



# 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. LI, Nº 1, 2011

Maracay - Aragua - Venezuela

# BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL

Vol. LI, N° 1, ENERO-JULIO, 2011

ISSN: 1690 - 4648 - DEPÓSITO LEGAL pp- 200303AR314  
(antes Boletín de Malariología y Saneamiento Ambiental)

MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA SALUD

EUGENIA SADER C.  
MINISTRA

DIRECCIÓN GENERAL  
DE SALUD AMBIENTAL

LUIS MONTIEL  
DIRECTOR

DIRECCIÓN GENERAL  
DE CONTRALORÍA SANITARIA

DIVIS DEL CARMEN ANTUNEZ  
DIRECTOR

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

JESÚS ENRIQUE VALERO CHACÍN  
DIRECTOR

## Editores

José Vicente Scorza  
M. Dora Feliciangeli

## Diseño y Diagramación

Oswaldo Flores S. (IAES-MPPS)

## Comité Editorial

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

## Comité Honorario

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

Para envío de artículos: [bmsave@yahoo.com](mailto:bmsave@yahoo.com)

Para canje: [publpeiaesp@yahoo.com](mailto:publpeiaesp@yahoo.com)

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

Revista indizada en **Latindex, Lilacs, Global Health, Tropical Diseases Bulletin, Helminthological Abstracts, Protozoological Abstracts, Review of Medical & Veterinary Entomology, Zoological Record, WEB Science Citation Index Expanded 2010** y pertenece a la colección **SciELO Venezuela**.

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

Esta revista está editada "on line" en la dirección: [www.iaes.edu.ve](http://www.iaes.edu.ve)

# Boletín de Malariología y Salud Ambiental

Vol. LI, N° 1

Maracay, Aragua, Venezuela

Enero-Julio, 2011

## CONTENIDO

### REVISIONES

Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional

*Snakebite poisoning in Latin America and the Caribbean: An integral view from a regional perspective*

**José María Gutiérrez** ..... 1

### ARTÍCULOS ORIGINALES

Monitoreo in vitro de la susceptibilidad del *Plasmodium falciparum* a cinco drogas antimaláricas. Estado Amazonas, Venezuela

*Monitoring susceptibility of Plasmodium falciparum vs. five antimalaric drugs. Amazonas state, Venezuela*

**Irma Rodríguez, Aníbal Carrasquel & Margarita González** ..... 17

Inmunoterapia de la leishmaniasis cutánea: factores que influyen su efectividad

*Immunotherapy of cutaneous leishmaniasis: factors that influence their effectiveness*

**José Albar Carrero Rangel, Rafael Horacio Borges, Jacinto Convit García, José Avilan Rovira & Hector De Lima**..... 25

Phlebotomine sand fly species co-occurrence at the local scale: Differences between agricultural and forested areas

*Patrones de co-ocurrencia de especies de flebótomos a escala local: Diferencias entre áreas agrícolas y forestales*

**Luis Fernando Chaves** ..... 35

Evaluación de la posible asociación entre la presencia de parásitos intestinales y *Helicobacter pylori* en población infantil de la etnia Warao, Venezuela

*Evaluation of the possible association between the presence of intestinal parasites and Helicobacter pylori in children of ethnic Warao*

**Orquídea Leonor Rodríguez, Diana Ortiz-Princz, Cavazza María Eugenia, Elianska López & Isabel Hagel** .....41

Diagnóstico de *Dirofilaria immitis* en el municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela

*Diagnosis of Dirofilaria immitis in the municipality of Sucre, Sucre state, Venezuela*

**Del Valle Guilarte, Erika Gómez Martínez, Fabiana El Hen, Roselvia Guzmán, Deborah Blondell, Marcos Tulio Díaz & Javier Santiago** ..... 51

Nuevos registros de mosquitos (Diptera Culicidae) para el estado Bolívar, Venezuela: Dos de ellos nuevos para el país

*New records of mosquitoes (Diptera Culicidae) for the state of Bolivar, Venezuela: Two of them new to the country*

**Jesús Berti, Hernán Guzmán, Jonathan Liria, Julio González, Yarys Estrada & Enrique Pérez** ..... 59

Estudio histopatológico y ultraestructural de la infección de *Beauveria bassiana* (Ascomycota) sobre *Rhodnius prolixus* (Triatominae)

*Histopathological and ultrastructural study of Beauveria bassiana (Ascomycota) infection on Rhodnius prolixus (Triatominae)*

**Dalmiro José Cazorla Perfetti & Pedro Morales Moreno** ..... 71

## NOTAS CIENTÍFICAS

Primer registro de *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) en los municipios Alto Orinoco y Atures, estado Amazonas, Venezuela

*First record of Panstrongylus geniculatus (Latreille, 1811) in the municipalities of Atures and Alto Orinoco, Amazonas State, Venezuela*

**Oscar Noya-Alarcón, Carlos Botto, José Cortez, Elizabeth Ferrer, Mercedes Viettri & Leidi Herrera** ..... 81

Pathological alterations and prevalence of *Trypanosoma cruzi* in opossums from western Mexico

*Alteraciones patológicas y prevalencia de Trypanosoma cruzi en zarigüeyas en el occidente de México*

**Maria Elena Villagrán, José Alejandro Martínez-Ibarra & José Antonio de Diego** ..... 87

Primer registro de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) en áreas remotas del estado Bolívar

*First record of Aedes (Stegomyia) aegypti (L.) in remote areas of Bolivar State*

**Yasmin Rubio-Palis, Hernán Guzmán, Jairo Espinoza, Lya Cárdenas, Mariapia Bevilacqua & Domingo Medina** ..... 89

Aportes al conocimiento de la distribución y biología de *Anopheles algeriensis* Theobald, 1903 en España

*Contributions to the knowledge of the distribution and biology of Anopheles algeriensis Theobald, 1903 in Spain*

**Rubén Bueno Marí, Alberto Bernués Bañeres, Francisco Alberto Chordá Olmos & Ricardo Jiménez Peydró** ..... 93

Primera descripción del hábitat acuático de *Simulium guianense* s.l. (Diptera: Simuliidae) en el área endémica de oncocercosis, al sur de Venezuela

*First description of the Simulium guianense s.l. larval habitat in the Amazonian focus of onchocerciasis, southern Venezuela*

**Nestor Villamizar, José Cortez, Oscar Noya-Alarcón, Marisela Escalona, Carlos Botto & María Eugenia Grillet** ..... 97

**REVISTA DE REVISTAS** ..... 103

## Revisiones



### Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional

#### *Snakebite poisoning in Latin America and the Caribbean: An integral view from a regional perspective*

José María Gutiérrez

#### RESUMEN

Se analiza la situación de los envenenamientos por mordeduras de serpiente en América Latina y el Caribe, los cuales representan un importante problema de Salud Pública en la región. Esta patología afecta, fundamentalmente, a la población rural de nuestros países, y tiene un alto impacto en sectores desatendidos por los programas de salud. Estos envenenamientos son causados, en su gran mayoría, por especies de la familia Viperidae, especialmente del género *Bothrops*. Existe un conglomerado de laboratorios públicos y privados productores de antivenenos en la región, aunque en algunos casos la producción no satisface las necesidades de algunos países, por lo que los antivenenos deben ser importados de países vecinos. Las investigaciones científicas y tecnológicas efectuadas en América Latina han generado un gran bagaje de conocimiento sobre las serpientes y sus venenos, así como sobre la clínica de los envenenamientos y el perfil de eficacia y seguridad de los antivenenos, a niveles preclínico y clínico. Pese a los indudables logros obtenidos en el manejo de esta enfermedad en la región, se debe redoblar esfuerzos para garantizar: (a) un mejor conocimiento de los venenos y sus efectos; (b) una visión más realista de la incidencia de estos envenenamientos; (c) un mejoramiento cualitativo y cuantitativo en la producción de antivenenos; (d) un mejor control de calidad de los antivenenos que se importan en algunos países; (e) una más adecuada distribución de los antivenenos en la región, especialmente en zonas rurales de alta incidencia de envenenamientos; (f) una mayor capacitación del personal de salud en el tratamiento de estos envenenamientos, incluyendo el correcto uso de antivenenos; (g) un seguimiento y atención a las personas que han sufrido secuelas como producto de estos accidentes; y (h) programas comunitarios de prevención y atención de esta patología. Estas tareas deben ser enfrentadas con una filosofía de equidad, solidaridad y cooperación en la región, con la participación de múltiples protagonistas a muy diversos niveles.

**Palabras clave:** Envenenamientos, mordeduras de serpiente, América Latina y el Caribe, antivenenos, prevención, capacitación, investigación.

#### SUMMARY

*The public health problem of envenomings induced by snakebites in Latin America and the Caribbean is analyzed in this work. This pathology affects predominantly the rural population and has a high impact on regions where the provision of health services is insufficient. The majority of envenomings are inflicted by species of the genera *Bothrops* and *Crotalus*, classified in the family *Viperidae*. There are several laboratories in the region which manufacture antivenoms for the treatment of these envenomings, although the volume of production in some cases does not fulfill the national demand and, consequently, antivenoms have to be imported. A significant body of knowledge has been gained in the taxonomy of the snakes and the biochemistry, toxicology and immunology of venoms, as well as in the preclinical and clinical performance of antivenoms. Despite significant advances in the control of this neglected tropical disease in Latin America, there are pending tasks in the region, such as: (a) To improve our knowledge on snakes and their venoms; (b) to assess the actual incidence and mortality of snakebite envenomings; (c) to increase the volume of antivenom produced and, in some cases, to improve the quality of antivenoms; (d) to improve the national quality control laboratories; (e) to develop more effective strategies of distribution of antivenoms, especially to remote rural areas where snakebites are frequent; (f) to foster permanent education programs for the health staff in charge of the treatment of these envenomings; (g) to follow up and provide support to people that suffer physical or psychological sequelae as a consequence of these envenomings; and (h) to strengthen community programs aimed at improving the prevention and adequate management of snakebites. This conglomerate of tasks should be approached with a philosophy of solidarity, integration and cooperation in the region, with the involvement of multiple actors and institutions.*

**Key Words:** Envenomings, snakebites, Latin America and the Caribbean, antivenoms, prevention, training, research.

## INTRODUCCIÓN

Los envenenamientos por mordeduras de serpiente constituyen un importante problema de Salud Pública en amplias regiones de África, Asia y América Latina (WHO, 2007a; Kasturiratne *et al.*, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2010). Esta patología, que afecta fundamentalmente a personas pobres que habitan regiones rurales (Gutiérrez *et al.*, 2006; WHO, 2007a; Harrison *et al.*, 2009), ha sido tradicionalmente descuidada por las autoridades de salud, las agendas de investigación y las grandes empresas farmacéuticas en el mundo, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) la ha incluido en la lista de ‘enfermedades desatendidas’ (neglected) ([www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/)). En años recientes, se ha generado un renovado interés por el estudio y la atención de este problema, lo cual se ha reflejado en diversas actividades a escalas nacional, regional y global. En América Latina, varias iniciativas han coadyuvado para que este tema de Salud Pública sea visibilizado y atendido con mayor voluntad política, salubrista, científica y tecnológica ([www.paho.org/spanish/ad/dpc/vp/poisonous-animals.htm](http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/vp/poisonous-animals.htm); Gutiérrez *et al.*, 2007), lo cual ha abierto importantes perspectivas de desarrollo e integración regional en este campo.

Como ocurre con otros problemas de Salud Pública, el análisis y la solución de los envenenamientos por mordeduras de serpiente deben ser enfocados desde una perspectiva integral y holística, esto es, considerando la complejidad y el carácter multifactorial del problema. Este tipo de enfoque demanda la incorporación de muy diversos sectores en los ámbitos científico, tecnológico, político, salubrista y de organización social. El presente trabajo presenta un análisis de la situación actual de los envenenamientos por mordeduras de serpiente en América Latina y el Caribe. Así mismo, discute la producción, distribución y uso de los antivenenos en la región, conjuntamente con aspectos relacionados con la prevención y el tratamiento de estos envenenamientos. Se da especial énfasis a una serie de tareas pendientes que se tienen en la región para reducir el impacto de esta patología en la población.

## ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

### *Incidencia y mortalidad*

Los datos de incidencia y mortalidad por envenenamientos por mordeduras de serpiente en

América Latina son, en muchos casos, incompletos, por diversas razones. Generalmente estos datos emanan de estadísticas hospitalarias y, si bien en varios países la mayoría de los pacientes acude a centros hospitalarios para recibir tratamiento, en otros casos un número indeterminado de pacientes no es atendido en los centros de salud, por diversas razones. Por otra parte, no siempre hay un acopio y sistematización adecuados de los datos hospitalarios. Lo anterior redundo en que las estadísticas oficiales, en algunos casos, sean subregistros que no muestran la verdadera magnitud del problema. En países de África y Asia, algunos estimados de incidencia, basados en censos y entrevistas domiciliarias en poblaciones, han evidenciado un gran subregistro hospitalario y han arrojado cifras más realistas de incidencia y mortalidad (véase por ejemplo el estudio reciente de Rahman *et al.*, (2010) para Bangladesh). Una de las principales tareas pendientes en América Latina es la de desarrollar sistemas de registro y estudios epidemiológicos con diversas metodologías para tener una visión más rigurosa de la incidencia de estos envenenamientos en la región. La declaración del envenenamiento ofídico como una enfermedad de notificación obligatoria en algunos países ha constituido un paso importante que debe generalizarse en la región (Gutiérrez *et al.*, 2007).

Pese a las limitaciones señaladas en el párrafo anterior, contamos con información emanada de los Ministerios de Salud de los países latinoamericanos y del Caribe que permite tener un estimado del impacto de este problema, al menos a nivel hospitalario. La Tabla I resume las cifras de casos para los diferentes países, con un total para la región cercana a los 70.000 casos por año. Esta cifra corresponde aproximadamente al límite inferior de un estimado efectuado con base en diversas fuentes y que plantea que el número de casos anuales en América Latina oscila entre 80.329 y 129.084 (Kasturiratne *et al.*, 2008). Los datos de mortalidad son también incompletos, aunque se cuenta con información en ciertos países. La tasas de mortalidad por 100.000 habitantes por año descritas para algunos países son las siguientes: Costa Rica, 0,02-0,15 (Fernández & Gutiérrez, 2008); Panamá, 0,5 (Hilda Acosta, comunicación personal); Venezuela, 0,1 - 0,2 (Benítez *et al.*, 2007); Brasil, 0,05 (de Oliverira *et al.*, 2009); Ecuador, 0,05 (González-Andrade & Chippaux, 2010). Kasturiratne *et al.* (2008) estimaron que el número de muertes anuales por mordeduras de serpiente en América Latina oscila entre 540 y 2.298, aunque las cifras reales probablemente

**Tabla I. Número estimado por país de mordeduras por serpientes y especies de mayor relevancia médica en América Latina y El Caribe.**

Pais	Número de mordeduras por año	Especies más importantes <sup>1</sup>
<b>América del Norte</b>		
México	27.000 (Gomez & Dart, 1995)	<i>Agkistrodon bilineatus</i> <i>Agkistrodon taylori</i> <i>Bothrops asper</i> <i>Crotalus atrox</i> <i>Crotalus scutulatus</i> <i>Crotalus simus</i> <i>Crotalus totonacus</i>
<b>América Central</b>		
Belice	50 (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007)	<i>Bothrops asper</i>
Costa Rica	500-600 (Sasa & Vásquez, 2003)	<i>Bothrops asper</i> <i>Crotalus simus</i>
El Salvador	50 (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007)	<i>Crotalus simus</i>
Guatemala	500 (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007)	<i>Bothrops asper</i> <i>Crotalus simus</i>
Honduras	500 (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007)	<i>Bothrops asper</i>
Nicaragua	600 (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2009b)	<i>Bothrops asper</i> <i>Crotalus simus</i>
Panamá	1.300-1.800 (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2009b)	<i>Bothrops asper</i>
<b>El Caribe</b>		
Aruba	No se encontró información	<i>Crotalus durissus</i>
Martinica	20 (Warrell, 2004)	<i>Bothrops lanceolatus</i>
Santa Lucía	12 (Warrell, 2004)	<i>Bothrops caribbaeus</i>
Trinidad y Tobago	No se encontró información	<i>Bothrops atrox</i>
<b>América del Sur</b>		
Argentina	270 (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2009b)	<i>Bothrops alternatus</i> <i>Bothrops diporus</i> <sup>2</sup> <i>Crotalus durissus</i>
Bolivia	1.000 (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2009b)	<i>Bothrops atrox</i> <i>Bothrops mattogrossensis</i> <sup>2</sup> <i>Crotalus durissus</i>
Brasil	26.000-29.000 (de Oliveira <i>et al.</i> , 2009)	<i>Bothrops atrox</i> <i>Bothrops jararaca</i> <i>Bothrops jararacussu</i> <i>Bothrops leucurus</i> <i>Bothrops moojeni</i> <i>Crotalus durissus</i>
Colombia	3.000 (Otero <i>et al.</i> , 2006)	<i>Bothrops asper</i> <i>Bothrops atrox</i> <i>Bothrops bilineatus</i> <i>Crotalus durissus</i>
Ecuador	1.400-1.600 (González Andrade & Chippaux, 2010)	<i>Bothrops asper</i> <i>Bothrops atrox</i> <i>Bothrops bilineatus</i> <i>Lachesis muta</i>
Guyana	200 (Warrell, 2004)	<i>Bothrops atrox</i> <i>Bothrops bilineatus</i> <i>Bothrops brazili</i> <i>Crotalus durissus</i>

continúa en la pág. 04

viene de la pág. 03

Guyana Francesa	100 (Chippaux, 2002)	<i>Bothrops atrox</i> <i>Bothrops bilineatus</i> <i>Bothrops brazili</i> <i>Crotalus durissus</i>
Paraguay	400-500 (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2009)	<i>Bothrops alternatus</i> <i>Crotalus durissus</i>
Perú	1.400-1.500 (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007)	<i>Bothrops atrox</i> <i>Bothrops bilineatus</i> <i>Bothrops pictus</i> <i>Crotalus durissus</i> <i>Lachesis muta</i>
Surinam	No se encontró información	<i>Bothrops atrox</i> <i>Bothrops bilineatus</i> <i>Bothrops brazili</i> <i>Crotalus durissus</i>
Uruguay	50-60 (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007)	<i>Bothrops alternatus</i> <i>Crotalus durissus</i>
Venezuela	7.000 (Alexis Rodríguez-Acosta, comunicación personal)	<i>Bothrops atrox</i> <i>Bothrops colombiensis</i> <i>Bothrops venezuelensis</i> <i>Crotalus durissus</i>

1. Las especies más importantes son aquellas clasificadas en la Categoría 1 en las WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins (WHO, 2010). En el caso de Venezuela, se añade la especie *Bothrops colombiensis*.

2. Anteriormente clasificadas como subespecies de *Bothrops neuwiedi*.

sean mayores, debido al problema de subregistro mencionado anteriormente.

En general, estos envenenamientos afectan principalmente a trabajadores agrícolas, predominantemente varones adultos, pero afectando también a mujeres y niños residentes en zonas rurales (Otero *et al.*, 1992; Gutiérrez, 2009a; de Oliveira *et al.*, 2009). Sin embargo, las estadísticas generales a nivel nacional tienen el problema de que ocultan importantes diferencias de carácter regional, social y étnico. Opera aquí lo que se ha denominado ‘la tiranía de los promedios’ (Kliksberg, 2007), lo que significa que, si se analizan sólo las tendencias generales de cada país, esto impide detectar manifestaciones de asimetría en la incidencia de las enfermedades y de inequidad en la atención de las mismas por parte de los sistemas de salud. Poblaciones vulnerables ubicadas en zonas rurales retiradas de centros urbanos presentan alta incidencia y mortalidad por mordedura de serpiente, tal y como se ha documentado para poblaciones indígenas en América del Sur (Larrick *et al.*, 1978; Pierini *et al.*, 1996). El uso de sistemas de georeferenciación, conjuntamente con el análisis de diversos parámetros de distribución de especies de serpientes, poblaciones humanas y acceso a sistemas de atención en salud, permitirá tener una visión más amplia y precisa de la magnitud de este problema y de su impacto en regiones específicas que constituyen áreas vulnerables

que requieren ser atendidas. Dos estudios recientes en Argentina y Nicaragua (Leynaud & Reati, 2009; Hansson *et al.*, 2010) ilustran la utilidad de estas metodologías.

#### *Las especies más relevantes*

Las serpientes venenosas de América Latina y el Caribe se ubican, principalmente, en las familias Viperidae y Elapidae (Campbell & Lamar, 2004). Si bien existen especies clasificadas en la familia Colubridae (*sensu lato*) que son capaces de producir una secreción tóxica e inyectarla, la severidad de los casos de mordeduras por especies de esta familia es, generalmente, leve (Prado-Franceschi & Hyslop, 2002; Gutiérrez & Sasa, 2002). La gran mayoría de los casos son provocados por especies de la familia Viperidae, predominando las clasificadas en el género *Bothrops*, seguidos por las del género *Crotalus* (Otero *et al.*, 1992; Fan & Cardoso, 1995; de Oliveira *et al.*, 2009; Warrell, 2004; Gutiérrez, 2009a). Los envenenamientos provocados por especies del género *Micrurus* (familia Elapidae, conocidas como corales) representan aproximadamente el 1% de los casos (de Oliveira *et al.*, 2009; Gutiérrez, 2009a). Las especies que causan más accidentes varían de acuerdo al país (Tabla I). Algunas especies destacan por la alta frecuencia de casos y por su amplia distribución geográfica, tales como *Bothrops asper* en América Central y la región norte de

América del Sur, *B. atrox* en la región amazónica, *B. alternatus* y *B. jararaca* en la región sur de América del Sur, y la cascabel *Crotalus durissus* en toda la región sudamericana (Cardoso *et al.*, 2009; Warrell, 2004; Gutiérrez, 2009a; WHO, 2010) (Tabla I).

## ASPECTOS CLÍNICOS DE LOS ENVENENAMIENTOS

### *Envenenamientos por especies de la familia Viperidae*

Pese a la existencia de importantes diferencias intra- e inter-específicas en la composición de los venenos de serpientes en la región, los patrones clínicos de envenenamientos por especies de la familia Viperidae son similares en el continente. Estos envenenamientos se caracterizan principalmente por manifestaciones locales, en el sitio de la inyección del veneno, tales como dolor, edema, sangrado, necrosis de tejido muscular, dermonecrosis y formación de ampollas (Cardoso *et al.*, 2009; Warrell, 2004; Otero-Patiño, 2009; Gutiérrez, 2009a). Esta patología local frecuentemente se complica por infecciones por diversos microorganismos (Otero *et al.*, 2002; Otero, 2009). La severidad de esta patología local varía mucho y puede ir desde casos leves, que cursan solamente con edema y dolor, hasta casos severos donde hay importante necrosis tisular y daño permanente del tejido. Por otra parte, estos venenos provocan alteraciones sistémicas, caracterizadas por hemorragia, alteraciones de la coagulación (desfibrinogénación), alteraciones hemodinámicas que pueden llevar a choque cardiovascular, e insuficiencia renal aguda (Cardoso *et al.*, 2009; Warrell, 2004; Otero-Patiño, 2009; Gutiérrez, 2009a). Se han descrito al menos dos excepciones importantes a este patrón fisiopatológico predominante en vipéridos: (a) Los envenenamientos por dos especies de cascabel, *Crotalus durissus* en América del Sur y algunas poblaciones de la cascabel de Mojave, *C. scutulatus*, en América del Norte, se caracterizan por neurotoxicidad severa y miotoxicidad sistémica (rabdomiólisis), acompañadas de desfibrinogénación e insuficiencia renal aguda, pero sin presentar patología local importante (Azevedo-Marques *et al.*, 2009). (b) Los envenenamientos por las especies *Bothrops lanceolatus* y *B. caribbaeus*, endémicas en las islas caribeñas de Martinica y Santa Lucía (Campbell & Lamar, 2004), las cuales inducen un cuadro de trombosis severas en un porcentaje de los pacientes, conjuntamente con la patología local característica de envenenamientos botrópicos (Thomas *et al.*, 1996).

### *Envenenamientos por especies de la familia Elapidae*

Los envenenamientos por serpientes coral (género *Micrurus*) se caracterizan por la ausencia de efectos patológicos locales y de la coagulación, y por el predominio de la actividad neurotóxica de toxinas que bloquean las uniones neuromusculares. El cuadro clínico se basa en una secuencia de eventos paralíticos progresivos que pueden culminar, en casos severos, en parálisis respiratoria y muerte (da Silva & Bucarechi, 2009; Warrell, 2004). Se han descrito casos asociados, además, con miotoxicidad y con otras alteraciones, aunque la parálisis flácida es claramente la manifestación clínica predominante (Manock *et al.*, 2008).

### *La importancia de las secuelas*

Un número no bien determinado de pacientes que sufren envenenamientos por especies de la familia Viperidae desarrollan secuelas de carácter físico y psicológico. Las drásticas alteraciones patológicas que los venenos causan en la región de la mordedura originan frecuentemente pérdida de tejido y disfunción en la extremidad, lo cual acarrea consecuencias permanentes con implicaciones físicas, sociales y económicas. Además, estos envenenamientos pueden generar secuelas psicológicas, incluyendo síndrome de estrés postraumático. Aunque la incidencia e impacto de estas secuelas no han sido debidamente investigadas en América Latina, es claro que este es un aspecto muy importante de esta patología, el cual requiere intervenciones en diversos ámbitos.

## LOS VENENOS DE SERPIENTES: BIOQUÍMICA Y TOXICOLOGÍA

Existe una rica tradición en la región latinoamericana de investigación en las áreas de Bioquímica, Biología Molecular, Farmacología, Inmunología y Patología Experimental de los venenos de serpientes de la región. Las contribuciones efectuadas en estos campos por grupos ubicados en diversos países de la región es enorme y su revisión detallada supera los alcances de un trabajo de carácter más bien general como el presente. No obstante, cabe mencionar, entre otros logros, el estudio de la proteómica de los venenos, el aislamiento y caracterización de toxinas, el estudio de su mecanismo de acción y de sus efectos en modelos experimentales in vivo e in vitro (ver por ejemplo los capítulos incluidos en el libro editado por Cardoso *et al.*, 2009). En años

recientes, grupos de investigación de la región, en colaboración con grupos europeos y norteamericanos, han profundizado en el estudio de la proteómica de los venenos de serpientes, esto es, del análisis completo de las proteínas contenidas en dichos venenos (ver por ejemplo Serrano *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2009a; Calvete, 2010). Estos estudios han evidenciado, por un lado, un complejo patrón de variaciones intra- e interespecíficas en estos venenos, así como el hecho de que los venenos de vipéridos en la región están constituidos por muchas proteínas y péptidos que, sin embargo, se pueden agrupar en un número pequeño de familias de proteínas principales, tales como: fosfolipasas A2, metaloproteinasas dependientes de zinc, serina proteinasas, proteínas tipo lectinas tipo C, desintegrinas, proteínas ricas en cisteína (CRISPs), péptidos potenciadores de bradicinina y L-aminoácido oxidasas, entre otras (Gutiérrez *et al.*, 2009a; Calvete, 2010). También se ha investigado la proteómica y transcriptómica de venenos de serpientes *Micrurus*, destacándose la gran abundancia de neurotoxinas de baja masa molecular y de fosfolipasas A2 (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008; Leão *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2011). El tema de las variaciones intraespecíficas en los venenos de especies de relevancia médica es muy importante para el reconocimiento de cuadros clínicos divergentes, así como para la selección de las mezclas ideales de venenos para ser empleadas en la inmunización para la producción de antivenenos. Un caso notorio de variación en América Latina lo constituyen los venenos de serpientes cascabel (género *Crotalus*), los cuales divergen enormemente en cuanto a la expresión de toxinas con actividades neurotóxicas, coagulante y hemorrágica (Saravia *et al.*, 2002; Aguilar *et al.*, 2007; Calvete *et al.*, 2010).

Por otro lado, se ha dilucidado los aspectos principales del mecanismo de acción de las toxinas que provocan necrosis muscular (Gutiérrez & Lomonte, 2009), hemorragia (Baldo *et al.*, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2005; Escalante *et al.*, 2011), coagulopatías (Sano-Martins & Santoro, 2009) y neurotoxicidad (Vital-Brazil, 1987a), así como los mecanismos involucrados en el edema y el dolor (Teixeira *et al.*, 2009). Los estudios de los venenos también han permitido desarrollar y adaptar una serie de metodologías sencillas de laboratorio que pueden utilizarse no sólo en la caracterización de los mismos, sino también en el análisis de la capacidad de los antivenenos para neutralizar los efectos letal, hemorrágico, miotóxico, edematígeno, coagulante y desfibrinogenante de los

venenos (Instituto Clodomiro Picado, 2008; WHO, 2010).

Debe destacarse que, no obstante el importante avance logrado en el conocimiento de la composición y mecanismo de acción de los venenos de serpientes de la región, existe una separación entre los grupos de investigación que generan estos conocimientos y los grupos que trabajan en los ámbitos clínicos y de producción de antivenenos. En otras palabras, el conocimiento generado sobre los venenos no siempre se traslada a los ámbitos clínico y productivo, donde dicho conocimiento sería de enorme utilidad en el manejo de los pacientes mordidos por serpientes y en el mejoramiento de las tecnologías para producción y control de calidad de antivenenos. El desarrollo de actividades y programas que permitan fortalecer contactos y sinergias entre quienes trabajan en ciencia básica y quienes se dedican a la clínica, el desarrollo tecnológico y la producción es una tarea importante en la región.

#### ANTIVENENOS: PRODUCCIÓN Y CONTROL DE CALIDAD

La administración parenteral de antivenenos de origen animal constituye el único tratamiento científicamente validado para los envenenamientos por mordeduras de serpiente. Los primeros antivenenos se desarrollaron a finales del siglo XIX, en Francia (Bon, 1996) y rápidamente se estableció su producción en el Instituto Butantan, en Brasil (Vital-Brazil, 1987b). En las décadas subsiguientes, otros laboratorios de la región iniciaron la producción de estos inmunobiológicos y, actualmente, existen centros productores en México, Costa Rica, Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Bolivia, Brasil, Argentina y Uruguay (<http://apps.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms/database/>) (Gutiérrez *et al.*, 2007). La información contenida en esta página web de la OMS incluye la lista de antivenenos y las especies cuyos venenos son neutralizados por los diferentes antivenenos.

Los antivenenos poliespecíficos (o polivalentes) contra venenos de especies clasificadas en la familia Viperidae son los que se producen en mayor cantidad y por un mayor número de laboratorios, especialmente los antivenenos antibotrópicos (<http://apps.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms/database/>). En América del Sur existen antivenenos distintos para el tratamiento de envenenamientos por especies de *Bothrops* y de

*Crotalus*, dado que clínicamente es posible diferenciar entre estos tipos de envenenamientos (Cardoso *et al.*, 2009; Warrell, 2004). Por el contrario, en América Central y en México se producen antivenenos polivalentes botrópico-crotálico y, en Costa Rica, botrópico-crotálico-laquésico (Gutiérrez, 2009a). Algunos laboratorios producen antivenenos anti-elapídicos, para el tratamiento de envenenamientos por mordeduras de serpientes *Micrurus* sp.

Las tecnologías utilizadas en la producción de estos antivenenos varían en la región pero, en términos generales, se basan en tres tipos de procedimientos: (a) Tratamiento con pepsina y precipitación con sulfato de amonio, lo cual genera antivenenos compuestos por fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de las inmunoglobulinas; (b) precipitación con sulfato de amonio para generar preparaciones de IgG completas; y (c) precipitación con ácido caprílico para purificar moléculas de IgG completas (Gutiérrez & León, 2009). La OMS desarrolló y publicó guías para la producción y control de antivenenos, las cuales constituyen una herramienta de gran utilidad para uniformar y mejorar las condiciones de manufactura y regulación de estos productos (WHO, 2010). En América Latina, la gran mayoría de los productores utilizan el caballo para la inmunización con venenos, aunque en el caso de Bolivia se emplean burros y, recientemente, llamas, por su mejor adaptabilidad a la altura de La Paz, donde se encuentra el laboratorio productor (Gutiérrez *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2010).

Algunos países de la región, tales como Brasil, Costa Rica, México y Argentina, son autosuficientes en el abastecimiento de sus necesidades de antivenenos. Otros países, como Colombia, Venezuela, Perú y Bolivia, tienen centros productores que en determinadas ocasiones no satisfacen la demanda nacional de estos productos, por lo que recurren a la importación de antivenenos de otros países de la región. En los casos de Paraguay, las Guayanas, Panamá, Nicaragua, Honduras, El Salvador, Belice y Guatemala, sus necesidades de antivenenos son llenadas por productores de otros países, generalmente de Costa Rica, Brasil y México. Los envenenamientos por la especie *Bothrops lanceolatus*, en la isla antillana de Martinica, son tratados con un antiveneno monoespecífico anti-B. *lanceolatus* producido en Francia (Thomas *et al.*, 1995).

El control de calidad de antivenenos se efectúa tanto a nivel de los laboratorios productores

como, en algunos países, por los Ministerios de Salud. Es importante introducir el control de calidad a nivel nacional en aquellos países donde aún no existe, para garantizar que los antivenenos que se produzcan localmente, o que se importen de países de la región, cumplan con los requisitos de eficacia y seguridad establecidos para estos inmunobiológicos. Las guías de la OMS incluyen descripciones detalladas de las metodologías de control que se deben utilizar (WHO, 2010). Un mejoramiento en el control de calidad de antivenenos podría lograrse mediante programas de cooperación regional, auspiciados por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), dirigidos a generar capacitación a nivel regional en este tema.

## LA EVALUACIÓN PRECLÍNICA Y CLÍNICA DE LOS ANTIVENENOS

### *Estudios preclínicos*

En América Latina se ha prestado especial atención a la evaluación preclínica de los antivenenos que se emplean en la región. Se han efectuado diversos proyectos colaborativos para evaluar la reactividad cruzada de los antivenenos de varios países, esto es, la capacidad de antivenenos para neutralizar los venenos de especies de la región. Estudios de este tipo se han realizado para venenos y antivenenos de Argentina (de Roodt *et al.*, 1998), Brasil (Camey *et al.*, 2002; Bogarín *et al.*, 2000), Perú (Rojas *et al.*, 2005), Bolivia (Fernández *et al.*, 2010), Colombia (Otero *et al.*, 1995), Ecuador (Theakston *et al.*, 1995), Costa Rica (Bolaños, 1971; Gutiérrez *et al.*, 1985; Bogarín *et al.*, 2000) y Guatemala (Saravia *et al.*, 2001), entre otros. Recientemente, y gracias a un proyecto regional apoyado por el Programa CYTED, se efectuó lo que ha sido el estudio regional más amplio para evaluar preclínicamente antivenenos de la región (Segura *et al.*, 2010). Se debe estimular el desarrollo de este tipo de investigaciones en América Latina con el fin de tener un marco más amplio de la reactividad cruzada de los antivenenos y, consecuentemente, del uso potencial de productos de la región en diversos países. Existen metodologías sencillas y de bajo costo para cumplir con estos objetivos (Instituto Clodomiro Picado, 2008; WHO, 2010).

Los resultados de estas investigaciones, en general, reflejan una alta reactividad cruzada de los antivenenos botrópicos en la región, independientemente de los venenos que se utilicen en la inmunización (Segura

*et al.*, 2010). Sin embargo, se han dado situaciones donde determinados antivenenos no neutralizan venenos heterólogos, o sea, venenos no empleados en la inmunización. Un ejemplo claro es la incapacidad de antivenenos contra serpientes cascabel (*Crotalus* sp.) producidos en América Central para neutralizar venenos de cascabeles de América del Sur, y viceversa (Saravia *et al.*, 2002; Calvete *et al.*, 2010). Los antivenenos para envenenamientos por *Micrurus* sp tienen escasa reactividad cruzada (Bolaños & Cerdas, 1978; Tanaka *et al.*, 2010), lo cual limita el uso de los mismos y señala la necesidad de emprender esfuerzos regionales para producir un antiveneno antielapídico panamericano.

### Ensayos clínicos

Como lo ha señalado la OMS (WHO, 2010), la introducción en una determinada región o país de un antiveneno nuevo o que ha sido producido en otra región debe estar sustentado, además de por una minuciosa evaluación preclínica, por evidencia clínica de su eficacia y seguridad. En muchas ocasiones, la evidencia clínica se basa en observaciones no sistemáticas efectuadas a lo largo de muchos años de práctica con estos productos. Sin embargo, se han emprendido importantes esfuerzos por efectuar ensayos clínicos aleatorizados y controlados con antivenenos en Brasil (Cardoso *et al.*, 1993; Pardal *et al.*, 2004), Ecuador (Smalligan *et al.*, 2004) y Colombia (Otero *et al.*, 1996, 1999, 2006; Otero-Patiño *et al.*, 1998, 2007). Estos estudios han corroborado la eficacia de antivenenos generados en Colombia, Brasil, Ecuador, Costa Rica y México, y han evidenciado importantes diferencias en la seguridad de estos productos, ya que antivenenos del tipo IgG manufacturados mediante precipitación con sulfato de amonio han mostrado un perfil de seguridad inferior a los antivenenos IgG fraccionados con ácido caprílico y a algunos antivenenos F(ab')<sub>2</sub> (ver por ejemplo Otero *et al.*, 1999 y Otero-Patiño *et al.*, 1998). Es necesario fomentar la capacitación en este tema en la región, así como apoyar el desarrollo de ensayos clínicos con antivenenos en los diferentes países.

### MÁS ALLÁ DE LOS ASPECTOS TECNOLÓGICOS: EL PROBLEMA DE LA DISTRIBUCIÓN DE ANTIVENENOS EN EL CONTEXTO DE LA SALUD PÚBLICA

Aún cuando se incremente la producción de antivenenos eficaces y seguros en América Latina, se presenta el problema de la gestión de la distribución de

los mismos a las localidades donde éstos se necesitan, especialmente en las zonas rurales del continente. Existen regiones altamente vulnerables en este sentido, ubicadas en zonas remotas donde los servicios de salud son insuficientes o inexistentes, generándose un patrón de inequidad en la atención de esta patología. Los problemas de distribución se pueden categorizar en los siguientes aspectos:

- (1) El deficiente registro de la incidencia de las mordeduras por serpiente provoca que, en muchos casos, se desconozca el impacto de este problema en ciertas regiones y, consecuentemente, la distribución de antivenenos no se ajuste a la realidad epidemiológica de esta patología. Ello hace que regiones con alta incidencia no registrada no reciban dotaciones de antiveneno adecuadas. Para solventar este problema se requiere conocer con mayor precisión la distribución regional de estos envenenamientos, mediante el uso de sistemas de recolección de información más eficaces y el empleo de tecnologías de georeferenciación (ver por ejemplo Leynaud & Reati, 2009 y Hansson *et al.*, 2010).
- (2) Las políticas de adquisición de antivenenos son frecuentemente engorrosas e ineficientes, y los presupuestos son insuficientes para la adquisición de los volúmenes de antiveneno que requiere un país. Esto se debe enfrentar con políticas de adquisición expeditas y con programas de carácter regional fomentados por la OPS y los Ministerios de Salud. Así mismo, los gobiernos deben asignar los presupuestos necesarios para la adquisición de los volúmenes de antiveneno adecuados para cubrir las necesidades de cada país. Este tema también atañe a la necesidad de que los precios de estos productos se mantengan en un ámbito razonable, lo cual conlleva la necesidad de fortalecer los laboratorios públicos productores de la región.
- (3) Los antivenenos adquiridos por los ministerios se distribuyen, en muchas ocasiones, a hospitales regionales, pero no a clínicas y centros de salud de zonas rurales donde ocurren la mayoría de las mordeduras por serpientes. Este problema debe ser enfrentado mediante el diseño de políticas de distribución de antivenenos que se ajusten a la verdadera incidencia de estos envenenamientos y que consideren la necesidad de que zonas rurales retiradas cuenten con la cantidad suficiente de frascos de antiveneno. Así mismo, la promoción

de una gestión eficiente y transparente en dichos programas, con una adecuada descentralización de los mismos, debe fomentarse en la región.

- (4) La ‘cadena de frío’ es defectuosa o ausente en muchas localidades rurales, lo que dificulta la distribución y mantenimiento de antivenenos líquidos en la región, los cuales requieren ser almacenados y transportados a temperaturas que oscilen entre 2 y 8°C (Gutiérrez *et al.*, 2009b; WHO, 2010). La solución a este problema tiene varios componentes: por un lado, debe darse inversión, en los sistemas de salud de la región, en el fortalecimiento de la cadena de frío. Además, debe promoverse el uso de canales de distribución previamente establecidos para otros inmunobiológicos, como las vacunas, y forjar alianzas con otros componentes del sector salud. Por otra parte, se debe capacitar al personal médico, de enfermería, de farmacia y administrativo en el correcto manejo de la cadena de frío. Finalmente, se debe consolidar la capacidad tecnológica regional para producir antivenenos que no requieran de cadena de frío, ya sea como productos liofilizados, o bien mediante el desarrollo de nuevas formulaciones de antiveneno líquido que sean estables a temperatura ambiente (Rodrigues-Silva *et al.*, 1999; Segura *et al.*, 2009).
- (5) Ausencia de centros de salud en localidades remotas donde es frecuente el envenenamiento ofídico. Este problema atañe a las políticas de salud en general, y sus raíces y soluciones son complejas. Las políticas macroeconómicas predominantes en muchos países de la región en las últimas décadas no han privilegiado la inversión social, incluyendo el área de la Salud Pública (Kliksberg, 2007). Es necesario llevar adelante procesos de participación ciudadana y comunitaria, así como de voluntad política de los sectores dirigentes para consolidar los sistemas de salud, particularmente en regiones de vulnerabilidad donde los estados fallan en la provisión de servicios esenciales. Así mismo, el establecimiento de alianzas y sinergias entre organizaciones de la sociedad civil, del sector privado y de los gobiernos, en un contexto de descentralización eficiente y con transparencia, está llamado a jugar un papel central en este y en otros temas de salud (Kliksberg, 2007). La solución de este problema macro de Salud Pública traerá consecuencias muy positivas en el

ámbito de los envenenamientos por mordeduras de serpiente.

