pero siempre con una menor frecuencia que *An. triannulatus*. Sin embargo, durante el estudio exploratorio *An. darlingi* fue la especie de

mayor abundancia, tanto en el hábitat tipo laguna (El Granzón), como en la quebrada con sombra del Granzón (Tabla I). Por otro lado, aunque en general la especie *An. darlingi* fue menos abundante que *An. triannulatus*, ésta se presentó con mayor frecuencia que en estudios anteriores, principalmente en la localidad del Granzón, donde durante el estudio exploratorio fueron colectadas 189 larvas (Laguna = 38 y quebrada = 151) (Tabla I).

En todas las quebradas (con sombra parcial o total) y en el río Las Claritas también hubo presencia de *Chagasia bathana* y ocasionalmente de *Anopheles eiseni*, aunque esta solo fue abundante en río Las Claritas. Por el contrario, *Ch. bathana* fue bastante abundante en quebradas con sombra parcial o total (Tablas I y II).

En la Tabla II, se presentan resultados sobre algunas de las variables físicas y químicas que se midieron “in situ” en cada uno de los criaderos visitados durante el estudio exploratorio. Al respecto, *An. darlingi* fue colectado en sitios con caracteres físico-químicos similares (quebradas, excepto en San Miguel de Betania y lagunas), siendo mas abundante en aquellas con sombra; la misma no esta presente ni en pantanos (Tierra Blanca) ni en el río Las Claritas, los cuales tienen caracteres físico-químicos diferentes a las lagunas y quebradas señaladas. En el caso de *An. triannulatus*, la especie se presenta en la mayoría de los criaderos estudiados, solo no estuvo presente en el río Las Claritas y fue muy abundante en quebradas (a pleno sol o sombreadas) y en pantanos (sombreados o a pleno sol). Por su parte, *An. eiseni* solo fue colectado ocasionalmente en sitios con sombra (río Las Claritas y quebradas con sombra) y fue mas abundante en el río Las Claritas (Sombra parcial). En un manantial muy sombreado (Las Manacas) y con abundancia de helechos, fueron colectadas tres larvas de la especie *Anopheles thomasi* Shannon, la cual es de muy rara ocurrencia en el estado Bolívar (Berti *et al.*, 1998).

El criadero típico de *An. darlingi*, donde presentó su mayor abundancia y hubo presencia de larvas durante todo el año, fue clasificado como del tipo “Quebrada con sombra”. La misma está situada aproximadamente a 200 m. del caserío El Granzón. El sitio presenta mucha sombra (Casi total: 90-100%), caudal de poca corriente (época de menor pluviosidad), abundante materia orgánica sumergida o flotante (hojarasca, palitos, hojas, semillas) a orillas del criadero, profundidad promedio de 65,22 cm (35 - 110 cm), pH promedio de 6,16 (6,0 - 6,5), contenido medio de oxígeno disuelto de 6,40 g/L (5,0 - 8,0 g/L) y temperatura promedio del agua de 26°C, con rango entre 24 y 29°C (Tabla II).

En cuanto al inventario de insectos asociados, hasta el presente se dispone de las listas preliminares de familias y géneros de Coleópteros y Hemípteros, la mayoría de los cuales tienen hábitos de depredación. Una vez identificados todos los ejemplares colectados, se establecerán colecciones y listas de referencia por estado, municipio, parroquia, localidades, tipo de hábitat y especie de *Anopheles* con la cual estén asociados. Estos resultados se publicarán posteriormente.

Fluctuación estacional de la densidad relativa de larvas de An. darlingi e insectos asociados.

Los resultados del estudio longitudinal de 12 meses pueden observarse en la Fig. 2; según los mismos, *An. darlingi* fue más abundante en los meses de menor pluviosidad, particularmente febrero y mayo del año 2000 (Febrero = 43 larvas/muestra y mayo = 45 larvas/muestra) y fue menos abundante de julio a noviembre del año 1999 (Rango entre 8 y 12 larvas/muestra), justamente cuando la pluviosidad fue mayor (Fig. 2). No obstante, la especie está presente durante todo el año en el hábitat, incluso en la época cuando aumentó considerablemente la precipitación (Fig. 2). Este resultado es muy importante, ya que en anteriores estudios realizados en la misma región, nunca fue posible observar densidades larvárias similares, debido a la ausencia total o la continua baja densidad de la especie en muchas localidades investigadas. En las Fig. 3, 4 y 5, pueden observarse las fluctuaciones de la densidad relativa de las familias de insectos (Coleoptera, Hemiptera y Odonata) asociados al hábitat de la especie. Al respecto, se encontró una correlación negativa y significativa ($R = -0,644$; $P < 0,023$) entre la abundancia de *An. darlingi* y la de la familia Naucoridae del orden Hemiptera (Tabla III) y asimismo con la abundancia de la familia Aeshnidae ($R = -0,483$; $P < 0,102$) del orden Odonata (Tabla III). El resto de pares de variables probadas presentaron correlaciones que no fueron estadísticamente significativas (Tabla III, $P > 0,1123$). Por otro lado, la variable precipitación acumulada en el mes anterior a cada fecha de colecta, también presentó una correlación negativa y significativa ($R = -0,523$; $P < 0,081$) con la abundancia mensual de larvas de *An. darlingi* (Tabla IV); asimismo esta variable presentó una correlación positiva y altamente significativa ($R = 0,732$; $P < 0,0068$) con la abundancia de la familia Naucoridae (Tabla IV). El resto de pares de variables probadas presentaron correlaciones que no fueron estadísticamente significativas (Tabla IV, $P > 0,1139$). En anteriores investigaciones realizadas en la misma región del estado Bolívar, nunca fueron colectados los insectos asociados al hábitat de *An. darlingi* o al hábitat de otras especies de *Anopheles* (Berti *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 2000), es decir, que en relación a este aspecto no existen antecedentes. Tampoco existen registros previos, en relación a estudios similares realizados en el estado Amazonas; por lo que para ambos estados, se carece de antecedentes que permitan enriquecer la discusión de los resultados.

Fig. 2. Densidad mensual de larvas de *An. darlingi* colectadas entre Julio de 1999 y Junio de 2000 en El Granzón y precipitación acumulada el mes anterior.

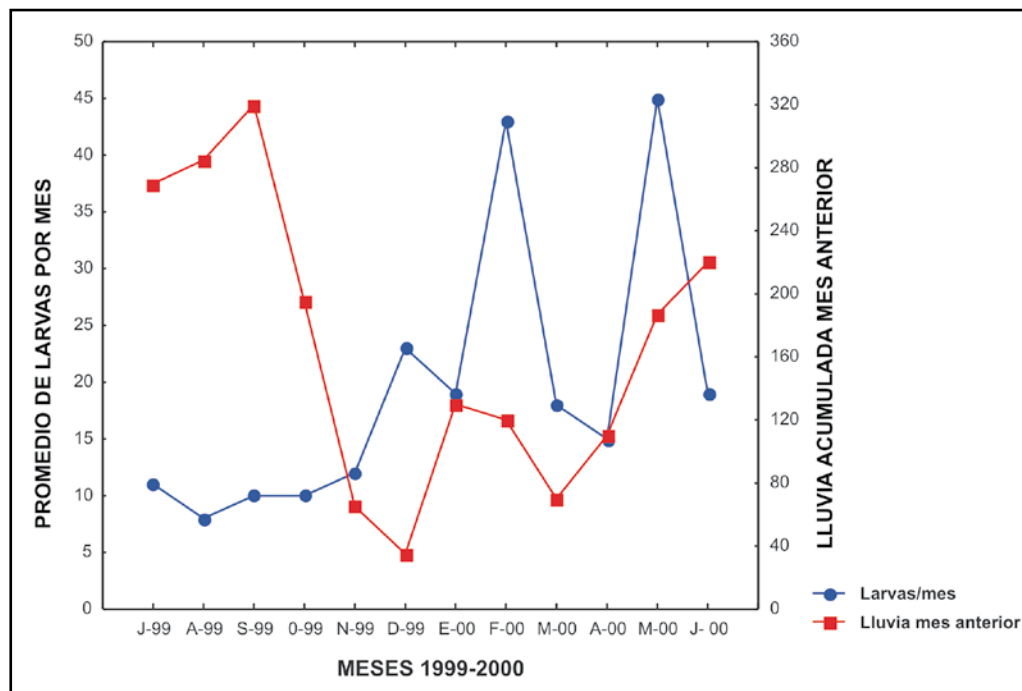


Fig. 3. Densidad mensual de ejemplares de las familias del orden Hemiptera, colectadas entre Julio de 1999 y Junio de 2000 en El Granzón.