#### EL USO ADECUADO DE LOS ANTIVENENOS Y LA CAPACITACIÓN MÉDICA

Aún si se contara con una cantidad suficiente de antivenenos y los mismos se distribuyeran adecuadamente a las regiones donde ocurren las mordeduras por serpientes, ello no necesariamente implica que los antivenenos van a emplearse adecuadamente y que los pacientes van a recibir un tratamiento eficaz. Para cumplir esta meta es necesario tener programas de capacitación para el personal del sector salud en el adecuado tratamiento de los envenenamientos. Esta meta conlleva la capacitación en las carreras de la salud, como parte de los estudios universitarios, así como el desarrollo de programas de educación continua para estos profesionales. Es fundamental garantizar que dichas actividades de educación continua se lleven a las zonas rurales donde la incidencia de este problema es mayor. La edición de textos y materiales diversos, incluyendo algoritmos de manejo y material audiovisual, debe complementar estas actividades, tal y como se ha efectuado en Brasil (Ministerio da Saúde, 1998), Costa Rica (Instituto Clodomiro Picado, 2009), Panamá (Hildauro Acosta, comunicación personal), Argentina (Ministerio de Salud, 2007), Venezuela (Rodríguez-Acosta *et al.*, 1995) y Paraguay (Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, 2008), entre otros países. Así mismo, las tecnologías de la información y comunicación (TIC's) deben emplearse creativamente en este ámbito. Estos programas de capacitación deben incluir el correcto diagnóstico de esta patología, el uso adecuado del antiveneno, el manejo de las reacciones adversas al antiveneno, la terapia complementaria para enfrentar las complicaciones de estos envenenamientos y el adecuado seguimiento de los casos. La cooperación y el establecimiento de sinergias entre las universidades, los centros productores de antivenenos y las autoridades de salud nacionales y locales, con participación de organizaciones de la sociedad civil, debe ser la base para el desarrollo de programas eficaces en este ámbito.

#### LA ATENCIÓN A PERSONAS CON SECUELAS PRODUCTO DE ENVENENAMIENTOS OFÍDICOS

Un aspecto que ha sido descuidado en América Latina, así como en otras partes del mundo, relacionado con los envenenamientos por mordeduras

de serpiente lo constituye la ausencia de seguimiento y apoyo a aquellas personas que presentan algún tipo de secuela como consecuencia de estos accidentes, se trate de secuelas físicas o psicológicas (Williams *et al.*, 2010). El hecho de que la mayoría de los pacientes mordidos por serpiente, luego de su atención médica, regresan a sus comunidades y no reciben seguimiento, hace que se desconozca la incidencia de secuelas y las consecuencias que las mismas tienen en la vida de estas personas. Es necesario desarrollar investigaciones sobre este tema y, con base en los hallazgos, implementar políticas de atención, con participación de instituciones públicas y de organizaciones no gubernamentales de diverso tipo, incluyendo las que desarrollan actividades de atención a otros tipos de discapacidades. El desarrollo de sinergias y programas conjuntos, con activa participación ciudadana, debe ser fomentado en este ámbito de acción.

#### LA PREVENCIÓN Y LA ADECUADA ATENCIÓN INMEDIATA A LAS PERSONAS QUE SUFREN ENVENENAMIENTOS

Finalmente, es necesario consolidar esfuerzos, en unos casos, y desplegar nuevas iniciativas, en otros, con la finalidad de fomentar la prevención de las mordeduras por serpientes. En este campo se abren amplias posibilidades de participación comunitaria y de desarrollo de programas, involucrando diversas organizaciones públicas y privadas, con el fin de mejorar el conocimiento sobre el tema y de reducir, con base en dicho conocimiento, la incidencia y la gravedad del problema. Uno de los aspectos críticos, en términos de promoción de la salud a nivel comunitario, lo constituye evitar el uso de intervenciones perjudiciales que con cierta frecuencia se emplean en la región cuando ocurre una mordedura de serpiente, tales como la administración de sustancias potencialmente tóxicas y el uso de torniquetes y otras intervenciones que causan lesiones. A ello se suma que estas medidas conllevan un retraso en el traslado del paciente a los centros donde se dispone de antiveneno, contribuyendo a que los casos se compliquen. En este contexto, es importante desarrollar campañas de diálogo y comunicación con personas que practican medicina tradicional, con el fin de reducir el uso de intervenciones perjudiciales y más bien fomentar que estas personas contribuyan con el rápido traslado de los pacientes a los centros de salud. Por ejemplo, en Nicaragua se efectuó un programa muy original, desarrollado por el Ministerio de Salud con apoyo

de la OPS, para promover una alianza entre el sector salud y las personas que practican medicina tradicional en la atención de estos casos (Luz Marina Lozano, comunicación personal). Así mismo, es esencial que estos programas de prevención y atención se adapten a las particularidades culturales, económicas y sociales de cada región, y de los grupos a los que van dirigidas, y que incorporen a las organizaciones comunitarias en su diseño e implementación.

#### CONSIDERACIONES FINALES: LA NECESIDAD DE INTEGRAR ESFUERZOS REGIONALES EN DIVERSOS ÁMBITOS

El panorama planteado en este trabajo señala áreas en las cuales se han efectuado avances importantes en América Latina y el Caribe con relación al tema de los envenenamientos por mordeduras de serpiente. Así mismo, permite detectar áreas de trabajo deficitarias, que requieren renovados esfuerzos en la región. Los grupos de investigación ubicados en diversos países han realizado avances significativos en el estudio de las serpientes y sus venenos, tanto en su composición química como en su mecanismo de acción (ver una recopilación de estos avances en Gutiérrez, 2002). El conocimiento bioquímico e inmunológico de los venenos, aunado al estudio de la eficacia preclínica de los antivenenos de la región, permite analizar y reconsiderar los esquemas de inmunización utilizados en los centros productores de antivenenos, así como los ámbitos geográficos en los que determinados antivenenos son eficaces. Por otra parte, las investigaciones y la experiencia clínica en la región han permitido el diseño de protocolos de tratamiento de estos envenenamientos, que sirven de base para programas de educación continua para el personal de salud. Además, existe en la región un conglomerado importante de laboratorios productores de antivenenos, en los ámbitos público y privado, que satisfacen parcialmente la demanda de estos productos.

A la par de estos logros indudables, tenemos importantes deficiencias que deben ser enfrentadas y superadas. Por un lado, es necesario profundizar en el estudio de los venenos y las serpientes de la región, con el fin de tener un panorama más amplio de la variación de los venenos y de los mecanismos mediante los cuales generan patologías. Estas tareas de investigación deben extenderse al conocimiento de los perfiles clínicos de envenenamientos, al análisis de la eficacia y seguridad de los antivenenos y a la obtención

de información epidemiológica más rigurosa, que permita detectar regiones de alta vulnerabilidad en esta patología, particularmente grupos de población excluidos de los beneficios de los sistemas de salud. Además, es fundamental que se establezcan sinergias entre grupos de investigación que trabajan en ciencias naturales y en ciencias sociales, para abordar muchos de los temas discutidos aquí desde una perspectiva integradora y multidisciplinaria (Gutiérrez, 2009b).

Por otra parte, se debe consolidar esfuerzos regionales para el mejoramiento cualitativo y cuantitativo en la producción de antivenenos. Ello demanda renovados empeños de carácter colaborativo entre laboratorios productores con mayor experiencia y con plataformas tecnológicas más consolidadas y laboratorios que tengan más limitaciones. En algunos casos, como por ejemplo los antivenenos anti-*Micrurus*, se podrían efectuar proyectos de producción colaborativos entre varios laboratorios de la región. A la par de estos esfuerzos, se debe promover el establecimiento de programas de distribución de antivenenos, con el apoyo de la OPS y de las autoridades de salud nacionales, que garanticen la accesibilidad de estos productos en toda la región, incluso en países que no cuenten con centros productores. Esta tarea debe ir aparejada de mejoras sustanciales en los sistemas reguladores, a niveles nacional y regional, de manera que se garantice que los antivenenos que se distribuyen en los diferentes países sean eficaces y seguros; para ello, la consolidación de programas regionales de capacitación e intercambio debe ser promovida.

Finalmente, debe prestarse especial atención a los sistemas de adquisición y distribución de antivenenos por parte de las instituciones de salud de la región, así como a la adecuada capacitación del personal de salud en el tratamiento de estos envenenamientos. Ello, junto con programas de participación comunitaria en la prevención y el traslado de pacientes a los centros de salud, así como la extensión de los servicios de salud a zonas desatendidas donde la incidencia de mordeduras de serpiente es alta, deben convertirse en programas prioritarios de atención en toda la región. La búsqueda de soluciones y alternativas para una más adecuada atención de este problema debe integrarse con esfuerzos más generales para la promoción de la salud en la región, dirigidos a reducir las inequidades existentes y a generar procesos participativos y de gestión amplios y profundos. La

integración de esfuerzos en la región debe marcar la pauta en el enfrentamiento de este problema de salud, tal y como se realizó durante el proyecto apoyado por el programa CYTED en el período 2006-2009, en el que participaron grupos de nueve países (Gutiérrez *et al.*, 2007). Así mismo, es importante integrar acciones con otras regiones del planeta, para darle a estas luchas una perspectiva global, como lo está promoviendo la Global Snake Bite Initiative ([www.snakebiteinitiative.org](http://www.snakebiteinitiative.org); Williams *et al.*, 2010). El cumplimiento de las metas discutidas en este trabajo debe basarse en el principio de que la atención a las personas mordidas por serpiente, incluyendo el acceso a los antivenenos, catalogados por la OMS como ‘medicamentos esenciales’ (WHO, 2007b), constituye un asunto ético y de derechos humanos (Hunt, 2007) que debe ser garantizado por nuestros sistemas de salud. Se requiere de un enfoque basado en la solidaridad, la equidad, la cooperación, la transferencia de conocimiento y la integración de esfuerzos en América Latina, con el fin de disminuir el impacto y el sufrimiento que genera este problema en nuestras poblaciones.

#### AGRADECIMIENTOS

Muchos de los aspectos discutidos en este trabajo son el resultado de análisis, discusiones y reflexiones compartidas con colegas del Instituto Clodomiro Picado (Universidad de Costa Rica) y de muchas instituciones de países latinoamericanos y de otras latitudes. Algunos de los esfuerzos de integración regional mencionados en este trabajo fueron apoyados por el Programa CYTED y por la Universidad de Costa Rica.

#### REFERENCIAS

- Aguilar I., Guerrero B., Salazar A. M., Girón M. E., Pérez J. C., Sánchez E. E. *et al.* (2007). Individual venom variability in the South American rattlesnake *Crotalus durissus cumanensis*. *Toxicon*. **50**: 214-224.
- Azevedo-Marques M. M., Hering S. E. & Cupo P. (2009). Accidente crotálico. pp. 108-115. En: *Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Eds. Cardoso J.L.C., França F. O. S., Wen F. H., Málaque C. M. S. & Haddad Jr V. 2ª ed. Sarvier, São Paulo, Brasil.
- Baldo C., Jamora C., Yamanouye N., Zom T. M. & Moura-da-Silva A. M. (2010). Mechanisms of

- vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**: e727.
- Benítez J. A., Rifakis P. M., Vargas J. A., Cabaniel G. & Rodríguez-Morales A. J. (2007). Trends in fatal snakebites in Venezuela, 1995-2002. *Wilderness Environ. Med.* **18**: 209-213.
- Bogarín G., Morais J.F., Yamaguchi I.K., Stephano M.A., Marcelino J.R., Nishikawa A.K. *et al.* (2000). Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. *Toxicon.* **38**: 1429-1441.
- Bolaños R. & Cerdas L. (1978). Venoms of coral snakes (*Micrurus* spp): report on a multivalent antivenin for the Americas. *Bull. Pan Am. Health Organ.* **12**: 23-27.
- Bolaños R. (1971). *Nuevos Recursos contra el Ofidismo en Centroamérica*. 2ª Edición. Instituto Clodomiro Picado. San José, Costa Rica.
- Bon C. (1996). Serum therapy was discovered 100 years ago. pp. 3-9. En: *Envenomings and their treatments*. Eds. Bon C & Goyffon M. Fondation Marcel Mérieux. Lyon, Francia.
- Calvete J. J. (2010). Antivenomics and venom phenotyping: A marriage of convenience to address the performance and range of clinical use of antivenoms. *Toxicon.* **56**: 1284-1291.
- Calvete J. J., Sanz L., Cid P., de la Torre P., Flores-Díaz M., dos Santos M. C. *et al.* (2010). Snake venomomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *J. Proteome Res.* **9**: 528-544.
- Camey K. U., Velarde D. T. & Sanchez E. F. (2002). Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. *Toxicon.* **40**: 501-509.
- Campbell J. A. & Lamar W. W. (2004). *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Cornell University Press. Ithaca, USA
- Cardoso J. L., Fan H. W., França F. O. S., Jorge M. T., Leite R. P., Nishioka S. A. *et al.* (1993) Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in Sao Paulo, Brazil. *Q. J. Med.* **86**: 315-25.
- Cardoso J. L. C., França F. O. S., Wen F. H., Málaque C. M. S. & Haddad Jr V. (2009). *Animais Peçonhentos no Brasil*. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. 2ª edición. Ed. Sarvier. São Paulo, Brasil.
- Chippaux J. P. (2002) Les envenimations ophidiennes en Guyane Française. *Méd. Trop.* **62**: 177-184.
- da Silva N. J. & Bucarechi F. (2009) Mecanismo de ação do veneno elapídico e aspectos clínicos dos acidentes. pp. 116-124. En: *Animais Peçonhentos no Brasil*. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. Eds. Cardoso J. L. C., França F. O. S., Wen F. H., Málaque C. M. S. & Haddad Jr V. 2ª ed. Sarvier, São Paulo, Brasil.
- de Oliveira R. C., Wen F. H. & Sifuentes D. N. (2009). Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. pp. 6-21. En: *Animais Peçonhentos no Brasil*. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. Eds. Cardoso J. L. C., França F. O. S., Wen F. H., Málaque C. M. S. & Haddad Jr V. 2ª ed. Sarvier, São Paulo, Brasil.
- de Roodt A., Dolab J. A., Fernández T., Segre L. & Hajos E. E. (1998). Cross-reactivity and heterologous neutralisation of crotaline antivenoms used in Argentina. *Toxicon.* **36**: 1025-1038.
- Escalante T., Rucavado A., Fox J. W. & Gutiérrez J. M. (2011). Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *J. Proteomics*. (en prensa).
- Fan H. W. & Cardoso J. L. (1995) Clinical toxicology of snake bites in South America. pp. 667-688. En: *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. Eds. Meier J. & White J. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.

- Fernández P. & Gutiérrez J. M. (2008). Mortality due to snakebite envenomation in Costa Rica (1993-2006). *Toxicon*. **52**: 530-533.
- Fernández G. P., Segura A., Herrera M., Velasco W., Solano G., Gutiérrez J. M. *et al.* (2010). Neutralization of *Bothrops matogrossensis* snake venom from Bolivia: experimental evaluation of llama and donkey antivenoms produced by caprylic acid precipitation. *Toxicon*. **55**: 642-645.
- Fernández J., Alape-Girón A., Angulo Y., Sanz L., Gutiérrez J. M., Calvete J. J. *et al.* (2011). Venomic and antivenomic analyses of the Central American coral snake, *Micrurus nigrocinctus* (Elapidae). *J. Proteome Res.* **10**: 1816-1827.
- Gomez H. F. & Dart R. C. (1995). Clinical toxicology of snakebite in North America. pp. 619-644. En: *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*. Eds. Meier J. & White J. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- González-Andrade F. & Chippaux J. P. (2010). Snake bite envenomation in Ecuador. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **104**: 588-591.
- Gutiérrez J. M. (2002). Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Rev. Biol. Trop.* **50**: 377-394.
- Gutiérrez J. M. (2009a). Snakebite envenomation in Central America. pp. 491-507. En: *Handbook of venoms and toxins of reptiles*. Ed. Mackessy S.P. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Gutiérrez J. M. (2009b). Hacia una mayor integración de las ciencias naturales y las ciencias sociales: análisis de un caso relacionado con un problema de salud pública. *Trama* (Instituto Tecnológico de Costa Rica). **2**: 30-38.
- Gutiérrez J. M. & Sasa M. (2002). Bites and envenomations by colubrid snakes in Mexico and Central America. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **21**: 105-115.
- Gutiérrez J. M. & León G. (2009). Snake Antivenoms. Technological, clinical and public health issues. pp. 393-421. En: *Animal toxins: State of the art perspectives in health and biotechnology*. Eds. de Lima ME, Pimenta AMC, Martin-Euclaire MF & Zingalli RB. Editora UFMG. Belo Horizonte, Brasil.
- Gutiérrez J. M. & Lomonte B. (2009). Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. pp. 352-365. En: *Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Eds. Cardoso J. L. C., França F. O. S., Wen F. H., Málaque C. M. S. & Haddad Jr V. 2ª ed. Sarvier, São Paulo, Brasil.
- Gutiérrez J. M., Gené, J. A., Rojas G. & Cerdas L. (1985). Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon*. **23**: 887-893.
- Gutiérrez J. M., Rucavado A., Escalante T. & Díaz C. (2005). Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*. **45**: 997-1011.
- Gutiérrez J. M., Theakston R. D. G. & Warrell D. A. (2006). Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PLoS Med.* **3**: 5150.
- Gutiérrez J. M., Higashi H. G., Wen F. H. & Burnouf T. (2007). Strengthening antivenom production in Central and South American public laboratories: report of a workshop. *Toxicon*. **49**: 30-35.
- Gutiérrez J. M., Lomonte B., León G., Alape-Girón A., Flores-Díaz M., Sanz L. *et al.* (2009a). Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *J. Proteomics*. **72**: 165-182.
- Gutiérrez J. M., Fan H. W., Silvera C.L. & Angulo Y. (2009b). Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: report of a workshop. *Toxicon*. **53**: 625-630.
- Gutiérrez J. M., Williams D., Fan H. W. & Warrell D. A. (2010). Snakebite envenoming from a global

- perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*. **56**: 1223-1235.
- Hansson E., Cuadra S., Oudin A., de Jong K., Stroh E., Torén K. & Albin M. (2010). Mapping snakebite epidemiology in Nicaragua. Pitfalls and possible solutions. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**: e896.
- Harrison R. A., Hargreaves A., Wagstaff S. C., Faraguer B. & Lalloo D. G. (2009). Snake envenoming: a disease of poverty. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**: e569.
- Hunt P. (2007). *Neglected Diseases: A Human Rights Analysis*. World Health Organization, Geneva.
- Instituto Clodomiro Picado (2008). *Determinación de Actividades Tóxicas de Venenos de Serpientes y su Neutralización por Antivenenos*. Manual de Métodos de Laboratorio. Instituto Clodomiro Picado. San José, Costa Rica.
- Instituto Clodomiro Picado (2009). *El Envenenamiento por Mordedura de Serpiente en Centroamérica*. Instituto Clodomiro Picado. San José, Costa Rica.
- Kasturiratne A., Wickremasinghe A. R., de Silva N., Gunawardena N. K., Pathmeswaran A., Premaratna R. *et al.* (2008). The global burden of snakebite: a literature analysis and modeling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Medicine*. **5**: e218.
- Kliksberg B. (2007). América Latina. El caso de la salud pública. pp. 121-185. En: *Primero la Gente. Una Mirada desde la Ética del Desarrollo a los Principales Problemas del Mundo Globalizado*. Eds. Sen A. & Kliksberg B. Temas, Buenos Aires, Argentina.
- Larrick J. W., Yost J. A. & Kaplan J. (1978). Snake bite among the Waorani Indians of eastern Ecuador. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**: 542-543.
- Leão L. I., Ho P. L. & Junqueira-de-Azevedo I. L. (2009) Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. *BMC Genomics*. **10**: 112.
- Leynaud G. C. & Reati G. J. (2009). Identificación de las zonas de riesgo ofídico en Córdoba, Argentina, mediante el programa SIGEpi. *Rev. Panam. Salud Pública*. **26**: 64-69.
- Manock S. R., Suárez G., Graham D., Avila-Agüero M. L. & Warrell D. A. (2008). Neurotoxic envenoming by South American coral snake (*Micrurus lemniscatus helleri*): case report from eastern Ecuador and review. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **102**: 1127-1132.
- Ministerio da Saúde (1998). *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos*. Ministerio da Saúde. Brasília, Brasil.
- Ministerio de Salud (2007). *Guía de Prevención, Diagnóstico, Tratamiento y Vigilancia Epidemiológica de los Envenenamientos Ofídicos*. Ministerio de Salud. Buenos Aires, Argentina.
- Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (2008). *Manual de Procedimientos sobre Accidentes Ofídicos*. Organización Panamericana de la Salud. Asunción, Paraguay.
- Olamendi-Portugal T., Batiasta C. V., Restano-Cassulini R., Pando V., Villa-Hernández O., Zavaleta Martínez-Vargas A. *et al.* (2008) Proteomic analysis of the venoms from the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*: novel toxins, their function and phylogeny. *Proteomics*. **8**: 1919-1932.
- Otero R., Tobón G. S., Gómez L. F., Osorio R., Valderrama R., Hoyos D. *et al.* (1992). Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (marzo de 1989-febrero de 1990). *Acta Méd. Coloma*. **17**: 229-249.
- Otero R., Núñez V., Osorio R. G., Gutiérrez J. M., Giraldo C. A. & Posada L. E. (1995). Ability of six Latin American antivenoms to neutralize the venom of mapaná equis (*Bothrops atrox*) from Antioquia and Chocó (Colombia). *Toxicon*. **33**: 809-815.
- Otero R., Gutiérrez J.M., Núñez V., Robles A., Estrada R., Segura E. *et al.* (1996). A randomized double-blind clinical trial of two antivenoms in patients bitten by *Bothrops atrox* in Colombia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **90**: 696-700.

- Otero R., Gutiérrez J. M., Rojas G., Núñez V., Díaz A., Miranda E. *et al.* (1999). A randomized blinded clinical trial of two antivenoms, prepared by caprylic acid or ammonium sulphate fractionation of IgG in *Bothrops* and *Porthidium* snake bites in Colombia: correlation between safety and biochemical characteristics of antivenoms. *Toxicon*. **37**: 895-908.
- Otero R., Gutiérrez J., Mesa M. B., Duque E., Rodríguez O., Arango J. L. *et al.* (2002). Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon*. **40**: 1107-1114.
- Otero R., León G., Gutiérrez J. M., Rojas G., Toro M. F., Barona J. *et al.* (2006). Efficacy and safety of two whole IgG polyvalent antivenoms, refined by caprylic acid fractionation with or without  $\beta$ -propiolactone, in the treatment of *Bothrops asper* bites in Colombia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100**: 1173-1182.
- Otero-Patiño R. (2009). Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. *Toxicon*. **54**: 998-1011.
- Otero-Patiño R., Cardoso J.L. C., Higashi H. G., Núñez V., Díaz A., Toro M. F. *et al.* (1998). A randomized, blinded, comparative trial of one pepsin-digested and two whole IgG antivenoms for *Bothrops* snake bites in Uraba, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**: 183-189.
- Otero-Patiño R., Silva-Haad J. J., Barona-Acevedo M. J., Toro-Castaño M. F., Quintana-Castillo J. C., Díaz-Cadavid A. *et al.* (2007) Accidente bothrópico en Colombia: estudio multicéntrico de la eficacia y seguridad de Antivipmyn-Tri<sup>®</sup>, un antiveneno polivalente producido en México. *Iatreia*. **20**: 244-262.
- Pardal P. P., Souza S. M., Monteiro M. R., Fan H. W., Cardoso J. L., França F. O. S. *et al.* (2004). Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and *Lachesis* bites in the north eastern Amazon region of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **98**: 28-42.
- Pierini S. V., Warrell D. A., de Paulo A. & Theakston R. D. G. (1996). High incidence of bites and stings by snakes and other animals among rubber tappers and Amazonian Indians of the Juruá valley, Acre state, Brazil. *Toxicon*. **34**: 225-236.
- Prado-Franceschi J. & Hyslop S. (2002). South American colubrid envenomations. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **21**: 117-158.
- Rahman R., Faiz M. A., Selim S., Rahman B., Basher A., Jones A. *et al.* (2010). Annual incidence of snake bite in rural Bangladesh. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**: e860.
- Rodrigues-Silva R., Antunes G. F., Velarde D. T. & Santoro M. M. (1999). Thermal stability studies of hyperimmune horse antivenoms. *Toxicon*. **37**: 33-45.
- Rodríguez-Acosta A., Mondolfi A., Orihuela R. & Aguilar M. (1995). *¿Qué hacer frente a un accidente ofídico?* Venediciones. Caracas, Venezuela.
- Rojas E., Quesada L., Arce V., Lomonte B., Rojas G. & Gutiérrez J. M. (2005). Neutralization of four Peruvian *Bothrops* sp snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Perú and Costa Rica: preclinical assessment. *Acta Trop.* **93**: 85-95.
- Sano-Martins I. S. & Santoro M. L. (2009). Distúrbios hemostáticos em envenenamentos por animais peçonhentos no Brasil. pp. 331-351. En: *Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Eds. Cardoso J. L. C., França F. O. S., Wen F. H., Málaque C. M. S. & Haddad Jr V. 2<sup>a</sup> ed. Sarvier, São Paulo, Brasil.
- Saravia P., Rojas E., Arce V., Guevara C., López J. C., Chaves E. *et al.* (2002). Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: pathophysiological and therapeutic implications. *Rev. Biol. Trop.* **50**: 337-346.
- Saravia P., Rojas E., Escalante T., Arce V., Chaves E., Velásquez R. *et al.* (2001). The venom of *Bothrops asper* from Guatemala: toxic activities and neutralization by antivenoms. *Toxicon*. **39**: 401-405.
- Sasa M. & Vázquez S. (2003) Snakebite envenomation in Costa Rica: a revision of incidence in the decade 1990-2000. *Toxicon*. **41**: 19-22.

- Segura A., Herrera M., González E., Vargas M., Solano G., Gutiérrez J. M. *et al.* (2009). Stability of equine IgG antivenoms obtained by caprylic acid precipitation: towards a liquid formulation stable at tropical room temperature. *Toxicon*. **53**: 609-615.
- Segura A., Castillo M. C., Núñez V., Yarlequé A., Gonçalves L. R. C., Villalta M. *et al.* (2010). Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*. **56**: 980-989.
- Serrano S. M. T., Shannon J. D., Wang D., Camargo A. C. & Fox J. W. (2005). A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understand venom Proteomics. *Proteomics*. **5**: 501-510.
- Smalligan R., Cole J., Brito N., Laing G. D., Mertz B. L., Manock S. *et al.* (2004). Crotaline snake bite in the Ecuadorian Amazon: randomised double blind comparative trial of three South American polyspecific antivenoms. *B. M. J.* **329**: 1129.
- Tanaka G. D., Furtado M. F. D., Portaro F. C., Sant'Anna O. A. & Tambourgi D. V. (2010). Diversity of *Micrurus* snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**: e622.
- Teixeira C., Cury Y., Moreira V., Picolo G. & Chaves F. (2009). Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon*. **54**: 988-997.
- Theakston R. D. G., Laing G. D., Fielding C. M., Lascano A. F., Touzet J. M., Vallejo F. *et al.* (1995). Treatment of snake bites by *Bothrops* species and *Lachesis muta* in Ecuador: laboratory screening of candidate antivenoms. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **89**: 550-554.
- Thomas L., Tyburn B., Bucher B., Pecout F., Ketterle J., Rieux D. *et al.* (1995). Prevention of thromboses in human patients with *Bothrops lanceolatus* envenoming in Martinique: failure of anticoagulants and efficacy of a monospecific antivenom. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **52**: 419-426.
- Thomas L., Tyburn B. & Research Group on Snake Bite in Martinique (1996). *Bothrops lanceolatus* bites in Martinique: Clinical aspects and treatment. pp. 255-265. En: *Envenomings and Their Treatments*. Eds. Bon C. & Goyffon M. Fondation Marcel Mérieux, Lyon, Francia.
- Vital Brazil O. (1987a). Coral snake venoms: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. *Rev. Med. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **29**: 119-126.
- Vital Brazil O. (1987b) History of the primordia of snake-bite accident serotherapy. *Mem. Inst. Butantan*. **49**: 7- 20.
- Warrell D. A. (2004). Snakebites in Central and South America: Epidemiology, clinical features, and clinical management. pp. 709-761. En: *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere, vol I*. Eds. Campbell J.A. & Lamar W.W. Cornell University Press. Ithaca, USA.
- Williams D., Gutiérrez J. M., Harrison R., Warrell D. A., White J., Winkel K. D. *et al.* (2010). The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. *Lancet*. **375**: 89-91.
- WHO (2007a). Rabies and envenomings. A neglected public health issue. World Health Organization, Geneva. Documento en línea: [www.who.int/bloodproducts/animal\\_sera/Rabies.pdf](http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/Rabies.pdf) (Consultado: 2011, 7 de abril).
- WHO (2007b). WHO Model List of Essential Medicines. WHO, Geneva. Documento en línea: [www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/index.html](http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/index.html) (Consultado: 2011, 7 de abril).
- WHO (2010). Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. WHO, Geneva. Documento en línea: [www.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms](http://www.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms) (Consultado: 2011, 3 de abril).

---

Recibido el 04/10/2010  
Aceptado el 21/12/2010

## Artículos Originales //

### Monitoreo *in vitro* de la susceptibilidad del *Plasmodium falciparum* a cinco drogas antimaláricas. Estado Amazonas, Venezuela

#### *Monitoring susceptibility of Plasmodium falciparum vs. five antimalarial drugs. Amazonas state, Venezuela*

Irma Rodríguez\*, Anibal Carrasquel & Margarita González

#### RESÚMEN

Se evaluó la susceptibilidad a cinco drogas antimaláricas en aislados de *Plasmodium falciparum*, en el municipio Atures del estado Amazonas. Se empleó la técnica de maduración de esquizontes (sistema de la OMS Mark II). Los parásitos fueron sensibles: a 64 pmol de mefloquina en 56/56 aislados; a 256 pmol de quinina en 56/60 aislados; a 1000 pmol de sulfadoxina/ pyrimetamina en 15/22 aislados; a 4 pmol de amodiaquina en 34/59 aislados y a 8 pmol de cloroquina en 34/58 aislados. Los valores del 50% de la Concentración Inhibitoria en pmol/pozo a mefloquina es 1,11; a quinina 7,60; a sulfadoxina-pyrimetamina 21,60; a cloroquina 1,23 y a amodiaquina 0,66. Se demostró en aislados de *P. falciparum* sensibilidad a mefloquina, disminución de la sensibilidad a quinina y resistencia a cloroquina, amodiaquina, sulfadoxina-pyrimetamina. Se sugiere implementar *in vitro* un monitoreo de variaciones temporales en la susceptibilidad a los antimaláricos empleados por el Programa de Control de la Malaria en Amazonas, como un sistema de alerta temprana de la resistencia.

**Palabras clave:** *Plasmodium falciparum*, *in vitro*, susceptibilidad, antimaláricos, Amazonas.

#### SUMMARY

The susceptibility of isolates of *Plasmodium falciparum* of the municipality Atures in Amazonas state, Venezuela, to five antimalarial drugs was evaluated using the schizont maturation inhibition technique (OMS Mark II). Parasites were sensible to: 64 pmol mefloquine in 56/56 isolates; 256 pmol of quinine in 56/60 isolates; 1000 pmol of sulfadoxinepyrimethamine in 15/22 isolates; 4 pmol of amodiaquine in 34/59 isolates; 8 pmol of chloroquine in 34/58 isolates. The values of the 50% inhibition concentration (IC50, geometric mean) were as follows: mefloquine = 1.11pmol; quinine = 7.60 pmol; sulfadoxine-pyrimethamine = 21.60 pmol; chloroquine= 1.23 pmol; amodiaquine = 0.66 pmol. The present study confirms full sensibility of the strains to mefloquine, and decreasing sensibility to quinine, chloroquine, amodiaquine and sulfadoxine-pyrimethamine. The susceptibility of *P. falciparum* to antimalarial drugs needs continuous monitoring in order to detect the emergence of resistant strains and to guarantee the quality of the malaria control programme of Amazonas, Venezuela.

**Key words:** *Plasmodium falciparum*, *in vitro*, susceptibility, antimalarial, Amazonas.

#### INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad parasitaria, producida por 4 especies de *Plasmodium*: *P. ovale*, *P. malariae*, *P. vivax* y *P. falciparum*, siendo esta última especie causante de la malaria grave, complicada y de muertes. En el 2008 se registró 247 millones de

casos de paludismo, causantes de cerca de un millón de muertes, sobre todo en niños africanos. En África, cada 45 segundos muere un niño de paludismo, y la enfermedad es responsable de un 20% de las muertes infantiles (OMS, 2011). La situación en América no es tan grave, probablemente porque *P. vivax* causa la mayoría de los casos, y raramente se ha observado

Servicio Autónomo Centro Amazónico de Investigación y Control de Enfermedades Tropicales "Simón Bolívar", Puerto Ayacucho, Estado Amazonas, Ministerio del Poder Popular de Salud.

\*Autor de correspondencia: rodir@hotmail.com

complicaciones por *P. vivax*, sin embargo esta especie causa múltiples recidivas y considerable morbilidad, debido a que los fármacos con acción curativa radical disponibles requieren de un esquema de tratamiento prolongado y por razones operacionales se dificulta el cumplimiento (Pérez, 2004). Sin embargo, existen áreas con transmisión de *P. falciparum* resistente a drogas antimaláricas (Tangpukdee *et al.*, 2009; Mendis *et al.*, 2001).

La resistencia a las drogas antimaláricas por *P. falciparum* fue reportada en Venezuela en el año 1959: en Trujillo se registró la resistencia a los inhibidores de la dihidrofolato reductasa (DHFR) como la pirimetamina (Maberti, 1960), en Bolívar se reportó la resistencia a la sulfadoxina-pyrimetamina (Godoy *et al.*, 1977; Caraballo & Rodríguez, 1999), resistencia a la cloroquina (Navarrete *et al.*, 1986; Caraballo & Rodríguez, 1999; Aché *et al.*, 2002). En Amazonas se ha reportado falla terapéutica de la cloroquina en el municipio Atures en 50% de 22 pacientes evaluados, (Maynadié *et al.*, 1989), en 100% de 20 pacientes evaluados (Rodríguez *et al.*, 2005); en el Municipio Manapires en 33% de 18 pacientes evaluados; en el Municipio Alto Orinoco 68% de 22 pacientes evaluados (Certad *et al.*, 2005).

Para la década de los 90, el mayor índice parasitario anual de malaria lo presentaba Amazonas, con 12% de los 22.000 casos registrados en Venezuela, 67% *P. vivax*, 31,2% *P. falciparum* y 0,8% *P. malariae* e infecciones mixtas. (Aché, 1998; Informe de gestión CAICET, 1998). El año 2007 en Amazonas se registraron 7736 casos (83%) de *P. vivax*, 1416 (16%) casos de *P. falciparum*, 12 casos (0,1%) de *P. malariae* y 40 casos (0,4%) infecciones mixtas (Metzger, *et al.*, 2009). El año 2010 en Amazonas se registraron 2118 casos (75%) de *P. vivax*, 635 (22%) casos de *P. falciparum*, 57 casos (2%) de *P. malariae* y 18 casos (0,6%) infecciones mixtas. En el año 2003 se registraron 2193 casos de *P. falciparum*, lo que representa una disminución de 3,5 veces menos casos de *P. falciparum* en Amazonas respecto el año 2010 (Sub Dirección de Salud Ambiental Amazonas, 2010).

La disminución de los casos de malaria *P. falciparum*, obedece a la toma de acciones al cambiar el tratamiento de primera línea (cloroquina) por la combinación de mefloquina-artesunato-primaquina (esquema de tres días) para la malaria no complicada causada por *P. falciparum*, y continuar con el uso de

cloroquina y primaquina (esquema de 14 días) para la malaria causada por *P. vivax*. (Metzger *et al.*, 2009).

Con el fin de desarrollar un monitoreo de la resistencia para generar información base del uso de antimaláricos adecuados en poblaciones que viven en Atures, y establecer con el uso de pruebas *in vitro* un sistema de vigilancia de las drogas antimaláricas en Amazonas; se monitoreó *in vitro* la susceptibilidad del *P. falciparum* a los antimaláricos: quinina, mefloquina, amodiaquina, cloroquina y sulfadoxina-pyrimetamina, en el municipio Atures.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio y población

El presente trabajo fue desarrollado en el municipio Atures del estado Amazonas venezolano durante 1998- 2002 (en los meses Julio a Diciembre de 1988; Febrero a Agosto de 1999 y de 2000; Noviembre a Diciembre de 2001 y Enero a Julio de 2002). Para la selección de los voluntarios se consideraron tres puestos de diagnóstico de malaria en Puerto Ayacucho: Centro Amazónico de Investigación para el Control de Enfermedades Tropicales (CAICET), Laboratorio Central de Malaria y Hospital José Gregorio Hernández. En estos puestos se hace el examen microscópico “La gota gruesa y extendido” para determinar la morfología y parasitemia de la especie de *Plasmodium* que causa la malaria o paludismo. Para el estudio se seleccionaron aquellos individuos procedentes del municipio Atures, que cumplieron con los criterios de selección de la OMS (1990): pacientes con malaria no complicada, mayores de 1 año, únicamente con anillos y trofozoitos de *P. falciparum*, con parasitemias entre 1000 y 80.000 parásitos/μl de sangre, que no habían ingerido antimaláricos en los últimos tres meses y previamente informados sobre el estudio accedieron voluntariamente a donar las muestras de sangre.

### Parásitos

De cada voluntario se extrajeron tres mililitros de sangre venosa recolectada en tubos con citrato de sodio, cada muestra de sangre se conservó a 37°C hasta el momento de su uso, en el laboratorio del CAICET, las muestras se centrifugaron a 2.500 rpm 5 minutos a temperatura ambiente, para obtener la capa sedimentada de eritrocitos, se descartó el plasma y las células blancas. El paquete de eritrocitos, se

centrifugó a 2.500rpm por 5 minutos por tres veces con una solución A pH 6,8: de 10,4g/L de RPMI 1640, suplementado con 2g/L de glucosa, 5,9g/L de HEPES, 0,1g/L de hypoxantina y 5mL/L al 5% (p/v) NaHCO<sub>3</sub>. Se obtuvieron los aislados frescos de *P. falciparum* de cada paquete de eritrocitos. Todos los productos fueron de la casa: Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA.

#### Ensayo de susceptibilidad a las drogas antimaláricas

Los eritrocitos parasitados se mezclaron con medio de cultivo RPMI 1640: solución A + 1mL/L al 3% (p/v) L-glutamine y 1mL/L al 5% (p/v) glutathione (para el caso de cloroquina, amodiaquina, quinina, y mefloquina); y medio de cultivo LPLF® (para el caso de la prueba con sulfadoxina/ pirimetamina), ambos medios suplementados al 10% con plasma humano AB+ (cortesía del Banco de Sangre del Hospital José Gregorio Hernández) inactivado a 56°C/30'. De cada mezcla sangre (4% de eritrocitos parasitados) medio, 50µl fueron agregados en duplicado en cada pozo de las placas predosificadas con las drogas antimaláricas (producidas por la OMS Filipinas/ OMS Malasia), luego se incubó en una cámara con CO<sub>2</sub> (producido al encender una vela) a 37°C por 24 a 48 horas, al finalizar la incubación, de cada pozo se hizo una gota gruesa, se coloreó con Giemsa al 20% pH 6,8 por 5 minutos y luego se examinó por microscopía.

Cada prueba se consideró válida al observar en cada gota gruesa con objetivo de 100X en el pozo control (sin droga), la presencia de más de 10% (20 esquizontes/200 parásitos asexuales: trofozoitos+esquizontes) esquizontes de 3 o más núcleos para cloroquina, amodiaquina, quinina, y mefloquina, y esquizontes de 8 o más núcleos para sulfadoxina/ pyrimetamina. La resistencia se consideró

cuando se observó esquizontes de *P. falciparum* en presencia de la mínima concentración de la droga que inhibe el desarrollo de los parásitos (Tabla I) y se evaluó para cada droga la concentración inhibitoria (IC) que inhibe el 50% de los parásitos (OMS, 1990). Con 10 pruebas válidas el resultado del análisis de la susceptibilidad es aceptable (OMS, 1990- 2001).

#### Análisis estadístico

Para cada droga se estimó con el software PROBIT la media geométrica de IC<sub>50</sub> que se requiere para inhibir el crecimiento del 50% de la población de *Plasmodium*.

#### Consideraciones éticas

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético del Centro Amazónico de Investigación y Control de Enfermedades Tropicales "Simón Bolívar" (CAICET).

#### RESULTADOS

Durante los meses: Julio a Diciembre de 1988; Febrero a Agosto de 1999 y de 2000; Noviembre a Diciembre de 2001 y Enero a Julio de 2002, se mantuvo vigilancia en los centros centinelas para la búsqueda de los casos de *P. falciparum*. Se registraron 210/ 955= 22% casos de *P. falciparum* que cumplieron con los criterios de selección recomendados por la OMS (1990) y solo 88/210= 42% voluntarios donaron las muestras de sangre venosa. Los cultivos exitosos resultaron ser, aquellas muestras de sangre procesadas antes de las 4 horas luego de la extracción venosa, aislados con parasitemias de inicio entre 1.200 a 9.000 parásitos/ µl de sangre. El tiempo medio de duración de los cultivos fue de 34±4 horas; al finalizar el cultivo, en cada pozo

**Tabla I. Rango de concentración (pmol/pozo) de cinco antimaláricos.**

POZO	cloroquina	amodiaquina	quinina	mefloquina	Sulfadoxina/pyrimetamina
B	1	0.25	4	2	10
C	2	0.50	8	4	30
D	4	1	16	8	100
E	8 *	2	32	16	300
F	16 *	4*	64	32	1000*
G	32*	8*	128	64*	3000*
H	64*	16*	256*	128*	10000*

\*Concentraciones que inhiben la formación de esquizontes (indicador de resistencia)

control se contaron desde 20 a 182 esquizontes por 200 parásitos asexuales.

La distribución general de pruebas válidas fue 58/88 = 66% para la cloroquina 59/88 = 67% para la amodiaquina 60/88 = 68% para la quinina, 56/88 = 64% para la mefloquina, 22/47 = 47% para la sulfadoxina/pyrimetamina, el número de aislados 47 difiere de 88 debido a que el medio de cultivo LPLF® se adquirió con retraso.

La inhibición completa de la maduración de los esquizontes fue 34/58 = 59% aislados a 8 pmol/pozo de cloroquina; 34/59 = 58% aislados a 4 pmol/pozo de amodiaquina; 56/60 = 93% aislados a 256 pmol/pozo de quinina; 56/56 = 100% aislados a 64 pmol/pozo de mefloquina y de 15/22 = 68% aislados a 1000 pmol/pozo de sulfadoxina/pyrimetamina, de acuerdo a los estándares de la OMS (1990) cada una de estas concentraciones son consideradas para representar la susceptibilidad a las drogas. La concentración de cada droga que inhibe el 50% de la maduración de los esquizontes (IC<sub>50</sub>) fue calculada con el software PROBIT y se resume en la Tabla II.