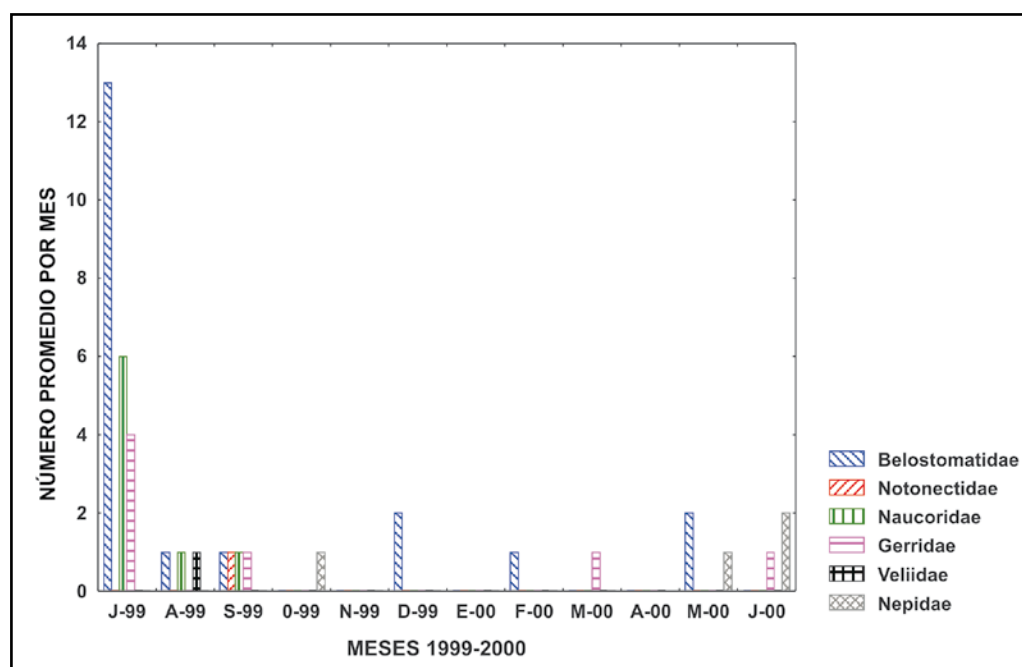


Fig. 4. Densidad mensual de ejemplares de las familias de Coleoptera, colectadas entre Julio de 1999 y Junio de 2000 en El Granzón.

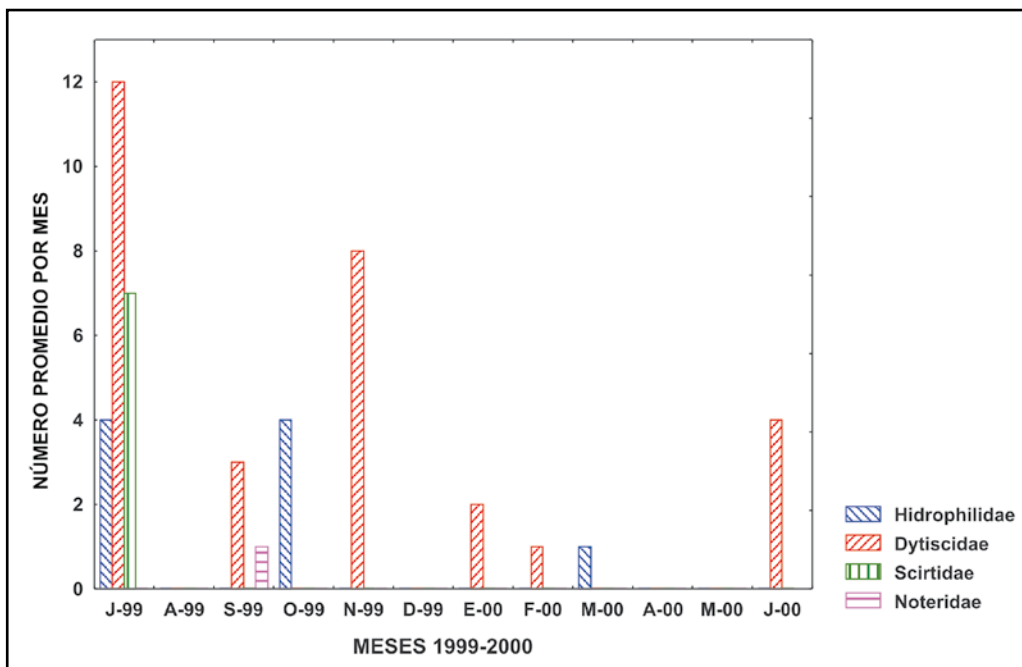


Fig. 5. Densidad mensual de ejemplares de las familias de Odonata, colectadas entre Julio de 1999 y Junio de 2000 en El Granzón.

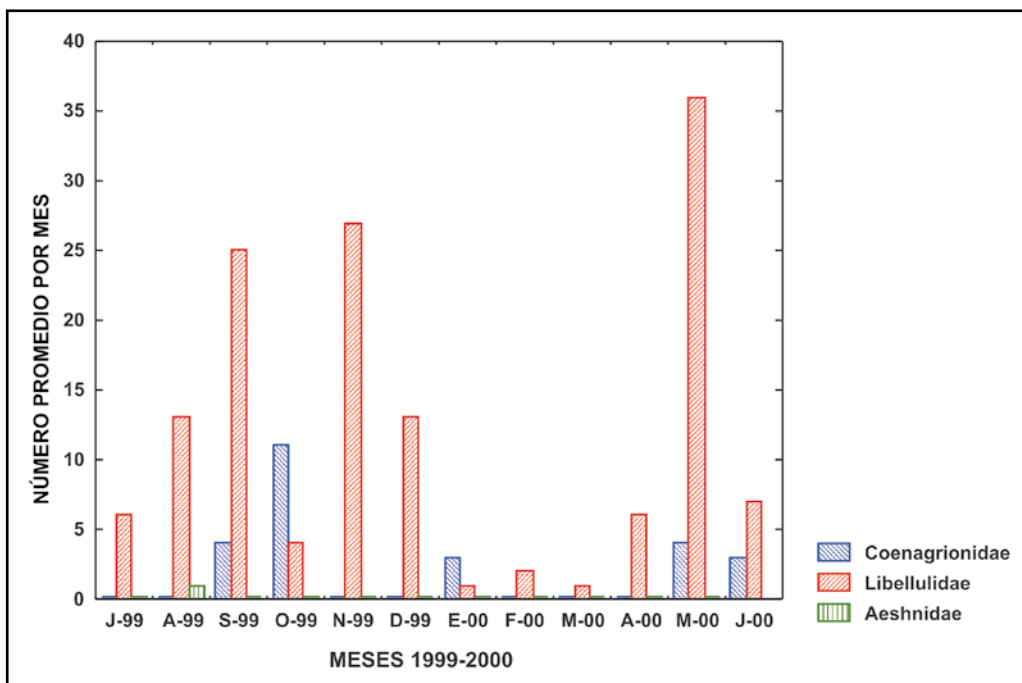


Tabla III. Valores del Coeficiente R (Spearman) según resultados de correlación entre la abundancia mensual de *An. darlingi* y la abundancia mensual de familias de Coleoptera (Noteridae, Hydrophilidae), Hemiptera (Naucoridae, Notonectidae, Veliidae) y Odonata (Aeshnidae) en El Granzón, estado Bolívar entre julio de 1999 y junio del 2000.

Pares de variables	Coeficiente R *	t (N-2) **	p-nivel
Densidad de larvas de <i>An. darlingi</i> y densidad de Naucoridae	- 0,644 *	-2,665	< 0,0237 *
Densidad de larvas de <i>An. darlingi</i> y densidad de Aeshnidae	- 0,483 *	-1,739	< 0,1025 *
Densidad de larvas de <i>An. darlingi</i> y densidad de Veliidae	- 0,482	-1,739	> 0,1123 NS
Densidad de larvas de <i>An. darlingi</i> y densidad de Hydrophilidae	- 0,367	-1,428	> 0,2402 NS
Densidad de larvas de <i>An. darlingi</i> y densidad de Notonectidae	- 0,350	- 1,184	> 0,2640 NS
Densidad de larvas de <i>An. darlingi</i> y densidad de Noteridae	- 0,350	- 1,184	> 0,2640 NS

*R de Spearman (con prueba T estadísticamente significativa).

**N = 12 meses, entre julio de 1999 y junio del 2000.

(NS) = El resto de pares de variables probadas presentaron valores de la prueba T de ninguna significación estadística ($p > 0,1123$).

Tabla IV. Valores del Coeficiente R (Spearman) según resultados de correlación entre la precipitación mensual, la abundancia mensual de *An. darlingi* y la abundancia mensual de familias de Coleoptera (Scirtidae y Noteridae), Hemiptera (Naucoridae, Notonectidae, Gerridae, Veliidae, Nepidae) y Odonata (Aeshnidae, Coenagrionidae, Libellulidae) en el Granzón, estado Bolívar entre julio de 1999 y junio del 2000.

Pares de variables	Coeficiente R *	t (N-2) **	p-nivel
Lluvia por mes anterior y densidad de <i>An. darlingi</i>	- 0,523 *	-1,939	< 0,0812 *
Lluvia por mes anterior y densidad de Naucoridae	0,732 *	3,397	< 0,0068 *
Lluvia por mes anterior y densidad de Noteridae	0,480	1,732	> 0,1139 NS
Lluvia por mes anterior y densidad de Notonectidae	0,480	1,732	> 0,1139 NS
Lluvia por mes anterior y densidad de Coenagrionidae	0,469	1,684	> 0,1232 NS
Lluvia por mes anterior densidad de Gerridae	0,428	1,500	> 0,1644 NS
Lluvia por mes anterior y densidad de Veliidae	0,393	1,351	> 0,2063 NS
Lluvia por mes anterior y densidad de Aeshnidae	0,393	1,351	> 0,2062 NS
Lluvia por mes anterior y densidad de Scirtidae	0,306	1,005	> 0,3339 NS
Lluvia por mes anterior y densidad de Nepidae	0,262	0,898	> 0,4099 NS
Lluvia por mes anterior y densidad de Libellulidae	0,151	0,484	> 0,6391 NS

* R de Spearman (con prueba T estadísticamente significativa).

** N = 12 meses, entre julio de 1999 y junio del 2000.

(NS) = El resto de pares de variables probadas presentaron valores de la prueba T de ninguna significación estadística ($p > 0,1139$), es decir, que estas tampoco fueron significativas.

DISCUSIÓN

La especie de mayor frecuencia y abundancia del estudio exploratorio fue *An. triannulatus* (Tabla I), lo que coincide con resultados anteriormente publicados (Berti *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 2000); la misma se presentó en todos los criaderos y localidades estudiadas, excepto en el Río Las Claritas; su mayor frecuencia y abundancia se observó sobre todo en sitios expuestos a pleno sol, como las quebradas de Puerto Beco y San Isidro. Por su parte, *An. darlingi* fue más frecuente y abundante en quebradas con sombra, muy especialmente en la quebrada del Granzón (Tabla I), resultado que difiere de estudios anteriores (Berti *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 2000; Rubio-Palis *et al.*, 2005). Sin embargo, esta especie también se localizó pero con menor abundancia en otros criaderos como las lagunas con sombra total o parcial, especialmente en El Granzón y Las Manacas (Tabla I). En el área del Alto Orinoco (estado Amazonas), se identificaron cuatro tipos de criaderos principales: lagunas, pozos, caños y charcas (Rejmánková *et al.*, 1999; Rubio-Palis *et al.*, 2005). Las lagunas, resultaron el hábitat más favorable para el desarrollo de diversas especies de *Anopheles* (Rejmánková *et al.*, 1999; Rubio-Palis *et al.*, 2005). Hay varias razones de porque las lagunas proveen un hábitat favorable para los estadios inmaduros de *Anopheles*, siendo la principal de ellas, la presencia de abundante vegetación flotante y/o emergente que proporciona refugios adecuados a las larvas y las protege de la depredación (Rejmánková *et al.*, 1999; Rubio-Palis *et al.*, 2005). Según estos autores, *An. darlingi* fue colectada en mayor proporción en el hábitat tipo laguna, pero también se colectó en otros tipos de criaderos como pozos y charcas, ubicados en lugares de poca profundidad, y siempre con sombra parcial y abundante detritus (palitos, hojas, semillas) (Rejmánková *et al.*, 1999; Rubio-Palis *et al.*, 2005). Lo antes expuesto concuerda con Fleming (1986) y Rozendaal (1990), quienes manifiestan que las larvas de *An. darlingi* ocupan una gran diversidad de criaderos, pero siempre en agua dulce, no contaminada y con sombra parcial, es decir, protegidas de los rayos directos del sol al menos durante gran parte del día.

Según Rejmánková *et al.* (1999) y Rubio-Palis *et al.* (2005), en el área del Alto Orinoco, la correlación entre la precipitación mensual y la densidad de larvas de *An. darlingi* no fue estadísticamente significativa, resultado que no coincide con el nuestro, ya que aquí se encontró correlación negativa y significativa entre estas dos variables (Tabla IV y Fig. 2). En

el Alto Orinoco, esta especie mostró una marcada estacionalidad desapareciendo entre los meses de abril y mayo; siendo más abundante entre julio y octubre (Rubio-Palis *et al.*, 2005). Esta presentó el pico de mayor abundancia larvaria en el mes de septiembre, justamente dos meses después del pico de máxima lluvia (Rubio-Palis *et al.*, 2005). Estos resultados también contrastan con los del presente estudio, ya que la mayor abundancia de larvas de *An. darlingi* en la quebrada de El Granzón, se encontró en el período de menor pluviosidad, particularmente entre enero y mayo; con picos de máxima abundancia de larvas en los meses de febrero y mayo (Fig. 2). En un área minera del estado Bolívar se encontró *An. darlingi* en lagunas, quebradas y ríos, pero a muy bajas densidades y la especie se presentó con mayor abundancia en pozos y cortes de minas (Moreno *et al.*, 2000), lo cual también contrasta con los resultados del presente estudio, ya que la mayor ocurrencia y abundancia de la especie fue en las quebradas con sombra (Tabla I).

En Surinam, Rozendaal (1990) coincide con nosotros en relación al pH del hábitat de *An. darlingi* (pH entre 6 y 7) y la temperatura promedio del agua de 26°C (Tabla II); asimismo, este autor señala como principales tipos de criaderos de la especie a los siguientes: 1) Las quebradas muy sombreadas dentro de la selva pluvial; 2) Las orillas de ríos usualmente sombreadas y con vegetación flotante (*Eichornia*, *Salvinia*, *Pistia*) y desechos naturales (hojarasca y detritus); y 3) Las charcas y pozos formados por desbordamiento de ríos, las cuales generalmente son sombreadas, debido a su cercanía con el mismo. Este autor asegura que en caso de que dichos pozos estén expuestos a pleno sol, no es posible colectar larvas de *An. darlingi*, señalando que sus larvas solamente fueron colectadas en aquellos sitios total o parcialmente sombreados (Rozendaal, 1990). En nuestro caso, si logramos colectar pocas larvas de la especie en sitios expuestos a pleno sol o parcialmente sombreados, como fueron las quebradas y la laguna de Puerto Beco y la laguna de Las Manacas.

Seasonal and temporal fluctuations of larval densities of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) and insects associated to the habitat in San Isidro Parish, Sifontes municipality, Bolívar state, Venezuela

SUMMARY

Anopheles darlingi Root has been considered under natural conditions as human malaria's principal

vector in South America. In Venezuela, Amazonas and Bolívar States, it is responsible for 90 % of malaria cases reported in the country. Field surveys and mosquito larvae sampling of mosquito breeding sites in mining areas, were carried out in seven localities of Sifontes county, Bolívar state during one month, between 2 and 29 June 1999. The breeding sites were *a priori* classified into four larval habitat categories: lagoons, streams, rivers and herbaceous swamps. At each breeding site, 30 dips for mosquito larvae samples were made. Simultaneously with mosquito larvae sampling, four selected variables of water were measured: temperature, dissolved oxygen, pH and water depth. On the other hand, a longitudinal study was carried out in the typical *An. darlingi* breeding site (shaded streams) in El Granzón (Sifontes county). Field surveys of mosquito larvae and aquatic insects were carried out in the same breeding site over a one-year period (July, 1999 to June, 2000). At this breeding site, *Anopheles* larvae and aquatic insects were collected monthly. During the study, 12 samples were taken from this larval habitat of *An. darlingi*. Seasonal and temporal variations of *An. darlingi* larvae and aquatic insects were determined. Relationships among the rain in the previous month, abundance of aquatic insects and abundance of *An. darlingi* larvae, were investigated using the Spearman nonparametric test (Spearman rank correlation). Results of the analysis revealed that the abundance of *An. darlingi* mosquito larvae was negatively correlated with the rainfall in the previous month. On the other hand, the results indicate that the abundance of *An. darlingi* larvae was negatively correlated with the abundance of the family Naucoridae (Hemiptera), and this family was positively correlated with the rainfall in the previous month. The typical *An. darlingi* larval habitat was classified into the category "streams shaded". This streams were very shaded (90-100%), with a water depth of 65.22 cm, with abundant floating organic debris (dry foliage, leaves, trash, small stick), a pH of 6.16, dissolved oxygen of 6.40 g/L, and a water temperature of 26°C.

Key words: Seasonal variations, *Anopheles*, larvae, habitat, aquatic insects, physical-chemical factors, Malaria, Bolívar state, Venezuela.

REFERENCIAS

- Aché A. (1998). Situación actual de la malaria en Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **38**: 68-72.
- Berti J., Zimmerman R. & Amarista J. (1993). Spatial and temporal distribution of anopheline larvae in two malarious areas in Sucre state, Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **88**: 353-362.
- Berti J., Gutiérrez A. & Zimmerman. (2004). Relaciones entre tipos de hábitat, algunas variables químicas y la presencia de larvas de *Anopheles aquasalis* Curry y *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald en un área costera del estado Sucre, Venezuela. *Entomotropica.* **19**: 79-84.
- DSAEB(2002).ServiciodeVigilanciaEpidemiológica. Registros de la Oficina de Actividades Médicas (1980-2002). Ciudad Bolívar, Venezuela.
- DSAEB(2007).ServiciodeVigilanciaEpidemiológica. Registros de la Oficina de Actividades Médicas. Ciudad Bolívar Venezuela.
- Ewel J., Madriz A. & Tosi, J. (1968). *Zonas de vida de Venezuela*. Caracas: Ediciones del Fondo Nacional de. Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura y Cría. 265 pp.
- Fleming G. (1986). *Biología y Ecología de los vectores de la malaria en América*. Organización Panamericana de Salud. Oficina Sanitaria Panamericana, Washington, 54 pp.
- Forattini P. (1962). *Entomología Médica. I. Parte Gral: Díptera, Anophelini*. Faculdade de Higiene e Saúde Pública. São Paulo, 662 pp.
- Grillet M. E., Montañez H. & Berti J. (1998). Estudio Biosistemático y Ecológico sobre *Anopheles aquasalis* y sus implicaciones para el control de la malaria en el estado Sucre, Venezuela. II. Ecología de sus criaderos. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **38**: 38-46.
- Lounibos L. P. & Conn J. E. (2000). Malaria Vector Heterogeneity in South America. *Amer. Entomol.* **46**: 238-249.
- Magris M., Rubio-Palis Y., Menare C. & Villegas L. (2007). Vector bionomics and malaria transmission in the Upper Orinoco River, Southern Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **102**: 303-311.