## DISCUSIÓN

El ensayo de susceptibilidad a las cinco drogas antimaláricas del *Plasmodium falciparum*, a través de las pruebas de maduración de esquizontes de la OMS: permitió determinar entre 24 a 48 horas, en parásitos frescos aislados en campo, la concentración de la droga que inhibe la maduración de esquizontes; básicamente sin riesgo para el paciente, puesto que no incluye procedimientos invasivos a parte de la recolección de muestra de sangre periférica, sin embargo, tiene una intensa labor particular, puesto que requiere de personal altamente entrenado en microscopía. Los valores de la media geométrica IC<sub>50</sub> en pmol/pozo de cloroquina 1,23; amodiaquina 0,66; quinina 7,60;

mefloquina 1,11 y sulfadoxina-pyrimetamina 21,60, están por debajo de las concentraciones consideradas inhibitorias del crecimiento de los parásitos, de acuerdo a los valores estándares de la micro-prueba *in vitro* (Mark II). Noedl *et al.* (2004) señalan que las pruebas *in vitro*, permiten medir la resistencia intrínseca de una droga en *Plasmodium*, pero una de las limitaciones de las pruebas *in vitro* con aislados frescos, es que estos aislados son pul de poblaciones de parásitos sensibles y/o resistentes. Cuando en un aislado la proporción de parásitos resistentes y sensibles a una droga son iguales, predominará el valor de la IC<sub>50</sub> de los parásitos resistentes.

Sin embargo, la proporción de aislados que mostraron esquizontes en las concentraciones inhibitorias del crecimiento de los parásitos en cada una de las drogas evaluadas, cloroquina, amodiaquina, quinina, mefloquina y sulfadoxina-pyrimetamina en 41%, 42%, 7%; 0% y 36% respectivamente, evidencia la presencia de *P. falciparum* resistente a la: cloroquina, amodiaquina y sulfadoxina-pyrimetamina. Reducción de la sensibilidad a la quinina en 7% y sensibilidad a la mefloquina en 100%, si comparamos estos resultados con los observados previamente en el municipio Atures por Maynadié, *et al.* (1989), quienes reportaron aislados de *P. falciparum* resistentes a la cloroquina en 25% y resistencia a la mefloquina en 11%. Estas observaciones muestran un aumento de la proporción de aislados resistentes del *P. falciparum* a la cloroquina, amodiaquina (4-aminoquinoleinas); inclusive podrían considerarse como un aviso de alerta temprana de la disminución de la actividad antimalárica de quinina y un alerta para el uso adecuado de la mefloquina, debido a la similitud en la estructura molecular en ambas drogas, como lo mencionó Maynadié *et al.* (1989).

La resistencia a las drogas antimaláricas está condicionada por presión de la droga sobre los parásitos (Young *et al.*, 1961; Kremsner *et al.*, 1989; Brasseur *et*

**Tabla II. Concentración (pmol / pozo) de las drogas que inhiben el 50% de la maduración de esquizontes de aislado de *P. falciparum*. Atures Amazonas 1998-2002.**

IC (%)	cloroquina	amodiaquina	quinina	mefloquina	Sul/pir
50	1,23	0,66	7,16	1,11	21,60
90	4,73	4,07	33,21	3,19	341,69
99	14,21	17,90	115,96	7,55	1804,41
Slope	2,19	1,62	1,92	2,79	1,06
Varianza EC <sub>50</sub>	5,84	5,81	6,13	3,11	7,11

al., 1993; Watkins *et al.*, 1993; Legrand *et al.*, 2008). En Venezuela desde 1946 se ha utilizado la cloroquina para el tratamiento de la malaria, se dejó de utilizar por un periodo de cuatro años (1988-1992) y durante este periodo, se administró la amodiaquina como droga de primera línea. La sulfadoxina-pirimetamina fue la droga de segunda línea y la quinina la droga de tercera línea. Las drogas cloroquina y amodiaquina son derivados de 4-aminoquinoleínas, poseen semejanza estructural y funcional y se han administrando en Venezuela por más de 5 décadas para el tratamiento de malaria a *P. falciparum*.

En el año 2005 en Venezuela se implementó cambios en la política de antimaláricos para tratamiento de la malaria por *P. falciparum*: se sustituyó a cloroquina como tratamiento de primera línea por la combinación de artesunato vs mefloquina, el coartem® como tratamiento de segunda línea, y la combinación quinina vs clindamicina como tratamiento de tercera línea. Al respecto Noedl *et al.* (2005), indican que la susceptibilidad a las drogas antimaláricas necesariamente deben ser monitoreadas continuamente para prevenir emergencias de la resistencia, las experiencias con cloroquina y sulfadoxina-pyrimetamina son muy claras, si las acciones son tomadas después de las fallas clínicas, esto al mismo tiempo, impide salvaguardar lo valioso de las drogas para el control de la malaria. En este sentido Bacon *et al.* (2007a), señalan que la actividad de las drogas antimaláricas sobre los parásitos se va perdiendo con el tiempo porque los parásitos desarrollan estrategias para evadir la acción antimalárica. Tomando en cuenta estas observaciones se considera que la vigilancia y prevención de la resistencia a las drogas son muy importantes en los Programas de Control de Malaria.

La OMS, plantea un sistema de monitoreo de variaciones temporales y espaciales en la susceptibilidad a los antimaláricos, como un sistema de alerta temprana de resistencia. Propone una metodología universal basada en la medición de los procedimientos y lectura de la prueba en condiciones controladas, con el uso de cepas de referencia resistentes y sensibles, puesto que no hay un valor estándar universal de  $IC_{50}$  comparable de laboratorio a laboratorio (Bacon *et al.*, 2007a; Kaddouri *et al.*, 2008). Actualmente se conocen 4 ensayos para evaluar las pruebas *in vitro*: la prueba morfológica del sistema de la OMS Mark III (OMS, 2001); los ensayos isotópicos, que miden la

incorporación de hypoxantina tritiada por el parásito; los métodos basados en ELISA: HRP II® y pLDH® y el ensayo de detección de DNA: SYBR®Green I o pico green (Noedl *et al.*, 2002, 2003; Basco, 2007; Bacon *et al.*, 2007b). El microtest de la OMS, requiere una intensiva labor particular, microscopistas altamente entrenado para disminuir variabilidad individual entre observadores. El ensayo isotópico, requiere alta parasitemias, equipo especializado y exclusivo, con riesgos de radiactividad. Los métodos basados mediante un ensayo inmunoenzimático ELISA, es fácil de ejecutar, requiere equipos de uso común, además, tiene sensibilidad similar al método microscópico y es altamente reproducible como el método radioisotópico (Noedl *et al.*, 2004); no obstante, requiere reactivos específicos para revelar la presencia de *P. falciparum* mucho más costosos que la gota gruesa del ensayo de la OMS. El uso de marcadores moleculares de la resistencia a los antimaláricos, también permiten servir como sistema de alarma de resistencia en poblaciones de parásitos del área en estudio (Sibley & Ringwald, 2006).

La  $IC_{50}$ , permite establecer la sensibilidad basal de los parásitos a una droga, evaluar el cambio en dicha sensibilidad en el tiempo, y los datos son la base para los estudios de eficacia terapéutica a nivel local (Ringwald, 2005). En los últimos 5 años, los países fronterizos con la amazonia venezolana, Colombia, Brasil y La Guyana, vienen empleando los métodos para evaluar la susceptibilidad a los antimaláricos *in vitro* recomendados por la OMS. Han reportado en aislados frescos de *P. falciparum* la media geométrica de la  $IC_{50}$  de cloroquina 422,9 nM; amodiaquina 131,4 nM; quinina 269,7 nM; mefloquina 56,3 nM y artesunato 1,88 nM, en Colombia (Arango *et al.*, 2008). La  $IC_{50}$  de cloroquina 100.1 nM; amodiaquina 22.3 nM; quinina 22.3 nM; mefloquina 22.3 nM y artemeter 2,03 nM; aunque en un área aislada se reportó artemeter 82.6 nM; en La Guyana Francesa (Legrand *et al.*, 2008). La  $IC_{50}$  de artesunato 0.85 nM y artemeter 3.0 nM; para Brasil en el estado Amazónico de Pará (Ferreira *et al.*, 2008). El área endémica en Guyana es un indicador de un alerta temprano del uso racional de los derivados de artemisina al Sur de América y que debe mantenerse la vigilancia de los antimaláricos. Los valores altos de  $IC_{50}$  de las 4 aminoquinolinas se debe a que continúa sobre *P. falciparum* la presión de la cloroquina, puesto que se emplea esta droga para el tratamiento de *P. vivax*, áreas donde ocurren infecciones mixtas (Lawpoolsri *et al.*, 2010).

En éste trabajo, se demuestra, que durante el periodo 1998 al 2002 en el municipio Atures circulaban *P. falciparum* que no eran eliminados con la cloroquina, amodiaquina y sulfadoxina-pyrimetamina, pero si por la mefloquina, con pérdida de la efectividad de quinina. Resultados que para ese momento generaron información importante que obligaron a evaluar los esquemas de tratamiento de primera y segunda línea *P. falciparum* en la región: como el estudio de Rodríguez *et al.*, 2005 y el de Certad *et al.*, 2005; los aportes de éstas investigaciones, sumados a los esfuerzos conjuntos de los países Amazónicos e instituciones (OPS/OMS, USAID, CDC, USP, MSH) para Hacer Retroceder la Malaria en la región de las Américas (Roll Back Malaria initiative), impulsaron al Programa de Control de Malaria a participar en La Red Amazónica de Vigilancia de la Resistencia a los Antimaláricos (RAVREDA) y la Iniciativa Amazónica para la Malaria (AMI), cuyos resultados produjeron el cambio de las políticas del tratamiento terapéutico para *P. falciparum* en Venezuela.

Este estudio ratifica que las pruebas *in vitro* permiten monitorear la susceptibilidad a los antimaláricos, por lo que se recomienda implementar un sistema de monitoreo de variaciones temporales y espaciales en la susceptibilidad a los antimaláricos de primera línea artesunato, mefloquina, y de segunda línea quinina que actualmente emplea el Programa de Control de la Malaria *P. falciparum* en Amazonas. Esto permitiría lograr un sistema de alerta temprana de la resistencia y poder preservar lo valioso de la actividad de las drogas.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el soporte financiero de la Agenda Salud FONACIT- proyecto Mal-96004. A Magda Magris; a Carlos Botto, al personal del Servicio de Endemias de Amazonas: por su colaboración en la realización del estudio.

#### REFERENCIAS

Aché A. (1998). Situación actual de la malaria en Venezuela. *Bol. Malar. Saneam. Amb.* **38**: 31-36.

Aché A., Escorihuela M., Vivas E., Páez E., Miranda I., Matos A., Pérez W., Díaz O. *et al.* (2002). *In vivo* drug resistance of *P. falciparum* malaria in

mining areas of Venezuela. *Trop. Med. Int. Health.* **7**: 737-743.

- Arango E., Carmona-Fonseca J. & Blair S. (2008). Susceptibilidad *in vitro* de aislamientos colombianos de *Plasmodium falciparum* a diferentes antipalúdicos. Documento en línea: <http://www.scielo.org.co/scielo.php> (Consultado 2011, Marzo 16).
- Bacon D. J., Jambou R., Fandeur T., Le Bras J., Wongsrichanalai Ch., Ringwald P., *et al.* (2007a). World Antimalarial Resistance Network (WARN) II: *In vitro* antimalarial drug susceptibility. *Mal J.* **6**: 120.
- Bacon D. J., Latour C., Lucas C., Colins O., Ringwald P. & Picos S. (2007b). Comparison of a SYBER green I-based assay with a histidine-rich protein II enzyme-linked immunosorbent assay for *in vitro* antimalarial drug efficacy testing and application to clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**: 1172-1178.
- Basco L. K. (2007). Field application of *in vitro* assays sensitivity of human malaria parasites antimalarial drugs. WHO. Geneva, Switzerland.
- Basco L. & Pascal R. (2007). Molecular epidemiology of malaria in Cameoon. XXXIV. Trends of *in vitro* antimalarial drug responses in Yaunde, Cameroon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **76**: 20-26.
- Brasseur P., Bitsindou P., Mayon R., Eggelte T., Samba G., Penchenier L., *et al.* (1993). For emergence of *Plasmodium falciparum* resistance to halofantrine. *Lancet.* **341**: 901-902.
- Caraballo A. & Rodríguez A. (1999). La quimioterapia de malaria y resistencia a las drogas antimalariales en el área de Guyana Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **61**: 120-124.
- Certad G., Wide A., Rodríguez I., Capaldo J., Zárate M., Galbán N., *et al.* (2005). Respuesta terapéutica y parasitemia en pacientes con malaria por *Plasmodium falciparum* en diferentes comunidades del estado Amazonas, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **45**: 19-25.

- Ferreira, I. D., Martinelli, A., Rodrigues, L. A., Do Carmo, E. L., Do Rosário, V. E., Póvoa, M. M. and Cravo, P. (2008), *Plasmodium falciparum* from Pará state (Brazil) shows satisfactory *in vitro* response to artemisinin derivatives and absence of the S769N mutation in the SERCA-type PfATPase6. *Trop. Med. Int. Health.* **13**: 199-207.
- Godoy G. A., Volcan G. S., Guevara R., Medrano C., Castro J. & Texeira A. (1977). Venezuelan strains of *Plasmodium falciparum* resistant to sulfa and pyrimetamine by *in vitro* test. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **19**: 229-231.
- Kaddouri H., Abdoulaye D., Souleymane D., Aly K., Mamadou T., Ve'ronique H., Aminatou K. *et al.* (2008). Baseline *in vitro* efficacy of ACT component drugs on *Plasmodium falciparum* clinical isolates from Mali. *Int. J. Parasitol.* **38**: 791-798.
- Kremsner P., Zatter G., Feldmeier H., Bienzleu U., Janse-Resseck R., Graninger W., *et al.* (1989) Differences in drug response of *Plasmodium falciparum* within an area of the Amazon region. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **83**: 158-161.
- Lawpoolsri S., Chavéz I. F., Yimsamran S., Puangsa-art S., Thanyavanich N., Maneeboonyang W. *et al.* (2010): The impact of human reservoir of malaria at a community-level on individual malaria occurrence in a low malaria transmission setting along the Thai-Myanmar border. Documento en línea: <http://www.malariajournal.com/content/9/1/143> (consultado: 2010, Agosto 04).
- Legrand E., Volney B., Meynard J.B., Mercereau-Puijalon O., & Esterre P. (2008). *In vitro* Monitoring of *Plasmodium falciparum* Drug Resistance in French Guiana: a Synopsis of Continuous Assessment from 1994 to 2005. Documento en línea: <http://www.ncbi.nih.gov/pmc/articles/PMC2223885> (Consultado: 2011, Marzo 15).
- Maberti S. (1990). Desarrollo de resistencia a la pyrimetamina. Presentación de 15 casos estudiados en Trujillo, Venezuela. *Archivos Vzlan. de Med. Trop. y Parasitol. Méd.* **3**: 239-259.
- Maynadié M., Peceño C., Noriega P. & Yarzabal L. (1989). Susceptibility of *Plasmodium falciparum* strain to chloroquine and mefloquine in the Amazonas Federal Territory of Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. and Hyg.* **83**: 586-588.
- Mendis K., Sina B. J., Marchesini P., Carter R. (2001).- The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **64**: 97-106.
- Metzger W. G., Girón A., Vivas-Martinez S., González J., Charrasco A. J., Mordmuller B. G. & Magris M. (2009). A rapid malaria appraisal in the Venezuelan Amazon. Documento en línea: <http://www.malariajournal.com/content/8/1/291> (consultado: 2010, Agosto 02).
- Navarrete L., Garron A., Flores F. & Morales de G. (1986). *Resistencia de Plasmodium a la cloroquina en el Estado Bolívar*. Servicios de Endémias Rurales, zona III, MSDS. Caracas, Venezuela.
- Noedl H., Wernsdorfer W. H., Miller R. S. & Wongsrichanalai C. (2002). Histidine-Rich Protein II: a novel approach to malaria drug sensitivity testing. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **46**: 1658-1664.
- Noedl H., Wongsrichanalai C. & Wernsdorfer W. H. (2003). Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. *Trends Parasitol.* **19**: 175-181.
- Noedl H., Attlmayr B., Wernsdorfer W.H., Kollaritsch H., Smiller R. (2004). A histidine-rich protein 2-based malaria drug sensitivity assay for field use. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **6**: 711-714
- Noedl H., Bronnert J., Yingyuen K., Attlmayr B., Kollaritsch H. & Fukuda M. (2005). Simple Histidine-Rich Protein 2 Double-Site Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent assay for Use in Malaria Drug Sensitivity Testing. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **49**(8): 3575-3577.
- OMS (1990). *In vitro* Micro-Tes (Mark II) for the assessment of response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, mefloquine, quinine, sulfadoxine/pyrimetamine and amodiaquine. WHO/MAP/87.2, Rev 1. Geneva, Switzerland.
- OMS (2001). *In vitro* micro-tes (Mark III) for the assessment of response of *Plasmodium falciparum*

- to chloroquine, mefloquine, quinine, amodiaquine, sulfadoxine/pyrimetamine and artemisinin. CTD/MAL/97.20, Rev. 2. Geneva, Switzerland.
- OMS (2011). Nota descriptiva N° 94. Actualizada en abril de 2010. Documento en línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/es/> (consultado: 2011, Marzo 16)
- Pérez H. (2004). El paludismo por *Plasmodium vivax* y los desafíos del tratamiento adecuado y oportuno. *Bol. Mal. Salud Amb.* **44**: 1-8.
- Rodríguez I., Giron A., Veloso G., Carrasquel A. & González M. (2005). Ensayo clínico aleatorizado, comparativo de cloroquina y quinina para el tratamiento de la malaria por *Plasmodium falciparum* en Amazonas Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **45**: 11-18.
- Ringwald P. (2005). Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs. Report on global monitoring 1996-2004. WHO/HTM/MAL/2005.1103. Geneva: World Health Organization.
- Sibley C. H. & Ringwald P. (2006). A database of antimalarial drug resistance. *Malaria J.* **5**: 48.
- Tangpukdee N., Duangdeev C., Wilaratana P. & Krudsood S. (2009). Malaria Diagnosis: a brief review. *Korean J. Parasitol.* **47**: 93-102.
- Watkins W. M. & Masobo M. (1993). Treatment of *Plasmodium falciparum* malaria with pyrimethamine-sulfadoxine: selective pressure for resistance is a function of long elimination half-life. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**: 75-78.
- Young M. D. & Moore D. V. (1961). Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **10**: 319-320.

Recibido el 28/12/2010  
Aceptado el 18/03/2011

## Inmunoterapia de la leishmaniasis cutánea: factores que influyen su efectividad

### *Immunotherapy of cutaneous leishmaniasis: factors that influence their effectiveness*

José Albar Carrero Rangel\*, Rafael Horacio Borges, Jacinto Convit García, José Avilan Rovira & Hector De Lima

#### RESUMEN

En Venezuela se utiliza la inmunoterapia por su bondad terapéutica y operacional en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea y se aprecian diferencias de su efectividad entre los servicios locales de salud que la emplean. En el estado Mérida, donde se tiene un bajo nivel de falla terapéutica, se desconocen los factores de riesgo ó de protección que la determinan. Por ello se planteó realizar un estudio epidemiológico de casos y controles para evaluar los factores individuales demográficos, clínicos, inmunológicos y adherencia terapéutica que influyen en dicha efectividad. El ajuste con regresión logística determinó según definición: a) Demográfica: como riesgo las edades extremas, tabaquismo y de oficio doméstico, con protección en el alfabeto educativamente, b) Clínica: como riesgo la forma intermedia, cinco o más lesiones, infección secundaria y ubicación en pié, con protección en la forma localizada y tamaño menor a 60 mm, c) Inmunológica: de riesgo las bajas respuestas a leishmánina y PPD, d) Adherencia terapéutica: son riesgo la aplicación tópica y aseo local inadecuados. Se concluye, hay factores de riesgo y protección que modelan la eficacia de la inmunoterapia, lo que en consecuencia demanda una dinámica vigilancia clínico-epidemiológica para potenciar dicha terapéutica.

**Palabras clave:** Leishmaniasis, inmunoterapia, eficacia, factores de riesgo, estudios de casos y controles, Venezuela.

#### INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad metaxénica parasitaria de distribución mundial, endémica en 100 países, existiendo 350 millones de personas en riesgo, con una prevalencia estimada de 12 a 14 millones de casos y una incidencia anual de 1.500.000 casos de las formas cutáneas y 500.000 casos de la forma visceral (WHO, 2010). En Venezuela en el periodo 1988-2007 se reportaron un total de 47.762 casos para un promedio de 2.388 casos/año y una tasa

#### SUMMARY

*Immunotherapy is used in Venezuela as treatment of cutaneous leishmaniasis and there are differences among the health services that use it. In Merida State there are a low proportion of failures, but the factors that are related to this failure are unknown. A case-control study was planned to evaluate the demographics, clinical, immunological factors and the treatment compliance that can be related to the effectiveness. Logistic regression showed that the factors related to failure were: a) demographics: lower and older ages, smoking, domestic labor and illiteracy; b) clinical: intermediate leishmaniasis, five or more lesions, aggregated infection, lesions in feet, and lesion size above 60 mm; c) Immunology: low reactivity to Montenegro and tuberculin tests; d) treatment compliance: use of incorrect topical substances and inadequate cleaning of ulcer. As a conclusion, there are several factors that influence treatment response, that require clinical and epidemiological surveillance to increase the effect of therapy.*

**Key words:** leishmaniasis, Immunotherapy, effectiveness, risk factors, case-control studies, Venezuela.

de 10,5 por cien mil habitantes. Se presenta en casi todo el país, siendo importante el riesgo en la región andina, el Estado Mérida para el periodo 1988-2007 reporto 5.596 casos lo que equivale al 9,63 % del total nacional, a predominio del varón en edad productiva tiene gran impacto en la familia y la comunidad (De Lima *et al.*, 2010).

En el tratamiento hay múltiples medicamentos (Koff, 1994) de variada efectividad y efectos colaterales, entre otros los antimoniales, la inmunoterapia (IMT)

(Convit *et al.*, 1996), anfotericina y pentamidina. En el país, el Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) para controlar la enfermedad desde hace más de dos décadas utiliza la IMT como tratamiento de primera elección en la leishmaniasis cutánea (Convit *et al.*, 1995). La IMT es un producto combinado de promastigotes de *Leishmania* spp. pasteurizados más bacilos de Calmette-Guerin, que además de tener altos porcentajes de curación, es económico, tiene escasos efectos colaterales y es de buena aplicación operacional (Convit *et al.*, 1996; 2003).

La IMT muestra significativas diferencias de efectividad al comparar los resultados obtenidos en los servicios locales del país donde es usada. El Estado Mérida reporta alta efectividad de curación (95–97 %); no obstante se desconocen los factores individuales asociados de riesgo o protección, siendo esto una debilidad para el manejo de la IMT (Convit *et al.*, 2003). La estrategia en el control del enfermo es tratarlo con la IMT y controlar aquellas variables individuales específicas que permitan disminuir aún más la falla terapéutica o potenciar la efectividad.

Esto plantea como objetivo del presente trabajo una investigación epidemiológica que tomando en cuenta los aspectos demográfico, clínico, inmunológico y de adherencia al tratamiento, nos permita identificar aquellas condiciones que actúan como factores de riesgo o como factores de protección en la aplicación del tratamiento con la IMT, que dificultan o contribuyen a la curación, de manera que perfeccionando este conocimiento se restituirá el paciente de forma más rápida con un efecto terapéutico óptimo.

Este resultado, ajustado a las normas, pautas y procedimientos en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea, orienta con más claridad el plan terapéutico o en su defecto permite diseñar otras opciones y/o esquemas alternativos más adecuados al paciente.

## MATERIALES Y METODOS

Es un estudio epidemiológico analítico comparativo de casos y controles, en razón 1:3 (tres controles por cada caso), de pacientes tratados por leishmaniasis cutánea con la IMT bajo las normas, pautas y procedimientos del Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina (SAIB) (Convit *et al.*, 1995).

Se define como: 1.- Fracaso (Casos), al paciente tratado con la IMT que no curó después de 25 semanas de aplicar la primera dosis; 2.- Éxito (Control): al paciente tratado con la IMT que curó en 25 semanas o menos después de aplicada su primera dosis; 3.- Curación: la total cicatrización de las lesiones leishmánicas, sin lesiones satélites (infiltrados) y ausencia de cadenas linfáticas. Los criterios de inclusión de los casos y controles son: ser diagnosticados en el Servicio de Dermatología Sanitaria del estado Mérida y tratado sólo con la IMT. En forma retrospectiva a partir del año 2006 y según el número de registro de nómina del servicio se recolectan datos de la historia "sustituir por": clínica de los casos. Se tomaron como controles los individuos identificados con los números inmediatos superior e inferior acorde a la fecha de su ingreso a menos que alguno de esos números tuviera el criterio para ser clasificado como caso, en cuyo evento se tomó el siguiente número más próximo. Se procesó la información en Epi-Info, SPSS versión 11 y Excel, y representado en tablas, donde el primer tamizaje es un análisis univariado y aquellas variables significantes se someten a un segundo tamizaje de análisis multivariado (regresión logística). El nivel de significancia es alfa: 0,05 bilateral, para región crítica del 95 %.

De una población de 1.200 pacientes (2001–2006) del Servicio de Dermatología Sanitaria del Estado Mérida, para una muestra calculada por el programa Epi-Info 2003 (Statcalc), se seleccionaron 240 individuos (60 casos y 180 controles), por criterio de selección en frecuencia de la variable en el grupo control de 50 %, un error alfa de 0,05, un error beta de 0,2 y la razón de discrepancia de 2,5 para esa variable.

Se plantean como variables: A) Dependiente, la respuesta clínica (curación); B) Independientes: a) Demográficas (género, edad, unión marital, nivel educativo, ocupación, tiempo en el área y hábitos); b) Aspectos comórbidos (índice de masa corporal (IMC), trastornos cardiovasculares, renales y endocrinometabólicos (CAREM); Características de la lesión (tiempo de evolución, número, ubicación, tamaño), formas clínicas (leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y leishmaniasis cutánea intermedia (LCI), infección secundaria y adenopatía regional); c) Aspectos inmunológicos (Leishmanina, PPD); d) Aspecto adherencia al tratamiento (regularidad de aplicación y número de vacunas, efectos adversos, cura local y terapia tópica), y C) Intervinientes, escasez de recursos económicos, aspectos psicológicos.

## RESULTADOS

En la Tabla I, se presentan los resultados del primer análisis univariado determinándose las siguientes variables como factores de riesgo: a) *demográficas*: género mujer, la edad menor de 5 y mayores de 65 años, ocupación servicio doméstico y tabaquismo; b) *clínicas*: infección secundaria severa, tener 5 ó más lesiones, forma clínica LCI y de ubicación en cara, cuello, oreja, pie y tamaño > 60 mm de diámetro; c) *inmunológicas*: leishmanina entre 11 y 20 mm y PPD menor de 10 mm de diámetro y d) en la adherencia a la IMT: mal aseo local y uso de tópicos inadecuados. Como factores de protección por definición *Demográficas*: edad de 5-14 años, alfabeto y obreros; *clínicas*: lesiones de tamaño menor a 60 mm y forma clínica LCL; *inmunológicas*: leishmanina entre

21 y 30 mm y PPD entre 10 y 20 mm, y la adherencia a la IMT: Aplicar 3 dosis de vacuna.

Con estas variables significantes se realizó un segundo tamiz de ajuste con regresión logística no condicional (Tablas II y III), resultando factores de riesgo según definición: a) *demográficas*: edad menor de 5 y mayores de 65 años, ocupación servicio doméstico y tabaquismo; b) *clínicas*: infección secundaria severa, 5 ó más lesiones, forma clínica LCI y de ubicación en pie; c) *inmunológicas*: leishmanina entre 11 y 20 mm y PPD menor de 10 mm de diámetro y d) en la adherencia a la IMT: mal aseo local y uso de tópicos inadecuados. Como factores de protección *demográficas*: alfabeto; *clínicas*: lesión de tamaño menor a 60 mm y forma clínica LCL; *inmunológicas*: leishmanina entre 21 y 30 mm y PPD entre 10 y 20 mm.

**Tabla I. Inmunoterapia de la leishmaniasis cutánea: factores que influyen su efectividad. Variables según frecuencia, porcentaje y significancia (análisis univariado).**

Variables	Casos		Control		valor	OR	LC (95%)	PRA (%)	FE (%)	
	N°	%	N°	%	P	(a)	(b)	(c)	(d)	
Genero Mujer	35	58,3	76	42,2	0,0301863	1,9	1,02 - 3,62	47,9	28,0	
Edad	< 5 años	7	11,7	6	3,3	0,0086464	3,8	1,04 - 14,35	73,9	9,0
	5 - 14 años	8	13,3	55	30,6	0,0086464	0,4	0,14 - 0,83		
	> 65 años	7	11,7	6	3,3	0,0135221	3,8	1,04 - 14,35	73,9	9,0
Nivel Educativo	Alfabeto	19	31,7	107	59,4	0,0000190	0,3	0,16 - 0,61		
Ocupación	Servicio doméstico	24	53,3	31	26,1	0,0009594	3,2	1,50 - 7,06	69,1	37,0
	Obrero	2	4,4	22	18,5	0,0430965	0,2	0,02 - 0,90		
Habito	Tabáquico	8	13,3	8	4,4	0,0168274	3,3	1,06 - 10,29	69,7	8,0
Infección (severa)	Si	15	25,0	6	3,3	0,0000003	9,7	3,28 - 31,80	89,6	22,0
Tipo de lesión	LCI	16	26,7	11	6,1	0,0000013	5,6	2,25 - 14,00	82,1	21,0
	LCL	44	73,3	169	93,9	0,0000013	0,2	0,07 - 0,44		
N° de lesiones	5 y +	14	23,3	9	5,0	0,0000294	5,8	2,18 - 15,16	82,7	19,0
Ubicación	Cara, Cuello, Oreja	9	15,0	9	5,0	0,0108698	3,4	1,15 - 9,82	70,1	11,0
	Pie	12	20,0	11	6,1	0,0015501	3,0	1,47 - 10,07	67,4	11,0
Tamaño	> 60 y + mm / ø	10	16,7	4	2,2	0,0002159	8,8	2,38 - 39,63	14,8	15,0
	< 60 y + mm / ø	50	83,3	176	97,8	0,0002159	0,1	0,02 - 0,42		
Leishmanina	11-20 mm / ø	30	50,0	59	32,7	0,0167664	2,1	1,09 - 3,58	51,2	26,0
	21-30 mm / ø	22	36,7	101	56,1	0,0090658	0,5	0,24 - 0,86		
PPD	< 10 mm / ø	42	70,0	64	35,6	0,0000033	4,2	2,16 - 8,36	76,4	53,0
	10-20 mm / ø	13	21,7	105	58,3	0,0000009	0,2	0,09 - 0,41		
Aseo adecuado	No	37	61,7	41	22,8	0,0000000	5,5	2,79 - 10,73	81,7	50,0
Tópico adecuado	No	41	68,3	68	37,8	0,0000384	3,6	1,83 - 6,95	71,0	49,0
Dosis (vacuna)	3 dosis	56	93,3	179	99,4	0,0146527	0,1	0,00 - 0,82		

(a): Razón de discrepancia, (b): Limite de confianza, (c): Proporción de riesgo atribuible, (d): Fracción etiológica.

## DISCUSIÓN

La leishmaniasis cutánea, es una infección parasitaria crónica y de predominio en el área rural con debilidad social, la cual tiene como medida de control y tratamiento la IMT, que por ser de primera elección en la curación “obligan” a potenciarla. Por lo tanto, dada la variada respuesta clínica existente se hace necesario el análisis de las variables individuales de riesgo ó protección (Soto & Soto, 2006; Santos *et al.*, 2005; Mayrink *et al.*, 2006; Izasa *et al.*, 1999).

Con relación a la edad, la IMT tiene una probabilidad de fracaso 6,51 veces mayor en los menores de 5 años ( $P < 0,05$ ) con respecto a las otras edades, por carecer de maduración completa del sistema inmune, en estos la inmunidad innata es débil y la protección específica dependiente de respuesta inmunitaria adaptativa no está desarrollada completamente, siendo precisamente la base de la

curación con la IMT, así las leishmanias causan infecciones crónicas persistentes retardando la curación (Ampuero *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2006; Abbas *et al.*, 2000; Cabrera, 1994). Además, en la cotidianidad infantil el jugar o deambular junto a circunstancias clínicas (ubicación y número de lesiones) son causa de traumatismos sucesivos con procesos inflamatorios crónicos e infección secundaria retardando la cicatrización (Rodríguez *et al.*, 2006; Ampuero *et al.*, 2005). También por la condición psicoafectiva (dolor) del infante los padres realizan curas locales de baja calidad ó por su representación social aplican sustancias tóxicas no adecuadas que retardan la curación (Yalk *et al.*, 2004; Ellison & Harney, 2000; Soto *et al.*, 2005).

Al otro extremo de la vida, tener 65 y mas años de edad hace 3,83 veces más probable a fracasar que los de otra edad, si bien tienen “defensas desarrolladas”, la tendencia es al desgaste biológico propio del sistema

**Tabla II. Immunoterapia de la leishmaniasis cutánea: factores que influyen su efectividad. Estudio de casos y controles, variables de riesgo según su dimensión por análisis de regresión logística condicional, Mérida, Estado Mérida.**

Dimensión	Variable	(OR) (a)	IC95% (b)	P (c)
Demográfica	- Edad (< 5 a)	6,51	1,95 - 21,66	0,0022
	- Ocupación (Oficio doméstico)	3,98	1,60 - 9,86	0,0028
	- Edad (65 a y +)	3,83	1,15 - 12,71	0,0282
	- Hábitos (Tabáquico)	3,80	1,31 - 10,98	0,0136
Clínica	- Infección secundaria (severa)	5,13	1,61 - 16,36	0,0057
	- Forma clínica de la lesión (LCl)	3,61	1,36 - 9,57	0,0098
	- Número de lesiones (5 y +)	3,09	1,09 - 8,77	0,0337
	- Ubicación (Pie)	2,82	1,01 - 7,91	0,0481
Inmunológica	- PPD (< 10 mm)	4,29	2,26 - 8,13	0,0000
	- Leishmanina (11 - 20 mm)	2,10	1,12 - 3,94	0,0195
Adherencia a tratamiento	- Aseo local (no adecuado)	4,79	2,51 - 9,13	0,0000
	- Aplicación tóxica (no adecuada)	2,98	1,54 - 5,74	0,0011

Fuente: encuesta epidemiológica. (a) Razón de posibilidades (Odds ratio). b) IC95%: intervalo de confianza de 95 %. c) Nivel de significación: P valor: 0,05.

**Tabla III. Immunoterapia de la leishmaniasis cutánea: factores que influyen su efectividad. Estudio de casos y controles, variables de protección según su dimensión en análisis por regresión logística condicional, Mérida, Estado Mérida.**

Dimensión	Variable	(OR) (a)	IC95% (b)	P (c)
Demográfica	- Nivel educativo (Alfabeto)	0,28	0,14 - 0,56	0,0003
Clínica	- Forma clínica de la lesión (LCL)	0,20	0,08 - 0,48	0,0003
	- Tamaño de lesión (< 60 mm)	0,13	0,03 - 0,48	0,0021
Inmunológica	- PPD (11 - 20 mm)	0,16	0,07 - 0,33	0,0000
	- Leishmanina (21 - 30 mm)	0,39	0,20 - 0,75	0,0051
Adherencia a tratamiento	- Aseo local (adecuado)	0,18	0,09 - 0,36	0,0000
	- Aplicación tóxica (adecuada)	0,31	0,16 - 0,61	0,0007

Fuente: encuesta epidemiológica. (a) Razón de posibilidades (Odds ratio). b) IC95%: intervalo de confianza de 95 %. c) Nivel de significación.

inmunológico, aunado a otras condiciones propias de la edad (disminución del riego sanguíneo y capacidad fibroblástica). Las comórbidas, propias de esta edad como la hipertensión arterial, diabetes, arteriosclerosis, obesidad, ayudan a disminuir el riego sanguíneo, conllevando al déficit de O<sub>2</sub> y nutrientes tisulares, entre otros, que facilitan la infección secundaria afectando la curación (Rodríguez *et al.*, 2006; Lázaro & Longo, 2001; Abbas *et al.*, 2000). Además, por la actividad agrícola y el medio que habitan se exponen a materias infecciosas (tierra, heces de animales, etc.), así como traumas de la lesión por plantas y maquinarias entre otros, unos elementos adversos a la curación clínica. Estos hallazgos evidencian que las edades extremas influyen en el desenlace clínico, en concordancia al reportado por otros autores (Soto & Soto, 2006; Mayrink *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2006; Palacios *et al.*, 2001; Lázaro & Longo, 2001).

Con ocupación doméstica donde el género femenino es un atributo ligado, y en la áreas endémicas lo doméstico es básicamente realizado por mujeres, un hecho no casual, pues obedece a un enfoque social donde a la mujer se le asigna un carácter "subalterno", que le condiciona estilos de vida con problemas de salud y entre ellos la curación de úlceras leishmánicas (Castellanos, 2001; Carrero & Contreras, 2008). Una situación biológica con nexo social en mujeres en edad fértil y/o productiva con ocupación doméstica y leishmaniasis son la gestación, parto, puerperio, lactancia, cuidado de hijos y la actividad hogareña implícita (con largas jornadas de trabajo) como fuente de problemas por la doble o triple jornada que se traduce en fatiga e incremento de la falla terapéutica (Izasa *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2006; Castellanos, 2001). De esta manera, una condición patológica frecuente en la mujer del medio rural con leishmaniasis en miembros inferiores es la insuficiencia vascular periférica (varices), que aunado a la bipedestación prolongada, retardan el riego sanguíneo e incrementan la propensión a las infecciones secundarias haciendo crítico curar úlceras en miembros inferiores (Moreira *et al.*, 2002; Ampuero *et al.*, 2005). De igual forma, las domésticas tienden a posponer sus necesidades de salud, educación y recreación ante los otros miembros familiares descuidando entre otros el aseo local diario o simplemente no asumen la úlcera como situación que demande atención adecuada (Castellanos, 2001; Carrero & Contreras, 2008). La ocupación doméstica fuera del hogar es un hecho patente de economía, la que se basa en "jornada de trabajo" con remuneración

menor al laboral correspondiente, prohibiendo satisfacer sus necesidades de salud (compra de antibióticos, analgésicos u otros), cuyo desequilibrio deteriora aún más su salud comprometiendo la propia capacidad de producción. Lo doméstico implica exposición a las condiciones del trabajo en relación con materias infecciosas (bacterias, hongos, etc.), y en ritmos no favorables (Soto & Soto, 2006; Castellanos, 2001). Tener la ocupación doméstica hace 3,98 veces más probable al fracaso a la IMT, una situación contraria a lo planteado por otros autores (Soto *et al.*, 2005; Castellanos, 2001).

El hábito tabáquico hace 3,8 veces más probable el fracaso de la IMT, pues entre otros efectos, la nicotina (vasoconstrictor) disminuye el O<sub>2</sub> tisular, el monóxido inhibe el transporte O<sub>2</sub>, el cianuro de hidrogeno es inhibidor enzimático y de transporte, aumenta la viscosidad conllevando a hipoxemia al tegumento, en consecuencia la cicatrización es deficiente por déficit de O<sub>2</sub> tisular, proliferación de macrófagos, fibroblastos y déficit de colágeno, con disminución de IgA, IgG y aumento de IgE y células NK inhibidas, hechos concordantes a lo reportado en la literatura (Santos *et al.*, 2005; Lázaro & Longo, 2001; Sarobe & Rivera, 2000; Frick & Seals, 1992; Bowler *et al.*, 2001).

Demográficamente, alrededor del 70 % es clase social pobre (Graffar), con bajos niveles educativos, económicos, laborales, y escaso desarrollo tecnológico, con malas condiciones higiénico-ambientales particularmente en la vivienda (Landaeta, 1998). Estas características adversas, sean individuales o entremezcladas como aspectos biológicos, ambientales, estilos de vida y del propio sistema de salud propician la infección secundaria severa, un problema frecuente y negativo a la curación, siendo 5,13 veces más probable el fracasar ante quienes no los tienen (Bowler *et al.*, 2001; Lázaro & Longo, 2001).

Biológicamente, la úlcera leishmanica altera la barrera fisiológica de protección cutánea, con la ineludible contaminación bacteriana (sea por continuidad de la flora normal, ambiental o por autoinoculación), sin olvidar el importante número de vectores aéreos que al asentar en la lesión arrastran bacterias (*Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*), con producción de toxinas que producen inflamación exudativa o purulenta retrasando la curación (Convit *et al.*, 1996; Lázaro & Longo, 2001; Bowler *et al.*, 2001). Como ambiente social, estas poblaciones se

caracterizan por reproducción social bajo pobreza, malas condiciones en cuanto a vivienda e higiénico - ambientales (agua no potable y deficiencia de otros servicios básicos), de manera que no es extraño hallar agentes de la flora digestiva, nasal y genitourinaria (Castellanos, 2001, Bowler *et al.*, 2001). Como estilo de vida o propiamente por su representación social optan mantener las úlceras al descubierto y el uso de sustancias tóxicas erráticas alejando la curación. En relación al sistema de salud aún con la adecuada accesibilidad es débil la disponibilidad a antibióticos, antiinflamatorios o gases; aunado al débil conocimiento del trabajador de salud en el manejo integral de úlceras cutáneas (Carrero & Contreras, 2008; Castellanos 2001). Estas características generan la frecuente infección polimicrobiana, con colecciones purulentas, exudado, linfa, sangre, sustancias tóxicas y los detritus celulares propios de la reparación ulcerativa, los que retardan la curación aumentando el diámetro y la profundidad en la úlcera, de manera que cuando éstas tienen tamaños menor a 60 mm de diámetro se favorece la curación, un hallazgo similar al reportado en la literatura (Bowler *et al.*, 2001; Arévalo *et al.*, 1998; Lázaro & Longo, 2001; Convit *et al.*, 1996, Rodríguez *et al.*, 2006). Ahora, si bien la mayoría no alcanza el nivel educativo básico, al menos aprende a leer y escribir (alfabeto) permitiendo adecuada comprensión y cumplimiento terapéutico de predominio domiciliario (toma de analgésico, antibiótico, cura local, aplicación tóxica, reposo, entre otros), en consecuencia el ser alfabeto es un factor de protección (Ortega-Canto *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 2005).

Según la forma clínica LCI, es 3,61 veces más probable a fracasar a la IMT, por ser perfil inmunológico de citoquinas Th1/Th2, a predominio de CD4 Th2 productores de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 entre otras citocinas asociadas a resistencia frente a la IMT, debido a algún defecto genético del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) que altera la capacidad efectora del macrófago determinando susceptibilidad a enfermar y falla terapéutica. De otra manera la forma clínica LCL, con el desarrollo de una respuesta de células T CD4+ Th1, con citocinas IL-12 e Interferón  $\gamma$ , TNF, son activadores de la respuesta inmune y promueven la eliminación del parásito, con buena respuesta a la IMT, hallazgos en concordancia con lo reportado por otros autores (Convit *et al.*, 1995, 2003; Mayrink *et al.*, 2006; Mimori *et al.*, 1987; Cabrera, 1994; Sadeghian *et al.*, 2006).