- Moreno J., Rubio-Palis Y., & Acevedo P. (2000). Identificación de criaderos de anofelinos en un área endémica a malaria del estado Bolívar, Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **40**: 21-30.
- Moreno J., Rubio-Palis Y., Pérez E., Sánchez V. & Páez E. (2002). Evaluación de tres métodos de captura de anofelinos en un área endémica a malaria del estado Bolívar, Venezuela. *Entomotropica*. **17**: 157-165.
- MPPS (2008). Reporte epidemiológico semanal. Dirección General de Salud Ambiental. Semana Epidemiológica 20. Mayo 2008. Caracas, Venezuela. 26 pp.
- OPS (1994). XXIV Conferencia Sanitaria Panamericana. *Situación de los Programas de Malaria en las Américas*. Informe XLII. Washington CSP24/INF/2.
- OMS (1992). Conferencia ministerial sobre paludismo. *Informe de la Reunión Interregional sobre el Paludismo en las Américas, Brasilia*. Doc OMS CTD/MCM/IM/92.3.
- Rejmánková E., Rubio-Palis Y., & Villegas L. (1999). Larval habits of anopheline mosquitoes in the Upper Orinoco, Venezuela. *J. Vector Ecol.* **24**: 130-137.
- Rejmánková E., Harbin-Ireland A. & Lege M. (2000). Bacterial abundance in larval habitats of four species of *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Belize, Central America. *J. Vector Ecol.* **25**: 229-239..
- Rozendaal J. A. (1990). *Epidemiology and control of malaria in Suriname*. Edit. ICG Printing B.V. Dordrecht. 172 pp.
- Rubio-Palis Y. (2000). *Anopheles (Nyssorhynchus) de Venezuela: Taxonomía, Bionomía, Ecología e importancia médica*. Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental-Proyecto Control de Enfermedades Endémicas. Banco Mundial-MSDS. Maracay, Venezuela. 120 pp.
- 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.
- Savage H., Rejmánková E., Arredondo-Jimenez J., Roberts D. & Rodriguez M. (1990). Limnological and botanical characterization of larval habitats for two malarial vectors, *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis*, in coastal areas of Chiapas State, Mexico. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* **6**: 612-620.
- Zimmerman R. H. (1992). Ecology of malaria vectors in the Americas and future and direction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **87**: 371-383.

Recibido el 12/06/2008
Aceptado el 19/09/2008

Revista de revistas

□ ALVAR J., YACTAYO S. & BERN C. (2006). **Leishmaniasis and poverty.** (*Leishmaniasis y pobreza*). *Trends Parasitol.* **22**: 552-557.

Communicable Diseases, Neglected Tropical Diseases Control, World Health Organization, 20 Ave Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland. alvarj@who.int

La leishmaniasis, una enfermedad tropical desatendida, tiene fuertes y complejos vínculos con la pobreza. El peso de la leishmaniasis cae de manera desproporcionada sobre los sectores más pobres de la población global. Dentro de las áreas endémicas el riesgo creciente de infección es mediado a través de pobres condiciones de vivienda y pobres condiciones sanitarias ambientales, la falta de medidas de protección personal y la migración y empleo que, por problemas económicos, llevan hospedadores no inmunes en contacto con flebótomos infectados. La pobreza está asociada con nutrición pobre y con otras enfermedades infecciosas, las cuales aumentan el riesgo que una persona (una vez infectada) desarrolle la enfermedad clínicamente manifiesta. La falta de acceso a los centros asistenciales de salud causa demoras en el diagnóstico apropiado y en el tratamiento y acentúa la morbilidad y la mortalidad de la leishmaniasis, particularmente en las mujeres. El diagnóstico y el tratamiento de la leishmaniasis son costosos y las familias deben vender activos y tomar préstamos para pagar para curarse, llevando a ulterior empobrecimiento y a reforzar el círculo vicioso enfermedad-pobreza. La inversión pública en el tratamiento y control disminuiría el peso de la enfermedad y ayudaría a aliviar la pobreza.

□ COURA J. R. (2007). **Chagas disease: what is known and what is needed - A background article.** (*Enfermedad de Chagas: que se conoce y que se necesita- un artículo sobre los antecedentes*). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **102 (Suppl. 1)**: 113-22.

Laboratório de Doenças Parasitárias, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, 21045-900, Brasil. coura@ioc.fiocruz.br

La Enfermedad de Chagas apareció hace millones de años como una enfermedad zoonótica de animales selváticos y empezó a ser transmitida al hombre accidentalmente en forma de una antropozoonosis

cuando el hombre invadió los ecotopos silvestres. La Enfermedad de Chagas endémica se estableció como una zoonosis en los últimos 200-300 años a través de la deforestación para agricultura y cría de ganado y la adaptación de triatominos a los ambientes domésticos y al hombre y animales domésticos como fuentes de alimento. Se estima que 15 a 16 millones de personas están infectadas con *Trypanosoma cruzi* en Latinoamérica y que 75 a 90 millones están expuestos a la infección. Cuando *T. cruzi* es transmitido al hombre a través de las heces de los triatominos, en el sitio de la picada o a través de la mucosa, a través de transfusión sanguínea u oralmente a través de alimento contaminado, éste invade la circulación general y el sistema linfático y se establece en el músculo y tejido cardíaco, el sistema digestivo y las células fagocíticas. Causa lesiones inflamatorias y respuestas inmunes mediadas particularmente por CD4+, CD8+, interleukin-2 (IL) and IL-4, con destrucción de células y neuronas y destrucción de las neuronas y fibrosis y lleva al bloqueo de la conducción del sistema cardíaco, arritmia, insuficiencia cardíaca, peristalsis, y dilatación de vísceras profundas particularmente el esófago y el colon. *T. cruzi* puede también ser transmitido de la madre al hijo a través de la placenta y a través del canal del nacimiento, causando por lo tanto aborto, nacimientos prematuros y lesiones orgánicas en el feto. En individuos inmunosuprimidos la infección a *T. cruzi* podría reactivarse y dispersarse como una enfermedad severa causando miocarditis difusa y lesiones al sistema nervioso central. La Enfermedad de Chagas es caracterizada por una fase aguda con o sin síntomas y con signos de puntos de entradas (chagoma de inoculación o signo de Romana), fiebre, adenomegalia, hepatoesplenomegalia y parasitemia evidente y una fase crónica indeterminada (asintomática, con resultados normales de electrocardiograma y rayos X del corazón, esófago y colon) o con forma cardíaca, digestiva o cardíaco-digestiva. Hay gran variación regional en la morbilidad debida a la enfermedad de Chagas y las formas graves cardíacas o digestivas pueden ocurrir en 10 a 50% de los casos o las formas indeterminadas en los otros casos asintomáticos, pero con serología positiva. Varios casos agudos han sido reportados de la región amazónica, la mayoría por *T. cruzi* I, Z3 y un híbrido Z1/Z3. Concluimos este artículo presentando las diez necesidades más importantes de la Enfermedad de Chagas en el futuro próximo.

□ HAGEL I., CABRERA M., HURTADO M. A., SANCHEZ P., PUCCIO F., DI PRISCO M. C. & PALENQUE M. (2007). **Infection by *Ascaris lumbricoides* and bronchial hyper reactivity: an outstanding association in Venezuelan school children from endemic area.** (*Infección por *Ascaris lumbricoides* y asma bronquial: una asociación importante en niños venezolanos en áreas endémicas*). *Acta Trop.* **103**: 231-41

Institute of Biomedicine, Faculty of Medicine, Central University of Venezuela, Caracas, Venezuela. isabelhagel@yahoo.com

El asma y otras enfermedades respiratorias han aumentado en los últimos años entre los niños venezolanos de áreas endémicas a helmintiasis donde la infección por *Ascaris lumbricoides* ha sido asociada a la inflamación de vías bronquiales en los individuos parasitados. El objetivo del presente trabajo fue investigar las posibles asociaciones entre el desarrollo de hiper-reactividad bronquial y la respuesta inmune a *A. lumbricoides* en niños de áreas urbanas y rurales. Evaluamos 470 escolares de comunidades rurales y urbanas. Variaciones significativas en las pruebas de función pulmonar así como un aumento >20% en la prueba de PC20 fueron considerados como un diagnóstico positivo de hiperreactividad pulmonar. La prevalencia y la intensidad de la infección de *A. lumbricoides* fue determinada por examen coprológico. Se midieron niveles específicos IgE usando una prueba modificada de ELISA y pruebas de reactividad cutánea frente a antígenos de *A. lumbricoides* y al alérgeno común *Dermatophagoides pteronyssinus*. El número de subpoblaciones de linfocitos circulantes fue determinado por análisis de citometría de flujo. En los niños de las comunidades rurales la hiper-reactividad fue asociada con niveles específicos de IgE anti- *A. lumbricoides* ($p < 0,0001$) y positividad a la reacción de piel para *A. lumbricoides* ($p < 0,0001$). En cambio, en niños de zonas urbanas, la hiper-reactividad fue asociada con elevados niveles de IgE anti-*D. pteronyssinus* ($p = 0,0089$) y a la hiperreactividad hacia el alérgeno aéreo piel ($p = 0,003$) así como a un aumento significativo en el número de CD3+CD8+ ($p < 0,0001$). Nuestros resultados sugieren que la respuesta IgE a la infección *A. lumbricoides* puede estar involucrada en el desarrollo de hiper-reactividad bronquial entre los niños de áreas rurales mientras que en el ambiente urbano en donde la mejoría en las condiciones higiénicas disminuyen la prevalencia de enfermedades parasitarias, la hiper-reactividad bronquial fue asociada a la respuesta inmune frente a aero- alérgenos.

□ INCANI R. N., CALEIRAS E., MARTÍN M. & GONZÁLEZ C. (2007). **Human infection by *Angiostrongylus costaricensis* in Venezuela: first report of a confirmed case.** (*Infección humana por *Angiostrongylus costaricensis* en Venezuela: primer reporte de un caso confirmado*). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **49**: 197-200.

Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela. rincani@uc.edu.ve

Se reporta por primera vez un caso humano de infección comprobada por *Angiostrongylus costaricensis* en Venezuela. El paciente fue una mujer de 57 años operada quirúrgicamente por signos de peritonitis con una masa palpable en la fosa iliaca derecha del abdomen. El conteo de leucocitos reportó 16.000 células/mm³, con 46% de eosinófilos. El aspecto tumoral del área ileocólica y la presencia de linfadenopatías peritoneales requirieron la resección de una amplia área del íleon terminal, el ciego, parte del colon ascendente y una pequeña parte del yeyuno, donde se encontró una pequeña lesión. La patología mostró áreas engrosadas de la pared intestinal con hemorragia y perforación del ciego. La histología mostró intensa infiltración eosinofílica de toda la pared intestinal, y granulomas con células gigantes y eosinófilos. Algunos de los granulomas circundaban huevos redondeados u ovals con contenido caracterizado por una amplia área vacía, células o embrión en el centro y a veces larvas de nemátodo. Dentro de una rama de la arteria mesentérica se observó un corte transversal de un nemátodo adulto. El área intestinal afectada, las características de las lesiones, la presencia de huevos en la submucosa con larvas de nemátodo en su interior y la observación de un nemátodo adulto dentro de una rama de la arteria mesentérica son suficientes criterios diagnósticos de una infección por *Angiostrongylus costaricensis*.

□ DE LIMA H., RODRÍGUEZ N., BARRIOS M.A., AVILA A., CAÑIZALES I. & GUTIÉRREZ S. (2008). **Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela** (*Aislamiento e identificación molecular de *Leishmania chagasi* de murciélago (*Carollia perspicillata*) en el noreste de Venezuela*). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **103**: 412-414.

Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. delimah@gmail.com

Este reporte describe el aislamiento de una cepa de *Leishmania chagasi* de un murciélago (*Carollia perspicillata*) y su identificación utilizando métodos biológicos y caracterización molecular. Los parásitos fueron aislados en un medio de cultivo artificial de una muestra de sangre extraída del corazón de un murciélago. El aislado fue inoculado en la almoadilla plantar de las patas de un ratón Balb/c, el cual subsecuentemente desarrolló una típica lesión nodular leishmánica: los parásitos fueron confirmados como *Leishmania* por frotis e histopatología. La caracterización molecular de los parásitos fue llevada a cabo con primers especie-específicos, patrones de restricción de kDNA y digestión por endonucleasa e hibridización con sondas específicas de kDNA. Este reporte demuestra que los murciélagos pueden ser hospedadores de *L. chagasi* y sugiere la necesidad de estudios para determinar si pueden estar involucrados en focos de leishmaniasis visceral.

Noticias

❑ VIII REUNIÓN DE LA COMISIÓN INTER-GUBERNAMENTAL (CI) DE LA INICIATIVA ANDINA DE CONTROL DE LA TRANSMISIÓN VECTORIAL Y TRANSFUSIONAL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS (IPA).

Organismos patrocinantes:

- OPS/OMS.
- Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI).
- Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), Venezuela.

Fecha: 1 - 3 de Julio 2008

Sede: Caracas, Venezuela

Con la participación de representantes de los Ministerios de Salud de Colombia, Perú, Ecuador y Venezuela, de personal del MPPS de Venezuela, Directores de Salud Ambiental y Epidemiólogos Regionales de los estados endémicos e investigadores nacionales e internacionales, se celebró en Caracas la VIII Reunión de la Iniciativa Andina para el Control de la Enfermedad de Chagas (IPA) presidida por la Dra. Glenda Velásquez, (Venezuela), el Dr. Mauricio Vera, Secretario (Colombia) y el Dr. Edison Vivas, Relator (Venezuela). Se analizaron el estado actual de los Programas de Control en los diferentes Países y nuevas situaciones epidemiológicas, de cuya discusión se generaron las siguientes Conclusiones y Acuerdos suscritos por los delegados.

Conclusiones y Acuerdos firmados:

1. Generar un consenso para la vigilancia en salud publica de la enfermedad de Chagas en la IPA. Se propone que sea el tema central en la próxima reunión IPA.

2. Los países de IPA adhieren al objetivo estratégico de alcanzar 100% de cobertura universal del tamizaje de sangre para Chagas en bancos de sangre para el año 2010 o mantenerla en el caso de ya haberlo logrado, programándose de forma coordinada entre los Programas Nacionales de Control de la Enfermedad de Chagas y los Servicios Nacionales de Sangre de cada país los esfuerzos necesarios para ello.
3. Fortalecer los esfuerzos tendientes a la calidad del tamizaje de sangre para Chagas en bancos de sangre de la Subregión, recurriendo al control de calidad externo, control de calidad de reactivos, capacitación de recursos humanos y atención de los infectados que se detecten en los afectores correspondientes, entre otras medidas pertinentes.
4. Expresar la preocupación y solicitar se genere un consenso que defina un algoritmo de acciones a seguir en relación a potenciales donantes con factores de riesgo de la enfermedad de Chagas en el interrogatorio previo.
5. Proporcionar un plan de trabajo regional que nos acerque al tamizaje universal de sangre en los 21 países endémicos de la Región y especialmente en los que conforman la Subregión Andina de Chagas (COL, ECU, PER, VEN), a través de la alianza estratégica e integración del trabajo entre los Programas Nacionales de Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas y los Servicios Nacionales de Sangre de los países endémicos de las Américas, con el apoyo y asesoría técnica de OPS-OMS.
6. Los países reportan a la Secretaría Técnica de OPS-OMS un inventario de medicamentos para la Enfermedad de Chagas, (Nifurtimox y Benznidazol), a fines de agosto de cada año.
7. Los países aportarán a la Secretaría Técnica de

- OPS-OMS, información de eventos adversos atribuibles a los medicamentos y participaran activamente en la elaboración del consenso para fármaco vigilancia con apoyo del proyecto BID Bien Publico Regional- Chagas y la red Global para la Eliminación de la Enfermedad de Chagas. Venezuela queda sujeto a la consulta que realizara a Cooperación Técnica Internacional MPPS.
8. Que cada país establezca el mecanismo de acuerdo a su normativa legal para el uso de los medicamentos para la enfermedad de Chagas, en su territorio. Esto es especialmente relevante para el nuevo Benznidazol (LAFEPE).
 9. Apoyar técnicamente a Colombia en el proceso que ha iniciado, en materia de priorización de la enfermedad de Chagas y su gestión, prevención y control integral, dentro de sus políticas de salud e impulsar por el Ministerio de Protección Social con el apoyo de OPS-OMS.
 10. Destacar el manejo de cooperación técnica que Ecuador ha formulado para estímulo de sus acciones de control de la enfermedad de Chagas, utilizando coyunturas internas y externas de disponibilidad de recursos, con el apoyo de OPS-OMS y CIDA Canadá, recomendándose la permanencia de los equipos técnicos capacitados en Chagas.
 11. Resaltar el abordaje planteado por Perú al control de la enfermedad de Chagas, así como los resultados obtenidos en el sur del país, con apoyo OPS-OMS y CIDA Canadá, estimulando el avance de los trabajos en el Norte.
 12. Destacar el desarrollo que Venezuela plantea para incrementar sus acciones de control, recurriendo a una estratificación de situaciones para marcar prioridades a ser abordadas.
 13. Considerando que los países miembros de IPA poseen diversidad epidemiológica en lo que a tripanosomiasis americana se refiere, su prevención y control requiere programas integrales e integrados, para lo cual demanda:
 - Estatificar mediante análisis de riesgo para polarizar intervenciones.
 - Implementar la estrategia de control integrado, mediante la participación comunitaria e intersectorial para garantizar la sostenibilidad de las acciones.
 - Generar supervisión y evaluación de las acciones efectuadas.
 14. Considerando la necesidad de capacitar recursos humanos, adoptar estándares de intervención en vigilancia y abordar problemas emergentes se propone para Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela:
 - Desarrollar un taller de Actualización y consolidación de metodologías en microscopia diagnóstica de Chagas para las redes diagnósticas con apoyo de AECI a realizarse en Quito – Ecuador en el mes de Octubre 2008.
 - Realizar un taller de revisión de la transmisión oral de Chagas, con apoyo de AECI a realizarse en Colombia en el mes de Noviembre 2008.
 15. Se propone un plan de misiones internacionales contando con el apoyo de OPS-OMS y AECI, que visiten los países en el segundo semestre de 2008, para brindar cooperación técnica de acuerdo a los términos de referencia y plan de trabajo que propongan los países:
 - Colombia: Julio 23 al 26 apoyo elaboración estrategia EGI Chagas y noviembre evaluaciones Casanare, Boyacá y norte de Santander.
 - Ecuador: 13 al 17 de Octubre, apoyo técnico en sistemas de información geográfica (SIG) geo-referenciación y manejo de equipos GPS.
 - Perú: Noviembre diseño e intervenciones en el área norte y amazónica.
 - Venezuela: transmisión oral de la enfermedad de Chagas, 22-26 Septiembre
 16. Se cuenta con apoyo y cronograma de acciones para el Proyecto TCC Perú- Ecuador en Enfermedad de Chagas, que iniciaría en septiembre 2008 en el área endémica limítrofe de ambos países, como aporte de información y conocimiento a las estrategias y planes de prevención y control.
 17. En referencia a metas andinas:
 - Establecer metas nacionales para el próximo decenio, que sea el soporte para la elaboración de la nueva resolución mundial para el control / eliminación de la enfermedad de Chagas con vista a ser presentada y aprobada en la Asamblea Mundial de la Salud 2009. Plazo máximo de entrega ala secretaria regional OPS hasta el 30 de Octubre 2008.
 - La secretaria técnica regional de OPS presentara a los Ministros respectivos, la propuesta de resolución mundial para el control / eliminación de la enfermedad de Chagas para la discusión y aprobación en la Asamblea Mundial de la Salud 2009. Plazo máximo abril 2009.
 18. La IPA se adhiere a la conmemoración de los 100 años del descubrimiento del parásito, ciclo y descripción de la enfermedad por Carlos Chagas y proponen acciones de fortalecimiento de los

programas nacionales de Chagas en el año 2009 y celebración del centenario.