En relación al número de lesiones, 5 o más lesiones hacen 3,09 veces más probable el fracaso, bien sea por múltiples picadas, diseminación de la infección o la especie de *Leishmania* implicada, todas estas condiciones expresan de alguna manera disminución de la inmunidad frente al parásito. Estos resultados son similares al reporte de otros autores (Rodríguez *et al.*, 2006; Bowler *et al.*, 2001).

La ubicación anatómica de las lesiones en pie, le hacen 2,82 veces más probable al fracaso, por implicaciones de la parte más distal de la extremidad inferior con exposición a múltiples factores: estasis venoso y linfático, bipedestación, traumatismos (uso de calzado o botas) e infección bacteriana por la continua exposición al piso, tierra, entre otros. Igualmente posee áreas de piel con importante movilidad o tensión (dedos). Resultados similares al reportado por otros autores (Rodríguez *et al.*, 2006; Lázaro & Longo, 2001; Bowler *et al.*, 2001).

Desde el punto de vista inmunológico, pacientes cuyo PPD tenga un diámetro < 10 mm, son 4,29 veces más probable al fracaso. Esto refleja bajos niveles de citocinas pro - inflamatorias, infiriendo una posible falla al uso del BCG como adyuvante, quien es un natural estimulador de respuesta inmune Th1. Los valores de PPD entre 11 a 20 mm de diámetro son un factor protector, por el desarrollo de una respuesta celular adecuada, hallazgos similares al descrito en otras investigaciones (Convit *et al.*, 2003). Por otra parte, pacientes con leishmanina entre 11 y 20 mm, son 2,10 veces más propensos al fracaso, bien sea por la ausencia o presencia de citocinas asociadas a la progresión de la enfermedad, dado que al no tener “el gatillo” de respuesta inmune por algún defecto genético en la activación de células T CD4+ se altera la capacidad efectora del macrófago, aunque también se ha planteado estar asociada a infección reciente (Passos *et al.*, 2000; Cabrera, 1994; Sadeghian *et al.*, 2006; Mimori *et al.*, 1987). Al contrario, el valor de leishmanina de 21 a 30 mm es factor protector, por desarrollo de respuesta linfocitaria adecuada (Passos *et al.*, 2000). En fin, es posible el uso de leishmanina o PPD como predictores de falla, de importancia en salud pública por ser productos seguros, económicos y de amplio uso, unos hallazgos similares al de otros autores (Passos *et al.* 2002; Sadeghian *et al.*, 2006; Mimori *et al.*, 1987; De Luca *et al.*, 2003; Manzur & Bari, 2006; Convit *et al.*, 1996; 1995; Mayrink *et al.*, 2006).

La adherencia al tratamiento por parte del paciente, referida como el grado de éxito en llevar a cabo las recomendaciones terapéuticas, es un acto frecuentemente incumplido (D'Anello, 2006). Se inicia con la aceptación y cumplimiento del tratamiento (vacunas, aseo local), donde es importante reconocer lo variado en cada paciente: su clínica, inmunología, educativo, económico, hábitos, cultural, equilibrio emocional, interacción médico-paciente, influencia del contexto familiar y social, elementos que apoyan o socavan la adherencia y reconocerlos para manejarlos correctamente son imperativos a la buena asistencia clínica, de manera que en la adherencia al tratamiento están el aseo local y el uso de sustancias tópicas (D'Anello, 2006; Ellison & Harney, 2000; Dobles-Ulloa & Perriard, 1994; Izasa *et al.*, 1999).

El aseo local de las úlceras para lograr una buena granulación, epitelización y cicatrización se condicionan por su calidad, frecuencia y sustancias utilizadas en el proceso. Se exige retirar todo material sobre la úlcera a un ritmo de cura variable (una, dos o tres veces / día), según lo necrótico, secreciones y presencia de sustancias extrañas (Bowler *et al.*, 2001). Además de las sustancias utilizadas povidine o clorhexidina, también hay otras citotóxicas como el agua oxigenada, alcohol y el frecuente uso de jabón azul comercial con capacidad limpiadora y potencial irritante por su alta alcalinidad. Con el aseo local inadecuado es 4,79 veces más probable el fracaso al tratamiento con la inmunoterapia (Carrero & Contreras, 2008; Bowler *et al.*, 2001; Arévalo *et al.*, 1998; D'Santiago, 1996).

El "anhelo" por curar en un periodo corto (dos a tres semanas) promueve la automedicación con el uso de sustancias variadas irritantes, haciendo 3,55 veces más probable el fracaso por la falta de adherencia al tratamiento (Carrero & Contreras, 2008; Bowler *et al.*, 2001; Ortega-Canto, 1994; Dobles-Ulloa & Perriard, 1994; Izasa *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 2002; Arevalo *et al.*, 1998; García *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2006). Se han descrito la aplicación caliente ó en infusión de llantén (*Plantago major*), manzanilla (*Matricaria chamomilla*), hierba mora (*Solanum nigrum*), sábila (*Aloe vera*) para "baños", compresas o por goteo directo en la úlcera, adicionando luego creosota, "chimo caliente", "sábila", mupirocin, centella asiática, penicilina y cremas no especificadas; también la aplicación directa en la úlcera de vegetales como: jugo de limón (*Citrus aurantifolia*),

ajo (*Allium sativum*), cebolla (*Allium cepa*). Otros aplican sustancias químicas solas o combinadas (alcohol, yodo, merthiolate, pasta dental, productos de uso veterinario). El 83 % de estas sustancias son irritantes y generan dermatitis físico-químicas que para una úlcera de etiología múltiple que desarrolla una reacción inflamatoria granulomatosa crónica, dificultan la infiltración fibroblástica y propician la infección (Arevalo *et al.*, 1998; Moreira *et al.*, 2002; Cabrera, 1994; Ortega-Canto, 1994; Carrero & Contreras, 2008).

Finalmente, ante la necesidad planteada de desarrollar estrategias efectivas de control se constata que el proceso de curación de la leishmaniasis cutánea con IMT es modelado por factores demográficos, clínicos, inmunológicos y de adherencia al tratamiento, con una trama relacional entre ellos. Cada paciente tiene su propia condición de repercusión directa en la curación, siendo necesario un enfoque biopsicosocial, que demanda una dinámica vigilancia clínica-epidemiológica para una buena intervención o plantear alternativas terapéuticas en su defecto, donde incorporado este conocimiento a las Normas, pautas y procedimientos para aplicación de la IMT en LCL la potenciará basado en las características individuales de cada paciente. Se sugiere la realización de estudios similares en los diferentes centros de atención de leishmaniasis a manera de conocer su propia realidad local y exhortar una IMT con enfoque biopsicosocial.

## REFERENCIAS

- Abbas A. K., Lichtman A. H. & Pober J. S. (2000). Inmunología celular y molecular. 4a ed. McGraw-Hill, Madrid, España.
- Ampuero J., Urdaneta M. & De Olivera M. (2005). Risk factor for cutaneous leishmaniasis transmission in children aged 0 to 5 years in an endemic area of Leishmania (Viannia) braziliensis. *Cad. Saúde Pública*. **21**: 52-59.
- Arévalo J., Arriba M. & Hernández M. (1998). Guía de utilización de los antisépticos. *Medicina Preventiva*. **4**: 38-43.
- Bowler P., Duerden L. B. & Armstrong D. (2001). Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clinical Microbiology Reviews*. **14**: 244-269.

- Cabrera M. (1994). *T cell responses associated with immunotherapy of American cutaneous Leishmaniasis*. Thesis Doctor of Philosophy. University of London. U.K.
- Carrero J. & Contreras R. (2008). *Leishmaniasis cutánea: aspectos psicosociales*. Tesis para especialización. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Castellanos P. (2001). *Los modelos explicativos del proceso salud - enfermedad: los determinantes sociales*. México: Interamericana McGRAW-HILL, OPS. p. 82-102.
- Convit J., De Lima H., Díaz D., Quiroga R. & García B. (1995). *Normas, pautas y procedimientos para la aplicación del tratamiento inmunoterapéutico de la leishmaniasis cutánea localizada*. MSAS - SAIB. Caracas, Venezuela.
- Convit J., Ulrich M., Castellanos P., Castes M., Pinardi M., De Lima H., *et al.* (1996). Desarrollo de la inmunoterapia de la leishmaniasis cutánea americana en el Instituto de Biomedicina. *Gac. Med. Caracas*. **104**: 232-246.
- Convit J., Ulrich M., Zerpa O., Aránzazu N., Valera M., Villarroel H., *et al.* (2003). Immunotherapy of American Cutaneous Leishmaniasis in Venezuela, 1990 to 1999. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **97**: 469-472.
- D'Anello K. S. (2006). El cumplimiento del tratamiento médico. *MedULA*. **15**: 102-109.
- D'Anello Santiago I. (1996). El pH de los jabones. *Dermatología Venezolana*. **34**: 16-19.
- De Lima H., Borges R., Escobar J. & Convit J. (2010). Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela: un análisis clínico epidemiológico a nivel nacional y por entidad federal, 1988-2007. *Bol. Mal. Salud Amb.* **50**: 283-299.
- De Luca P., Mayrink W., Santiago M., Nogueira R., Conceicao-Silva F., Magli G. *et al.* (2003). Randomized, double-blind, placebo-controlled study on the immunogenicity of the leishmánina skin test. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **97**: 709-712.
- Dobles-Ulloa A. & Perriard C. (1994). Representation, attitudes, and practices related to cutaneous leishmaniasis in people from Acosta Country, San Jose province, Costa Rica. An exploratory anthropological study. *Cad. Saúde Pública*. **10**: 181-189.
- Ellison J. & Harney P. (2000). Treatment-Resistant depression and the collaborative treatment relationship. *J. Psychother. Pract. Resp.* **9**: 1-3.
- Frick W. & Seals R. (1992). Smoking and wound healing. *Piel*. **93**: 22-28.
- García B., Borges R. & Salgado A. (2004). *La Etnografía, manual teórico - práctico para el diseño de iniciativas de educación y participación comunitaria en leishmaniasis*. M.S.D.S. - U.C.V. - S.A.I.B. Caracas, Venezuela.
- Izasa D., Restrepo N., Arboleda M., Casas E., Ineztroza H. & Yugarqui T. (1999). La leishmaniasis: conocimientos y prácticas en poblaciones de la Costa del Pacífico de Colombia. *Boletín Epidemiológico OPS*. **6**: 177-184.
- Koff A. (1994). Treatment of cutaneous Leishmaniasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **31**: 693-698.
- Landaeta J. (1998). FUNDACREDESA. Proyecto Venezuela. Archivos venezolanos de puericultura y pediatría. **61(Supl. 2)**: 6-13.
- Lázaro O. & Longo I. (2001). Tratamiento de úlceras crónicas. *Piel*. **16**: 213-219.
- Manzur A. & Bari A. (2006). Sensitivity of leishmanin skin test in patients of acute cutaneous leishmaniasis. *Dermatol. Online J.* **30**: 2-4.
- Mayrink W., Carvalho A., Araújo P., Batista S., Oliveira A., Genaro O. *et al.* (2006). Inmunoterapia, inmunoquimioterapia e quimioterapia no tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **39**: 14-21.
- Mimori T., Hashiguchi Y., Kawabata M., Gamez E. & De Coronel V. (1987). The relationship between severity of ulcerated lesions and immune responses in the early stage of cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **81**: 681-685.

- Moreira R., Rebelo J., Gama M., Alve E. & Costa J. (2002). Awareness of American tegumentary leishmaniasis (ATL) and use of alternative therapies in an endemic area in the Amazon Region in the State of Maranhao, Brazil. *Cad. Saúde Pública*. **18**: 187- 195.
- Ortega-Canto J., Hoil-Santos J. & Puga L. (1994). México: Creencias y prácticas sobre la leishmaniasis cutánea en una población de migrantes en el Estado de Campeche. *Rev. Venez. Sociol. Antropol.* **4**: 126-141.
- Palacios R., Osorio L., Fernando L. & Ochoa M. (2001). Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of Meglumine Antimonate for cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania Viannia* species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **64**: 187-193.
- Passos V., Barreto S., Romanha A., Krettli A., Volpini A. & Lima e Costa M. (2000). American cutaneous leishmaniasis. Use of a skin test a predictor of relapse after treatment. *Bull. World Health Org.* **78**: 968-974.
- Rodríguez A., Hueb M., Santos T. & Rodríguez S. (2006). Factors associated with treatment failure of cutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **39**: 139-145.
- Sadeghian G., Momeni A., Siadat A. & Usefi P. (2006). Evaluation of leishmanin skin test and its relationship with the clinical form and duration of cutaneous leishmaniasis. *Dermatol. Online J.* **10**: 3-7.
- Santos J., Lauand L., Souza G., Macedo V., De Oliveira V. & Costa C. (2005). Socioeconomic factor and attitudes towards household prevention of American cutaneous leishmaniasis in an area in southern Bahia, Brazil. *Cad. Saude Pública*. **16 (Supl. 3)**: 701-708.
- Sarobe M. & Rivera M. (2000). Efectos del consumo de tabaco sobre la Piel. *Piel*. **15**: 176-181.
- Soto J. & Soto P. (2006). Estado actual y futuro de la terapia anti-leishmaniásica en Colombia. *Biomédica*. **26 (Supl. 1)**: 194-196.
- Soto J., Toledo J., Vega J. & Berman J. (2005). Short report: Efficacy of pentavalent antimony for treatment of Colombian cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **72**: 421-422.
- WHO (2010). Control of the leishmaniasis, report of a World Health Organization Expert Committee. Technical Report Series N° 949, p. 91-104.
- Yalk M., Gurel M., Simsek Z. & Kati M. (2004). The psychological impact of cutaneous Leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.* **29**: 464-467.

Recibido el 28/08/2010  
Aceptado el 14/03/2011



## Phlebotomine sand fly species co-occurrence at the local scale: Differences between agricultural and forested areas

### *Patrones de co-ocurrencia de especies de flebotomos a escala local: Diferencias entre áreas agrícolas y forestales*

Luis Fernando Chaves\*

#### SUMMARY

Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) are vectors of *Leishmania* parasites, etiological agents of leishmaniasis in humans and other mammals worldwide. A previous study showed that at large biogeographical scales sand fly patterns of co-occurrence are segregated, indicating that sand fly communities at such scales are likely shaped by environmental factors and inter-specific interactions. However, no study has addressed co-occurrence patterns at the local scale of disease transmission. Here, a null-model analysis of species co-occurrence patterns is presented, showing that at the local scale patterns of sand fly species co-occurrence shift from a segregated structure to random when comparing a forest to a farmland. These patterns may explain the ecological fitting of sand flies with regard to the choice of diurnal resting sites in transformed landscapes, which may impact the transmission of *Leishmania* parasites by disrupting patterns of blood foraging across vertebrate hosts.

**Key Words:** Phlebotominae, Leishmaniasis, C-score, null models, ecological fitting.

#### INTRODUCTION

Sand flies are vectors of *Leishmania* spp., flagellates which cause leishmaniasis in humans and other mammals worldwide. Leishmaniasis foci are often inhabited by several sand fly species (Jimenez *et al.*, 2000; Rotureau *et al.*, 2006; Salomon *et al.*, 2008). Although several studies have made the point that in environments with higher vertebrate diversity the likelihood of sustaining high overall prevalence of *Leishmania* infections across all hosts is reduced (Alexander *et al.*, 2001; Travi *et al.*, 2002), little or no

#### RESUMEN

Los flebotómos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) son vectores de los parásitos *Leishmania*, agentes etiológicos de las leishmaniasis en el ser humano y otras especies de mamíferos a nivel mundial. Investigaciones previas demostraron que en escalas regionales las especies de anopheles se segregan, posiblemente por la influencia de factores ambientales e interacciones inter-específicas. Sin embargo, los patrones de co-ocurrencia no han sido estudiados a nivel local. Aquí se presenta un análisis de modelos nulos de patrones de co-ocurrencia que muestra que los patrones de co-ocurrencia de especies de flebotómos pasan de segregados a agregados cuando se compara un bosque con una granja. Tal resultado podría explicarse en el ajuste ecológico de los flebotómos con respecto a la selección de sitios de descanso diurno en paisajes transformados. Este ajuste ecológico podría impactar la transmisión de los parásitos de *Leishmania* al cambiar los patrones de alimentación sanguínea de los flebotómos con respecto a varias especies de hospedadores vertebrados.

**Palabras clave:** Phlebotominae, Leishmaniasis, C-score, modelos nulos, ajuste ecológico.

attention has been given to the community structure of sand fly vectors.

Patterns of species co-occurrence can be studied using null-model tests, a tool originally proposed to examine randomness in community assemblages (Gotelli, 2000). Nowadays, null-models are considered to be pattern-generating models based on randomisation of ecological data or random sampling from a known or imagined distribution (Gotelli, 2000). The results of studies using null models to study sand fly species co-occurrence patterns at large

---

Department of Environmental Studies, Emory University, Atlanta GA, 30322 USA.  
Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

\* lfchave@emory.edu

biogeographical scales (encompassing ecological life zones and altitudinal gradients) revealed these species to be more clustered than expected at random. This supports the hypothesis that large-scale sand fly species distribution is probably determined by the environment and inter-specific interactions (Chaves & Añez, 2004).

However, It is still unclear what patterns of sand fly species co-occurrence exist at the local scale; Do species tend to be clustered around some kind of habitat?, Are they associated with specific habitats that exclude other species, or Are these patterns completely unstructured/random?. This information can be very useful for targeting vector control measures, allowing specific habitats to be treated with insecticides or rendered unsuitable through environmental modification. Similarly, it is not known whether large scale landscape transformation affects sand fly co-occurrence patterns at the local scale. Patterns of species co-occurrence at the local scale could change with landscape transformation and impact the dynamics of *Leishmania* spp. parasite transmission, given differential access to reservoir and incidental hosts (Chaves *et al.*, 2008). Also land use change can modify the composition of the vector community. Sand fly species with large “ecological fitting”, i.e., species with the ability to use new or transformed habitats without the need for adaptation (Janzen, 1986), can dominate communities that used to be very diverse before land use change. It can be expected that undisturbed environments, like forests, when compared to transformed landscapes, like farmlands, would have communities that are more structured with regard to their specificity in use of resting sites, which are of great importance for leishmaniasis transmission risk, given the limited dispersal of these insects (Morrison *et al.*, 1993). In the present study patterns of sand fly species co-occurrence are analyzed using null-model

tests, looking at published data from sand flies captured at resting sites in two transmission foci with different degrees of human intervention, a farmland and a forest.

## METHODS

### Data

After the examination of the Web of Science and PubMed only two studies had detailed local data on sand fly species co-occurrence suitable for the analysis with null-model tests, one in a farmland, the other in a forest. Sand flies from a farmland focus were collected in Camerino, a hill town in the Marche region of Central Italy, using sticky traps and aspirator hand collection (Bongiorno *et al.*, 2003). The insects were sampled bi-weekly over two four-month periods (June-September of 2000 and 2001) in a variety of sand fly diurnal resting sites, which included two kennels, a sheep pen, a stable, a chicken house, a multi-species pen (chicken, sheep, etc) and drainage openings within crevices of the walls of a human dwelling. Sand fly species collected from all resting sites in this study are summarized in Table I. Sand flies from the Forest focus were collected at Limbo Field Station which is located about 8 km Northwest of Gamboa, Panama using aspirator hand collection (Chaniotis *et al.*, 1972). Samples were taken during a period slightly longer than two years (1969-1971), no information was reported on the sampling frequency. Sand fly species collected from all resting sites in this study are summarized in Table II.

### Null Model Tests

To test the null hypothesis that sand fly species co-occurrence at the local scale of transmission is random, C-scores (Stone & Roberts, 1990) were calculated using the data shown Table I and Table II.

**Table I. Old World sand fly species occurrence across resting sites in an agricultural area. Species presence/absence is denoted by 1/0.**

Species	Resting Site							
	Kennel A	Stable	Chicken House	Sheep Pen	Multi-species Pen	Kennel B	Wall Crevices	
<i>Phlebotomus perniciosus</i>	1	1	1	1	1	1	0	
<i>P. perfiliewi</i>	1	1	0	1	1	1	0	
<i>P. papatasi</i>	1	1	1	0	1	1	0	
<i>P. mascittii</i>	0	1	1	0	0	0	0	
<i>Sergentomyia minuta</i>	1	1	0	1	0	1	1	

**Table II. New World sand fly species occurrence across resting sites in a forested area. Species presence/absence is denoted by 1/0.**

Species	Resting Site					Green Plants	Leaf Litter	Animal burrows	Tree hollows
	Tree Trunk								
	0.0 m 0.6 m	0.6 m 2.0 m	5 m	9 m	15 m				
<i>Lutzomyia trinidadensis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>L. shannoni</i>	1	1	1	0	0	0	1	1	1
<i>L. ylephiletrix</i>	1	1	1	1	0	1	1	1	1
<i>L. trapidoi</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>L. vespertilionis</i>	1	1	1	1	0	0	0	1	1
<i>L. ovallesi</i>	1	1	1	1	1	0	1	0	0
<i>L. camposi</i>	1	1	0	0	0	0	1	1	1
<i>L. arborealis</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>L. cruciata</i>	1	1	1	1	1	0	1	0	0
<i>L. panamensis</i>	1	0	0	0	0	1	1	0	1
<i>L. pessoana</i>	1	0	0	0	0	1	1	1	1
<i>L. sanguinaria</i>	1	0	0	0	0	1	1	1	1
<i>Brumptomyia</i> sp	1	0	0	0	0	0	1	1	1
<i>L. rorotaensis</i>	0	1	1	1	1	0	0	0	0
<i>L. dysponeta</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>L. micropyga</i>	0	1	1	1	1	0	0	0	0
<i>L. puntigeniculata</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>L. undulata</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>L. serrana</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>L. olmeca</i>	0	0	0	0	0	1	1	1	0
<i>L. gomezi</i>	0	0	0	0	0	1	1	0	1
<i>L. rubidula</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>L. triramula</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	1
<i>L. aclydifera</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>L. vesicifera</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>L. carpenteri</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>L. runoides</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>L. nordestina</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>L. saulensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>L. aragaoi</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>L. barrettoii</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>L. insolita</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Warileya nigrosacculus</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>L. dasymera</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>L. hansonii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Null-model tests for C-scores were carried out using the program Co-Occur (Ulrich, 2006). The null models were fixed-fixed, i.e., row and column sums of the original matrix were preserved. This algorithm was chosen because of its good statistical properties, including the low frequencies of type I and II errors when tested against random and structured matrices (Gotelli, 2000). The random matrices were created using a sequential swap algorithm (Gotelli & Entsminger, 2003). Null model tests were done using 5000 randomizations of the original dataset. If the C-score value of the dataset was significantly larger than the one obtained with the randomizations, species are considered to be non-aggregated. When a C-score is significantly smaller species are aggregated and when the two values are similar co-occurrence patterns are random (Stone & Roberts, 1992). Further details about null models and C-scores applied to the community ecology of vectors are presented in Chaves *et al.* (2010).

## RESULTS

Results for the null model tests are shown in Table III. The C-score null-model test for the sand fly community structure in the farmland corresponded to that expected under random conditions, i.e., without differences between the expected value and the simulations. The C-score null-model test for the sand fly community structure in the forest was segregated, with the expected value being significantly higher than the value obtained by simulations.

## DISCUSSION

Studies on sand fly ecology are very scarce when compared to studies on other vectors like mosquitoes or kissing bugs. Although it would have been ideal to study local patterns restricted to either New or Old World sand flies, this information has not been published for any given site with the high level of detail presented by Chaniotis *et al.* (1972) and Bongiorno *et al.*

(2003). In addition, it can be argued that comparing New and Old World sand fly communities to study the use of resting sites is sound. For example, similar patterns of decreased diversity in agriculturally transformed landscapes have been reported across gradients of habitat intervention, as well as the widespread microhabitat usage by the most common sand fly species (Travi *et al.*, 2002; Warburg *et al.*, 1991). At the local scale of transmission, patterns changed from segregated in the forest to random in the farmland, a trend which probably is linked to the expansion of the disease to multiple hosts following environmental modification. This phenomenon has been partially studied in the Neotropics, where the extraction of selected tree species at a site in the Amazon forest did not change the rate of infection in Sand Flies following a logging event that led to the reduction of reservoirs (Pessoa *et al.*, 2007). Although in the forest site both *Lutzomyia trapidoi* (Fairchild & Hertig) and *Lu. trinidadensis* (Newstead) were present across all microhabitats their densities were low in some of them (Chaniotis *et al.*, 1972). Thus, the homogenization of the environment can favor the contact between most host species and sand fly species like *Lu. trapidoi* and *Lu. trinidadensis*. The latter can be explained by the “ecological fitting” (Janzen, 1985) of those sand fly vector species, i.e., their ability to be present everywhere and to exploit hosts that likely were associated with other sand fly species that have a diminished ability to contact several mammal host species. The fact that farmland sand fly species can rest across all suitable sites may indicate their ability to forage on blood from all hosts in the farmland, when compared to the forest where some species are strongly restricted to specific microhabitats. This finding precludes interventions based on the idea that the disease will disappear with the primary forest (Chaves *et al.*, 2008), and favors measures directed at avoiding contact with vectors. However, more ecological studies on sand fly microhabitat and its relationship to blood foraging are needed to determine whether the choice of resting places is influenced by environmental conditions that may vary across other elements of the local landscape of transmission like climate.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The author is thankful to Dr. Bruce Alexander for his valuable comments on an earlier draft. This work was supported by Swedish International Development Agency – Netropica grant No. 04-N-2010 and the Gorgas Award from the American Society of Tropical Medicine and Hygiene.

**Table III. C-score values for phlebotomine sand fly communities across several resting sites in a farmland and a forest area.**

Dataset	C-Score	Mean ± variance of simulated C-scores	P
Farmland	1.600	1.532 ± 0.023	n.s.
Forest	2.240	1.841 ± 0.337	0*

n.s. not significant ( $P>0.05$ ),

\* statistically significant ( $P<0.0001$ )

## REFERENCES

- Alexander B., Agudelo L. A., Navarro F., Ruiz F., Molina J., Aguilera G. & Quiñones M. L. (2001). Phlebotomine sandflies and leishmaniasis risks in Colombian coffee plantations under two systems of cultivation. *Med. Vet. Entomol.* **15**: 364-373.
- Bongiorno G., Habluetzel A., Khoury C. & Maroli M. (2003). Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Tropica.* **88**: 109-116.
- Chaniotis B. N., Tesh R. B., Correa M. A. & Johnson K. M. (1972) Diurnal resting sites of phlebotomine Sandflies in a panamanian tropical forest. *J. Med. Entomol.* **9**: 91-98.
- Chaves L. F. & Añez N. (2004). Species co-occurrence and feeding behavior in sand fly transmission of American cutaneous leishmaniasis in western Venezuela. *Acta Tropica.* **92**: 219-224.
- Chaves L. F., Cohen J. M., Pascual M. & Wilson M. L. (2008). Social exclusion modifies climate and deforestation impacts on a vector-borne disease. *PLoS Negl Trop Dis.* **2**: e176.
- Chaves L. F., Harrington L. C., Keogh C. L., Nguyen A. M. & Kitron U. D. (2010). Blood feeding patterns of mosquitoes: random or structured? *Frontiers in Zoology.* **7**: 3.
- Gotelli N. J. (2000). Null model analysis of species co-occurrence patterns. *Ecology.* **81**: 2606-2621.
- Gotelli N. J. & Entsminger G. L. (2003). Swap algorithms in null model analysis. *Ecology.* **84**: 532-535.
- Janzen D. H. (1985) On ecological fitting. *Oikos.* **45**: 308-310.
- Jimenez A. E., Rojas J. C., Vargas F. & Herrero M. V. (2000). Temporal and spatial variation of phlebotomine (Diptera : Psychodidae) community diversity in a cutaneous leishmaniasis endemic area of Costa Rica. *J. Med. Entomol.* **37**: 216-221.
- Morrison A. C., Ferro C., Morales A., Tesh R. B. & Wilson M. L. (1993). Dispersal of the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) at an Endemic Focus of Visceral Leishmaniasis in Colombia. *J. Med. Entomol.* **30**: 427-435.
- Pessoa F. A. C., Medeiros J. F. & Barrett T. V. (2007). Effects of timber harvest on phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a production forest: abundance of species on tree trunks and prevalence of trypanosomatids. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz.* **102**: 593-599.
- Rotureau B., Gaborit A., Issaly J., Carinci R., Fouque F. & Carne B. (2006). Diversity and ecology of sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in coastal French Guiana. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75**: 62-69.
- Salomon O. D., Quintana M. G. & Zaidenberg M. (2008). Urban distribution of Phlebotominae in a cutaneous leishmaniasis focus, Argentina. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz.* **103**: 282-287.
- Stone L. & Roberts A. (1990). The Checkerboard Score and Species Distributions. *Oecologia.* **85**: 74-79.
- Stone L. & Roberts A. (1992). Competitive-Exclusion, or Species Aggregation - an Aid in Deciding. *Oecologia.* **91**: 419-424.
- Travi B. L., Adler G. H., Lozano M., Cadena H. & Montoya-Lerma J. (2002). Impact of habitat degradation on Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of tropical dry forests in northern Colombia. *J. Med. Entomol.* **39**: 451-456.
- Ulrich W. (2006). CoOccurrence – a FORTRAN program for species co-occurrence analysis. [www.uni.torun.pl/~ulrichw](http://www.uni.torun.pl/~ulrichw).
- Warburg A., Montoya-Lerma J., Jaramillo C., Cruzruiz A. L. & Ostrovska K. (1991). Leishmaniasis Vector Potential of *Lutzomyia* Spp in Colombian Coffee Plantations. *Med. Vet. Entomol.* **5**: 9-16.

Recibido el 30/12/2010  
Aceptado el 14/03/2011



## Evaluación de la posible asociación entre la presencia de parásitos intestinales y *Helicobacter pylori* en población infantil de la etnia Warao, Venezuela

### *Evaluation of the possible association between the presence of intestinal parasites and Helicobacter pylori in children of ethnic Warao*

Orquídea Leonor Rodríguez, Diana Ortiz-Princz\*, María Eugenia Cavazza, Elianska López & Isabel Hagel

#### RESUMEN

Las infecciones por microorganismos gastrointestinales constituyen hoy en día una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en países en vías de desarrollo. Nos planteamos como objetivo evaluar la posible asociación entre la presencia de parásitos intestinales y la infección por *Helicobacter pylori*, y el comportamiento de anticuerpos séricos y secretores en una población infantil de la etnia Warao del Edo. Delta Amacuro, Venezuela. La presencia de parásitos se determinó por examen microscópico directo de las heces. Los niveles séricos de IgE total, IgG anti *H. pylori* e IgA anti *Giardia duodenalis*; y los secretores IgA total y específica a *G. duodenalis* y *H. pylori* en muestra de saliva, se determinaron utilizando el método de ELISA. El 65% de los niños estaban parasitados por protozoarios, observándose un 47% de poliparasitismo. Encontramos una mayor seroprevalencia de *H. pylori* en el grupo de niños no parasitados (46%) comparado con los parasitados (25%) ( $P<0,05$ ). Sin embargo, los niños seropositivos a *H. pylori* y parasitados con *G. duodenalis* mostraron niveles séricos de IgE total mayores que los no parasitados ( $P<0,01$ ); en contraparte, los niveles de IgA secretora total y específica a *H. pylori* y *G. duodenalis* estaban disminuidos ( $P<0,05$ ). Es posible que la respuesta inflamatoria generada por *Giardia* pueda aumentar los niveles de IgE total y disminuir la respuesta de IgA secretora favoreciendo la instauración de la infección por *H. pylori*.

**Palabras clave:** *Giardia duodenalis*, *Helicobacter pylori*, parásitos intestinales, respuesta inmune.

#### INTRODUCCIÓN

Las infecciones por parásitos intestinales constituyen hoy en día una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en países en vías de desarrollo (Bakr *et al.*, 2009; Hagel *et al.*, 2001). Además, ha sido establecido que deficiencias en las

#### SUMMARY

The infections for gastrointestinal microorganisms represent nowadays one of the major reasons of morbidity and mortality in developing countries. We had evaluated both, the possible association between the presence of intestinal parasites and infection by *Helicobacter pylori*, and the production of serum and salivary antibodies in Amerindian Warao children from the Orinoco Delta, Venezuela. The prevalence of parasites was determined by faecal examination. The levels of serum antibodies (total IgE, specific anti- *H. pylori* IgG and anti *G. duodenalis* IgA) and salivary antibodies (total and specific IgA to *G. duodenalis* and *H. pylori*), was determined by ELISA. 65% of the child population was parasitized by protozoos, and a 47% of polyparasitism was observed. We found a major seroprevalence of *H. pylori* in the group of children not parasitized (46 %) compared with the parasitized ones (25 %) ( $P<0.05$ ). Nevertheless, the seropositive children to *H. pylori* and parasitized with *G. duodenalis* showed levels of total IgE higher than the non parasitized ones ( $P<0.01$ ); in contrast, levels of total and specific secretory IgA to *H. pylori* and *G. duodenalis* were decreased ( $P<0.05$ ). It is possible that the inflammatory response generated by *G. duodenalis* infection may increase levels of total IgE and diminish secretory IgA response favoring the establishment of infection by *H. pylori*.

**Key words:** *Giardia duodenalis*, *Helicobacter pylori*, intestinal parasites, immune response.

condiciones ambientales y socioeconómicas favorecen una mayor exposición y persistencia de agentes infecciosos intestinales, lo cual modula la respuesta inmune y afecta directamente el desarrollo de una respuesta inmune local eficiente y protectora (Cooper *et al.*, 1991; Ortiz *et al.*, 2000). Esta situación se hace particularmente evidente en comunidades indígenas de

Venezuela que se caracterizan por ausencia de servicios de agua potable y disposición de excretas adecuadas.

*Helicobacter pylori*, el agente causal de una infección crónica, progresiva y transmisible, coloniza alrededor del 50% de la población mundial y puede generar desde leves hasta graves trastornos gástricos. Aunque las manifestaciones gastroduodenales asociadas a *H. pylori* se presentan con mayor frecuencia en adultos, habitualmente la infección se adquiere durante la niñez y posiblemente la respuesta humoral y de mucosa desarrollada durante este tiempo determine, en gran parte, el curso de la infección natural (Goodman *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 2000). Más aún, la infección por *H. pylori* favorece infecciones entéricas por depresión de la barrera creada por el ácido gástrico, conduciendo a diarreas, malnutrición y retardo en el crecimiento; por lo tanto la prevención o erradicación de *H. pylori* puede reducir significativamente la incidencia de un síndrome que es la mayor causa de morbilidad y mortalidad en la infancia (Weaver, 1995), además de prevenir el desarrollo de enfermedades gástricas graves asociadas a esta bacteria, de aquí la importancia de los estudios seroepidemiológicos en las poblaciones infantiles. En este sentido, se ha establecido la valoración de anticuerpos séricos específicos tipo IgG para estudios a gran escala de evaluaciones epidemiológicas de comunidades (Megraud *et al.*, 1996; Karvar *et al.*, 1997).

Innumerables evidencias sugieren que la IgA secretora (IgAs) tiene un papel principal en la protección de la mucosa gastrointestinal; esta es liberada al lumen intestinal ensamblada al componente secretor e impide el contacto de los microorganismos con las superficies epiteliales formando así complejos inmunes que son eliminados mediante los movimientos peristálticos del sistema gastrointestinal, además la IgAs es capaz de eliminar antígenos mediante reacciones de citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por células y promover la fagocitosis (Welsh *et al.*, 1998; Acheson *et al.*, 2004), lo cual indica que su valoración es relevante en infecciones que comprometen la integridad de la mucosa gástrica. Esta función otorgada a la IgAs ha sido evidenciada mediante estudios de inmunidad pasiva experimentales y en humanos, en los cuales los títulos de IgAs se correlacionaron con un retardo en la instauración de patógenos gastrointestinales, tales como *H. pylori* y *Giardia duodenalis* (Walterspiel *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995).

Diversos autores establecen que la naturaleza de una infección parasitaria específica en un hospedador concurrentemente infectado con otro agente infeccioso, puede ser muy diferente a la infección causada por el mismo parásito en un hospedador no infectado (Cox, 200; Geiger *et al.*, 2002).

En Venezuela no se han reportado estudios de coexistencia de agentes infecciosos gastrointestinales y la capacidad de respuesta frente a estos agentes patógenos en comunidades rurales. En tal sentido, el objetivo de este trabajo fue evaluar la posible asociación entre la presencia de parásitos intestinales y la seroprevalencia de *H. pylori*, y el comportamiento de anticuerpos séricos y secretores en una población infantil indígena de Venezuela.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Población estudiada*

Se realizó un estudio descriptivo de 81 niños de ambos sexos (edad media= 6.8±3.6 años) de la comunidad Isla Misteriosa del Estado Delta Amacuro, Venezuela. Este estado se caracteriza por presentar un clima tropical lluvioso y sus comunidades están dispersas a lo largo de las orillas del Delta del Río Orinoco, viviendo principalmente de la caza y la pesca. Estas características contribuyen a un riesgo mayor de sufrir enfermedades gastrointestinales.

Los niños fueron evaluados bajo supervisión y responsabilidad del dispensario médico establecido en las áreas rurales por el Ministerio del Poder Popular para la Salud y el personal médico y de laboratorio del Instituto de Biomedicina.

A cada niño se le realizó una evaluación clínica, hematológica, parasitológica e inmunológica, lo cual permitió impartir el tratamiento apropiado de acuerdo a las deficiencias e infecciones encontradas, acción provista por el programa de atención al indígena de la Guardia Nacional.

### *Evaluación Clínica*

Los niños fueron examinados físicamente por médicos pediatras inmunólogos del Instituto de Biomedicina, de la Guardia Nacional y médicos locales. En la historia clínica se hizo énfasis en aspectos

relacionados con patologías gastrointestinales, de acuerdo al protocolo establecido por la Sociedad Venezolana de Puericultura y Pediatría.

#### *Estudio parasitológico*

La evaluación de las heces seriadas se hizo por revisión microscópica directa de cada muestra fecal fresca con solución salina 0.85% y lugol.

#### *Estudio Inmunológico*

Seroprevalencia de *H. pylori*: se evidenció por la determinación de IgG específica utilizando el estuche comercial de ELISA PYLORISSET-EIA-G (Orion Diagnóstica). Los resultados fueron expresados como títulos de anticuerpos y, siguiendo las indicaciones del fabricante, se consideraron títulos positivos aquellos mayores o iguales a 300.

Niveles de IgE sérica total: se midieron por una ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) siguiendo el protocolo descrito en estudios previos<sup>3</sup>.

#### *Niveles de IgA secretora total y específica*

Para valorar la IgAs total y específica se recolectaron muestras de saliva a través de un algodón estéril que se introdujo en la boca de cada niño por 10 minutos, luego se conservaron en tubos con EDTA (Vacutainer) a -20°C hasta su procesamiento.

La cantidad de IgAs total se midió utilizando placas de microtitulación sensibilizadas durante dos horas a 37°C con un anticuerpo monoclonal anti-componente secretor (IgA) humano de Sigma a una dilución 1:1000, y bloqueadas con PBS - suero de caballo al 10%. Las muestras diluidas 1:500 fueron añadidas y luego el conjugado anti - IgA peroxidasa 1:2500. Se reveló con OPD y la absorbancia se leyó a 492 nm.

Para la determinación de IgAs específica a *H. pylori* se estandarizó una ELISA empleando como antígeno un sonicado de colonias bacterianas obtenidas de cultivo de biopsias de pacientes infectados. Se acoplaron tiras de poliestireno con 2.5µg/pozo del antígeno, se bloquearon con PBS tween - BSA 0.5% y las muestras se diluyeron 1/10, el conjugado añadido se usó a 1/1000. Se reveló con OPD y se leyó la absorbancia a 492 nm.

La determinación de IgA sérica y secretora específica a *G. duodenalis* se realizó mediante una ELISA descrita previamente (Rodríguez *et al.*, 2004).

#### *Análisis estadístico*

Las medias y las desviaciones estándares se compararon por pruebas t no pareadas. Para comparar las proporciones entre los diferentes grupos se usó la prueba exacta de Fisher. Debido a que los niveles de IgE sérica total no tienen una distribución normal, se realizó una transformación logarítmica de los valores expresados en UI/mL y se calcularon las medias y desviaciones estándares. Un valor de  $P < 0,05$  se consideró significativo.

#### *Consideraciones éticas*

El protocolo de trabajo fue aprobado por la Comisión de Bioética del Instituto de Biomedicina - Ministerio del Poder Popular para la Salud- Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela y por la Coordinación Regional de Salud del Estado Delta Amacuro.

## RESULTADOS

### *Prevalencia de parásitos y de Helicobacter pylori*

La prevalencia de parásitos gastrointestinales encontrada fue del 65% (53/81 niños), de los cuales 47% estaba poliparasitado (Tabla I). Los protozoarios representaron la mayor prevalencia (94%) mientras que solo se consiguieron 10 niños (18%) parasitados con helmintos. *G. duodenalis* fue el parásito más frecuente, por lo cual, se determinaron anticuerpos séricos y secretores específicos a este parásito, para establecer las posibles asociaciones con la seroprevalencia de *H. pylori*. Sólo un 28 (35%) de los niños no estaban parasitados para el momento de la evaluación.

La seroprevalencia de *H. pylori* fue del 32% en toda la población infantil estudiada, mayor en el grupo de niños no parasitados (46%) comparado con los parasitados (25%) ( $P < 0,05$ ). No se encontró diferencia de seropositividad de acuerdo a los parásitos encontrados (Tabla I); indicando que la colonización por *H. pylori* podría ser independiente de la presencia de otras infecciones gastrointestinales.

El 51% del total de niños evaluados presentó sintomatología gastrointestinal (diarrea,

**Tabla I. Prevalencia de parásitos gastrointestinales y seroprevalencia de *H. pylori* en niños de la etnia Warao.**

	Número de niños (%)	Número de Niños Seropositivos a <i>H. pylori</i> (%)
Al menos un parásito	53 (65)	13 (25)*
Protozoarios:	50 (94)	12 (24)
<i>Giardia duodenalis</i>	26 (49)	7 (27)
<i>Blastocystis hominis</i>	23 (43)	6 (26)
<i>Entamoeba coli</i>	19 (36)	7 (37)
Helminetos:	10 (18)	2 (20)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	4 (8)	1 (25)
<i>Trichuris trichura</i>	3 (6)	0 (0)
<i>Hymenolepis nana</i>	3 (6)	1 (33)
Sin parásitos	28 (35)	13 (46)*

\*  $P < 0,05$ 

dolor abdominal), de los cuales el 79% (27/34) se encontraban parasitados con al menos un parásito y 35% reveló seropositividad a *H. pylori*.