19. En conocimiento de la necesidad de iniciar la elaboración de la materia prima de Benznidazol, cuya fabricación mundial del medicamento esta exclusivamente bajo la responsabilidad del Laboratorio Publico LAFEPE de Brasil, el grupo de países de la Iniciativa Andina de Chagas expresa su interés y urgencia en conocer el estado actual del proceso de producción de la materia prima, encarga a la secretaria técnica OPS-OMS su seguimiento e información.
20. En el marco de la VIII Reunión de la Comisión Intergubernamental (CI) de la Iniciativa Andina de Control de la Transmisión Vectorial de la Enfermedad de Chagas (IPA) se ha rendido un homenaje póstumo al Dr. Víctor Reyes Lituma (Ecuador), en virtud de sus aportes a la salud pública continental.
21. Realizar seguimiento a los acuerdos de la VI y VII reunión ratificando la vigencia pendiente de los ítems siguientes:
 - La puesta en marcha la compra conjunta de medicamentos y pruebas rápidas a través del fondo estratégico de OPS.
 - Difusión del manual de capacitación en diagnóstico de Chagas producido y validado por Brasil. Venezuela se compromete a traducir y hacerlo llegar a los respectivos países
22. Se anexa estatus de cumplimiento de los acuerdos suscritos en la VI y VII reunión del IPA.
23. La IPA manifiesta su entusiasmo e interés en el desarrollo del proyecto BID Bien Publico Regional – Chagas (BPR).
24. Se aprueba la propuesta de Perú en designar a la ciudad de Arequipa como sede la IX Reunión de la Comisión Intergubernamental (CI) de la Iniciativa Andina Control de la Transmisión Vectorial y Transfusional de la Enfermedad de Chagas (IPA) Junio 2009.

II CONSENSO DE ATENCIÓN, MANEJO Y TRATAMIENTO DEL PACIENTE CHAGASICO

Organismos Patrocinadores:

Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), Venezuela

Fecha: 15 - 17 Octubre 2008

Sede: San Carlos, Cojedes, Venezuela

Esta reunión, celebrada en el Centro de Investigaciones de Enfermedades Tropicales “Dr Witremundo Torrealba” (CIET-UC), fue presidida por la Dra. Glenda Velásquez, Coordinadora Nacional Programa de Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas, Dirección de Salud Ambiental, Ministerio del Poder Popular para la Salud (DGSA-MPPS), y contó con la asistencia de destacados profesionales de diferentes disciplinas relacionadas al objetivo central que perseguía la reunión, además de Directores de Salud Ambiental y Epidemiólogos Regionales de los estados endémicos invitados. Es oportuno destacar el papel desempeñado por los Doctores Raúl Espinoza, Henry Parada y Néstor González Ochoa, médicos cardiólogos de amplia trayectoria en el tratamiento del paciente Chagásico reconocida no sólo en el país, sino en el ámbito internacional. La relatoria de la Mesa Atención y Manejo de paciente Chagasico, estuvo a cargo de la Dra Rosmary Villadiego, Directora de Salud Ambiental del estado Apure, quien presentó un Algoritmo de Atención al paciente Chagasico, Formatos de Referencia y Ficha de reporte de caso.

Acuerdos:

1. Se aprobó el Flujograma de Tratamiento del paciente Agudo de Chagas, quedando el compromiso de la elaboración de Manual sobre Enfermedad de Chagas Agudo para la comunidad a cargo de la Coordinación Nacional de Promoción para la Salud Ambiental (Dirección General de Salud Ambiental).
2. Se discutió sobre el Tratamiento del paciente Crónico y se acordó escribir el Manual correspondiente.
3. Se propuso remitir el presente acuerdo en manuscrito a la ciudadana Viceministra de Redes de Salud Colectiva Dra Nancy Pérez Sierra, a fin de que se eleve esta solicitud al ciudadano Ministro del Poder Popular para la Salud, y su posterior resolución por Gaceta, para dar estricto cumplimiento a estas pautas de tratamiento a nivel nacional, con la posibilidad que el mismo sea revisado cada dos (02) años para su continua revisión y actualización.
4. Se fijó como sede del próximo Consenso en la Ciudad de Acarigua Edo. Portuguesa, para la revisión de estas pautas.
5. Se acordó la realización de la próxima reunión nacional para el año 2009, en el Centro de Investigaciones de Enfermedades Tropicales “Dr. José Francisco Torrealba” (San Juan de los Morros, estado Guarico) en el marco del Aniversario del

Descubrimiento del parásito transmisor de la Enfermedad de Chagas.

❑ V REUNIÓN DE LA INICIATIVA INTER-GUBERNAMENTAL DE VIGILANCIA Y PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN LA AMAZONIA (AMCHA)

Organismos Patrocinadores:

- OPS-OMS.
- Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECI).
- Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), Venezuela.

Fecha: 28 - 30 Octubre 2008

Sede: Caracas, Venezuela

La Comisión Intergubernamental estuvo integrada por los Delegados Gubernamentales de Brasil, Colombia, Ecuador, Guyana, Guyana Francesa, Perú y Venezuela. Se contó además con la participación de un panel de investigadores y técnicos, especialistas en diversos aspectos de la investigación, prevención y manejo de la enfermedad de Chagas, Directores de Salud Ambientales como Epidemiólogos Regionales de los estados endémicos y representantes de los programas de Enfermedades de Trasmisión Alimentaria de los países. La reunión fue presidida por Dra. Glenda Velásquez, Coordinadora Nacional del Programa de Chagas de Venezuela, Secretario: Dr. Mauricio Vera, Coordinador del sub programa Enfermedad de Chagas, Asesor de la Dirección General de Salud Publica Ministerio de la Protección Social de Colombia, Relatoras: Dras. Ángela Martínez y Rosmary Villadiego, Venezuela.

Conclusiones y Recomendaciones:

1. Fomentar el desarrollo de diagnósticos de situación epidemiológica y de control de la enfermedad de Chagas por parte de los países de la Subregión Amazónica, como forma de obtener una línea de base para las tareas a planificar, desarrollar y evaluar.
2. Fomentar en la subregión y particularmente en las áreas amazónicas de los países miembros, la capacitación y formación en prevención, vigilancia y atención de la enfermedad de Chagas de los recursos humanos de salud y disciplinas relacionadas o implicadas.

3. Propiciar encuentros de Universidades ubicadas en países amazónicos, con carreras afines a las ciencias de la salud, para discutir y actualizar la enseñanza de la enfermedad de Chagas en sus actividades docentes.
4. Desarrollar en 2009, en Bogotá, Colombia, un taller teórico práctico con apoyo de OPS, dirigido a analizar y capacitar técnicos de países amazónicos que trabajan en la enfermedad de Chagas e inocuidad de alimentos en transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*, su prevención y manejo de casos e investigación y control de brotes.
5. Implementar y fortalecer, entre los países de la región amazónica, la gestión integral de la enfermedad de Chagas en relación a los sistemas de vigilancia y atención médica instalados (Atención Primaria en Salud y Malaria)
6. Iniciar el desarrollo del análisis de riesgo, en relación a alimentos potencialmente vinculados a transmisión oral de *T. cruzi*, en los países de la región amazónica, tomando como ejemplo el caso de Brasil (“acai” y su jugo).
7. Generar documentos para la promoción de buenas prácticas de manufactura (BPM) para alimentos potencialmente vinculados a transmisión oral de *T. cruzi*, tanto para ámbitos domésticos como comerciales.
8. Promover la participación de técnicos de los países miembros en el Curso de Capacitación para el diagnóstico parasitológico directo de *T. cruzi*, notificación de casos agudos y referencia del individuo infectado para tratamiento, a realizarse en Quito, Ecuador, del 24 a 28 de noviembre de 2008.
9. Solicitar a Perú que respalde en el Consejo Ejecutivo de OMS, junto con Brasil, Paraguay y El Salvador, para la preparación de la Asamblea Mundial de la Salud, la inclusión del tema “enfermedad de Chagas”, con el objetivo de presentar para aprobación la nueva resolución de la Asamblea Mundial de la Salud 2009 para los próximos 10 años.
10. En relación a la prevención de la transmisión transfusional de la enfermedad de Chagas en bancos de sangre de la subregión amazónica, recomendar:
 - Que se revisen los cuestionarios administrados al donante para verificar que estén incorporadas las preguntas propias y adecuadas a la situación epidemiológica de la Enfermedad de Chagas en la subregión

- Que se utilicen reactivos en el tamizaje optimizados a las peculiaridades del agente y la respuesta del huésped en esta subregión
 - Que se realice el tamizaje serológico sistemático para *T. cruzi*, del 100 % de las unidades de sangre donadas
11. Propiciar estudios en los países de la región amazónica, dirigidos a mejorar los conocimientos y conductas clínico-diagnósticas, adecuadas a las particularidades de la enfermedad de Chagas en la subregión y en las diferentes áreas de esta.
 12. Acordar con Guyana la cooperación técnica OPS, bajo forma de consultoría de dos expertos por cinco días en el primer semestre de 2009, con el objetivo de:
 - Cooperar con la puesta en marcha del tamizaje para Chagas en bancos de sangre
 - Diseñar una estrategia y modalidad de atención médica y vigilancia de Chagas en los servicios de salud
 13. Remitir a OPS de cada país la relación de saldos de medicamentos, la cuantificación de necesidades (Nifurtimox y Benzonidazol) para el año 2009 y una breve descripción de resultados de farmacovigilancia. Plazo hasta el 30 de Noviembre de 2008.
 14. Remitir a OPS por país las metas propuestas para el decenio, fundamento de la resolución de la asamblea mundial de la salud 2009 para enfermedad de Chagas.
 15. En el segundo semestre de 2009 con financiación de OPS y apoyo de FIOCRUZ realizar el taller regional de métodos avanzados de vigilancia entomológica en enfermedad de Chagas.
 16. OPS y la secretaria de AMCHA generaran la estandarización de un instrumento que permita a los países de la región amazónica la comparabilidad de sus procesos en marco de los programas nacionales de prevención y control de la enfermedad de Chagas.
 17. En futuras reuniones de la iniciativa se debe iniciar con la revisión a compromisos establecidos en la reunión anterior.
 18. Los Países participantes (Brasil, Colombia, Ecuador, Perú, Guyana, Guyana Francesa y Venezuela) establecieron los compromisos a adquirir.
 19. La Comisión Intergubernamental de AMCHA realizara su VI reunión bajo la modalidad de conjunto de iniciativas en Belén –Brasil del 19 al 23 de Abril.
-

Fe de Errata //

Vol. XLVIII, N° 1 Maracay, Aragua, Venezuela
Enero-Julio, 2008

Se corrige en el CONTENIDO, el N° de las páginas que no coincide con el número del texto, por lo tanto debe leerse como aparecen a continuación:

REVISIONES

Eco-Epidemiología de flebovirus (Bunyaviridae, Phlebovirus) transmitidos por flebotomos (Psychodidae, Phlebotominae)

Eco-epidemiology of Phlebovirus (Bunyaviridae, Phlebovirus) transmitted by Phlebotomus (Psychodidae, Phlebotominae)

María de los Ángeles Acevedo & Jazzmín Arrivillaga.....3

Contaminación bacteriológica en los sistemas de distribución de agua potable: Revisión de las estrategias de control

Bacteriological contamination of the drinking water distribution systems: revision of control strategies

Cristina De Sousa, María Cristina Colmenares & Angelina Correia.....17

ARTÍCULOS ORIGINALES

Disposición farmacocinética de las especies de antimonio en perros después de una dosis de antimonio de meglumina (Glucantime®)

Pharmacokinetic disposition of antimony species in dogs after a dose of meglumine antimonate (Glucantime®)

Laura Vásquez de Ricciardi, Nelson Vicuña-Fernández, Yaneina Petit de Peña, Sabrina López, José V. Scorza, José V. Scorza-Dager, Elsy Villegas & Belén Pérez27

Reacción en cadena de polimerasa (PCR) para detectar formas infectivas de *Onchocerca volvulus* en *Simulium metallicum* s.l. (Diptera: Simuliidae), en áreas endémicas de Venezuela

Polymerase chain reaction (PCR) for detecting infective forms of Onchocerca volvulus in Simulium metallicum s.l. (Diptera: Simuliidae) in Venezuelan endemic areas

Alexis Fernández, Jaime Ramírez-Pérez, Harland Shuler & Noris Rodríguez.....35

Efectividad de metopreno en el control de *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio: efecto de la densidad larvaria

Efficacy of metopreno for the control of Anopheles albimanus Wiedemann (Diptera: Culicidae) in laboratory conditions: effect of larval density

Edith Navarro, Jesús Berti & Julio E. González.....45

Percepciones y comportamiento de la población de un área endémica de Argentina en relación a la transmisión de *Tunga penetrans* (Siphonaptera: Tungidae)

Perceptions and behaviour about the transmission of Tunga penetrans (Siphonaptera: Tungidae) in a population from an endemic area of Argentina

Elena Beatriz Oscherov, Alicia María Francisca Milano & Anibal Roque Bar53

Conocimientos, prácticas y percepciones sobre malaria en la parroquia Yaguaraparo, estado Sucre, Venezuela, 2004

Knowledge, practices and perceptions about malaria in Yaguaraparo parish, Sucre state, Venezuela, 2004

Mayira Sojo-Milano, José Luis Cáceres G., Eliecer Sojo-Milano, Leticia Rondón, Carlos González & Néstor Rubio61

Evaluación de la calidad fisicoquímica y bacteriológica en piscinas del estado Carabobo, Venezuela

Evaluation of physicochemical and bacteriological characteristics of some swimming pools in Carabobo state, Venezuela

María Cristina Colmenares, Angelina Correia de Soto & Cristina De Sousa.....73

REPORTE EPIDEMIOLÓGICO

Malaria antes y después de la cura radical masiva en el Estado Sucre, Venezuela

Malaria before and after massive radical cure in Sucre state, Venezuela

José Luis Cáceres G.83

NOTAS CIENTÍFICAS

Supervivencia de formas de cultivo de *Trypanosoma cruzi* en alimentos experimentalmente contaminados
Survival of culture forms of Trypanosoma cruzi in experimentally contaminated food

Néstor Añez & Gladys Crisante.....91

Observaciones sobre la bionomía de *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) en el municipio Valencia, departamento Córdoba, Colombia

Observations on the bionomics of Anopheles (Diptera: Culicidae) in the Valencia municipality, Cordoba department, Colombia

Gabriel Parra-Henao & Erika Patricia Alarcón Pineda.....95

Infección natural de *Panstrongylus rufotuberculatus* (Hemiptera: Reduviidae) al sureste del estado Lara, Venezuela

Natural infection of Panstrongylus rufotuberculatus (Hemiptera: Reduviidae) at Southheastern of Lara state, Venezuela

Luis Eduardo Traviezo-Valles, Dorit Berkefeld & Elis Aldana99

REVISTA DE REVISTAS.....103

FE DE ERRATA.....105

INDICE ACUMULADO POR MATERIA, Vol. XLVIII , 2008

PARASITOLOGÍA

Reacción en cadena de polimerasa (PCR) para detectar formas infectivas de <i>Onchocerca volvulus</i> en <i>Simulium metallicum</i> s.l. (Díptera: Simuliidae), en áreas endémicas de Venezuela (Fernández A. <i>et al.</i>)	35
Supervivencia de formas de cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i> en alimentos experimentalmente contaminados (Añez N. & Crisante G.).....	91
Infección natural de <i>Panstrongylus rufotuberculatus</i> (Hemiptera: Reduviidae) al sureste del estado Lara, Venezuela (Traviezo-Valles L. E. <i>et al.</i>).....	99
Anomalías morfológicas y estructurales en fetos de ratones con infección aguda experimental por <i>Trypanosoma cruzi</i> (Pérez M.C. <i>et al.</i>)	127
Susceptibilidad de <i>Trypanosoma cruzi</i> a diferentes venenos de serpientes de Costa Rica (Castillo-Vigil A. <i>et al.</i>)	135
Valoración de la calidad del diagnóstico malárico. Red de vigilancia, municipio Cajigal, estado Sucre, Venezuela (Sojo-Milano M. <i>et al.</i>)	153
Producción, purificación y caracterización de un anticuerpo anti IgG canino como sonda en el diagnóstico de leishmaniasis visceral canina (Fernández L. J. <i>et al.</i>)	161

CASOS CLÍNICOS

Enfermedad de Chagas en el estado Anzoátegui, Venezuela: Registro de un caso agudo y caracterización parasitológica y molecular del aislado (Morocoima A. <i>et al.</i>)	121
--	-----

EPIDEMIOLOGÍA

Eco-Epidemiología de flebovirus (Bunyaviridae, Phlebovirus) transmitidos por flebótomos (Psychodidae, Phlebotominae) (Acevedo M. A. & Arrivillaga J.)	3
Malaria antes y después de la cura radical masiva en el Estado Sucre, Venezuela (Cáceres G. J. L.)	83
Reactividad alérgica a <i>Anisakis simples</i> y su asociación con asma bronquial en niños escolares del estado Nueva Esparta (Puccio F. <i>et al.</i>).....	145

ENTOMOLOGÍA

- Observaciones sobre la bionomía de *Anopheles* spp. (Díptera: Culicidae) en el municipio Valencia, departamento Córdoba, Colombia
(Parra-Henao G. & Alarcón P. E.P.).....95
- Fluctuaciones estacionales y temporales de la densidad larvaria de *Anopheles darlingi* Root (Díptera: Culicidae) y familias de insectos asociados al hábitat en El Granzón, Parroquia San Isidro, municipio Sifontes del estado Bolívar
(Berti-Moser J. et al.).....177

CONTROL

- Disposición farmacocinética de las especies de antimonio en perros después de una dosis de antimoniato de meglumina (Glucantime®)
(Vásquez de R. L. et al.) 27
- Efectividad de metopreno en el control de *Anopheles albimanus* Wiedemann (Díptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio: efecto de la densidad larvaria
(Navarro E. et al.)45
- Diferencias en la susceptibilidad a la deltametrina en poblaciones de *Aedes aegypti* de Trujillo, Venezuela
(Álvarez L. et al.)169