#### Niveles de IgA secretora total y específica.

Los niveles de IgAs total y específica fueron similares en los grupos parasitados y no parasitados (diferencia no significativa) (Tabla II). Sin embargo, se encontró una ligera disminución de dichos niveles en los niños parasitados con *G. duodenalis* ( $P < 0,05$ ) con respecto a aquellos parasitados con *B. hominis* y *Ent. coli*, parásitos más prevalentes (Fig. 1). No se encontró diferencia significativa en los niveles de anticuerpos secretores en los grupos parasitados seropositivos y seronegativos a *H. pylori* (Tabla III); no obstante, se observó que los

niveles de IgAs total eran significativamente más bajos ( $P < 0,05$ ) en los niños seropositivos parasitados con *G. duodenalis* que en los no parasitados por el mismo (Fig. 2). Igual comportamiento se observó en los niveles de IgAs anti *H. pylori*, los cuales estaban disminuidos en el grupo parasitado con *G. duodenalis* comparados con el grupo parasitado con otros microorganismos ( $P < 0,01$ ) (Fig. 3).

#### Niveles de IgA sérica específica a *G. duodenalis* e IgE sérica total

Con respecto a los anticuerpos séricos, no se encontró diferencia significativa entre el grupo parasitado y el no parasitado (Tabla II). Sin embargo, en contraparte con lo observado en los niveles de IgAs,

**Tabla II. Niveles de Inmunoglobulinas totales y específicas anti *G. duodenalis* y *H. pylori* en niños parasitados y no parasitados de la etnia Warao.**

	Niños parasitados (n=53)	Niños no parasitados* (n=28)
IgE sérica total (UI/mL) <sup>a</sup>	1309 (5383)	1222 (4613)
IgA sérica anti <i>G. duodenalis</i> (U.D.O) <sup>b</sup>	0,879 ± 0,377	0,912 ± 0,372
IgA secretora total (U.D.O) <sup>b</sup>	0,631 ± 0,268	0,675 ± 0,268
IgA secretora anti <i>G. duodenalis</i> (U.D.O) <sup>b</sup>	0,485 ± 0,254	0,474 ± 0,173
IgA secretora anti <i>H. pylori</i> (U.D.O) <sup>b</sup>	0,488 ± 0,239	0,493 ± 0,207

a Media geométrica (M.G. ± Desviación estándar)

b Media ± Desviación estándar; U.D.O: unidades de densidad óptica

\* No parasitados para el momento de la evaluación

**Tabla III. Niveles de Inmunoglobulinas totales y específicas anti *G. duodenalis* y *H. pylori* en niños parasitados de la etnia Warao con serología positiva y negativa a *H. pylori*.**

	Seropositivos a <i>H. pylori</i> (n=13)	Seronegativos a <i>H. pylori</i> (n=40)
IgE sérica total (UI/mL) <sup>a</sup>	1439 (5035)	1268 (5559)
IgA sérica anti <i>G. duodenalis</i> (U.D.O) <sup>b</sup>	0,939 ± 0,397	0,859 ± 0,373
IgA secretora total (U.D.O) <sup>b</sup>	0,722 ± 0,233	0,601 ± 0,275
IgA secretora anti <i>G. duodenalis</i> (U.D.O) <sup>b</sup>	0,514 ± 0,145	0,475 ± 0,281
IgA secretora anti <i>H. pylori</i> (U.D.O) <sup>b</sup>	0,527 ± 0,229	0,475 ± 0,244

<sup>a</sup> Media geométrica (M.G. ± Desviación estándar)

<sup>b</sup> Media ± Desviación estándar; U.D.O: unidades de densidad óptica

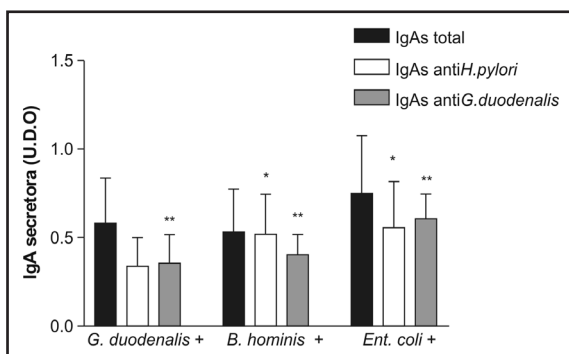
los niveles de IgE total fueron significativamente más altos ( $P<0,01$ ) en los niños seropositivos parasitados con *G. duodenalis* en comparación con seropositivos no parasitados.

## DISCUSIÓN

Numerosos estudios han reportado que en países en vías de desarrollo la prevalencia de parasitosis intestinales está asociada con los altos niveles de pobreza existentes, particularmente a la falta de condiciones sanitarias adecuadas en las comunidades, especialmente en las de ambiente rural (Cooper, 1991;

Hagel *et al.*, 2001). En este estudio encontramos una alta prevalencia de infecciones parasitarias mixtas del 47%, lo cual es similar a los hallazgos de otros autores, donde postulan que en comunidades rurales existe una alta tasa de poliparasitismo (Ortiz *et al.*, 2000; Hagel *et al.*, 2001; Fleming *et al.*, 2006); sin embargo, hallamos una prevalencia de helmintos baja (18%) y una prevalencia de giardiasis de aproximadamente dos veces más (49%) comparado con otros estudios realizados por nuestro grupo de investigación en comunidades rurales, donde la prevalencia de helmintos alcanza alrededor del 80% (Hagel *et al.*, 1999; Ortiz *et al.*, 2000; Hagel *et al.*, 2001). Esto pudiera deberse a las campañas puntuales

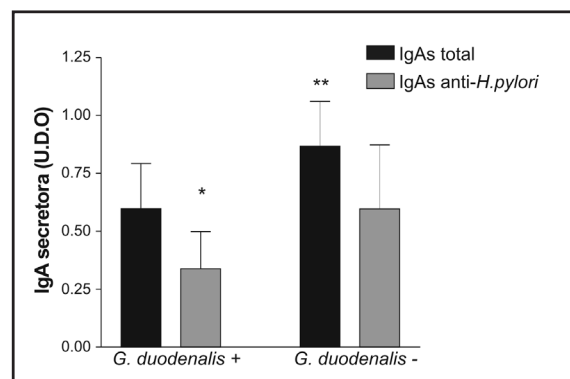
**Fig. 1. Niveles de IgA secretora total y específica en niños de la etnia Warao parasitados con los protozoarios más prevalentes.**



\* $P<0,05$  Al comparar los niveles de IgAs anti *H. pylori* de los niños *B. hominis* y *Ent. coli* positivos con los *G. duodenalis* positivos.

\*\* $P<0,05$  Al comparar los niveles de IgAs anti *G. duodenalis* de los niños *B. hominis* y *Ent. coli* positivos con los *G. duodenalis* positivos.

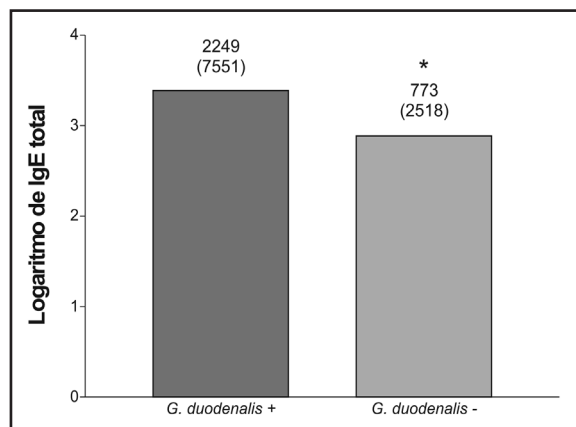
**Fig. 2. Niveles de IgA secretora total y específica anti-*H. pylori* en niños seropositivos a *H. pylori* de la etnia Warao parasitados y no parasitados con *G. duodenalis*.**



\* $P<0,05$  Al comparar con los niveles de IgAs total de los niños positivos a *G. duodenalis* positivos.

\*\* $P<0,01$  Al comparar con los niveles de IgAs anti *H. pylori* de los niños positivos a *G. duodenalis* positivos.

**Fig. 3. Niveles de IgE sérica total en niños seropositivos a *H. pylori* de la etnia Warao parasitados y no parasitados con *G. duodenalis*.**



\* $P < 0,01$  Al comparar con los niveles de IgE sérica total de los niños positivos a *G. duodenalis* positivos.

de desparasitación que se ejecutan en Venezuela en zonas rurales donde las infecciones helmínticas son endémicas, siendo probable que esos niños hayan sido tratados con antihelmínticos antes de la realización de nuestro estudio sin haber recibido tratamiento para protozoarios, lo cual coincide con otros autores que han reportado un aumento de la prevalencia de *Giardia* en niños que reciben tratamiento antihelmíntico (Rousham, 1994).

Por su parte, los factores ligados a la prevalencia de *H. pylori* han sido también motivo de diversas investigaciones y se ha encontrado estrechamente asociada con las condiciones de vida (Torres *et al.*, 2000; Ortiz *et al.*, 2003; Ramírez & Sánchez, 2009). Estudios en comunidades en vías de desarrollo con bajo nivel socioeconómico y pobre mantenimiento de los sistemas de agua, sugieren que los factores ambientales son importantes en la transmisión de esta bacteria (Engstrand, 2001; Dube *et al.*, 2009), esto podría explicar en parte la prevalencia de *H. pylori* encontrada en las comunidades indígenas evaluadas donde uno de los principales problemas radica en la falta de agua potable y educación en los sistemas de consumo adecuado de las aguas. La incidencia de la infección por *H. pylori* generalmente aumenta con la edad, inclusive han sido notados cambios dentro de la población infantil por rangos de edades; sin embargo, varias evidencias sugieren que la primo infección ocurre más frecuentemente en niños (Torres *et al.*, 2000; Blaser & Atherton, 2004). En

este estudio reportamos una seroprevalencia del 32%, lo cual está en el rango encontrado en otros estudios realizados en poblaciones infantiles que va desde 10% hasta 80% (Torres *et al.*, 2000).

Existen vastas evidencias experimentales que sugieren que el estado clínico de muchas infecciones puede ser marcadamente influenciado por la presencia de organismos no relacionados (Cox, 2001; Du *et al.*, 2006), es por esto que la evaluación de los mecanismos inmunológicos involucrados en infecciones intestinales coexistentes, en comunidades donde están presentes múltiples factores de riesgo relacionados con la adquisición precoz de los microorganismos, es de vital importancia para el entendimiento fisiopatológico de las mismas.

En este estudio encontramos que los niños parasitados presentaron menor prevalencia de *H. pylori*. Estudios anteriores han demostrado que niños con alta prevalencia de helmintiasis presentan una mayor respuesta de anticuerpos IgG1 (tipo Th2) frente a *H. pylori* (Whary *et al.*, 2005). Además, ha sido reportado que la respuesta Th2 protege a la mucosa gastrointestinal del daño causado por los mediadores inflamatorios liberados durante la respuesta Th1 provocada por *Helicobacter* reduciendo el riesgo de gastritis atrófica (Fox *et al.*, 2000). Estos hallazgos soportan la hipótesis de que en los niños de estas comunidades Warao, donde las condiciones ambientales favorecen el ciclo de vida y la transmisión de parásitos a niños, la respuesta inmune Th2 que se suscita por la presencia en su mayoría de helmintos (Ortiz *et al.*, 2000; Hagel *et al.*, 2001), que en nuestro estudio se evidencia por los altos niveles de IgE sérica encontrados, podría estar ayudando a reducir la sintomatología asociada a la infección por esta bacteria, más aun, pudiera actuar como un factor protector frente a la primo-infección de *H. pylori* en estos niños.

Por otra parte, la coinfección de *G. duodenalis* y *H. pylori* es motivo de investigación debido a la relación de estas infecciones con gastritis crónica (Reynaert *et al.*, 1995; Zeyrek *et al.*, 2008). Ha sido reportado que alrededor de un 12% de pacientes con giardiasis intestinal hacen una giardiasis gástrica; no obstante, un 75% de los mismos tienen *H. pylori* (Moreira *et al.*, 2005). En nuestro estudio encontramos que el 27% de los niños con *G. duodenalis* presentaron títulos positivos de IgG específica para *H. pylori*, lo cual afirma la sugerencia de algunos autores de investigar

*G. duodenalis* en biopsias gástricas, particularmente aquellas que muestran gastritis atrófica y *H. pylori* (Doglioni *et al.*, 1992; Misra *et al.*, 2006). Además, los niños parasitados con *Giardia* e infectados con *H. pylori* representan un grupo que está mayormente expuesto a otras enfermedades entéricas provocando mayor daño a la mucosa gastrointestinal, aumentando así el riesgo a desarrollar enfermedades gástricas severas en la edad adulta. Es posible que estos agentes infecciosos compartan una misma ruta de transmisión fecal-oral (Moreira *et al.*, 2005) aunque ambas infecciones pudieran ocurrir de manera independiente, pero también es probable que la presencia de uno de estos patógenos incremente la susceptibilidad del individuo a ser infectado por el otro.

Con respecto a la homogeneidad de los niveles de anticuerpos totales y específicos encontrada en la población infantil evaluada, podríamos inferir que es un reflejo de retos antigénicos constantes por la exposición continua a los agentes infecciosos o afecciones crónicas más que el desarrollo de infecciones agudas por los mismos.

Los niveles de IgA secretora total y específica se encontraron elevados en los niños parasitados con *G. duodenalis*, *B. hominis* y *Ent. coli*, lo cual coincide con lo reportado en estudios anteriores donde evidenciamos que los protozoarios estimulan la producción de IgAs (Rodríguez *et al.*, 2004). No obstante, en aquellos parasitados solamente con *G. duodenalis* los niveles de este anticuerpo tendieron a disminuir significativamente con respecto a los parasitados con *B. hominis* y *Ent. coli*. Igualmente observamos que los niños seropositivos a *H. pylori* y parasitados con *G. duodenalis* mostraron niveles de IgA secretora total y específica anti *H. pylori* más bajos que los no parasitados con el mismo, indicando que *G. duodenalis* puede disminuir la producción de anticuerpo IgAs frente a *H. pylori*. Esto podría indicar que la coinfección disminuye el efecto protector de la IgA secretora pudiendo potenciarse un aumento de los efectos patológicos. En ese sentido, Abou Holw *et al.* (2009), describen que en pacientes coinfectados por *G. duodenalis* y *H. pylori* los síntomas gastrointestinales y el número de lesiones son mayores que en los pacientes que solo sufrían giardiasis.

En cuanto a la determinación de títulos de IgA secretora en giardiasis se han reportado resultados contradictorios. Aunque estudios experimentales y

humanos soportan que la secreción de IgA específica a *Giardia* está relacionada directamente con la eliminación del parásito (Pérez *et al.*, 1994; Langford *et al.*, 2002), diversos autores han encontrado en humanos niveles bajos de IgAs y niveles normales en suero (Pérez *et al.*, 1994), coincidiendo con lo encontrado en este estudio a pesar de que los niveles en suero son altos en el grupo evaluado. En tanto, otras investigaciones arrojan una relación directa entre los niveles de IgAs intestinal y la tasa de exposición a este parásito flagelado en la población estudiada (Miotti *et al.*, 1985). Previamente, evaluamos los niveles de IgAs en niños escolares de localidades urbanas y periurbanas y encontramos niveles más elevados de este anticuerpo en los parasitados con *Giardia* en comparación con los no infectados (Rodríguez *et al.*, 2004), postulando que la respuesta de IgAs contra *Giardia* medida en saliva es un método diagnóstico específico para este parásito (Hashkes *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 2004). Otro grupo de autores reportaron que las diferencias significativas en los niveles de este anticuerpo entre niños parasitados y no parasitados con *Giardia* se evidenciaban sólo en el grupo de niños escolares de 4 a 14 años de edad (Noemi *et al.*, 1981), siendo superiores en el grupo parasitado, sin embargo, 5 a 15% de los niños con giardiasis sintomática presentaron niveles disminuidos de este anticuerpo al comparar con el grupo control. En este contexto, estudios posteriores estarían en parte encaminados a dilucidar la relación entre la producción de este anticuerpo y los cambios histopatológicos de la mucosa gastrointestinal en pacientes infectados con *G. duodenalis*.

No obstante, las evidencias señaladas y los resultados encontrados en este estudio nos permiten inferir que la giardiasis sintomática pudiese estar produciendo una alteración de la arquitectura de la mucosa intestinal directamente a través de su adherencia a las microvellosidades intestinales por su disco succionario e interferir en el ensamblaje de la IgA polimérica con el componente secretor y posterior salida de la IgA secretora al lumen intestinal, o también a través de la secreción de cistein-proteasas que ha sido reportado que este tipo de enzimas parasitarias degradan la matriz extracelular, las mucoproteínas, la membrana basal epitelial y los anticuerpos tipo IgA e IgG producidos en respuesta al parásito (Que *et al.*, 1997).

Por otra parte, los niveles de IgE sérica total en el grupo *Giardia* y *H. pylori* positivos eran más

altos, lo cual coincide con trabajos anteriores en donde se ha observado que estas infecciones pueden favorecer la producción de IgE frente a antígenos no relacionados al parásito favoreciendo la aparición de síntomas de alergia (Pérez *et al.*, 1994; Di Prisco *et al.*, 1998). Es posible que la disfunción de la mucosa intestinal causada por *Giardia* favorezca la sensibilización por antígenos que estimulan la respuesta IgE, tras la deficiencia de IgA secretora en niños con *Helicobacter pylori*, más aún, que se relacione con la colonización y cronicidad de la infección por esta bacteria.

Además, autores han reportado que es probable que las enfermedades relacionadas con parásitos y *H. pylori* en indígenas y su respuesta inmune puedan ser una consecuencia de un desbalance ecológico cuando uno de los agentes infectantes se superpone, más que por la simple presencia de estos microorganismos en su hábitat natural (Marini *et al.*, 2007); por lo cual, los mecanismos de acción e interacción de *Giardia* y *H. pylori* así como su influencia y modulación frente a las infecciones helmínticas en la salud y enfermedad de los indígenas, son aspectos que deben ser revisados en profundidad tomando en cuenta las características étnicas, ecológicas y socio culturales que necesariamente deben influir en la infección y respuesta inmune de estos individuos.

#### AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento al personal médico de la Guardia Nacional, doctores Daniel Díaz y Manuel Maldonado, por su colaboración en la evaluación física de los niños. También agradecemos a la Dra. Maira Cabrera por la revisión crítica de este manuscrito. Este trabajo fue financiado por Fundación Proyecto País/Guardia Nacional y FONACIT IB-G-200500371.

#### REFERENCIAS

Abou Holw S. A., Anwar M. M., Heshmat M. G., Enany A. Y. & Rashad M. M. (2009). Effect of concomitant *Helicobacter pylori* infection in patients with *Giardiasis lamblia* in Egypt. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **39**: 439-446.

Acheson D. & Luccioli S. (2004). Mucosal immune response. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**: 387-404.

Bakr I. M., Arafa N.A., Ahmed M. A., Mostafa Mel H. & Mohamed M. K. (2009). Prevalence of intestinal parasitosis in a rural population in Egypt, and its relation to socio-demographic characteristics. *Egypt. Soc. Parasitol.* **39**: 371-381.

Blaser M. J. & Atherton J. C. (2004). *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J. Clin. Invest.* **113**: 321-333.

Cooper E. (1991). Intestinal parasitosis and the modern description of diseases of poverty. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**: 168-170.

Cox F. E. (2001). Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology.* **122**: S23-S38.

Di Prisco M. C., Hagel I., Lynch N. R., Jimenez J., Rojas R., Gil M., *et al.* (1998). Association between giardiasis and allergy. *Ann Allergy.* **81**: 261-265.

Dogliani C., De Boni M., Cielo R., Laurino L., Pelosio P., Braidotti P., *et al.* (1992). Gastric giardiasis. *J. Clin. Pathol.* **45**: 964-970.

Du Y., Agnew A., Ye X. P., Robinson P. A., Forman D. & Crabtree J. E. (2006). *Helicobacter pylori* and *Schistosoma japonicum* co-infection in a Chinese population: helminth infection alters humoral responses to *H. pylori* and serum pepsinogen I/II ratio. *Microbes Infect.* **8**: 52-60.

Dube C., Tanih N. F. & Ndip R. N. (2009). *Helicobacter pylori* in water sources: a global environmental health concern. *Rev. Environ. Health.* **24**: 1-14.

Engstrand L. (2001). *Helicobacter* in water and waterborne routes of transmission. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* **30**: 80S-84S.

Fleming F., Brooker S., Geiger S., Caldas I., Correa-Oliveira R., Hotez P., *et al.* (2006). Synergistic associations between hookworm and other helminth species in a rural community in Brazil. *Trop. Med. Int. Health.* **2**: 56-64.

Fox J. G., Beck P., Dangler C. A., Whary M. T., Wang T. C., Shi H. N. & Nagler-Anderson C. (2000). Concurrent enteric helminthes infection modulates

- inflammation and gastric immune responses and reduces *Helicobacter*-induced gastric atrophy. *Nat. Med.* **6**: 536-542.
- Geiger S. M., Massara C. L., Bethony J., Soboslay P. T., Carvalho O. S. & Correa-Oliveira R. (2002). Cellular responses and cytokine profiles in *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infected patients. *Parasite Immunol.* **24**: 499-509.
- Goodman K.J. & Correa P. (1995). The transmission of *Helicobacter pylori*. A critical review of the evidence. *Int. J. Epidemiol.* **24**: 875.
- Hagel I., Lynch N.R., Di Prisco M.C., Pérez M., Sánchez J.E., Pereyra B.N., et al. (1999). Helminthic infection and anthropometric indicators in children from a tropical slum: *Ascaris* reinfection after anthelmintic treatment. *J. Trop. Pediatr.* **45**: 215-220.
- 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.
- Hashkes P. J., Spira D. T., Deckelbaum R. J. & Granot E. (1994). Salivary IgA antibodies to *Giardia lamblia* in day care center children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **13**: 953-958.
- Karvar S., Karch H., Frosch M., Burghardt W. & Gross U. (1997). Use of Serum-specific Immunoglobulins A and G for detection of *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic gastritis by immunoblot analysis. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 3058-3061.
- Langford T. D., Housley M. P., Boes M., Chen J., Kagnoff M. F., Gillin F. D. & Eckmann L. (2002). Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. *Infect. Immun.* **70**: 11-18.
- Lee C. K., Weltzin R., Thomas W. D. Jr, Kleanthous H., Ermak T. H., Soman G., et al. (1995). Oral immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease induces secretory IgA antibodies and protects mice from challenge with *Helicobacter felis*. *J. Infect. Dis.* **172**: 161-172.
- Marini E., Maldonado-Contreras A. L., Cabras S., Hidalgo G., Buffa R., Marin A., et al. (2007). *Helicobacter pylori* and intestinal parasites are not detrimental to the nutritional status of Amerindians. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **76**: 534-540.
- Megraud F. (1996). Advantages and disadvantages of current diagnostic test for the detection of *Helicobacter pylori*. *Scand. J. Gastroenterol.* **215**: 57-62.
- Misra V., Misra S.P., Dwivedi M. & Singh P.A. (2006). *Giardia lamblia* trophozoites in gastric biopsies. *Indian J. Pathol. Microbiol.* **49**: 519-523.
- Miotti P. G., Gilman R. H., Pickering L. K., Ruiz-Palacios G., Park H. S. & Yolken R. H. (1985). Prevalence of serum and milk antibodies to *Giardia lamblia* in different populations of lactating women. *J. Infect. Dis.* **152**: 1025-1031.
- Moreira E. D. Jr, Nassri V. B., Santos R. S., Matos J. F., de Carvalho W. A., Silvani C. S., et al. (2005). Association of *Helicobacter pylori* infection and giardiasis: results from a study of surrogate markers for fecal exposure among children. *World J. Gastroenterol.* **11**: 2759-2763.
- Noemí I., Retamal C., Guiraldes E., Reyes H., Rebolledo L., Muñoz P., et al. (1981). Secretory IgA in the saliva of children infected with *Giardia lamblia* and in control children. Part I. *Rev. Chil. Pediatr.* **52**: 20-24.
- Ortiz D., Afonso C., Hagel I., Rodríguez O., Ortiz C., Palenque M. & Lynch N. (2000). Influencia de las infecciones helmínticas y el estado nutricional en la respuesta inmunitaria de niños venezolanos. *Pan. Am. J. Public Health.* **8**: 156-163.
- Ortiz D., Cavazza M. E., Rodríguez O., Hagel I., Correnti M. & Convit J. (2003). Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Warao lineage communities of Delta Amacuro state, Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **98**: 721-725.
- Pérez O., Lastre M., Bandera F., Díaz M., Domenech I., Fagundo R., et al. (1994). Evaluation of the immune response in symptomatic and asymptomatic human giardiasis. *Arch. Med. Res.* **25**: 171-177.

- Que X. & Reed S. L. (1997). The role of extracellular cysteine proteinases in pathogenesis of invasion. *Parasitol. Today*. **13**: 190-194.
- Ramírez Ramos A. & Sánchez Sánchez R. (2009). *Helicobacter pylori* 25 years after (1983 -2008): epidemiology, microbiology, pathogenics, diagnostics and treatment. *Rev. Gastroenterol. Perú*. **29**: 158-170.
- Reynaert H., Fernandes E., Bourgain C., Smekens L. & Devis G. (1995). Proton-pump inhibition and gastric giardiasis: a causal or casual association?. *J. Gastroenterol.* **30**: 775-780.
- Rodríguez O. L., Hagel I., González Y., Roque M. E., Vásquez N., López E., *et al.* (2004) Secretory IgA antibody responses in Venezuelan children infected with *Giardia duodenalis*. *J. Trop. Pediatr.* **50**: 68-72.
- Rousham E. K. (1994). An increase in *Giardia duodenalis* infection among children receiving periodic anthelmintic treatment in Bangladesh. *J. Trop. Pediatr.* **40**: 329-333.
- Torres J., Perez-Perez G., Goodman K. J., Atherton J. C., Gold B. D., Harris P. R., *et al.* (2000). A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. *Arch. Med. Res.* **31**: 431-469.
- Walterspiel J. N., Morrow A. L., Guerrero M. L., Ruiz-Palacios G. M. & Pickering L. K. (1994). Secretory anti-*Giardia lamblia* antibodies in human milk: protective effect against diarrhea. *Pediatrics*. **93**: 28-31.
- Weaver L. T. (1995). *Helicobacter pylori* infection, nutrition and growth of West African infants. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **89**: 347-350.
- Welsh F. K., Farmery S. M., MacLennan K., Sheridan M. B., Barclay G. R., Guillou P. J., *et al.* (1998). Gut barrier function in malnourished patients. *Gut*. **42**: 396-401.
- Whary M. T., Sundina N., Bravo L. E., Correa P., Quinones F., Caro F., *et al.* (2005). Intestinal helminthiasis in Colombian children promotes a Th2 response to *Helicobacter pylori*: possible implications for gastric carcinogenesis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **14**: 1464-1469.
- Zeyrek D., Zeyrek F., Cakmak A. & Cekin A. (2008). Association of *Helicobacter pylori* and giardiasis in children with recurrent abdominal pain. *Turkiye Parazitol. Derg.* **32**: 4-7.

Recibido el 10/11/2010  
Aceptado el 18/03/2011

## Diagnóstico de *Dirofilaria immitis* en el municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela *Diagnosis of Dirofilaria immitis in the municipality of Sucre, Sucre state, Venezuela*

Del Valle Guilarte<sup>1\*</sup>, Erika Gómez Martínez<sup>2</sup>, Fabiana El Hen<sup>1</sup>, Roselvia Guzmán<sup>1</sup>, Deborah Blondell<sup>1</sup>, Marcos Tulio Díaz<sup>2</sup> & Javier Santiago<sup>3</sup>

### RESUMEN

La dirofilariasis es una patología parasitaria, causada por los nematodos *Dirofilaria immitis* y *D. repens*, principalmente. Mientras que *D. immitis* presenta distribución mundial, *D. repens* se extiende por el viejo mundo. Ambas especies afectan a caninos y felinos domésticos y salvajes, así como a humanos, por lo que es un problema de salud pública mundial. En este estudio se determinó la prevalencia de *D. immitis*, en caninos del municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela. Se tomaron muestras sanguíneas a 138 caninos domésticos, mayores de seis meses, sin distinción de raza ni sexo, previo consentimiento informado por sus propietarios. El diagnóstico parasitológico de las microfilarias circulantes se realizó por examen directo y método de concentración Knott modificado; las características morfológicas fueron observadas en extendidos teñidos con Giemsa. Se utilizó un estuche comercial, para la captura de antígenos de excreción-secreción de *D. immitis*. De los 138 caninos estudiados, 12 casos positivos (8,7%) fueron detectados parasitológicamente, mientras que por el estuche comercial se detectaron antígenos en 20 caninos (14,5%), lo que demuestra que existe una dirofilariasis oculta en el 5,8% de los casos evaluados. Uno de los perros microfilarémicos, no presentó antígenos circulantes. La prevalencia de dirofilariasis en el municipio Sucre, estado Sucre fue de 15,2%. Este reporte de dirofilariasis canina en el municipio Sucre, representa un importante aporte en el levantamiento epidemiológico de la enfermedad. Futuros estudios permitirán evaluar el riesgo de infección de las personas que conviven con los perros con dirofilariasis.

**Palabras clave:** Dirofilariasis canina, *Dirofilaria immitis*, gusano del corazón, prevalencia, estado Sucre-Venezuela.

### INTRODUCCIÓN

La dirofilariasis canina es una patología parasitaria causada por un nemátodo filariforme *Dirofilaria immitis* (Pérez *et al.*, 1995) siendo sus hospederos definitivos el perro, el gato, el zorro y el

### SUMMARY

Heartworm is a parasitic disease, caused by nematodes *Dirofilaria immitis* and *D. repens*, mainly. While *D. immitis* presents worldwide distribution, *D. repens* extends the old world. Both species affect canines and felines domestic and wild, as well as human, so it is a global public health problem. In this study we determined the prevalence of *D. immitis* in dogs in the municipality of Sucre, Sucre state, Venezuela. Blood samples were taken for 138 domestic dogs, over six months, regardless of race or sex, prior informed consent by their owners. The parasitological diagnosis of circulating microfilariae was done by direct examination and concentration method modified Knott, the morphological characteristics were observed in Giemsa-stained smears. We used a commercial kit, for the capture of excretory-secretory antigens of *D. immitis*. Of the 138 dogs studied, 12 cases (8.7%) were detected parasitologically, whereas the commercial kit antigens were detected in 20 dogs (14.5%), demonstrating that there is an occult infections in 5.8% of the cases. One of the dogs with microfilariae in blood, did not submit antigens circulating. The prevalence of heartworm in the municipality of Sucre, Sucre state was 15.2%. This report of canine heartworm in the municipality of Sucre, represents an important contribution in an epidemiologic survey of the disease. Future studies will assess the risk of infection for people living with dogs with heartworm disease.

**Key words:** Canine dirofilariosis, *Dirofilaria immitis*, heartworm disease, prevalence, Sucre state, Venezuela.

lobo. El hombre actúa como hospedador accidental, aunque en éste no se completa el desarrollo del nemátodo desde microfilaria hasta adulto (Soulsby, 1987). La dirofilariasis usualmente se presenta en perros adultos, la microfilaremia alcanza su nivel más alto a los seis meses y medio después de la infección

<sup>1</sup> Laboratorio de Especialidades Parasitológicas, Escuela de Ciencias, Departamento de Bioanálisis, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente.

<sup>2</sup> Laboratorio de Parasitología del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Universidad de Oriente.

<sup>3</sup> Laboratorio Clínico Bacteriolab, Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

\*Autor de correspondencia: delguifa67@gmail.com

(Johnstone *et al.*, 1997). Clínicamente, este proceso crónico puede ser asintomático o caracterizarse por fatiga, tos crónica o disnea. El animal presenta aspecto cansado incluso en reposo (Olson *et al.*, 1982).

La localización final del parásito adulto en el ventrículo derecho y en la salida de la arteria pulmonar produce una arteritis vellosa y obstrucción parcial del flujo sanguíneo hacia los pulmones (Johnstone, 1998), generando daño endotelial de las arterias pulmonares, hipertensión pulmonar (Muponamunda *et al.*, 1997) y neumonitis alérgica (Lok *et al.*, 2001). La extensa patología de esta enfermedad parasitaria es atribuible, principalmente, a los vermes adultos, teniendo la microfilaria una escasa participación, aunque éstas sean abundantes en la circulación sanguínea (Grubisich, 1999).

La dirofilariasis es transmitida del hospedero infectado al susceptible, por diferentes especies de mosquitos que actúan como hospederos intermediarios (Soulsby, 1987). El alcance geográfico de esta verminosis probablemente guarde relación directa con la distribución de los insectos transmisores (Rawlings & Calvert, 1997).

La dirofilariasis canina es un problema internacional, el cual ocurre en todos los continentes, excepto en la Antártida (Leguía, 1996). En México existe una tasa de infección variable entre 6,2% y 73,3% (Corimanya *et al.*, 2004). En Perú existe una seroprevalencia de 7,3% (Bravo *et al.*, 2002). En Argentina se encontró una seroprevalencia de 12,0% y en Brasil de 2,0% (Labarthe *et al.*, 1998). En Venezuela se reportaron 15 casos de *D. immitis* en diferentes regiones del estado Zulia, donde esta parasitosis ocurre con cierta frecuencia (Vale *et al.*, 2005).

Adicionalmente, Labarthe & Guerrero (2005) mostraron, en una revisión de la dirofilariasis, que en México la prevalencia se ha mantenido por 10 años entre 7,3 y 7,5%. En Argentina la prevalencia nacional fluctúa entre 3,5 y 12,7%, con zonas de mayor prevalencia (17,7-23,5%). En Lima, Perú, la prevalencia es de 4,4% y en Colombia se ha reportado entre 3,8 y 4,8% de perros infectados. En contraste, en Chile no se encuentran perros positivos. En Brasil la prevalencia declinó de 7,9% (1998) a 2,0% (2001).

La primera línea de diagnóstico para la infección es el examen clínico-parasitológico, el cual se basa en los signos clínicos y la observación directa de las microfilarias en sangre periférica de los

caninos (Johnstone *et al.*, 1997). No obstante, cuando la microfilaremia es baja, es necesario recurrir a las técnicas de concentración, siendo la técnica estándar el Knott modificado, con el cual es posible procesar con eficiencia gran número de muestras y es más precisa la identificación de las especies de filaria por su aspecto morfológico (Knight, 1987).

Los métodos serológicos se basan en la detección de antígenos de *D. immitis* o anticuerpos presentes en el organismo parasitado. La especificidad y sensibilidad de las inmuno-valoraciones enzimáticas actuales, comparadas con el examen directo para microfilarias, han hecho que estas pruebas sean el principal método de identificación prospectivo de la infección en perros asintomáticos y en perros que tienen signos ambiguos de la enfermedad (Knight, 1987). Sin embargo, existen reportes de casos de perros con bajas cargas parasitarias, en los que la detección de los antígenos ha sido negativa, aunque la microfilaremia haya sido comprobada parasitológicamente (Vezzani *et al.*, 2008).

Por otra parte, Rishniw *et al.* (2006) han señalado que las técnicas moleculares (Reacción en cadena de la polimerasa, PCR) permiten discriminar entre *D. immitis* y otras 6 microfilarias caninas, lo que es de gran importancia clínica, ya que en función de esto pueden tomarse decisiones adecuadas para la terapéutica oportuna. Las técnicas moleculares permiten en consecuencia, confirmar los casos de antigenemia negativa en casos con microfilaremia.

Particularmente, en el estado Sucre no existe reporte oficiales de esta zoonosis, por lo que se determinó la prevalencia de *D. immitis* en caninos domésticos del municipio Sucre, estado Sucre, lo que significa un importante aporte epidemiológico para el estado, que permitirá la aplicación de programas de prevención para una enfermedad que ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud como una zoonosis (OMS, 1979). Tal reconocimiento resulta beneficioso para la comunidad en general, ya que *D. immitis* pudiera alcanzar accidentalmente al hombre y podría constituir a largo plazo un problema de salud pública.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Población estudiada*

En el desarrollo de esta investigación, se muestrearon 138 perros domésticos, todos mayores

de 6 meses, sin distinción de raza ni sexo, del municipio Sucre, estado Sucre (Fig. 1), distribuidos proporcionalmente por parroquias de la siguiente manera: Ayacucho (17), Altagracia (56), Santa Inés (26), Valentín Valiente (25), Santa fé (3), Raúl Leóni (6), San Juan (5).

El municipio Sucre limita por el norte con el Mar Caribe, por el sur con el estado Anzoátegui, por el este con el municipio Bolívar y el municipio Montes del estado Sucre y por el oeste con los municipios Bolívar y Sotillo del estado Anzoátegui. Las parroquias Ayacucho, Altagracia, Santa Inés y Valentín Valiente tienen un clima cálido marítimo que oscila entre 26-33°C, mientras que, Santa Fé, Raúl Leóni y San Juan presentan un clima templado de montaña o subtropical de altura con temperaturas que oscilan entre 9-14°C (INE, 2007).

#### Recolección de las muestras

A los propietarios de cada perro se les aplicó una encuesta epidemiológica con la finalidad de conocer en detalle la clínica y condiciones generales de cada animal, y se les entregó un consentimiento informado siguiendo la normativa de la Declaración de Helsinki (Declaración de Helsinki, 2000) dándoles a conocer la naturaleza, propósitos, inconvenientes y riesgos de la investigación. Para la valoración clínica y la toma de las muestras sanguíneas se contó con la colaboración de un médico veterinario, quien procedió a la extracción de 10 mL de sangre por punción venosa, previa asepsia de la vena yugular de cada animal. Las muestras sanguíneas fueron tomadas en horas de la tarde y fueron distribuidas equitativamente en 2 tubos (uno con heparina y otro seco) para ser usadas en el diagnóstico parasitológico y serológico, respectivamente; luego fueron trasladadas en cavas refrigeradas al Laboratorio de Especialidades

Parasitológicas del Departamento de Bioanálisis, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente.

Los tubos sin anticoagulante fueron centrifugados por 15 minutos a 550 g en una centrifuga Digisystem para la obtención de los sueros, los cuales fueron trasvasados a tubos Eppendorf de 1,5 mL y conservados a -20°C hasta su posterior uso. Las muestras en los tubos heparinizados fueron usados inmediatamente, después de la recolección, para la realización del estudio parasitológico.

#### Diagnóstico parasitológico

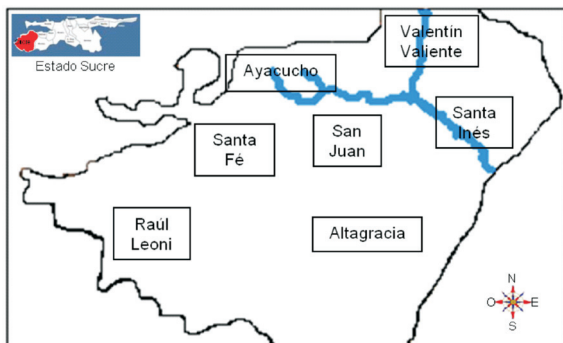
Se realizó el examen directo de la sangre, que consistió en la colocación de una gota de la misma entre lámina y laminilla, para ser vista al microscopio con objetivo de 10X, con la finalidad de observar la presencia o no de las microfilarias. Al mismo tiempo, se realizaron extendidos sanguíneos, fijados con metanol por 1 minuto y teñidos con Giemsa por 2 minutos, lo cual facilitó la observación microscópica de la morfología parasitaria.

Posteriormente se empleó la técnica de concentración Knott, para la cual se mezcló 1 mL de sangre con 9 mL de formol al 2% y se centrifugó a 138 g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se colocó entre lámina y laminilla una muestra del sedimento, coloreado con azul de metileno al 1%, para poder realizar el diagnóstico de acuerdo con las características morfológicas y biométricas de las larvas (Soulsby, 1987).

#### Diagnóstico serológico

El diagnóstico serológico se llevó a cabo empleando un estuche comercial tipo ELISA (Snap 4Dx®) de IDEXX laboratorios, Inc., para la determinación del antígeno de *D. immitis*, de anticuerpos contra *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* y enfermedad de Lyme, en suero, plasma o sangre total canina. Para el procedimiento de análisis se utilizaron sueros preservados a -20°C, previamente descongelados y equilibrados a temperatura ambiente durante 30 minutos y se centrifugaron nuevamente a 550 g por 10 minutos. Los resultados fueron leídos transcurridos 8 minutos, como lo indica la prueba. Los resultados positivos se manifestaron con la aparición de color azul en la mancha de la muestra que contiene antígenos de *D. immitis*.

Fig. 1. Mapa del municipio Sucre, estado Sucre.



*Análisis estadístico*

Una vez determinado el número de perros positivos a *D. immitis* por el método serológico, como por el método parasitológico directo, se calculó la seroprevalencia de la dirofilariasis y se comparó con la prevalencia obtenida por el método parasitológico, calculando el índice de concordancia Kappa entre ambas (Fleiss, 2000). Para la interpretación de la fuerza de concordancia se empleó la escala arbitraria de Altman (1991), la cual establece que si el valor de K es menor de 0,20, la fuerza de concordancia es pobre; valores entre 0,21 y 0,40, indican una concordancia débil; entre 0,41 y 0,60, es moderada; entre 0,61 y 0,80, es buena y entre 0,81 y 1,0 es muy buena.

Al mismo tiempo, se calculó la sensibilidad y especificidad de cada una de las pruebas. Se utilizó la prueba de  $\chi^2$  con la corrección de Yates, para la comparación estadística de las variables epidemiológicas de los caninos en estudio (Hanrahan & Madopu, 1994).

**RESULTADOS**

Del total de 138 caninos evaluados, 21 fueron positivos por una o más técnicas de las tres utilizadas; así, 11 perros resultaron positivos por las tres técnicas, 1 sólo por el Knott, 1 por el examen directo y Snap, y 8 sólo por estuche comercial Snap 4DX, estos últimos representan el 5,8% de dirofilariasis oculta.

La prevalencia de la dirofilariasis en caninos domésticos del municipio Sucre, estado Sucre fue de 15,2% (21/138); la seroprevalencia de dirofilariasis obtenida por el estuche comercial fue mayor (14,5%) (Tabla III) que la determinada por el método parasitológico directo (8,7%) (Tabla I) y por el método de concentración Knott modificado (8,7%) (Tabla II). De los 20 perros que presentaron antígenos

de *D. immitis*, 12 estaban positivos al examen directo y 11 al Knott, por lo que se encontró un índice de concordancia Kappa entre el método serológico y el método parasitológico directo de 0,7195, lo que significa que la fuerza de concordancia entre los dos métodos es buena, por lo que la consistencia entre estas técnicas es del 71,95%; y con el método de concentración Knott modificado fue de 0,6494, lo que implica menor consistencia entre el método serológico y el Knott (64,94%), a pesar de que la fuerza de concordancia también es buena.

Al comparar los métodos (parasitológico directo y serológico comercial) utilizados en el diagnóstico de *D. immitis* con la prueba de referencia o prueba de oro (técnica de Knott modificada), se observó que la sensibilidad del estuche comercial fue mayor (100%) que la obtenida por la técnica parasitológica directa (92%), por el contrario al evaluar la especificidad de la técnica parasitológica directa esta fue mayor (99%) que la obtenida por el estuche comercial (93%).

Con respecto al sexo, en la Fig. 2, se muestra que de los 21 perros positivos para *D. immitis*, se obtuvo una frecuencia de 52,4% (11/21) para machos y 47,6% (10/21) para hembras, observándose que el mayor número de animales positivos fueron

**Tabla I. Prevalencia de *Dirofilaria immitis* determinada por el método parasitológico directo en caninos del municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela.**

Examen Directo		
Caninos	N	Prevalencia (%)
Positivos	12	8,7
Negativos	126	91,3
Total	138	100,0

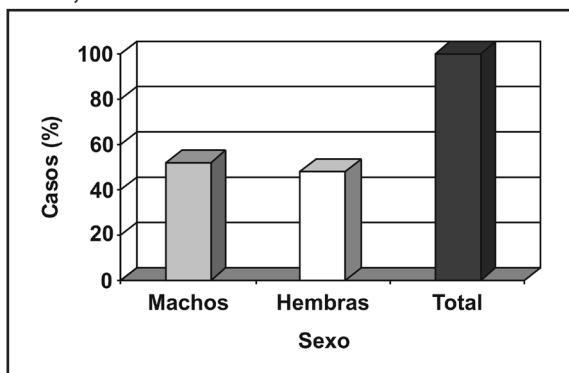
**Tabla II. Prevalencia de *Dirofilaria immitis* determinada por el método parasitológico de Knott modificado en caninos del municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela.**

Técnica de Knott Modificada		
Caninos	N	Prevalencia (%)
Positivos	12	8,7
Negativos	126	91,3
Total	138	100,0

**Tabla III. Seroprevalencia de *Dirofilaria immitis* determinada por el método serológico ELISA en caninos del municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela.**

ELISA		
Caninos	N	Seroprevalencia (%)
Positivos	20	14,5
Negativos	118	85,5
Total	138	100,0

**Fig. 2. Prevalencia de *Dirofilaria immitis* según el sexo de los caninos del municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela.**



machos, aunque no se encontró asociación estadística significativa entre sexos ( $\chi^2=0,51$ ;  $P<0,05$ ). Esto implica que en la comunidad estudiada ambos sexos están igualmente expuestos a la infección. Otro aspecto que se tomó en cuenta en esta investigación fue la edad, observándose que de los 21 perros, 8 eran cachorros y 13 eran adultos o seniles, también sin asociación estadística significativa ( $\chi^2=0,11$ ;  $P<0,05$ ).

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En la presente investigación la seroprevalencia de dirofilariasis en caninos domésticos de municipio Sucre, estado Sucre, obtenida por el estuche comercial fue mayor (14,5%) que la determinada por el método parasitológico directo (8,7%) y por el método de concentración Knott modificado (8,7%) indicando que existe un 5,8% de infecciones ocultas. En este sentido, Ferrer *et al.* (2002), al comparar dos técnicas (parasitológicas e inmunológicas) para el diagnóstico de la dirofilariasis, encontró un 20% de infecciones ocultas. En un trabajo previo específicamente en el Sector La Sander, municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela, se registró un seroprevalencia del 21,0% igualmente mayor a la obtenida por estudio parasitológico directo (13,0%), lo que sugiere un 8,0% de infecciones ocultas (Gómez *et al.*, 2008).

Algunos autores reportan que los métodos parasitológicos (examen directo) son relativamente sencillos pero de baja sensibilidad (Martin *et al.*, 1991), esto se debe a que existen parasitosis por vermes de un solo sexo, bajas parasitemias, uso mensual de microfilaricidas y presencia de parásitos adultos inmaduros 5 a 6 meses post-infección

manifestándose en falsos negativos, que desde el punto de vista parasitológico explicaría los resultados aquí obtenidos, por lo que se hace necesario el uso de técnicas tipo ELISA (Ferrer *et al.*, 2002). Sin embargo, el método parasitológico directo, basado en la determinación de microfilarias en sangre, permite la identificación y diferenciación de las larvas de *D. immitis* de otras microfilarias, como *Dipetalonema reconditum* (Hernández, 1958). Wang (1997) usando Knott modificado y ELISA reportan un 60,6% de perros positivos a dirofilariasis, de los cuales 55,0% eran *D. immitis* y 12,2 % *Dipetalonema reconditum*, reforzando la importancia de un diagnóstico integral.

El diagnóstico inmunológico dirigido a la búsqueda de anticuerpos anti *D. immitis*, por su parte, también pudiera dar lugar a falsos positivos. En primer lugar, por las posibles reacciones cruzadas con parásitos intestinales del perro y con otras filarias; en segundo lugar, porque la respuesta inmune de los hospederos muy parasitados puede verse suprimida, debido a la alteración que estos animales sufren a lo largo del tiempo. También pueden dar falsos positivos, en casos en que el animal haya estado en contacto con el parásito, sin que haya adquirido la parasitosis (Grieve, 1990).

El estuche comercial que se utilizó es mucho más confiable para diagnosticar la enfermedad, ya que está basado en la detección de antígenos de excreción-secreción de la hembra de *D. immitis*, lo que permite diagnosticar dirofilariasis ocultas e infecciones unisexuales donde no hay presencia de microfilarias en sangre, entidades que con los otros métodos (examen directo, métodos de concentración, entre otros) no se pueden identificar. Con este método se ha destacado que pueden ocurrir resultados falsos negativos debido a la presencia solamente de parásitos machos.

Es por ello que la dirofilariasis canina debe ser diagnosticada considerando los aspectos clínicos, epidemiológicos y de laboratorio (pruebas parasitológicas y serológicas), ya que generalmente los perros no presentan signos patognomónicos.

Si bien es cierto que en esta investigación la técnica parasitológica (92,0%) se presentó como menos sensible que el estuche comercial utilizado (100,0%), ésta presentó una mayor especificidad (99,0%), lo cual indica que la técnica parasitológica permite clasificar correctamente a un perro sano en un 99,0%.

Es importante destacar que estos cálculos se hicieron utilizando como prueba de referencia al método de Knott modificado, con el cual en esta investigación se obtuvo resultados positivos iguales para dirofilariasis que los obtenidos por el método directo, lo que coincide con lo reportado por otros investigadores que concuerdan en que hay métodos más eficientes que la técnica de Knott y esta no debería ser utilizada como prueba de referencia (Bautista *et al.*, 2001).

Al comparar la seroprevalencia hallada en el municipio Sucre, estado Sucre 14,5% (20/138), con la encontrada por Ferrer *et al.* (2002) en el estado Zulia, Venezuela, quienes mediante ELISA detectaron 29 (42,0%) casos de dirofilariasis canina, se observa que fue menor. Sin embargo, en Brasil utilizando el mismo estuche comercial (SNAP 3DX) empleado en el presente estudio, la seroprevalencia fue mayor (73,5%) (25/34), y, al comparar los resultados obtenidos por técnicas parasitológicas como el Knott, los porcentajes obtenidos por Garcez *et al.* (2006) son superiores (61,8%) (21/34) al obtenido en esta investigación (8,7%). Sin embargo, la seroprevalencia obtenida en la presente investigación, fue mayor (14,5%) a la reportada por Corimanya *et al.* (2004) en Perú, quienes detectaron 6 (5,6 %) animales positivos por técnicas inmunológicas.

La proporción de machos y hembras hallada en este estudio (11:10) fue similar a la obtenida por Corimanya *et al.* (2004). En este sentido, Calvert (1994) manifestó que los perros machos suelen infectarse con mayor frecuencia que las hembras, quizás por el incremento de exposición a los exteriores.

Con respecto a la edad, los 21 perros que resultaron positivos tenían entre 6 meses y 15 años; la edad representa un factor muy importante para diversos investigadores. En animales menores de un año es raro que se detecte la infestación, ya que el parásito tiene una prepatencia de 6 a 7 meses. Un perro menor de un año es poco frecuente que pueda albergar vermes adultos. Sin embargo, sí es posible que tenga microfilarias en su sangre si la madre estaba infestada en la gestación, pero las larvas así transmitidas no alcanzan el estado adulto (Selby *et al.*, 1980). Garcez *et al.* (2006) presentan a la edad como un factor de riesgo que determina el tiempo de exposición al área endémica, ya que generalmente la prevalencia de la dirofilariasis aumenta con la edad. En un estudio

realizado en San Luis, Brasil, la prevalencia de la dirofilariasis en caninos de 2 a 6 años fue de 86,4% y en caninos de más de 9 años fue del 100% (Ahid *et al.*, 1999).

Al evaluar la prevalencia obtenida en el presente estudio, y tomando en cuenta que el municipio Sucre, estado Sucre, cumple con todas las condiciones necesarias para la existencia de los vectores, en cuanto a clima, humedad y presencia de aguas estancadas, se puede decir que la dirofilariasis canina se mantiene en el tiempo, ya que los caninos positivos para *D. immitis* representan un foco de infección activa para otros animales del municipio, tanto para otros animales como para todos los habitantes del municipio. Si bien es cierto que la cantidad de perros evaluados en estudios de prevalencias es mayor (Brito *et al.* 2001) a la cantidad de perros evaluados en el presente estudio, llama la atención de que tan solo evaluando 138 caninos domésticos se observara una prevalencia de 15,2%, por lo que esta investigación conlleva a la evaluación inmediata de los municipios aledaños al municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela. Además, los caninos positivos para *D. immitis*, en el municipio estudiado, representan un foco importante de infección activa, no sólo para otros animales sino también para todos sus habitantes. En este contexto, se sabe que en aquellos lugares en los que la frecuencia de dirofilariasis canina es superior al 10%, en la población humana este valor se aproxima al 5% (Gómez *et al.*, 1999). Bajo esta premisa se contempla realizar futuros estudios que permitirán evaluar otros aspectos relacionados con la infección por *D. immitis* en caninos así como el riesgo de infección.

## REFERENCIAS

- Ahid S., Lourenco-de-Oliveira R. & Saraiva L. (1999). Dirofilariase canina na Ilha de Sao Luis, Nordeste du Brasil: uma zoonose potencial. *Cad. Saude Públ.* **15**: 405-412.
- Altman D. (1991). Practical statistics for medical research. New York: Chapman and Hall.
- Bautista C., Arroyo M., Velasco O. & Canto L. (2001). Comparación de las pruebas quantitative buffy coat, frotis grueso de sangre y observación directa para el diagnóstico de la infección por *Dirofilaria immitis* en perros de tres zonas geográficas de México. *Vet. Mex.* **32**: 153-156.

- Bravo R., Chávez A., Casas E. & Suárez F. (2002). Estudio de la dirofilariasis canina en la ribera del río Lurín. *Rev. Inv. Vet. Perú.* **13**: 80-83.
- Brito A., Villa-Nova M., Gomes L., Pinheiro de Almeida W., Viana L., Ramalho R., *et al.* (2001). Prevalencia da filaríose canina causada por *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* em Maceio, Alagoas, Brasil. *Cad. Saúde Pública.* **17**: 1497-1504.
- Calvert C. (1994). *Manual clínico de pequeñas especies*. Eds. Birchard/Sherding. McGraw-Hill Interamericana, México.
- Corimanya J., Chávez A., Casas E. & Díaz D. (2004). Frecuencia de *Dirofilaria immitis* en caninos del distrito de San Juan de Lurigancho. *Rev. Inv. Vet. Perú.* **15**: 141-144.
- Declaración de Helsinki (2000). Asociación Médica Mundial. 52ª Asamblea General. Edimburgo, U.K.
- Ferrer J., Arraga De Alvarado C., Alvarado M. & Sandoval J. (2002). Diagnóstico de dirofilariasis canina: un estudio comparativo usando las pruebas de ELISA y de WOO. *Rev. Cient.* **12**: 351-357.
- Fleiss J. (2000). *Statistical methods for rates and proportions*. Ed. John Wiley. 2da edición. New York, USA.
- Garcez L., Fonseca N., Ferreira E., Dickson L., Uchoa W., Do Nascimento V., *et al.* (2006). Focos de dirofilariasis canina na Ilha do Marajó: un factor de riesgo para a saúde humana. *Rev. Soc. Bras. Medic. Trop.* **39**: 333-336.
- Gómez M., Rojo F. & Guerrero J. (1999). *Filariatosis*. Parasitología veterinaria. Mc Graw-Hill-Interamericana. Madrid, España.
- Gómez, E., El Hen F., Guzmán R., Brito L., Díaz M., Sánchez A., *et al.* (2008). Prevalencia de la ehrlichiosis y dirofilariasis canina en el municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela. Documento en línea: [www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos](http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos). (Consultado: 2009, Octubre11).
- Grieve R. (1990). Immunologic relevance of the cuticle and epicuticle of larval *Dirofilaria immitis* and *Toxocara canis*. *Acta Trop.* **47**: 399-402.
- Grubissich J. A. (1999). Dirofilariasis Canina. *Holliday News.* **2**: 8-12.
- Hanrahan E. & Madopu G. (1994). Review of epidemiology & biostatistics for the usmLe. Appleton & Lange, Connecticut.
- Hernández A. (1958). *Contribución al estudio de la filariasis canina en la Ciudad de Lima*. Tesis de Bachiller. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Instituto Nacional de Estadísticas (INE). República Bolivariana de Venezuela. Documento en línea: <http://www.ine.gov.ve> (Consultado: 2007, Enero 01).
- Johnstone C. (1998). *Introduction to Parasitology. The Spectrum of Parasitism*. In: Parasites and Parasitic Disease of Domestic Animals. Universidad de Pennsylvania: Merial. USA.
- Johnstone C., Knight D. & Lok J. (1997). Parasitology-*Dirofilaria immitis*. Documento en línea: <http://cal.vet.upenn.edu/parasi/heartwormm> (Consultado: 2006, Noviembre 01).
- Knight D. (1987). Heartworm infection. *Vet. Clin. North Am. Small Animal Practice.* **17**: 1463-1519.
- Labarthe N. & Guerrero J. (2005). Epidemiology of heartworm: What is happening in South America and México? *Vet. Parasitol.* **133**: 149-156.
- Labarthe N., Serrão M., Melo Y., De Oliveira S., De Oliveira R. & Lourenço R. (1998). Mosquito frequency and feeding habits in an enzootic canine dirofilariasis area in Niterói, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **93**: 425-432.
- Leguía G. (1996). *Enfermedades Parasitarias de Perros y Gatos. Epidemiología y control*. Editora del Mar, Lima. Perú.
- Lok J., Knight D., Wang G., Doscher M., Nolan T. & Hendrick M. (2001). Activity of an injectable, sustained-release formulation of moxidectin administered prophylactically to mixed-breed dogs to prevent infection with *Dirofilaria immitis*. *Am. J. Vet. Res.* **62**: 1721-1726.

- Martin M., Poglayen G., Capelli G. & Roda R. (1991). "Diagnosis of canine filariosis: relative sensitivity and specificity of some haematological techniques". *Angew. Parasitol.* **32**: 133-136.
- Muponamunda M., Williams J., Mackenzie C. & Kaiser L. (1997). *Dirofilaria immitis*: heartworm infection alters pulmonary artery endothelial cell behavior. *Am. Physiol. Society.* **82**: 389-398.
- Olson N., Scout J. & Robinson N. (1982). Central blood volumen and the lung extravascular termal volumen in dogs with dirofilariasis. *Am. J. Vet. Res.* **43**: 1019-1022.
- OMS (1979). *Zoonosis parasitarias*. Informe Técnico. 637: 105-106. Ginebra. Suiza.
- Pérez G., Rosa A., Ribicich M., Meyer P., Welch E., Casalonga O., *et al.* (1995). Dirofiliriasis Canina (Resumen). Parte II. *Rev. Med. Vet.* **76**: 228-240.
- Rawlings C. & Calvert C. (1997). Verminosis Cardíaca. En: *Ehinger, S. (Ed) Tratado de Medicina Interna Veterinaria*. 4ta ed. Tomo I. Interamericana, Buenos Aires. Argentina.
- Rishniw H., Barr S., Simpson K., Frongillo M., Franz M. & Dominguez J. (2006). Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol.* **135**: 303-314.
- Selby L., Corwin R. & Hayes H. (1980). Risk factors associated with canine heartworm infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **176**: 33-35.
- Soulsby E. (1987). *Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos*. Séptima Edición. McGraw-Hill Interamericana, México. 308 pp.
- Vale O., Simoes D., Camacho J., Vale Oviedo O. & Oviedo M. (2005). Dirofilariasis en caninos: estudio anatomopatológico de 15 casos. *R. C.* **15**: 0798-2259.
- Vezzani D., Fontanarrosa M. & Eiras D. (2008). Are antigen test kits efficient for detecting heartworm-infected dogs. *Res. Vet. Sci.* **85**: 113-115.
- Wang L.C. (1997). Canine filarial infections in North Taiwan. *Ac. Trop.* **68**: 115-120.

Recibido el 23/11/2010  
Aceptado el 16/04/2011

## Nuevos registros de mosquitos (Diptera Culicidae) para el estado Bolívar, Venezuela: Dos de ellos nuevos para el país

### *New records of mosquitoes (Diptera Culicidae) for the state of Bolivar, Venezuela: Two of them new to the country*

Jesús Berti<sup>1\*</sup>, Hernán Guzmán<sup>1</sup>, Jonathan Liria<sup>2</sup>, Julio González<sup>1</sup>, Yarys Estrada<sup>1</sup> & Enrique Pérez<sup>1</sup>

#### RESÚMEN

En el presente trabajo se hace referencia por primera vez para el estado Bolívar de diez y nueve especies de mosquitos (Diptera Culicidae), pertenecientes a diez (10) géneros: *Anopheles*, *Chagasia*, *Culex*, *Aedes*, *Mansonia*, *Coquillettidia*, *Uranotaenia*, *Psorophora*, *Limatus* y *Wyeomyia*, de las subfamilias *Anophelinae* y *Culicinae*. Dos de estas especies, son citadas por primera vez para Venezuela: *Chagasia bonneae* Root, 1927 y *Chagasia ablusus* Harbach, 2009.

**Palabras clave:** Anophelinae, Culicinae, distribución, géneros, especies, inventario, mosquitos, Bolívar, Venezuela.

#### SUMMARY

*First report of 19 Culicidae species (Diptera: Culicidae) from Bolivar State is made, belonging to 10 genera of Anophelinae and Culicinae: Anopheles, Chagasia, Culex, Aedes, Mansonia, Coquillettidia, Uranotaenia, Psorophora, Limatus and Wyeomyia. Chagasia bonneae Root, 1927 and Chagasia ablusus Harbach, 2009 are reported for the first time in Venezuela*

**Key words:** Anophelinae, Culicinae, distribution, genera, species, inventory, mosquitoes, Bolivar, Venezuela.

#### INTRODUCCIÓN

En el estado Bolívar, el principal problema de salud tanto en las áreas rurales como áreas selváticas y zonas mineras es la malaria. En los últimos cinco años esta enfermedad se ha incrementado notablemente en ese estado, cerrando el último año con 29.420 casos. El municipio Sifontes representa el área de mayor incidencia de malaria de todo el estado, la mayor parte de los casos se originan en zonas mineras de este municipio (Berti *et al.*, 2008, Moreno *et al.* 2000). En este municipio, persisten focos de malaria, caracterizados 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 esta enfermedad (Berti *et al.*, 2008). El mismo abarca una superficie de 24.392 Km<sup>2</sup>; y 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. En este último se han producido numerosos brotes epidémicos de malaria, principalmente en el área minera de Icabarú (Fig. 1), donde la actividad económica principal es la minería, basada en extracción de oro por métodos artesanales, y conocida como la minería del Garimpo, Asimismo, en Santa Elena de Uairén, Manakrú, San Antonio del Morichal, Maurak y Waramasen, se reportaron varios brotes de dengue, en los cuales el único vector presente fue *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). El cambio climático por un lado y la deforestación y alteración del suelo producida por esta actividad minera, han propiciado en el municipio Gran Sabana, la aparición de criaderos adecuados para la reproducción de *Anopheles darlingi* Root, 1926, *Anopheles marajora* Galvao & Damasceno, 1942 y *Anopheles brasiliensis*

<sup>1</sup> Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios Dr. Arnoldo Gabaldon. Centro de Investigación en Enfermedades Endémicas. Laboratorio de Entomología, Maracay, Venezuela.

<sup>2</sup> Universidad de Carabobo. Facultad de Ciencias y Tecnología, Departamento de Biología, Valencia, Venezuela.

\*Autor de correspondencia: jbertimoser@yahoo.com

(Chagas, 1907), los tres principales vectores de malaria del área amazónica del estado Bolívar. El principal vector del dengue en el área del municipio Gran Sabana es el mosquito *Aedes aegypti* y actualmente existe el riesgo de penetración de *Ae. albopictus*; debido a que el vector está presente en el municipio Pacaraima de Brasil. El control de vectores en estas áreas fronterizas, municipios Gran Sabana y Pacaraima, hasta el presente solo incluye la aplicación de insecticidas químicos, con las consecuencias ecológicas que ello implica para el medio ambiente. El área del municipio Gran Sabana hasta el presente no ha sido estudiada desde el punto de vista entomológico y se desconoce la entomología descriptiva, sobre todo la ecología y distribución espacial y estacional de las especies de mosquitos de la familia Culicidae; muchas de estas especies son vectores de malaria, dengue, fiebre amarilla, encefalitis equina venezolana, fiebre mayaro y otras enfermedades virales transmitidas por insectos. Debido

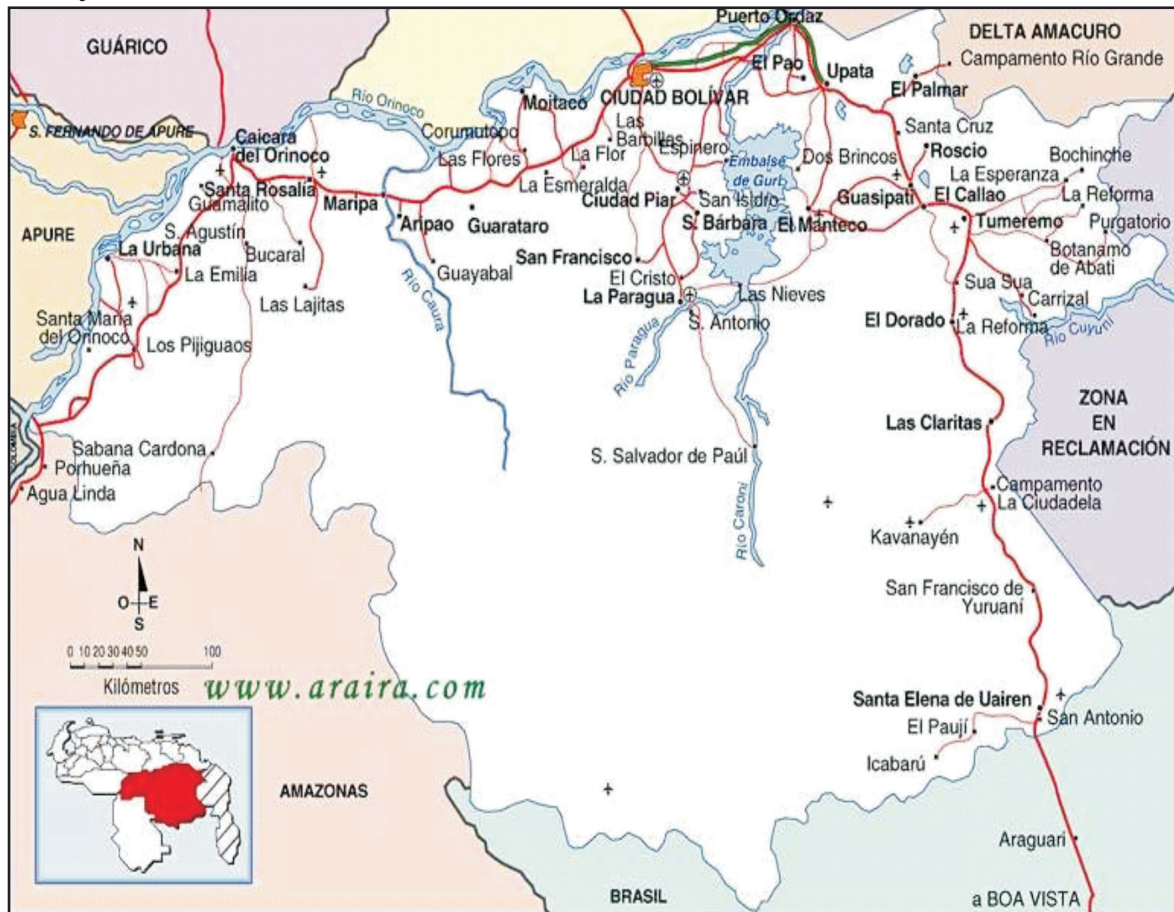
a esta problemática, en el presente trabajo se realizó el inventario preliminar de la fauna de mosquitos (Culicidae) presentes en el municipio Gran Sabana, con énfasis en los principales vectores de enfermedades.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio y comunidades inspeccionadas

Se realizaron capturas de mosquitos y búsqueda de larvas en criaderos de las comunidades indígenas y en la capital del municipio Gran Sabana (Fig. 1), al sureste del estado Bolívar. El territorio, conocido como la Gran Sabana, forma parte del Parque Nacional Canaima. Es una extensa área de unos 75.000 Km<sup>2</sup>, con altitudes entre los 700 y los 2800 m (Monte Roraima). Por ser parte integral del escudo guayanés, su paisaje se caracteriza por colinas redondeadas y mesas escarpadas, rodeadas de superficies tabulares

Fig. 1. Mapa vial del estado Bolívar, señalando la ruta de acceso a Santa Elena de Uairén, San Antonio, El Paují e Icabarú.



denominadas tepuyes (Trinca-Fighera, 2006). El centro poblado más importante de esta región es Santa Elena de Uairén, capital del municipio Gran Sabana. Según información recogida en campo (2003), Santa Elena tiene cerca de 32.000 habitantes, incluyendo la población indígena que vive tanto en el centro poblado como en sus alrededores. Es oportuno señalar que la población indígena en Venezuela se censa aparte del resto de la población (Trinca-Fighera, 2006). Santa Elena está localizada a 15 kilómetros de la frontera con Brasil y del centro poblado brasileño más próximo a la frontera llamado Villa Pacaraima (La Línea), elevado a la condición de capital del municipio Pacaraima en 1997. La fundación de Santa Elena de Uairén data del año 1923. Santa Elena está a 1.287 Km de Caracas, a 729 Km de Ciudad Bolívar y a 215 Km de Boa Vista, capital del estado de Roraima. El área presenta una temperatura media de 22°C y una precipitación muy elevada entre 1.500 y 5.700 mm, con un promedio de 1900 mm, correspondiendo a una zona de vida llamada por Osborn *et al.* (2004) "Sabanas de Altura", que se caracterizan por un clima de constante lluvia, con un promedio de 205 días de lluvia por año, por lo cual esta región se mantiene en constante estado de humedad y baja temperatura (18°C a 24°C). Según Ewel *et al.* (1968), la región es una zona de vida denominada bosque muy húmedo pre montano. Al respecto, Osborn *et al.* (2004), citan al mosquito *An. brasiliensis* (Chagas, 1907) como el vector principal asociado a la transmisión de malaria en la zona. Esta región es muy frecuentada por personas que hacen turismo de aventura, lo que ha significado el construir toda una red técnica-turística (posadas, campamentos, carreteras, centros de internet), que garantice, tanto en Santa Elena como en otros puntos de la Gran Sabana, un servicio eficiente (Trinca-Fighera, 2006). Sin embargo, la actividad económica líder en esta parte del país, continúa siendo la extracción de oro y de diamantes. Existen infinidad de minas explotadas de forma artesanal tanto en el territorio venezolano como en el brasileño. Esto ha generado numerosos problemas ambientales, sociales y de salud; sobre todo a partir de los años setenta del siglo pasado, época del auge de la colonización y la minería (Trinca-Fighera, 2006). Santa Elena es el centro de intercambio comercial más importante de la frontera sureste del país, es un centro con características propias de pueblos mineros y de frontera. La declaración de Santa Elena de Uairén como Puerto Libre (decreto N° 3112, 1998), que permitió, 5 años después (2004), la creación de

la Aduana Ecológica de Santa Elena, es ejemplo de la materialización del expreso interés de ambos gobiernos por propiciar cada vez más la integración de Brasil y Venezuela (Trinca-Fighera, 2006).

Tanto en la capital del municipio, como en otras comunidades rurales e indígenas se realizaron capturas de mosquitos y búsqueda de larvas en sus criaderos naturales y artificiales. Se visitaron diez (10) comunidades: Santa Elena de Uairén, Manakrú, Maurak, Waramasen, San Antonio del Morichal, Kinok-Pon, Chiricayen, Waiparú, Betania, El Paují y un campamento vacacional llamado El Paraíso, situado a pocos kilómetros de El Paují. En la Tabla I, se observan las coordenadas geográficas de los sitios de muestreo larvario y las estaciones de captura de mosquitos.

#### *Recolección de larvas y adultos*

Se realizaron varios tipos de captura de larvas y adultos de mosquitos:

- 1- Recolección de larvas y pupas en criaderos naturales y en fitotelmata; así como también en recipientes artificiales en cada una de las comunidades. Posteriormente las muestras se almacenaron en bolsas plásticas herméticas para su traslado a la base de campo, donde las larvas del IV estadio fueron fijadas en solución AGA y etiquetadas para después ser enviadas al Laboratorio de Entomología y Taxonomía en Maracay. Las larvas del primer al tercer estadio fueron mantenidas en agua de su mismo criadero para lograr su desarrollo hasta la fase adulta. Las pupas también fueron desarrolladas hasta la fase adulta.
- 2- Captura de mosquitos adultos por atracción a la luz, utilizando una trampa de luz negra o luz ultravioleta similar a la usada por Lee et al (2009); la cual fue colocada durante toda la noche en cada una de las comunidades evaluadas.
- 3- Captura de mosquitos adultos por medio de la exposición de las piernas del investigador a la picada de las hembras (cebo humano), capturándolas de forma inmediata mediante un succionador especialmente diseñado para tal fin. Todo el material producto de las capturas y las crías asociadas fue montado en alfileres entomológicos, colocándole la respectiva identificación a cada ejemplar. Estas muestras fueron enviadas al Laboratorio de Entomología y Taxonomía en Maracay.

**Tabla I. Coordenadas geográficas de los sitios de muestreo larval y estaciones de captura de mosquitos adultos (trampa de luz y cebo humano) en localidades del municipio Gran Sabana.**

SANTA ELENA	4°36'07" 61°06'34"	4°32'53" 61°08'30"	4°36'41" 61°06'22"	4°35'49" 61°06'59"	4°36'01" 61°06'52"			
WARAMASEN	4°33'26" 61°16'59"	4°34'17" 61°14'45"	4°33'25" 61°16'58"	4°33'36" 61°16'29"	4°33'39" 61°16'29"	4°33'38" 61°16'28"	4°33'43" 61°16'32"	
EL PAUJÍ	4°28'32" 61°35'34"	4°31'52" 61°37'26"						
CAMPAMENTO PARAÍSO	4°26'53" 61°41'65"							
KINOK-PON	4°33'31" 61°12'47"	4°33'37" 61°12'42"						
WAIPARU	4°31'52" 61°37'26"							
MANAKRU	4°36'39" 61°07'20"	4°36'24" 61°07'11"	4°36'28" 61°07'10"					
CHIRICAYEN	4°39'39" 61°20'30"	4°40'10" 61°20'36"	4°42'11" 61°19'48"	4°43'03" 61°19'18"				
MAURAK	4°33'46" 61°10'46"	4°33'55" 61°12'37"	4°35'11" 61°10'50"					
BETANIA	4°39'33" 61°22'59"	4°39'29" 61°23'11"	4°39'30" 61°22'52"	4°39'25" 61°22'47"	4°39'57" 61°23'22"			
SAN ANTONIO	4°31'14" 61°07'14"	4°31'12" 61°07'12"	4°31'13" 61°07'08"	4°31'15" 61°07'04"	4°31'17" 61°06'56"	4°31'18" 61°06'33"	4°31'16" 61°06'54"	4°31'41" 61°07'48"

### Identificación del material biológico

Para la identificación de las especies se utilizaron claves y descripciones de nuevas especies de los siguientes autores: Cova-García (1961), Cova-García *et al.* (1966), Cova-García & Sutil (1977), Gorham *et al.* (1967), Forattini (1962), Harbach & Howard (2009), Lane (1953), Navarro (1996), Rubio-Palis (2000, 2005), Stojanovich *et al.* (1966 a, 1966 b), Wilkerson & Strickman (1990), Wilkerson & Peyton (1991) y Wilkerson *et al.* (1993). De las capturas con cebo humano y la recolección de larvas en criaderos, se realizaron de ser necesario crías asociadas de mosquitos.

### RESULTADOS

Los resultados obtenidos se representan en las Tablas II-A, II-B y III. En las mismas puede observarse la lista de especies de mosquitos de la familia Culicidae presentes en las localidades estudiadas en el municipio Gran Sabana.

### DISCUSIÓN

La localidad que presentó la mayor diversidad de especies de Culicidae fue Santa Elena, la capital

del municipio (Tablas II-A y II-B), esto aumenta el riesgo de transmisión de enfermedades endémicas por tratarse de un área urbana con alta concentración de población criolla, brasilera e indígena; las otras localidades son comunidades indígenas rurales con una mayoría de habitantes de la etnia Pemón. Entre estas, Waramasen presentó la mayor diversidad de especies seguida de Maurak (Tablas II-A y II-B). El Paují es una comunidad rural con mayoría criolla cuya principal actividad es la apicultura y el turismo ecológico o de aventura; en este sector hay muchos campamentos y posadas turísticas. El campamento "El Paraíso" situado a pocos kilómetros del Paují en la vía hacia Icabarú, presentó (Tabla II-B) la mayor diversidad de géneros de la Tribu Sabethini (*Sabethes*, *Wyeomyia*, *Limatus*, *Runchomyia*). Las larvas de *Trichoprosopon digitatum* (Rodani, 1848) (Tribu Sabethini) fueron recolectadas en Brasil, solamente en conchas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*), ubicadas en una plantación de cacao blanco (copoazú) de la localidad de Nova Esperanza, municipio Pacaraima. Durante el desarrollo del estudio, esta especie hasta ahora solo ha sido encontrada como adulto en el lado venezolano (Santa Elena de Uairén) y fue capturada con la trampa de luz (Tabla II B); sin embargo, ya la misma estaba señalada por Sutil (1980) para el estado Bolívar.

**Tabla II-A. Lista de especies de mosquitos del municipio Gran Sabana, ordenados según el tipo de captura y las localidades donde fueron capturados.**

Especies	Localidades	Tipo de Captura	Observaciones
<i>Anopheles triannulatus</i>	1,2,7,8,9	Cebo humano Trampa luz negra	Adultos machos y hembras
<i>Anopheles brasiliensis</i>	1,2,3,4,6,8,9,10	Cebo humano Crías de larvas Trampa luz negra	Larvas, adultos machos y hembras
<i>Anopheles marajoara</i>	1,2,4,5,7,10	Cebo humano Crías de larvas	Larvas, adultos machos y hembras
<i>Anopheles argyritarsis</i>	4,10	Cebo humano Trampa luz negra	Adultos machos y hembras
<i>Anopheles nuneztovari</i>	1,2,3,4,6,9,10	Cebo humano Trampa luz negra	Adultos hembras
<i>Anopheles darlingi</i>	1,8	Cebo humano	Adultos hembras
<i>Anopheles rangeli</i>	2,3,4,6,9,10	Cebo humano Trampa luz negra	Adultos machos y hembras
<i>Anopheles oswaldoi</i>	1,3,4,9,10	Cebo humano Trampa luz negra	Adultos machos y hembras
<i>Anopheles strodei</i>	1,5	Cebo humano Trampa luz negra	Adultos machos y hembras
<i>Anopheles matogrosensis</i>	2,3,5	Cebo humano Trampa luz negra	Adultos hembras
<i>Anopheles peryassui</i>	1,4,5,6,10	Trampa luz negra Cebo humano	Adultos machos y hembras
<i>Anopheles eiseni</i>	5	Cebo humano Trampa luz negra	Adultos hembras
<i>Anopheles cruzii</i> *	5	Cebo humano Trampa luz negra	Adultos machos y hembras
<i>Anopheles squamifemur</i>	6	Crías de larvas	Larvas, adultos machos y hembras
<i>Chagasia bonneaee</i> **	1,3,4,6	Crías de larvas	Larvas, adultos machos y hembras
<i>Chagasia ablusa</i> **	1,3,6	Crías de larvas	Larvas, adultos machos y hembras
<i>Aedes fulvus</i>	1,6	Cebo humano Trampa luz negra	Adultos hembras
<i>Aedes scapularis</i>	1,7,8	Cebo humano Trampa luz negra	Adultos hembras
<i>Aedes aegypti</i>	1,2,3,4,7,11	Cebo humano Crías de larvas	Larvas, adultos machos y hembras
<i>Aedes serratus</i>	1,5,10	Crías de larvas Trampa luz negra	Larvas, adultos machos y hembras
<i>Aedes angustivittatus</i> *	1	Trampa luz negra	Adultos machos y hembras
<i>Aedeomyia squamipennis</i>	1,2,3,4,5,6,7	Trampa luz negra Crías de larvas	Larvas, adultos machos y hembras
<i>Culex quinquefasciatus</i>	1,2,3,4,5,7,8,11	Cebo humano Crías de larvas	Larvas, adultos machos y hembras
<i>Culex corniger</i>	1,2,3	Crías de larvas	Larvas, adultos machos y hembras
<i>Culex bigoti</i> *	3	Crías de larvas	Larvas, adultos machos y hembras
<i>Culex (Carrollia)</i>	1,2,3,4,5,7,10	Cebo humano	Adultos hembras
<i>Culex (Melanoconion)</i>	1,2,3,4	Cebo humano	Adultos hembras

Localidades: Santa Elena Capital = 1. Maurak = 2. Waramasen = 3. San Antonio del Morichal = 4. Campamento Paraíso = 5. Chiricayen = 6. Manakru = 7. Waiparú = 8. Betania = 9. Kinok-Pon = 10. El Pauji = 11.

Nota: Especies con asterisco(\*), son nuevos registros para el estado Bolívar y con 2 asteriscos(\*\*), nuevos registros para Venezuela.

**Tabla II-B. Lista de especies de mosquitos del municipio Gran Sabana, ordenados según el tipo de captura y las localidades donde fueron capturados.**

Especies	Localidades	Tipo de Captura	Observaciones
<i>Psorophora albipes</i>	1,10	Cebo humano	Adultos hembras
<i>Psorophora ferox</i>	1,4	Cebo humano Trampa luz negra	Adultos hembras
<i>Psorophora ciliata*</i>	1,4,9	Cebo humano Crías de larvas	Larvas, adultos machos y hembras
<i>Psorophora lineata</i>	1	Cebo humano Trampa luz negra	Adultos hembras
<i>Psorophora cingulata</i>	1,3,10	Cebo humano Trampa luz negra	Adultos hembras
<i>Psorophora cianescens</i>	1,2,4,10	Cebo humano Trampa luz negra	Adultos hembras
<i>Mansonia pseudotitillans*</i>	1	Crías de larvas Trampa luz negra	Larvas, adultos machos y hembras
<i>Mansonia titillans*</i>	1,9	Crías de larvas Trampa luz negra	Larvas, adultos machos y hembras
<i>Coquilletidia juxtamansonia*</i>	1,3,4,7,9	Crías de larvas Cebo humano Trampa luz negra	Larvas, adultos machos y hembras
<i>Coquilletidia venezuelensis*</i>	1	Cebo humano Trampa luz negra	Adultos machos y hembras
<i>Coquilletidia nigricans*</i>	1,9	Cebo humano Trampa luz negra	Adultos machos y hembras
<i>Uranotaenia typhlosomata*</i>	1	Crías de larvas Trampa luz negra	Larvas, adultos machos y hembras
<i>Uranotaenia geometrica</i>	1, 3, 7, 10	Crías de larvas Trampa luz negra	Larvas, adultos machos y hembras
<i>Uranotaenia pulcherrima</i>	1,4	Crías de larvas Trampa luz negra	Larvas, adultos machos y hembras
<i>Uranotaenia calosomata*</i>	1	Crías de larvas Trampa luz negra	Larvas, adultos machos y hembras
<i>Uranotaenia nataliae*</i>	1	Crías de larvas Trampa luz negra	Larvas, adultos machos y hembras
<i>Uranotaenia leucoptera*</i>	1, 10	Crías de larvas	Larvas, adultos machos y hembras
<i>Uranotaenia lowii*</i>	1	Trampa luz negra	Adultos machos y hembras
<i>Haemagogus sp.</i>	5	Cebo humano	Adultos hembras
<i>Trichoprosopon digitatum</i>	1	Crías de larvas Trampa luz negra	Adultos machos y hembras
<i>Wyeomyia celaenocephala*</i>	1,5	Cebo humano	Adultos hembras
<i>Wyeomyia splendida*</i>	1,5	Cebo humano Trampa luz negra	Adultos hembras
<i>Limatus asulleptus*</i>	5	Cebo humano	Adultos hembras
<i>Limatus durhami</i>	9	Crías de larvas	Larvas, adultos machos y hembras
<i>Runchomyia sp.</i>	5	Cebo humano	Adultos hembras
<i>Sabethes sp</i>	5	Cebo humano	Adultos hembras

Localidades: Santa Elena Capital = 1. Maurak = 2. Waramasen = 3. San Antonio del Morichal = 4. Campamento Paraiso = 5. Chiricayen = 6. Manakru = 7. Waiparú = 8. Betania = 9. Kinok-Pon = 10. El Paují = 11.

Nota: Especies con asterisco(\*), son nuevos registros para el estado Bolívar.

*Trichoprosopon digitatum* solo fue capturada en fase de larva en conchas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*), en Nova Esperanza, Brasil. La especie hasta ahora solo ha sido encontrada como adulto en Santa Elena Capital y fue capturada con la trampa de luz negra.