CIENCIAS SOCIALES

- Percepciones y comportamiento de la población de un área endémica de Argentina en relación a la transmisión de *Tunga penetrans* (Siphonaptera: Tungidae)
(Oscherov E. B. et al.)53
- Conocimientos, prácticas y percepciones sobre malaria en la parroquia Yaguaraparo, estado Sucre, Venezuela, 2004
(Sojo-Milano M. et al.)61

SALUD AMBIENTAL

- Contaminación bacteriológica en los sistemas de distribución de agua potable: Revisión de las estrategias de control
(De Sousa C. et al.)17
- Evaluación de la calidad fisicoquímica y bacteriológica en piscinas del estado Carabobo, Venezuela
(Colmenares M. C. et al.)73
- Macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores de salud ambiental Benthic macroinvertebrates as bioindicators of environmental health
(Gamboa M. et al.)109

INDICE ACUMULADO POR AUTORES, Vol. XLVIII , 2008

A

Acevedo M. A.: 3
Alarcón P E. P.: 95
Alarcón M.: 127
Aldana E.: 99
Álvarez L.: 169
Añez N.: 91
Araujo S.: 127
Arrivillaga J.: 3, 109

B

Bar A. R.: 53
Berkefeld D.: 99
Berti J.: 45, 177
Blanco F.: 145
Briceño F.: 169

C

Cáceres G. J. L.: 61, 83, 153
Capriles A.: 145
Castillo C.: 169
Castillo-Vigil A.: 135
Cifarelli D.: 145
Colmenares M. C.: 17, 73
Correia A.: 17, 73
Crisante G.: 91
Delgado O.: 161
De Sousa C.: 17, 73
Di Prisco M. C.: 145

F

Fernandes L. J.: 161
Fernández A.: 35
Ferrer E.: 121
Figueroa I.: 145

G

Gamboa M.: 109
Ghezzi M. E.: 145
Goncalves L.: 127
González C.: 61
González J. E.: 45, 177

H

Hagel I.: 145
Herrera L.: 121

L

Loaiza R.: 135
López E.: 145
López S.: 27
Lomonte B.: 135
Lugo de Y. A.: 127

M

Machado L.: 145
Milano A. M.: 53
Matani M. T.: 161
Moreno E.: 127
Moreno
M.: 161
Morocoima A.: 121

N

Navarro E.: 45, 177
Nuñez M.: 121

O

Ordaz R.: 145
Oscherov E. B.: 53
Oviedo M.: 169

P

Parra-Henao G.: 95
Pérez B.: 27
Pérez M. C.: 127
Petit de P Y.: 27
Puccio F.: 145

R

Ramírez-Pérez J.: 35
Reyes R.: 109
Rodríguez N.: 35
Roque M. E.: 145
Rondón L.: 61
Rubio N.: 61

S

Sánchez M. A.: 161
Sarmiento L.: 145
Scorza-Dager J. V.: 27
Scorza J. V.: 27
Shuler H.: 35

Sojo-Milano E.: 61, 153
Sojo-Milano M.: 61, 153

T

Tineo Brito E. J.: 121
Traviezo-Valles L. E.: 99

U

Urbina A.: 135

V

Valverde B.: 135
Vásquez de R. L.: 27
Vicuña-Fernández N.: 27
Villarreal J.: 127
Villegas E.: 27

Z

Zeledón R.: 135

AGRADECIMIENTOS

El Comité Editorial del Boletín de Mariología y Salud Ambiental
agradece su colaboración a los Árbitros del Vol. XLVIII, 2008:

Cruz Manuel Aguilar, Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.

Nestor Añez, Centro de Investigaciones Parasitológicas “J. F. Torrealba”, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.

Maria Gloria Basañez, Department of Infectious Disease Epidemiology, Faculty of Medicine (St Mary’s campus) Imperial College, London, UK.

Rafael Bonfante-Garrido, Decanato de Medicina, Universidad Centro-Occidental “Lisandro Alvarado” (UCLA); Barquisimeto, Venezuela.

Rafael Borges, Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Luis Briceño Zoppi, Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Maira Cabrera, Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

José Luis Cáceres, Departamento de Salud Pública, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Sede Aragua, Maracay, Venezuela.

Edmundo Cayama, Facultad de Ciencias de la Salud, BIOMED, Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela.

Elizabeth Ferrer, BIOMED, Universidad de Carabobo, Sede Aragua, Maracay, Venezuela

Maria Eugenia Grillet, Instituto de Zoología Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Leidi Herrera, Instituto de Zoología Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

Renzo Nino Incani, Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.

Rodolfo Marciano, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela

Milena Mazzarri, Dirección de Vigilancia Epidemiológica, Ministerio del Poder Popular de Salud, Maracay, Venezuela.

Alexis Mendoza León, Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Parásitos, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Apartado 47577, Caracas 1041A, Venezuela.

Victor Mora Arellano, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Bolívar, Venezuela.

Walter Mosca, Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Oscar Noya, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Armando Notz, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela.

Belkys Pérez, Facultad de Ciencias, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.

Hilda Pérez, Laboratorio de Inmunoparasitología, Centro de Microbiología y Biología Celular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, IVIC; Apdo 21827, Caracas, Venezuela.

Maria Jesús Perteguer, Servicio de Parasitología, Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Microbiología, Ctra. Majadahonda-Pozuelo, Majadahonda, Madrid, España.

Gilberto Pinto, Facultad de Ciencias y Tecnología (FACYT), Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela

Alberto Rodríguez Capitulo, Instituto de Limnología “Dr. Raúl A. Ringuelet” Universidad de La Plata, La Plata, Argentina.

Morella Rodríguez-Ortega, Laboratorio de Virología, Instituto de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Elina Rojas, Centro de Investigaciones “J. W. Torrealba” Universidad de Los Andes, Núcleo Trujillo, Trujillo, Venezuela.

Majira Sojo-Milano, Dirección de Epidemiología Ambiental, Dirección General de Salud Ambiental, Ministerio de Salud, Maracay, Venezuela.

Yasmin Rubio-Palis, Dirección General de Salud Ambiental, Ministerio del Poder Popular de Salud, Maracay, Venezuela.

Samuel Segnini, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Servio Urdaneta.Morales, Instituto de Zoología Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Elcy Villegas, Centro de Investigaciones “J. W. Torrealba” Universidad de Los Andes, Núcleo Trujillo, Trujillo, Venezuela.

Noraida Zerpá, Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Centro de Biociencias, Sartenejas, Caracas, Venezuela.

Nota: El Comité Editorial también agradece la valiosa ayuda de Ms. Sharon Sumpter, U.S.A., por la revisión de los resúmenes en Inglés editados en este volumen y al Dr. M.Sc. Benny Suarez del Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldon”, Maracay, Venezuela y la Dra. MSc. Cristiane de Olivera Novaes, del Instituto Nacional de Cáncer (INCA) Rio deJaneiro, Brasil, por la traducción en Portugués de la Guía a los Autores.

BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL

(ISSN-1690-4648)

(antes: Boletín de Malariología y Saneamiento Ambiental)

El Boletín de Malariología y Salud Ambiental es una revista científica que publica artículos sobre diferentes aspectos de la Medicina Tropical (incluyendo patología, estudios clínicos, experimentales y terapéuticos, estudios sociales, epidemiología y control), Parasitología (protozoología, helmintología, entomología, malacología, bioquímica, inmunología, biología molecular, genética), Ingeniería Sanitaria y Salud Ambiental.

Es objetivo de la revista publicar nuevos conocimientos y metodologías para el entendimiento de la dinámica de la transmisión de enfermedades infecciosas virales y parasitarias y sus vectores, dentro de su contexto eco- y socio-epidemiológico, en apoyo y para el diseño y manejo oportuno de los programas de prevención y control y la salud ambiental.

El Boletín de Malariología y Salud Ambiental es una publicación periódica semestral con un (1) volumen y dos(2) números (Julio y Diciembre) por año, distribuida nacional e internacionalmente en formato impreso y en formato electrónico a través de la siguiente dirección de Internet: <http://www.iaesp.edu.ve>

El Boletín está estructurado en nueve Secciones

- I.- Artículos Originales.** Aportes inéditos en las áreas antes mencionadas de Medicina Tropical, Parasitología, Ingeniería Sanitaria, Salud Ambiental.
 - II.- Revisiones** sobre los temas de competencia del Boletín.
 - III.- Notas Científicas y/o Tecnológicas.** Comunicaciones cortas sobre hallazgos y/o resultados preliminares, nuevas técnicas y metodologías.
 - IV.- Reportes Epidemiológicos.** Actualización de los datos epidemiológicos sobre distribución geográfica y demográfica, prevalencia e incidencia.
 - V.- Revista de revistas.** Resúmenes de artículos publicados en otras revistas o de Trabajos Especiales de Grado.
 - VI.- Forum.** Discusión acerca de controversias sobre análisis de situaciones, programas, proyectos o intervenciones de salud.
 - VII.- El Hombre y la Ciencia.** Biografía de Científicos que se han destacado a nivel nacional y/o internacional en el área de la Salud y del Saneamiento Ambiental.
 - VIII.- Cartas al Editor.** Comunicaciones dirigidas a la redacción relacionadas con tópicos de interés para difusión en el Boletín de Malariología.
 - IX.- Noticias.** Información sobre reuniones científicas nacionales e internacionales, Congresos, Simposios, Talleres y otros eventos relevantes.
-



Servicio Autónomo
Instituto de Altos Estudios
"Dr. Arnoldo Gabaldon"



Gobierno **Bolivariano**
de Venezuela

Ministerio del Poder Popular
para la **Salud**