La actividad de campo desarrollada hasta ahora, mediante la recolección de muestras en las localidades de estudio, permite señalar diez y nueve (19) nuevos registros de especies de mosquitos que no habían sido citados anteriormente para el estado Bolívar, entre estos tenemos:

1. *Anopheles cruzii* Dyar & Knab, 1908.
2. *Chagasia bonneae* Root, 1927.
3. *Chagasia ablusa* Harbach, 2009.
4. *Culex bigoti* Bellardi, 1862.
5. *Aedes angustivittatus* Dyar & Knab, 1907.
6. *Mansonia pseudotitillans* Theobald, 1901.
7. *Mansonia titillans* (Walker, 1848).
8. *Coquilletidia juxtamansonia* (Chagas, 1907).
9. *Coquilletidia nigricans* (Coquillett, 1904).
10. *Coquilletidia venezuelensis* (Theobald, 1912).
11. *Uranotaenia typhlosomata* Dyar & Knab, 1907.
12. *Uranotaenia calosomata* Dyar & Knab, 1907.
13. *Uranotaenia nataliae* Arribalzaga, 1891.
14. *Uranotaenia leucoptera* Theobald, 1907.
15. *Uranotaenia lowii* Theobald, 1901.
16. *Psorophora ciliata* (Fabricius, 1794).
17. *Limatus asulleptus* (Theobald, 1903).
18. *Wyeomyia celaenocephala* Dyar & Knab, 1906.
19. *Wyeomyia splendida* Bonne-Wepster & Bonne, 1919.

Asimismo, entre las especies citadas anteriormente tenemos dos que son señaladas por primera vez para Venezuela, que son: *Chagasia bonneae* Root y *Chagasia ablusa* Harbach (Tabla II A). Las especies del género *Chagasia* pican al hombre durante el día, pero el contacto es poco frecuente, ya que son de hábitos zoofílicos y ninguna de las especies ha sido involucrada en la transmisión de enfermedades al hombre (Fauran, 1961). En Venezuela, son señaladas como especies que presentan ornitofilia (Gabaldon 1977). Según Navarro (1996) y Rubio-Palis (2005), solo *Chagasia bathana* (Dyar, 1928) está registrada para Venezuela. Además de Venezuela, la especie *Ch. bathana* también está citada en Belice, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Honduras, Guayana Francesa, Guatemala, México, Nicaragua y Panamá (Harbach & Howard, 2009). Según Harbach & Howard (2009), *Ch. ablusa* hasta ahora solo estaba presente en Colombia y Perú, y *Chagasia bonneae*, hasta el presente solo se encontraba registrada en Brasil, Bolivia, Colombia, Ecuador, Guayana Francesa, Guyana, Surinam y Perú (Harbach & Howard, 2009). Ambos registros aumentan el número de países en los cuales estas dos especies están presentes. Por su parte, *Anopheles cruzii*

Dyar & Knab, es considerado un vector principal de malaria humana en el sureste del Brasil (Fleming 1986, Wilkerson & Peyton 1991, Zimmerman 1992). Asimismo lo señalaron como un vector de malaria de simios (Deane *et al.* 1970). Las especies de *Anopheles* del subgénero *Kertessia* se crían y reproducen en el agua acumulada en las axilas de las plantas epífitas Bromeliáceas (Fleming 1986); las cuales son consideradas dentro del grupo de las Phytotelmata (Navarro *et al.*, 1995). Las hembras del subgénero *Kertessia* pican al humano durante todo el día y son más activas en la tarde dentro del bosque (Wilkerson & Peyton 1991).

El mosquito *Aedes aegypti*, vector principal del dengue en el país y en el continente, fue capturado en las comunidades de Santa Elena de Uairén, San Antonio del Morichal, Manakrú, Maurak, El Paují y Waramasen, el mismo se mantiene ausente en el resto de las localidades estudiadas. Al respecto, se reportaron varios brotes de dengue en estas localidades que presentaron *Ae. aegypti*. Por otro lado, *Aedes albopictus* hasta la fecha no ha sido capturado en ninguna de las comunidades investigadas, incluyendo algunos barrios y localidades pertenecientes al municipio fronterizo de Pacaraima en Brasil, donde también solo se encontró *Ae. aegypti*. En Venezuela recientemente se registró por primera vez la presencia del vector *Ae. albopictus* en la ciudad de Caracas en el Distrito Capital (Navarro *et al.* 2009). En Brasil, *Ae. aegypti* está modificando sus hábitos domiciliarios e incluso fue localizado en una zona rural en las afueras de Manaus, criándose dentro de conchas de cacao blanco (*Theobroma grandiflorum*) o copoazú (Vale-Barbosa *et al.* 2009).

En este trabajo se presenta el primer registro de *Culex bigoti* Bellardi para el estado Bolívar, específicamente en la localidad de Waramasen (Tabla II-A). Esta especie fue citada por primera vez en Venezuela por Anduze (1941). Las larvas de la especie solo fueron localizadas dentro de cauchos viejos abandonados a la intemperie alrededor de las casas, esta especie solo fue encontrada en cauchos. La hembra utiliza generalmente gran variedad de contenedores artificiales para reproducirse, aunque también se ha encontrado en huecos de árboles (Harbach 2007) y en bambú en Brasil (Lopes 2009). En Venezuela, hasta la fecha la especie no se ha encontrado en bromeliáceas ni en otras Phytotelmata (Navarro *et al.*, 1995, Navarro *et al.*, 2007); en su fase de larva la especie es depredadora y se alimenta principalmente de otras larvas de

**Tabla III. Lista de Especies de Mosquitos del municipio Gran Sabana, estado Bolívar, Ordenadas según su ubicación Taxonomica.**

---

<p>FAMILIA: Culicidae.                  1. Sub-Familia: Anophelinae</p> <p>1.1 Género <i>Anopheles</i>  <i>Anopheles (Nyssorhynchus) triannulatus</i> (Neiva &amp; Pinto, 1922)  <i>Anopheles (Nyssorhynchus) brasiliensis</i> (Chagas, 1907)  <i>Anopheles (Nyssorhynchus) marajoara</i> (Galvao &amp; Damasceno, 1942)  <i>Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari</i> (Gabaldon, 1940)  <i>Anopheles (Nyssorhynchus) argyritarsis</i> (Robineau-Desvoidy, 1827)  <i>Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi</i> (Root, 1926)  <i>Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi</i> (Peryassú, 1922)  <i>Anopheles (Nyssorhynchus) strodei</i> (Root, 1926)  <i>Anopheles (Nyssorhynchus) rangeli</i> (Cova-García &amp; López, 1940)  <i>Anopheles (Anopheles) matogrosensis</i> (Lutz &amp; Neiva, 1911)  <i>Anopheles (Anopheles) peryassui</i> (Dyar &amp; Knab, 1908)  <i>Anopheles (Anopheles) eiseni</i> (Coquillet, 1902)  <i>Anopheles (Lophopodomyia) squamifemur</i> (Antunes, 1937)  <i>Anopheles (Kertészia) cruzii</i> (Dyar &amp; Knab, 1908)</p> <p>1.2 Género <i>Chagasia</i>  <i>Chagasia bonneae</i> (Root, 1927)  <i>Chagasia ablusa</i> (Harbach, 2009)</p> <p>1. FAMILIA: Culicidae.                  2. Sub-Familia: Culicinae</p> <p>2.1 Género <i>Aedes</i>  <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus, 1762)  <i>Aedes (Ochlerotatus) angustivittatus</i> (Dyar &amp; Knab, 1907)  <i>Aedes (Ochlerotatus) scapularis</i> (Rondani, 1848)  <i>Aedes (Ochlerotatus) serratus</i> (Theobald, 1901)  <i>Aedes (Ochlerotatus) fulvus</i> (Wiedemann, 1828)</p> <p>2.2 Género <i>Culex</i>  <i>Culex (Culex) quinquefasciatus</i> (Say, 1823)  <i>Culex (Phenacomyia) corniger</i> (Theobald, 1903)  <i>Culex (Lutzia) bigoti</i> (Bellardi, 1862)</p> <p>2.3 Género <i>Psorophora</i>  <i>Psorophora (Janthinosoma) cyanescens</i> (Coquillet, 1902)  <i>Psorophora (Janthinosoma) albipes</i> (Theobald, 1907)  <i>Psorophora (Janthinosoma) ferox</i> (Humboldt, 1819)  <i>Psorophora (Psorophora) ciliata</i> (Fabricius, 1794)  <i>Psorophora (Psorophora) lineata</i> (Humboldt, 1819)  <i>Psorophora (Grabhamia) cingulata</i> (Fabricius, 1805)</p>	<p>2.4 Género <i>Mansonia</i>  <i>Mansonia (Mansonia) pseudotitillans</i> (Theobald, 1901)  <i>Mansonia (Mansonia) titillans</i> (Walker, 1848)</p> <p>2.5 Género <i>Coquilletidia</i>  <i>Coquilletidia (Rhynchotaenia) juxtamansonia</i> (Chagas, 1907)  <i>Coquilletidia (Rhynchotaenia) venezuelensis</i> (Theobald, 1912)  <i>Coquilletidia (Rhynchotaenia) nigricans</i> (Coquillet, 1904)</p> <p>2.6 Género <i>Haemagogus</i>  <i>Haemagogus</i> sp.</p> <p>2.7 Género <i>Uranotaenia</i>  <i>Uranotaenia (Uranotaenia) typhlosomata</i> (Dyar &amp; Knab, 1907)  <i>Uranotaenia (Uranotaenia) calosomata</i> (Dyar &amp; Knab, 1907)  <i>Uranotaenia (Uranotaenia) geometrica</i> (Theobald, 1901)  <i>Uranotaenia (Uranotaenia) pulcherrima</i> (Arribalzaga, 1891)  <i>Uranotaenia (Uranotaenia) nataliae</i> (Arribalzaga, 1891)  <i>Uranotaenia (Uranotaenia) leucoptera</i> (Theobald, 1907)  <i>Uranotaenia (Uranotaenia) lowii</i> (Theobald, 1901)</p> <p>2.8 Género <i>Aedeomyia</i>  <i>Aedeomyia (Aedeomyia) squamipennis</i> (Arribalzaga, 1878)</p> <p>FAMILIA: Culicidae.                  2. Sub-Familia: Culicinae. 3. Tribu: Sabethini</p> <p>3.1 Género <i>Sabethes</i>  <i>Sabethes</i> sp.</p> <p>3.2 Género <i>Limatus</i>  <i>Limatus asulleptus</i> (Theobald, 1903)  <i>Limatus durhami</i> (Theobald, 1901)</p> <p>3.3 Género <i>Wyeomyia</i>  <i>Wyeomyia (Phoniomyia) splendida</i> (Bonne-Wepster &amp; Bonne, 1919)  <i>Wyeomyia (Wyeomyia) celaenocephala</i> (Dyar &amp; Knab, 1906)</p> <p>3.4 Género <i>Runchomyia</i>  <i>Runchomyia</i> sp.</p> <p>3.5 Género <i>Trichoprosopon</i>  <i>Trichoprosopon digitatum</i> (Rondani, 1848)</p> <p>FAMILIA: Culicidae.                  4. Sub-Familia: Toxorhynchitinae</p> <p>4.1 Género <i>Toxorhynchites</i>  <i>Toxorhynchites</i> sp.</p>
---	---

---

mosquitos e insectos acuáticos (Harbach, 2007); lo cual la convierte junto con las especies del género *Toxorhynchites*, en un potencial enemigo natural de *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Culex quinquefasciatus* Say y otras especies de mosquitos que habitan en recipientes artificiales. Por otra parte, las hembras de *Cx. bigoti* se alimentan de sangre de animales domésticos y muy rara vez atacan al ser humano (Harbach, 2007), en consecuencia estas no han sido involucradas como vectores potenciales de patógenos al hombre. Las especies de *Uranotaenia*: *Uranotaenia typhlosomata* Dyar & Knab, *Uranotaenia calosomata* Dyar & Knab, *Uranotaenia nataliae* Arribalzaga, *Uranotaenia leucoptera* Theobald y *Uranotaenia lowii* Theobald, representan cinco nuevos registros de especies del género para el estado Bolívar (Tabla II-B); sin embargo, las mismas no tienen importancia médica en Venezuela y son señaladas por Gabaldon (1977, 1998) como especies que presentan ornitofilia. La especie *Aedeomyia squamipennis* Arribalzaga (Tabla II-A), tampoco tiene importancia médica y fue citada por Gabaldon (1977, 1998) como el principal vector natural de malaria aviaria en Venezuela, la misma ya estaba señalada para el estado Bolívar por Sutil (1980).

Por otro lado, *Mansonia pseudotitillans* Theobald y *Mansonia titillans* (Walker), que son dos nuevos registros para el estado Bolívar (Tabla II-B), han sido señaladas como vectores de la Encefalitis Equina Venezolana en Argentina (Oscherov *et al.*, 2007). El mismo autor, señala igualmente para Argentina a especies del género *Psorophora* principalmente *Psorophora albipes* (Theobald) (Oscherov, *et al.* 2007); sin embargo en Venezuela, son señalados mosquitos del género *Culex* subgénero *Melanoconion* como vectores principales de la Encefalitis Equina Venezolana en su ciclo selvático o enzoótico y especies de *Psorophora* y *Aedes* como vectores de los ciclos epizootico y epizoodémico (Navarro, 2007). En cuanto a las muestras de mosquitos del género *Culex* subgénero *Melanoconion*, estas fueron recolectadas en Santa Elena de Uairén, Maurak, Waramasen y San Antonio del Morichal (Tabla II-A), las mismas se obtuvieron mediante capturas con cebo humano, sin embargo estas permanecen aun sin identificación por no disponer de material para realizar las crías asociadas. Las especies de los géneros *Haemagogus*, *Runchomyia* y *Sabethes* tampoco han sido aun identificadas, estas se obtuvieron mediante capturas diurnas con cebo humano en el Campamento El Paraíso (Tabla II-B). Los pocos ejemplares de estos géneros, no pudieron

ser identificados debido al mal estado de los mismos y por no disponer de material para realizar las crías asociadas. En el campamento, también se capturaron durante el día las especies *Wyeomyia celaenocephala* Dyar and Knab, *Wyeomyia splendida* Bonne-Wepster & Bonne y *Limatus asulleptus* Theobald, que también representan tres nuevos registros para el estado Bolívar (Tabla II-B).

Mosquitos del género *Haemagogus* han sido las principales especies involucradas en la transmisión de fiebre amarilla selvática en América del Sur (Navarro, 2007); el género *Sabethes* también está involucrado en la transmisión de fiebre amarilla, con especies consideradas como vectores secundarios (Navarro, 2007). El género *Haemagogus* también ha sido involucrado en la transmisión del virus Mayaro (Liria & Navarro, 2010). Las especies de los géneros *Haemagogus* y *Sabethes* son arborícolas y tienen hábitos similares, ambos son de actividad de picada diurna y se alimentan en las partes altas del bosque donde pican generalmente a monos; sus larvas se crían en huecos de árboles y en bambú (Harbach, 2007). Los pocos ejemplares de ambos géneros no fueron identificados debido al mal estado de los mismos y por no disponer de material para realizar las crías asociadas. Sin embargo, en futuras investigaciones se intensificará la búsqueda de las especies involucradas en la transmisión de fiebre amarilla selvática o el virus Mayaro.

## AGRADECIMIENTOS

Al Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon", Dirección de Investigación por el financiamiento. A la Dra. Aura Suarez, Epidemióloga Distrital (Dtto. N° 7) del municipio Gran Sabana estado Bolívar por su constante colaboración y apoyo logístico.

## REFERENCIAS

- Anduze P. (1941). Lista provisional de zancudos hematófagos de Venezuela. *Bol. Entomol. Venez.* **1**: 6-18.
- Berti-Moser J., González-Rivas J. & Navarro, E. (2008). Fluctuaciones estacionales y temporales de la densidad larvaria de *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) y familias de insectos asociados a su hábitat en El Granzón, Parroquia

- San Isidro, municipio Sifontes del estado Bolívar. *Bol. Mal. Salud Amb.* **48**: 177-189.
- Cova-García P. (1961). *Notas sobre los Anofelinos de Venezuela y su identificación*. 2ª Ed. Editora Grafos C. A., Caracas. Venezuela.
- Cova-García P., Sutil E. & Rausseo J. (1966). *Mosquitos Culicinos de Venezuela*. Tomo II. Publicaciones del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. Caracas, Venezuela.
- Cova-García P. & Sutil E. (1977). *Claves gráficas para la identificación de Anofelinos de Venezuela*. Publicaciones de la División de Endemias Rurales. Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental. Maracay, Venezuela.
- Dean L., Ferreira-Neto J., Dean S. & Silveira I. (1970). *Anopheles (Kerteszia) cruzii* a natural vector of the monkey malaria parasites *Plasmodium simium* and *Plasmodium brasilianum*. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* **64**: 647-648.
- Ewel J., Madriz A. & Tosi J. (1968). *Zonas de vida de Venezuela*. Ediciones del Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura y Cría. Caracas, Venezuela.
- Fleming G. (1986). *Biology and Ecology of Malaria Vectors in The Americas*. Pan-American Health Organization. Washington, USA.
- Forattini P. (1962). *Entomología Médica. I. Parte General: Díptera, Anophelini*. Faculdade de Higiene e Saúde Pública. Publ. Univ. São Paulo, Brasil.
- Fauran P. (1961). *Catalogue annoté des Culicidés signalés en Guyane Française*. Arch Inst Pasteur de la Guyane Française et Inini. Publication N° 465. Guyane Française.
- Gabalton A., Ulloa G., Pulido J. & Sutil E. (1977). Especies de la familia Culicidae que presentan ornitofilia en Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **17**: 25-43.
- Gabalton A. (1998). *Malaria aviaria en un país de la región neotropical, Venezuela*. Fundación Venezolana para la Salud. Fundación Universidad Metropolitana. Caracas, Venezuela.
- Gorham R., Stojanovich R. & Scott G. (1967). *Clave ilustrada para los mosquitos anofelinos de Sudamérica Oriental*. U. S. Department of Health. Public Health Service. Communicable Disease Center, Atlanta, Georgia. USA.
- Harbach R. (2007). The Culicidae (Diptera): A review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa.* **1668**: 591-638.
- Harbach R. & Howard T. (2009). Review of the genus Chagasia (Diptera: Culicidae: Anophelinae). *Zootaxa.* **2210**: 1-25.
- Lane J. (1953). *Neotropical Culicidae*. Volume I & II. Publ. Univ. São Paulo, Brasil.
- Lee H., Seo B., Shin E., Burkett D., Lee J., & Shin Y. (2009). Efficiency evaluation of Nozawa-Style black light trap for control of Anopheline mosquitoes. *Korean J. Parasitol.* **47**: 159-165.
- Liria J. & Navarro J. C. (2010). Modelo de nicho ecológico de Haemagogus Williston (Diptera: Culicidae), vectores del virus de la fiebre amarilla. *Rev. Biomed.* **21**: 149-161.
- Lopes J. (1997). Ecología de mosquitos (Diptera: Culicidae) em criadouros naturais e artificiais de área rural do Norte do Estado do Paraná, Brasil. *Rev. Saude Public.* **31**: 370-377.
- Moreno J., Rubio-Palis Y. & Acevedo P. (2000). Identificación de criaderos de anofelinos en un área endémica a malaria del estado Bolívar, Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **40**: 21-30.
- Navarro J. C. (1996). Actualización de la tribu Anophelini de Venezuela, con una nueva clave para la identificación de larvas. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **36**: 25-43.
- Navarro J. C. (2007). Eco-epidemiología de las Arbovirosis en Venezuela. Memorias de la II Reunión Internacional sobre Enfermedades transmitidas por vectores en América. Editores Matías Reyes y Alexis Rodríguez. Instituto

- de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela. Editorial ATEPROCA C. A. Caracas, Venezuela.
- Navarro J. C., Ingunza J., Fernández Z. & Barrera R. (1995). Mosquitoes and bromeliads: species-specific selectivity patterns on the northern coast and southern Guiana Shields in Venezuela. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* **11**: 345-346.
- Navarro, J. C. Liria J., Piñango H. & R. Barrera. (2007). Biogeographic area relationships in Venezuela: A parsimony analysis of Culicidae. Phytotelmata distribution in National Parks. *Zootaxa.* **1547**: 1-19.
- Navarro J. C., Zorrilla, A. & Moncada, N. (2009). Primer registro de *Aedes albopictus* (Skuse) en Venezuela. Importancia como vector de Dengue y acciones a desarrollar. *Bol. Mal. Salud Amb.* **49**: 161-166.
- Osborn F., Rubio-Palis Y., Herrera, M., Figuera A. & Moreno J. (2004). Caracterización Ecoregional de los vectores de malaria de Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **44**: 77-92.
- Oscherov E., Bar M., Pieri-Damborsky M. & Avalos G. (2007). Culicidae (Diptera) de la Reserva Provincial Ibera, Corrientes, Argentina. *Bol. Mal. Salud Amb.* **47**: 221-229.
- 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.
- Rubio-Palis Y. (2005). Situación actual de la Taxonomía de la Subfamilia Anophelinae (Diptera: Culicidae) de Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **45**: 1-10.
- Stojanovich R., Gorham R. & Scott G. (1966a). *Clave ilustrada para los mosquitos anofelinos de Venezuela*. U. S. Department of Health. Public Health Service. Communicable Disease Center, Atlanta, Georgia. USA.
- Stojanovich, R., Gorham R. & Scott G. (1966b). *Clave ilustrada para los mosquitos anofelinos de America Central y Panamá*. U. S. Department of Health. Public Health Service. Communicable Disease Center, Atlanta, Georgia. USA.
- Sutil E. (1980). Enumeración histórica y geográfica de las especies de Culicidae de Venezuela ordenadas según su Taxonomía. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **20**: 1-32.
- Trinca-Fighera D. (2006). *La ocupación de la Amazonía vista desde Venezuela*. *Iconos*. Revista de Ciencias Sociales. **24**: 37-46.
- Vale-Barbosa M., Ferreira-Fe N., Dias-Barbosa R., Cabral-Rodríguez I., Monteiro W., Gomes-Mourão M. & De Oliveira-Guerra J. (2009). *Aedes aegypti* and associated fauna in the rural zone of Manaus, in the Brazilian Amazon. *Rev. Socied. Bras. Med. Trop.* **42**: 213-216.
- Wilkerson R. & Strickman D. (1990). Illustrated key to the anopheline mosquitoes of Central America and Mexico. *J. Amer. Mosq. Contr. Assoc.* **6**: 7-34.
- Wilkerson R. & Peyton E. L. (1991). The Brazilian Malaria vector *Anopheles (Kertessia) cruzii* Dyar & Knab. Life Stages and Biology. *Mosq. Systematics.* **23**: 110-122.
- Wilkerson R., Strickman D. & Fernández-Salas I. (1993). *Clave Ilustrada para la identificación de hembras de mosquitos anofelinos de México y Centro América*. Centro de Investigación de Paludismo. Secretaria de Salud. Chiapas, México.
- Zimmerman R. H. (1992). Ecology of malaria vectors in the Americas and future and direction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **87**: 371-383.

Recibido el 07/09/2010  
Aceptado el 11/05/2011



## Estudio histopatológico y ultraestructural de la infección de *Beauveria bassiana* (Ascomycota) sobre *Rhodnius prolixus* (Triatominae)

### *Histopathological and ultrastructural study of Beauveria bassiana (Ascomycota) infection on Rhodnius prolixus (Triatominae)*

Dalmiro José Cazorla Perfetti\* & Pedro Morales Moreno

#### RESUMEN

Se realizó un estudio para indagar aspectos histopatológicos y ultraestructurales de la interacción entre un aislamiento nativo (LF14) del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Hypocreales) y ninfas de quinto estadio y adultos de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). En los primeros estadios de la infección se observaron las conidias adheridas al exoesqueleto y en el momento de su penetración del tubo germinal. Después de la penetración vía tegumento y traqueolas del hemocele, las hifas invadieron virtualmente todos los tejidos y órganos, con el subsiguiente fallecimiento del insecto. En el último estadio del proceso infeccioso, se detectó la infección masiva del hifomiceto penetrando todo el cuerpo de adentro hacia aberturas del tegumento, para finalmente esporular, observándose numerosos conidios desprendidos de los conidióforos. La Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) reveló una invasión masiva de hifas y micelios fúngicos en todo el hemocele, con hemocitos fagocitando, encapsulando y melanizando al hongo. Durante la penetración tisular y tegumentaria de las hifas, se observan áreas electrotransparentes que sugieren actividad enzimática.

**Palabras clave:** Control biológico, hongo entomopatógeno, histopatología, microscopía electrónica, Triatominae.

#### INTRODUCCIÓN

A pesar de que existen varios trabajos que demuestran la patogenicidad y virulencia de varias especies/aislamientos/cepas de hongos entomopatógenos sobre las especies triatominae, vectores de la enfermedad de Chagas (Moura Costa, 1978; Sherlock & Guitton, 1982; Fargues & Luz, 2000; Lara da Costa *et al.*, 2003), es poco lo que se sabe acerca de los mecanismos de patogenicidad envueltos durante la interacción hongos hifomicetos-Triatominae; mecanismos que por lo

#### SUMMARY

A histopathological and ultrastructural study was used to describe the mode of interaction between a native isolate (LF14) of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Hypocreales) and nymphs/adults of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Conidia germinate on the surface of triatomine bugs and immediately begin penetration of the cuticle and spiracles by germinal tube. Once invade the haemocele, the fungus multiplies extensively whole insect tissues and organs, leading to triatomine death. When insect cadaver is in mummification stage, outgrowths of fungal hyphae occur first and most extensively in the intersegmental regions of triatomines, emerging at the surface, where they initiate sporulation process. Electron Transmission Microscopy (ETM) studies revealed abundant growth of fungal hyphae and micellar into haemocele, with haemocytic infiltration during phagocytosis, encapsulation and melanization process of fungal structures. Areas of low electron-density were frequently observed, suggesting the secretion of enzymes by hyphae to weaken and penetrating cuticle and tissues.

**Key words:** Biological control, entomopathogenic fungus, histopathology, electron microscopy, Triatomines.

demás, se han estudiado en varios taxones de artrópodos, incluidos los insectos (Maramorosch & Shope, 1975; Iwanaga & Lee, 2005).

Para el desarrollo de futuros programas de manejo integrado de plagas (MIP) para el control biorracional de los vectores de la enfermedad de Chagas, en los cuales se implementen los hongos entomopatógenos, es necesario y crucial la comprensión de sus modos de acción o mecanismos de patogenicidad.

En ensayos previos (Cazorla *et al.*, 2005; Cazorla & Morales: datos no publicados), nuestro equipo de investigación ha detectado que el aislamiento nativo LF14 del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Hypocreales) es altamente virulento hacia estadios ninfales e imaginales de *Rhodnius prolixus*, principal vector de la enfermedad de Chagas en Venezuela (OMS, 2007). Por lo que en el presente trabajo se utilizaron técnicas de microscopía de luz y electrónica de transmisión (MET) para verificar en primera instancia que la causa de la muerte de los insectos se debía al hifomiceto, además de dilucidar aspectos de la interacción íntima entre *B. bassiana* LF14-*R. prolixus*, i.e, adhesión, germinación, penetración, invasión, colonización y conidiación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Aislamiento fúngico y preparación de la suspensión de conidias*

Los ensayos se hicieron con el aislamiento LF14 de *B. bassiana*, de la micoteca del Laboratorio de Fitopatología (LF), Núcleo Universitario “Rafael Rangel” (NURR), Universidad de Los Andes (ULA), Trujillo, Estado Trujillo, Venezuela. El mismo fue aislado en 1992, a partir de cadáver, esporulado de un insecto coleóptero no identificado recolectado en la población de Monay, estado Trujillo, en la región andino-venezolana. Las conidias se obtuvieron removiendo, mediante asa de platino, la superficie de cultivos esporulados de 15 días crecidos sobre medio sólido (Sabouraud), y mantenidos a temperatura 26°C y HR >90% en cámara de ambientación o climatizada. El material fúngico cosechado se suspendió en agua destilada estéril con 0,1% Tween 20, y se filtró a través de gasa para separar el micelio de las conidias. La suspensión de conidias se ajustó, mediante hemocitómetro (Goettel & Inglis, 1997), a 1 x 10<sup>7</sup> conidias/ml, y se utilizó inmediatamente.

### *Insectos y bioensayos de infección*

Los triatominos se criaron en masa en el insectario del LEPAMET, CIB, UNEFM, Coro, estado Falcón, Venezuela, alimentándose sobre gallina cada 1-2 semanas, y se mantuvieron a 28 ± 1°C, 85 ± 5%HR con una fotofase de 12 horas. Los ensayos se hicieron con colonias de la especie triatolina *R. prolixus*. Para el tratamiento con *B. bassiana*, se emplearon 20 ninfas de quinto estadio y 20 adultos recién emergidos o

alimentados, las cuales se sumergieron en la suspensión de conidias por alrededor de 5-6 segundos. Los triatominos controles (20 ninfas de quinto estadio y 20 adultos) se sumergieron en agua destilada estéril con 0,1% Tween 20. Luego, los insectos se secaron durante 10-15 minutos, se transfirieron a envases de vidrio transparentes que contienen papel de filtro, y se mantuvieron en oscuridad en cámara de ambientación o climatizada ajustada a 26 °C y HR >90%. Se hicieron observaciones diarias, bajo lupa estereoscópica (Carl Zeiss, Stemi DRC, Alemania), de los cambios que ocurrían en la superficie de los insectos, y de la acción del hifomiceto.

### *Estudio Histopatológico y ultraestructural*

Para realizar los estudios, se cogieron 2-3 insectos de cada uno de los periodos siguientes: 14 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 15 días tras la aplicación. Dichos insectos, procedentes tanto de los individuos tratados como de los controles, se tomaron al azar, sin considerar para ello si estaban vivos o muertos. Los insectos se fijaron con alfileres en una placa de Petri rellena de parafina, sumergiéndose los mismos en una solución para disección (0,7% KCl + 0,3% NaCl). Se cortaron los conexivos, para luego retirar los tergitos y seccionándoseles con bisturí en segmentos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> el cuerpo graso, túbulos de malpighi, cutícula, sistema nervioso, músculos y sistema traqueal; las muestras tisulares se fijaron en formaldehído al 10% y se incluyeron en parafina para hacer cortes histológicos de 5-7µm con microtomo de rotación accionado manualmente. Los cortes se colorearon con hematoxilina - eosina (H & E) y azul de toluidina, y se evaluaron y fotografiaron bajo un microscopio fotónico (Martoja & Martoja-Pierson, 1970). Para la MET se siguió básicamente procedimiento dado por Cazorla *et al.* (2001). Para ello, las muestras se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato de sodio 0,2 M a pH 6,8 durante 3 horas a 4°C. Se lavaron tres veces con el mismo tampón durante 15 minutos cada lavado y se postfijaron con tetróxido de osmio al 1% durante 2 horas a temperatura ambiente. El exceso de fijador se extrajo por lavado con agua destilada desionizada tres veces consecutivas, por 10 minutos para cada lavado. El tejido se deshidrató en gradiente ascendente de etanol de 50, 70 y 90% durante 10 minutos y dos pases por etanol 100% por 60 minutos cada uno. Seguidamente, se hicieron tres pases por óxido de propileno durante 10 minutos cada uno. La inclusión se hizo en araldita, iniciando el proceso

con tres pases por una mezcla de óxido de propileno: araldita en proporciones de 3:1; 2:1 y 1:1 durante 1 hora cada uno. Las muestras se incluyeron en araldita pura durante 48 horas, con cambios cada 24 horas; realizándose la polimerización a 60 °C igualmente en araldita. Los cortes ultrafinos se hicieron con un ultramicrotomo Porter-Blume MT 2B. Las secciones ultrafinas se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se observaron en condiciones de bajo aumento con un microscopio electrónico de transmisión Hitachi 7000 a 75 kV.

## RESULTADOS

Una vez aplicada la suspensión de conidias, los insectos tardan entre 2-7 días en morir (Fig. 1). Ocorre un cambio en la coloración del tegumento de los ejemplares de *R. prolixus* al pasar de su característico color marrón-parduzco cuando se encuentran vivos, a un estado de coloración negruzco o ennegrecido en los cadáveres (Fig. 1 A). El estudio histológico reveló, tal como se esperaba, que la invasión de las conidias de *B. bassiana* ocurre tópicamente a través del tegumento y de las traqueolas (Fig. 2). El proceso de adherencia, germinación y penetración de las conidias al tegumento se logró captar con los cortes histológicos en las primeras horas de la aplicación del hifomiceto, aunque la adherencia no pareciera tener un sitio específico (Fig.2); la germinación de las conidias sobre la superficie de la cutícula del insecto dura aproximadamente entre las 12 y 18 horas después de la infección (Fig.2A). La penetración vía tegumento ocurre entre las 18 y 48 horas después de la infección; las hifas del hongo invaden masivamente el hemocele de los triatominos, logrando infectar y desintegrar la gran mayoría de los tejidos hasta que finalmente ocurre su deceso (Fig. 2). Las hifas emergieron a través de las aberturas de la cutícula, empezando por las coxas y tórax (Fig. 1B,C), y formaron una capa blanquecina micelial sobre la superficie de los cadáveres alrededor de 5 días post-inoculación, hasta que finalmente ocurrió la esporulación total cuando emergieron las conidias (Fig. 1C,D). En las electrografías por MET, las hifas invaden todos los tejidos hasta colapsar y fenecer el insecto (Fig.3). En este sentido, se detalla la aparición de una región electrotransparente en el sitio donde penetran las hifas, lo que sugiere una acción de exoenzimas degradando los tejidos (Fig. 3B). En la Fig.3D es particularmente apreciable la acción patogénica de las hifas sobre los tejidos del insecto, donde se aprecia así mismo, una apertura

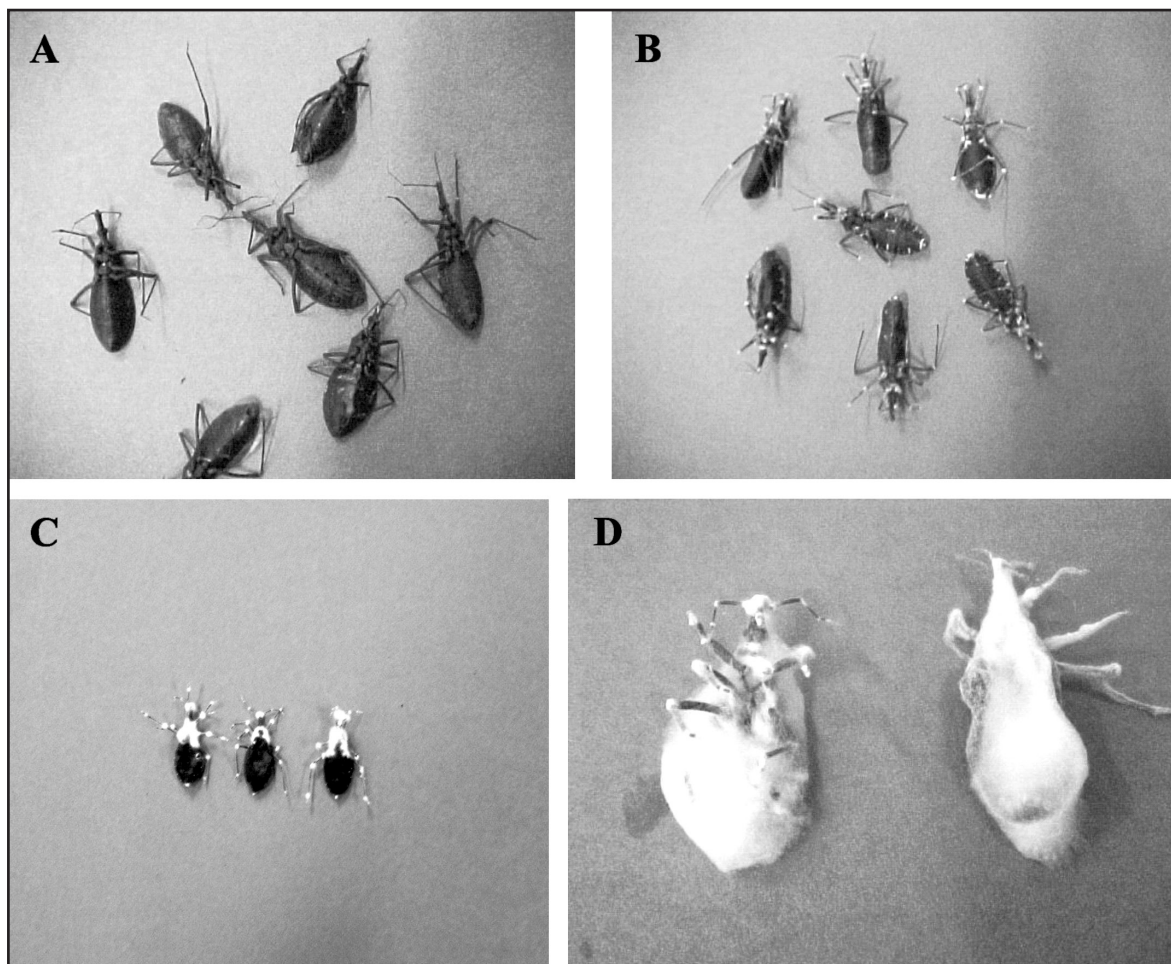
traqueolar por donde logran penetrar generalmente las hifas del hifomiceto. En la Fig. 4 se detalla mediante electrografías obtenidas por MET, la respuesta inmune celular del hemocele de *R. prolixus* ejercida por los hemocitos, sobre las esporas del aislamiento LF14 de *B. bassiana*. Así, se aprecia visiblemente cómo los hemocitos, en un intento por resistir la invasión, fagocitan, encapsulan y melanizan, hasta finalmente fenecer y colapsar, las esporas del hongo hifomiceto.

## DISCUSIÓN

La adhesión es el primer paso en el proceso de infección de cualquier hongo entomopatógeno. Haciéndose el análisis de las fotomicrografías por microscopía de luz, se revela la adhesión de numerosas conidias al tegumento de los triatominos, aunque sin tener un sitio específico para este evento. Tal como lo mencionan Hegedus & Khachatourians (1995), la cutícula es una de las principales barreras de defensa que poseen los insectos contra agentes externos, sin embargo es poco lo que se sabe acerca de cómo los insectos reconocen al hongo como algo extraño (Hayek & St. Leger, 1994). Resultados similares a éstos han obtenido otros investigadores en otras especies de insectos (Vey & Fargues, 1977; Bittencourt *et al.*, 1999; García *et al.*, 2004). En las figuras histopatológicas, se evidencia la germinación de las conidias sobre la superficie de la cutícula del insecto. Por su parte, la penetración vía tegumento, así como también por las traqueolas, ocurre entre las 18 y 48 horas después de la infección; este tipo de penetración “vía tegumento” es una característica que distingue a las entomomicosis de las infecciones de tipo viral, bacteriana o las debidas a protozoarios (Romaña & Romaña, 1981; Pineda *et al.*, 2003). La penetración del hongo por el tegumento es un hallazgo particularmente promisorio, ya que los insectos hematófagos como los triatominos, dejan su aparato bucal fijo a la superficie de sus hospedadores vertebrados, por lo que la vía oral no es viable para la penetración. Por lo tanto, una germinación y penetración rápida por la cutícula de los artrópodos-plagas son dos características importantes para la virulencia y selección de los aislamientos (García *et al.*, 2004).

Es importante destacar que se obtuvo evidencia histológica/ultraestructural in situ, tal como ya se mencionó, de la germinación y penetración

**Fig.1. Cadáveres de *Rhodnius prolixus* después de la acción patógena del aislamiento LF14 de *Beauveria bassiana*. A.- Cadáveres de adultos sin esporular (16 X). B.- Cadáveres de adultos comenzando a esporular el hongo por aberturas (16 X) C.- Cadáveres de ninfas de V estadio con conidiación en extremidades, cabeza y tórax (16X) D.- Cadáveres de ninfas de V estadio completamente esporulados (40 X).**



directa de las conidias del aislamiento LF14 de *B. bassiana* por los espiráculos respiratorios de *R. prolixus*; estos hallazgos confirman las observaciones mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de Perkul & Grula (1979), de la invasión traqueolar de *B. bassiana* en las larvas de la polilla *Heliothis zea* (Lepidóptera, Noctuidae), plaga del maíz.

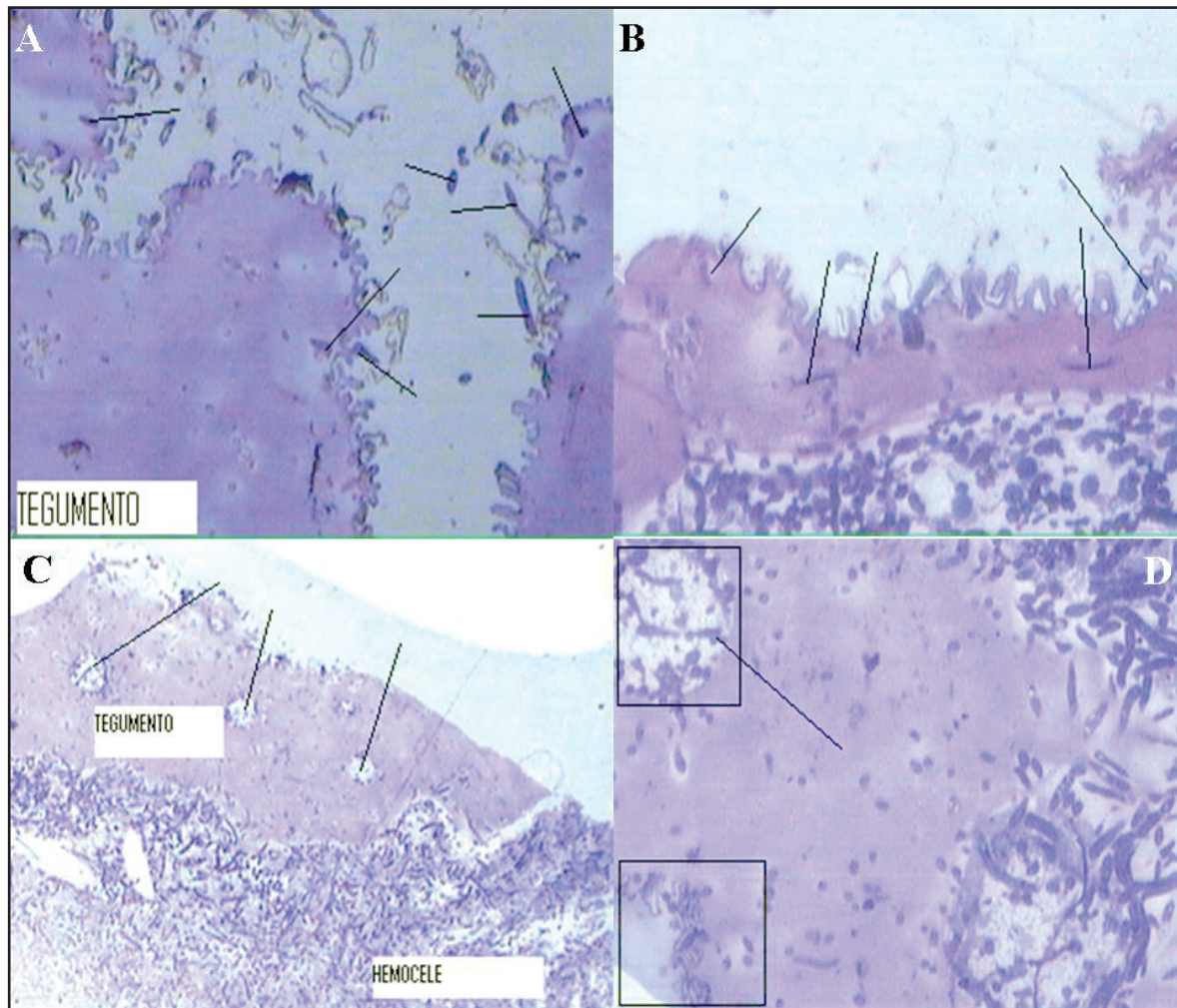
A pesar de que la epicutícula tiene varias capas, las mismas son proclives a la acción de las enzimas de los hongos (Hayek & St. Leger, 1994). Además, se debe acotar que existen otros factores, como la humedad, la inhabilidad para utilizar los nutrientes disponibles, o la ausencia de otro factor necesario para el reconocimiento en la superficie durante la adhesión, así como también la presencia de

otros que son inhibitorios del proceso (e.g., fenoles, quinonas, lípidos) (Hayek & St. Leger, 1994).

Las barreras de tipo físico, e.g., el exoesqueleto y la membrana peritrófica, son las primeras líneas de defensa de los insectos, las cuales sin embargo no pueden evitar la invasión de los microorganismos patógenos (Maramorosch & Shope, 1975; Iwanaga & Lee, 2005), tal como ocurrió con el aislamiento LF14 de *B. bassiana* contra *R. prolixus*.

Durante la invasión de tejidos, se observó alrededor de la punta de las hifas del hifomiceto una región electrotransparente en el sitio de la penetración, lo que sugiere una acción exoenzimática (e.g., lipasas, proteasas, quitinasas), tal como se ha observado

**Fig. 2.** Fotomicrografías mostrando detalles de cortes histopatológicos de secciones de cadáveres de *Rhodnius prolixus* infectados experimentalmente con aislamiento LF14 de *Beauveria bassiana*. **A)** Conidias (flechas) durante el acto de infección del triatomino (400 X). **B)** Flechas señalan hifas del hifomiceto sobre y a través del tegumento (400 X). **C)** Nótese gran cantidad de hifas invadiendo el hemocele del insecto. Las flechas indican traqueolas invadidas por el hifomiceto (100 X). **D)** Ampliación (400 X) de los eventos descritos en C. Coloración: azul de toluidina.

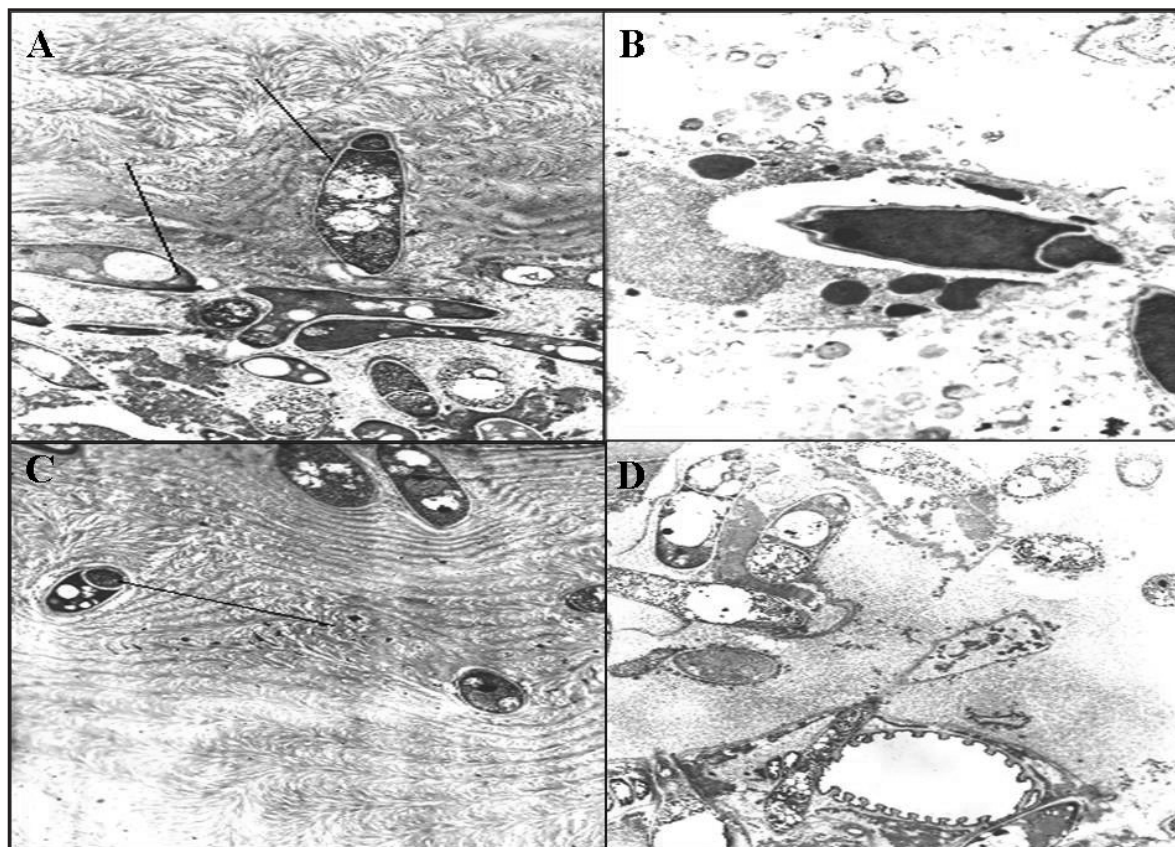


en otras especies de insectos por la acción de *B. bassiana*, lo que produce lesiones; estas lesiones no sólo estresan y aniquilan al insecto, sino que también extrae nutrientes para el crecimiento hifal (Perkul & Grula, 1979; Kumar *et al.*, 1999).

Resulta interesante resaltar y analizar la respuesta inmune celular (RC) del hemocele de esta especie de Triatominae, ejercida por los hemocitos sobre las esporas del aislamiento LF14 de este hifomiceto, tal como se observó en las electrografías exhibidas. Se aprecia visiblemente cómo los hemocitos,

en un intento por resistir la invasión, fagocitan, encapsulan y melanizan, hasta finalmente colapsar y fenecer, las esporas del hongo hifomiceto. Como bien lo señalan Abraham & Jacobs-Lorena (2004), Leclerc & Reichhart (2004) y Waterfield *et al.* (2004), una vez que un patógeno penetra al hemocele, se encuentra expuesto a la respuesta humoral (RH) y RC de los insectos. La de tipo humoral comprende la producción de péptidos antimicrobianos, incluyendo proteínas antifúngicas (Natori *et al.*, 1999), la inducción de la síntesis de lectinas y la activación del sistema profenoloxidasas; sin embargo, se debe recalcar que la RH

**Fig. 3. A y C. Electrografías mostrando las hifas (flechas) del aislamiento LF14 de *Beauveria bassiana* penetrando el tejido del hemocele y musculatura de ninfas V estadio de *Rhodnius prolixus*. En B, se muestra más detalladamente área electrotransparente entre la hifa y el tejido que sugiere acción enzimática del hifomiceto. En D, se observa abertura correspondiente a traqueola, por donde se encuentran hifas. Magnificación: 15.000 X. Nótese que el citoplasma de las células fúngicas es extremadamente denso.**

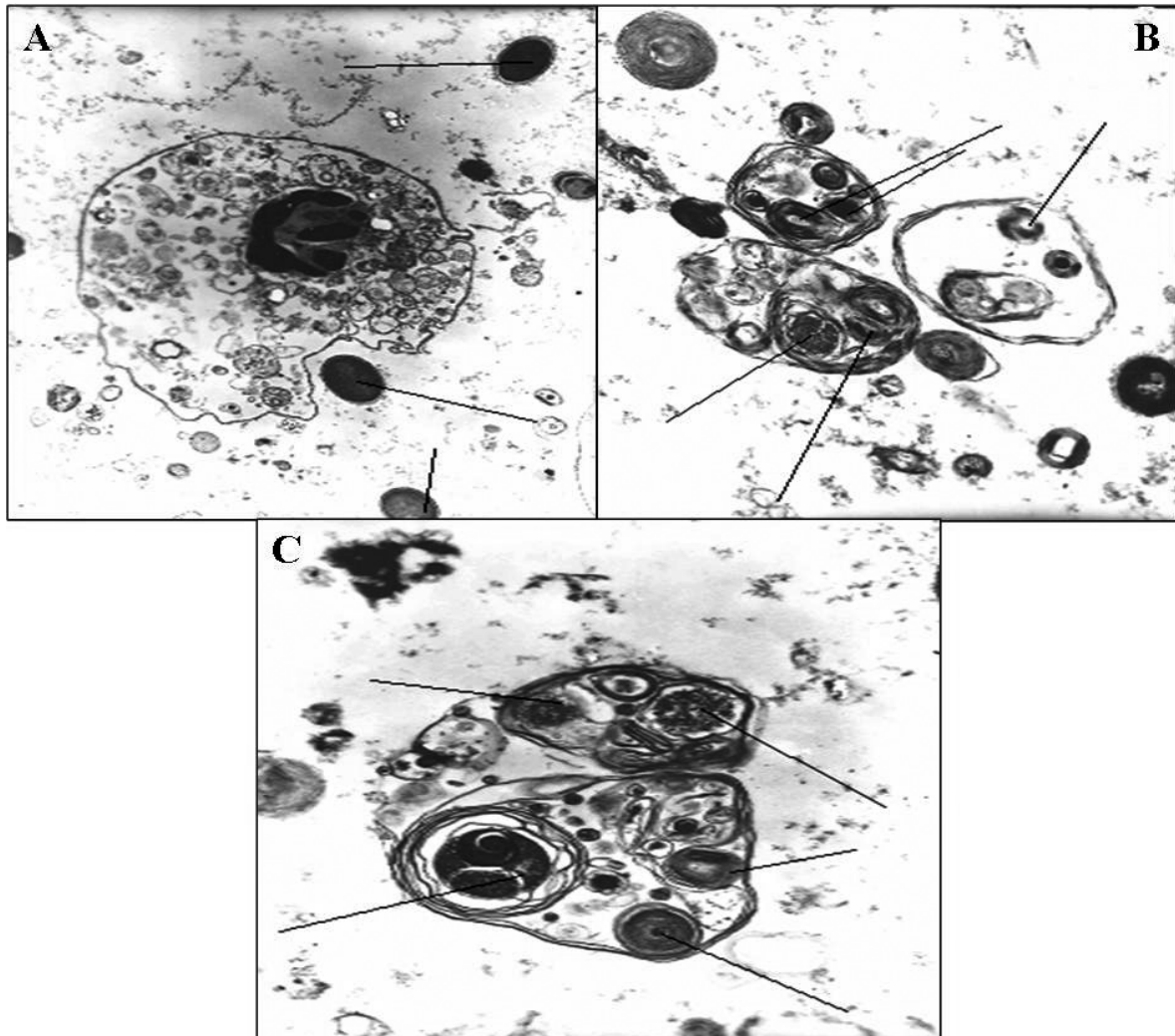


no es tan distinta de la RC, toda vez que la RH modula la RC (Iwanaga & Lee, 2005).

La fagocitosis es una de las primeras líneas de defensa celular del hemocele de los artrópodos contra cuerpos extraños, la cual es ejercida por lo hemocitos, que los encapsulan y luego los melanizan formando capas concéntricas de nódulos (Nappi, 1975; Söderhäll & Cerenius, 1992; Hayek & St. Leger, 1994; Hegedus & Khachatourians, 1995; Rendón & Balcázar, 2003). La fenoloxidasa es la enzima responsable de la melanización observada en crustáceos e insectos, actuando también en la reparación de las heridas y la esclerotización de la cutícula (Söderhäll & Cerenius, 1992; Iwanaga & Lee, 2005). Esta última es responsable de la oxidación de fenoles en quinonas, los cuales se polimerizan en

melanina y son altamente tóxicas. La melanina es un pigmento pardo-negro, al cual se le adjudican diversas propiedades biológicas tal como la inhibición de la actividad de enzimas bacterianas y fúngicas (Smith & Söderhäll, 1983; Quesada-Moraga & Vey, 2004; Iwanaga & Lee, 2005). Por su parte, la encapsulación es un mecanismo de defensa multicelular para eliminar sustancias externas que normalmente no pueden ser eliminadas exclusivamente por lo mecanismos humorales del insecto, aunque se han aislado proteínas de encapsulación que ayudan al proceso de defensa (Bidochka & Khachatourians, 1987; Johanson *et al.*, 1995; Vázquez *et al.*, 1998; Iwanaga & Lee, 2005). Estas cápsulas se encuentran fuertemente melanizadas, y actúan cuando una partícula es demasiado grande para ser fagocitada, muchos hemocitos cubren a la partícula grande formando capas alrededor de ella (Bidochka &

Fig. 4. Electrografías mostrando detalles ultraestructurales de la acción defensiva de hemocitos de ninfas estadio V de *Rhodnius prolixus* contra esporas del aislamiento LF14 de *Beauveria bassiana*. A) Nótese hemocito captado durante la fagocitosis de esporas (flechas) del hifomiceto encapsuladas. B y C) Esporas del hongo fagocitadas, melanizadas y encapsuladas (flechas) por los hemocitos, algunos de los cuales se encuentran prácticamente destruidos con el citoplasma degradado, de muy baja densidad, y aun vacíos. Magnificación: 15.000 X.



Khachatourians, 1987; Söderhäll & Cerenius, 1992). Götz & Vey (1974) revelaron que larvas de Chironomus (Diptera, Chironomidae) inyectadas con esporas de *B. bassiana* fueron encapsuladas, atribuyendo este fenómeno a la fenoloxidasa (Nappi, 1975). Además, se debe tomar en cuenta que *B. bassiana* produce una gran variedad de compuestos tóxicos (e.g., metabolitos secundarios: macromoléculas, péptidos cíclicos) que poseen capacidad insecticida y de melanización, para evitar la respuesta inmune del insecto (Fuguet & Vey, 2004).

A pesar de todo lo comentado, en las cepas hipervirulentas de *B. bassiana* los hemocitos de los insectos son incapaces de frenar al crecimiento de los hongos, como pareciera ser el caso del aislamiento LF14, no formándose la encapsulación o las blastosporas germinan libremente fuera de los hemocitos (Hung *et al.*, 1993; Hayek & St. Leger, 1994).

Con estos resultados queda demostrado que

el aislamiento LF14 de *B. bassiana* posee la capacidad de invadir y colonizar a *R. prolixus* a través de la cutícula y los espiráculos respiratorios, de aquí que la aplicación tópica es la manera indicada para las futuras formulaciones basadas en conidias viables de esta especie de hongo entomopatógeno.

#### AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Carmen Castillo del Laboratorio de Fitopatología, NURR, ULA, Trujillo, Estado Trujillo, Venezuela, por su gentileza de donarnos los aislamientos fúngicos. A la Unidad de Microscopía Electrónica, UNEFM, Coro, estado Falcón, Venezuela por apoyo en la realización de la MET.

#### REFERENCES

- Abraham E. & Jacobs-Lorena M. (2004). Mosquito midgut barriers to malaria parasite development. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**: 667-671.
- Bidochka M. & Khachatourians G. (1987). Hemocytic defense response to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. *Entomol. Exp. Appl.* **45**: 151-156.
- Bittencourt V., Masca-Renhas A. & Faccini J. (1999). The penetration of the fungus *Metarhizium anisopliae* on *Boophilus microplus* in experimental conditions. *Ciência Rural.* **29**: 351- 354.
- Cazorla D., Yépez J., Añez N. & Sánchez de Mirt A. (2001). Efecto del tratamiento intralesional con clorhidrato de emetina sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis* en hámsteres. *Invest. Clín.* **42**: 5-21.
- Cazorla D., Morales P., Salas P., Yáñez Y., Castillo C. & Acosta M. (2005). *Patogenicidad de un aislamiento autóctono de Beauveria bassiana (Deuteromycotina: Hyphomycetes) contra Rhodnius prolixus y Triatoma maculata (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae)*. XIX Congreso Venezolano de Entomología "Dr. Carlos Pereira Núñez". San Felipe, Venezuela.
- Fargues J. & Luz C. (2000). Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on the potential of *Beauveria bassiana* for *Rhodnius prolixus*. *J. Invertebr. Pathol.* **75**: 202-211.
- Fuguet R. & Vey A. (2004). Comparative analysis of the production of insecticidal and melanizing macromolecules by strains of *Beauveria* spp.: *in vivo* studies. *J. Invertebr. Pathol.* **85**: 152- 167.
- García M., Monteiro, A. & Szabó M. (2004). Colonização e lesão em fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* causadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. *Ciência Rural.* **34**: 1513-1518.
- Goettel M. & Inglis G. (1997). Fungi: Hyphomycetes. pp.213-249. En: *Manual of techniques in insect pathology*. Ed. L. Lacey. Academic Press. San Diego, California, USA.
- Götz P. & Vey A. (1974). Humoral encapsulation in Diptera (Insecta): defense reactions of Chironomus larvae against fungi. *Parasitology.* **68**: 193-205.
- Hayek A. & St. Leger R. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect host. *Annu. Rev. Entomol.* **39**: 293-322.
- Hedegus D. & Khachatourians G. (1995). The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnol. Adv.* **13**: 455-490.
- Hung S., Boucias D. & Vey A. (1993). Effect of *Beauveria bassiana* and *Candida albicans* on the cellular defense of *Spodoptera exigua*. *J. Invertebr. Pathol.* **61**: 179-187.
- Iwanaga S. & Lee B. (2005). Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biol.* **38**: 128-150.
- Johanson M., Lind M., Holmblad T., Thörnqvist P. & Söderhäll K. (1995). Peroxinectin, a novel adhesion protein from crayfish blood. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **216**: 1079-1087.
- Kumar V., Singh G., Babu A., Ahsan M. & Datta R. (1999). Germination, penetration, and invasion of *Beauveria bassiana* on silkworm, *Bombyx mori*, causing white muscardine. *Ital. J. Zool.* **66**: 39-43.
- Lara da Costa G., Lage de Moraes A. & Galvão C. (2003). Entomopathogenic effect of *Aspergillus*

- giganteus* and *Penicillium corylophilum* on two triatomine vectors of Chagas disease. *J. Basic. Microbiol.* **43**: 3-7.
- Leclerc V. & Reichhart J. (2004). The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunol. Rev.* **198**: 59-71.
- Maramorosch K. & Shope R. (1975). *Invertebrate Immunity: Mechanisms of Invertebrate Vector-Parasite Relations*. Academic Press. New York, USA.
- Martoja R. & Martoja-Pierson M. (1970). *Técnicas de histología animal*. Toray-Masson, Barcelona, España.
- Moura-Costa M. (1978). Susceptibilidad do triatomineo *Rhodnius prolixus* ao fungo entomopatogenico *Metarhizium anisopliae*. *Ann. Acad. Med. Bahia.* **1**: 35-44.
- Nappi A. (1975). Parasite encapsulation in insects. pp. 293-338. En: *Invertebrate Immunity. Mechanisms of vertebrate vector-parasite relations*. Eds. K. Maramorosch & R. Shope. Academic Press. New York. USA.
- Natori S., Shiraishi H., Hori S. & Kobayashi A. (1999). The roles of Sarcophaga defense molecules in immunity and metamorphosis. *Dev. Com. Imm.* **23**: 317-328.
- OMS (2007). Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Buenos Aires: Programa Especial de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales (TDR) UNICEF/PNUD/BancoMundial/OMS.Documento en línea: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/TDR\\_SWG\\_09\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/TDR_SWG_09_spa.pdf). (Consultado: 2010, Abril 14).
- Pekrul S. & Grula E. (1979). Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. *J. Invertebr. Pathol.* **34**: 238-247.
- Pineda F., Saldarriaga Y., Calle J & Uribe S. (2003). Susceptibility of *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae) of fifth instar nymph to the action of *Beauveria* spp. *Entomotrópica.* **18**: 163-168.
- Quesada-Moraga E. & Vey A. (2004). Bassiacridin, a Protein Toxic for Locusts Secreted by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. *Mycol. Res.* **108**: 441-452.
- Rendón L. & Balcázar J. (2003). Inmunología de camarones: conceptos básicos y recientes avances. *Revista AquaTIC.* **19**: 27-33.
- Romaña C. & Romaña CH. (1981). Experimental infection of *Triatoma infestans* with the fungus *Beauveria tenella*. pp. 215 -217. En: *Parasitological topics. A Presentation of volume to PCC GARNHAM FRF on the occasion of his 80 birthday*. Ed. E. Cannin. Allen Press. Kansas. USA.
- Sherlock I. & Guitton N. (1982). Observacoes sobre a açao do fungo *Metarhizium anisopliae* Metschnikoff sobre algumas espécies de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* **24**: 234 – 239.
- Smith V. & Söderhäll K. (1983). Induction of degranulation and lysis of hemocytes in the freshwater crayfish *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system *in vitro*. *Cell Tissue Res.* **233**: 295-303.
- Söderhäll K. & Cerenius L. (1992). Crustacean immunity. *Annu. Rev. Fish Dis.* **2**: 3- 23.
- Vázquez L., Sierra C., Juárez S., Agundis, C. Zavala, A. & Zenteno E. (1998). Mecanismos de inmunidad en crustáceos. *Interciencia.* **23**: 344-348.
- Vey A. & Fargues J. (1977). Histological and ultrastructural studies of *Beauveria bassiana* infection in *Leptinotarsa decemlineata* larvae during ecdysis. *J. Invertebr. Pathol.* **30**: 207-215.
- Waterfield N., Wren B. & Ffrench-Constant R. (2004). Invertebrates as a source of emerging human pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 833-841.

Recibido el 14/03/2011  
Aceptado el 18/05/2011



## Notas Científicas

### Primer registro de *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) en los municipios Alto Orinoco y Atures, estado Amazonas, Venezuela

### *First record of Panstrongylus geniculatus (Latreille, 1811) in the municipalities of Atures and Alto Orinoco, Amazonas State, Venezuela*

Oscar Noya-Alarcón<sup>1-2\*</sup>, Carlos Botto<sup>1-3</sup>, José Cortez<sup>3</sup>, Elizabeth Ferrer<sup>4</sup>, Mercedes Viettri<sup>4</sup> & Leidi Herrera<sup>5</sup>

#### RESUMEN

*Panstrongylus geniculatus* está adquiriendo cada vez más importancia en la transmisión de la Tripanosomiasis americana o Enfermedad de Chagas tanto en el medio rural como en el medio urbano, mostrando una amplia distribución en casi toda Venezuela. Sin embargo en el Estado Amazonas, el segundo de mayor área, sólo se reporta su presencia en el Municipio Río Negro. Un triatomino de la especie *Panstrongylus geniculatus* se capturó en el peridomicilio de la comunidad indígena Piaroa de Betania de Topocho, Municipio Atures, y un segundo triatomino de la misma especie, fue capturado en la comunidad indígena Yanomami de Parima B del municipio Alto Orinoco, estado Amazonas, Venezuela. No se encontraron parásitos en el contenido intestinal de ambos triatominos, sin embargo, en el segundo espécimen se detectó por técnicas moleculares la presencia de ADN de *Trypanosoma cruzi*. Se discute la importancia epidemiológica de estos hallazgos para la transmisión de la Enfermedad de Chagas en esta región.

**Palabras clave:** *Panstrongylus geniculatus*, *Trypanosoma cruzi*, Enfermedad de Chagas, Amazonas, Venezuela.

#### SUMMARY

The importance of *Panstrongylus geniculatus* as an urban and rural vector of Chagas Disease is increasing in the northern part of South America, particularly in Venezuela where it is widely distributed in its territory. However, in the Amazonas state, the second largest in Venezuela, its presence has only been reported in the Río Negro Municipality. A *Panstrongylus geniculatus* triatomine has been captured in the dwellings of a Piaroa indigenous community, called Betania de Topocho in the Municipality of Atures. A second triatomine of the same species was collected in Parima B, a Yanomami indigenous community, located in the Municipality of Alto Orinoco, Amazonas State, Venezuela. No parasites were found in the gut contents of both triatomines. However *Trypanosoma cruzi* DNA, was detected by molecular techniques in the second specimen. We discuss the epidemiological significance of these findings in terms of the possible role in the transmission of Chagas disease in this region.

**Key words:** *Panstrongylus geniculatus*, *Trypanosoma cruzi*, Chagas Disease, Amazonas, Venezuela.

Los triatominos (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) vectores del *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), causante de

la Enfermedad de Chagas, están agrupados en más de 140 especies, siendo las regiones tropicales y subtropicales de Sur América las de mayor diversidad.

<sup>1</sup> Laboratorio Ecología Parasitaria, Instituto de Medicina Tropical Félix Pifano, Universidad Central de Venezuela.

<sup>2</sup> Postgrado Nacional de Parasitología. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

<sup>3</sup> Unidad de Ecoepidemiología, Centro Amazónico de Investigación y Control de Enfermedades Tropicales "Simón Bolívar".

<sup>4</sup> Sección de Parasitología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED-UC), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Sede Aragua.

<sup>5</sup> Laboratorio de Biología de Tripanosomatídeos, Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Universidad Central de Venezuela.

\*Autor de correspondencia: ozonoya6@yahoo.com

En el Estado Amazonas se han reportado nueve especies de triatomínos: *Cavernicola pilosa* (Barber, 1937), *Rhodnius prolixus* (Stål, 1859), *Rhodnius brethesi* (Matta, 1910), *Rhodnius pictipes* (Stål, 1872), *Rhodnius pallescens* (Barber, 1932), *Triatoma maculata* (Ericsson, 1848), *Eratyrus mucronatus* (Stål, 1859), *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811), y *Panstrongylus rufotuberculatus* (Champion, 1899). Todos ellos sin registro de infección por *T. cruzi*. (Carcavallo *et al.*, 1999. Geographical distribution and alti-latitudinal dispersion. En: *Atlas of Chagas' Disease Vectors in the Americas*. Eds. Carcavallo *et al.* **Vol. III**: 747-792. Fiocruz Editorial, Rio de Janeiro, Brasil; Chavez, 2006. *An. Fac. Med. Lima*. **67**: 65-76; Feliciangeli *et al.*, 2004. *Bol. Mal. Salud Ambient.* **44**: 67-75).

En el Estado Amazonas se ha descrito la presencia de *P. geniculatus* en el Municipio Río Negro (Osuna, 1984. *Bol. Dir. Malar. San. Amb.* **24**: 1-4), y existe un reporte no formal en los registros del "Laboratorio de Chagas" de la Dirección General de Salud Ambiental y Contraloría Sanitaria (DGSACS) con sede en Maracay del año 1994, donde se recibió del Servicio de Puerto Ayacucho un *P. geniculatus* que resultó positivo a *T. cruzi* (sin datos de procedencia) (Feliciangeli *et al.*, 2004. *Op. cit.*). Nuestra revisión de la literatura no evidenció registros *P. geniculatus* para los Municipios Atures y Alto Orinoco, en el cual tampoco se cita la presencia de otras especies de triatomínos.

Se capturaron dos ejemplares adultos hembras, entre los meses de octubre y diciembre de 2009. Uno en el peridomicilio de una de vivienda unifamiliar de bloque y friso, de la comunidad Piaroa (Wóthuha) de Betania de Topocho, Municipio Atures, (05° 57' 40,86" N y 67° 20' 32,90" W, 56 msnm) en el eje carretero norte a 50 km del noreste de Puerto Ayacucho. Esta comunidad está en una planicie aluvial, rodeada por pie de monte y colinas con afloramientos rocosos graníticos de 40°-50° de inclinación, con sabanas arbustivas, bosques de galería y suelos coluvio aluviales recientes. La comunidad parcialmente urbanizada y con áreas aledañas de conucos está situada a 352 m del caño Topocho.

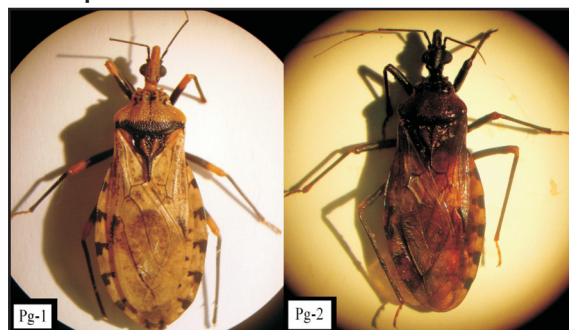
El segundo ejemplar se capturó en el intradomicilio de la residencia médica del Ambulatorio de la comunidad Yanomami de Parima B en el Municipio Alto Orinoco, Estado Amazonas (02° 46' 36" N y 64°

13' 55" W, 895 msnm), ubicada en un área de plateau con 30° a 60° de pendiente. Es un paisaje de montañas con topografía escarpada y geológicamente asentada sobre rocas graníticas tipo Santa Rosalía (Provincia Cuchivero, edad precámbrica). Su vegetación presenta una forma de vida mixta, con sabanas gramíneas arbustivas y bosques bajos y densos, y el clima del área es submesotérmico ombrófilo (Botto *et al.*, 2005. *Parassitología*. **47**: 145-150).

La comunidad de Parima B se encuentra dentro del Parque Nacional Parima-Tapirapecó que a su vez está inserto dentro de la Reserva de Biósfera Alto Orinoco-Casiquiare. Esta área Bajo Régimen de Administración Especial cubre un área de cerca de 83.830 km<sup>2</sup>, siendo una de las más grande del mundo que abarca desde las cabeceras del Río Orinoco (aguas abajo) hasta la desembocadura del río Cunucunuma y todas las cuencas hidrográficas tributarias en el medio. (Huber, 2001. *Biodivers. Conserv.* **10**: 1627-1643).

Los triatomínos fueron capturados en cajas de fósforos por habitantes previamente instruidos para la captura segura, sin contacto con los ejemplares, y con mínimo riesgo de infección con *T. cruzi*, según protocolo modificado de Reyes-Lugo (2009. *Rev. Biomed.* **20**: 180-205). Cada caja fue identificada con los datos del colector, fecha, hora y lugar de la captura en la cara posterior, y en la cara anterior se colocó una imagen de *P. geniculatus* a color de dimensiones reales respecto a su estadio de adulto. En los costados se leyó la palabra "chipo" en castellano o en la lengua indígena Yanomami "mamo frammai", las cuales fueron entregadas en el Alto Orinoco. En la comunidad Yanomami de Parima B, informantes

**Fig. 1. Pg-1: *P. geniculatus* capturado en la población Yanomami de Parima B, Municipio Alto Orinoco. Pg-2 *P. geniculatus* capturado en la comunidad Piaroa de Betania de Topocho, Municipio Atures.**



indígenas hacen referencia a los triatominos como “mamo fraamai” -tener el ojo irritado por una sustancia agresiva- (Lizot, 2004. Diccionario enciclopédico de la lengua Yanomami, Puerto Ayacucho, Venezuela), quizás por la asociación de los indígenas producto del contacto de estos insectos con la conjuntiva y la posterior irritación de la misma y/o edema bupalpebral.

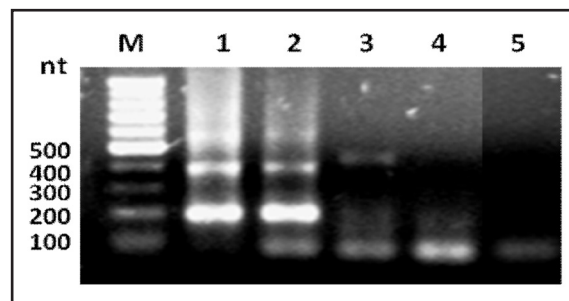
Los ejemplares fueron identificados como *P. geniculatus* por sus estructuras morfológicas diagnósticas como: cabeza corta, ancha y con tubérculos anteníferos situados detrás del medio de la región ante ocular, pronoto con manchas negras conspicuas y todos los segmentos del conexivo con manchas negras y claras (Lent & Wygodzinsky, 1979. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* **163**: 123-520; Soto-Vivas, 2009. *Bol. Mal. Salud. Amb.* **49**: 259-274). (Fig.1).

Se realizó la disección y extracción del contenido intestinal de cada ejemplar en solución salina isotónica (0,85%) y su examen microscópico (40X) no evidenció la presencia de hemoflagelados.

El contenido fue preservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la posterior extracción de ADN con resina Chelex®100 (BioRad) según indicaciones del fabricante, y a continuación, se realizó la amplificación de ADN de minicírculo de cinetoplasto de *T. cruzi* y la amplificación de ADN satélite (PCR-ADNsat) por Reacción en Cadena de la Polimerasa ( Polymerase Chain Reaction o PCR) a fin de verificar la infección por *T. cruzi* en el mismo y su potencial papel en la transmisión del parásito.

Se utilizó la técnica de PCR para la detección de ADN de cinetoplasto de *T. cruzi*, que amplifica una banda de 330 nucleótidos (nt) utilizando los cebadores 121 (AAATAATGTACGGGTGAGATGCATGA), 122 (GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT) (Wincker *et al.*, 1994. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**: 771-777) y para la PCR de detección de ADN satélite (ADNsat) de *T. cruzi* que amplifica una región repetida de 188 nt, se utilizaron los cebadores TCZ1 (CGAGCTCTTGCCCACACGGGTGCT) y TCZ2 CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG) (Moser *et al.*, 1989. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 1477). Se aplicaron ambas técnicas con modificaciones para adaptarlas a las condiciones del laboratorio (Ferrer *et al.*, 2008, Memorias del VI Congreso de Investigación en la Universidad de Carabobo Valencia, Edo. Carabobo Venezuela. 2008, **I**: 532-536).

**Fig. 2. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación de la secuencia de ADN satélite de *T. cruzi*. (M) Marcador de tamaño de ADN, 100 nt (Promega), (1) Control + ADN *T. cruzi* Dm28c (Tcl), (2) Control + ADN *T. cruzi* LH31 (Tcll), (3) contenido intestinal de *P. geniculatus* (Pg1) colectado en la comunidad Yanomami de Parima B, Mun. Alto Orinoco, (4) contenido intestinal de *P. geniculatus* (Pg2) capturado en la comunidad Piaroa de Betania de Topocho, Mun. Atures, (5) Control negativo.**

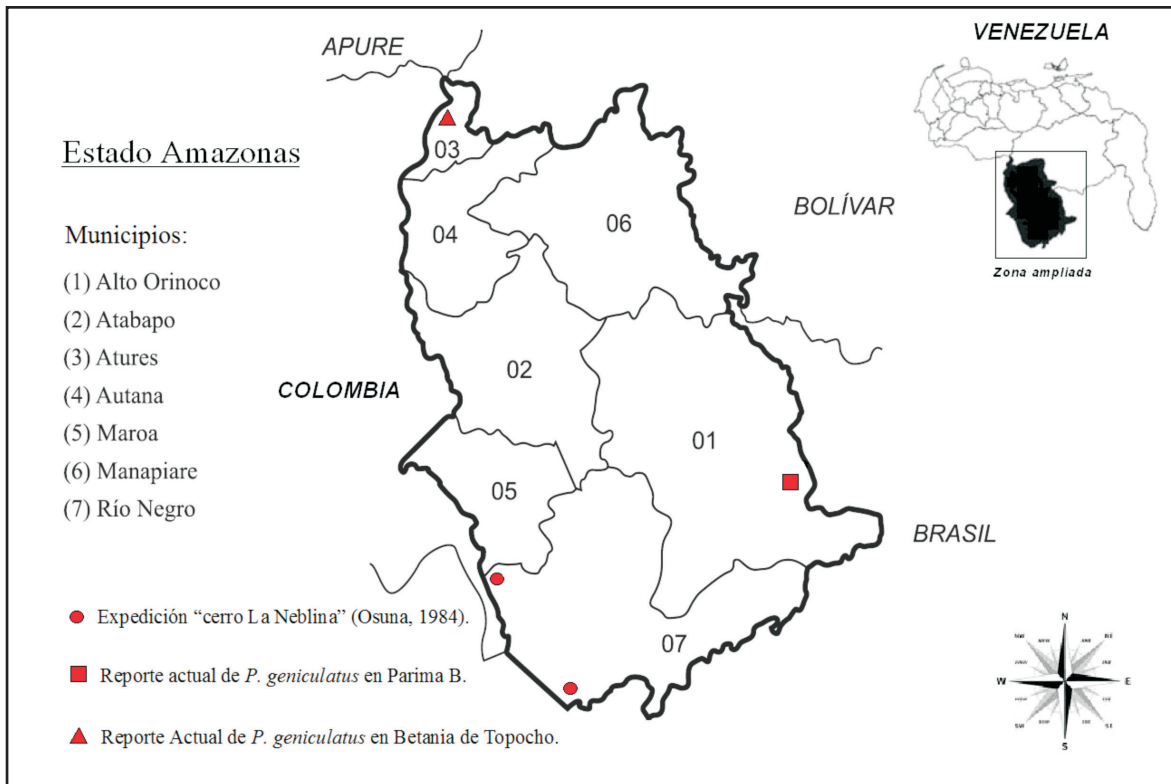


Los productos de PCR se evidenciaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, en tampón TAE (Tampón Tris Acetato 40 mM, EDTA 0,5 M pH 8,0), teñidos con bromuro de etidio (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y visualizados por UV en el sistema Gel Doc 1000 (BioRad). El tamaño de las bandas de ADN, se estimó por comparación con el marcador de tamaño de ADN de 100 nt (Promega).

La PCR para amplificación del ADN de cinetoplasto resultó negativa para ambos ejemplares, mas la amplificación del ADNsat resultó positiva para el triatómino de Parima B, evidenciándose una banda de 188 nt y una banda de mayor tamaño que se forma por amplificación de dos o más repeticiones de ADN satélite que se encuentran contiguas en los cromosomas del parásito (Kirchhoff *et al.*, 1996. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1171-1175) (Fig. 2).

*Panstrongylus geniculatus* es un triatómino con una amplia distribución en Venezuela que está presente tanto en el ciclo doméstico, como en el ciclo silvestre de *T. cruzi*. Se le ha considerado sinantrópico, fotofílico y de hábitos eclécticos en función de las acciones antrópicas como la deforestación, la cual provoca cambios en la densidad poblacional de otros triatominos competidores, de sus depredadores naturales o de la reducción de las fuentes sanguíneas animales (Reyes-Lugo, 2009. *Rev. Biomed.* **20**: 180-205).

**Fig. 3. Mapa geopolítico del Estado Amazonas, Venezuela, con la ubicación geográfica de los lugares de captura de dos *Panstrongylus geniculatus* en el Municipio Río Negro y los reportes de dos especímenes de la misma especie en los Municipios Alto Orinoco y Atures.**



Modificado de Feliciangeli *et al.*, 2004, *Bol. Mal. Salud Ambient.* 44: 67-75.

Esta especie ha sido encontrada en los Departamentos amazónicos colombianos de Guainía y Vichada (Guhl *et al.*, 2007. *Rev. Biomed.* 27: 143-62), los cuales limitan con la frontera occidental del Estado Amazonas venezolano a través de los Municipios Atures, Autana, Atabapo, Maroa (sin reportes previos para esta especie) y el Municipio Río Negro (en donde si existen registros), todos sin datos de infección para *T. cruzi* (Osuna, 1984. *Op. cit.*) (Fig. 3). En esta amplia frontera trazada en su mayoría por el eje fluvial del Orinoco medio, se podría sospechar de la existencia de *P. geniculatus* al margen de las dos orillas en todo su trayecto. De igual manera se pudiese especular en la presencia de esta especie en el Estado Apure (entidad sin registro para esta especie), debido a su cercanía con el Municipio Atures y con los Departamentos colombianos de Vichada y Arauca, donde si hay registros.

Por otra parte, estudios realizados en el estado brasilero de Roraima, el cual colinda con el Estado

Amazonas venezolano por su frontera oriental, se ha reportado en el peridomicilio de la población de Passarão (03°05' - 03°20'N y 60°35' - 60°43'W) cinco ejemplares de *P. geniculatus*, sin datos de infección por *T. cruzi*. Otras especies de triatominos han sido identificadas en esta y en otras poblaciones de Roraima (todos sin infección por *T. cruzi*), sin embargo, en este estado amazónico brasilero, se conjugan factores de riesgo como población humana infectada con *T. cruzi*, altas densidades de potenciales vectores en el peridomicilio, y condiciones para la domiciliación vectorial, existiendo la posibilidad que se establezca un ciclo autóctono con repercusión en la población humana (Luitgards-Moura *et al.*, 2005. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 47: 45-54).

Este sería el primer registro de la especie *P. geniculatus* en los Municipios Atures y Alto Orinoco con diagnóstico molecular de la presencia de ADN de *T. cruzi* en uno de los ejemplares, y el primer hallazgo de una especie de la subfamilia Triatominae

en el Municipio Alto Orinoco, Estado Amazonas. La presencia de este triatómino en la Amazonía venezolana aunado a los registros en áreas cercanas de los países limítrofes, hacen pensar en la existencia de corredores biológicos de vectores, reservorios y población humana potencialmente infectada. Este estudio abre la necesidad de una mayor investigación acerca del papel de este triatómino en regiones donde la tripanosomiasis americana o Enfermedad de Chagas pareciera presentarse como una enzootia o zoonosis, lo cual pudiese tener repercusión en la población indígena.

#### AGRADECIMIENTOS

Al personal biomédico del SACAICET, a la Doctora Micaela Montero y al Odontólogo Luis Pinto por su participación en la logística de captura y envíos de los triatominos. De igual manera agradecemos los

pobladores de las comunidades de Parima B y Betania de Topocho por su colaboración en este estudio y a las Fuerzas Armadas Bolivarianas por el apoyo en los traslados aéreos a las comunidades del Alto Orinoco. El trabajo se rigió por los lineamientos de Bioética del Fonacit quienes han aprobado los aspectos éticos del Proyecto Misión ciencia en red No 2008000911 para sus dos componentes: “Reservorios, Vectores y Participación Ciudadana en las estrategias de prevención y control de la enfermedad de Chagas en áreas endémicas de Venezuela” N° 2008000911-6 e “Investigación entomológica y eco-epidemiológica para la vigilancia y evaluación de impacto del control de la oncocercosis en Venezuela” N° 2008000911-5 que cofinanciaron el estudio.

Recibido el 24/10/2010  
Aceptado el 17/11/2010



## Pathological alterations and prevalence of *Trypanosoma cruzi* in opossums from western Mexico

### *Alteraciones patológicas y prevalencia de Trypanosoma cruzi en zarigüeyas en el occidente de México*

Maria Elena Villagrán<sup>1</sup>, José Alejandro Martínez-Ibarra<sup>2\*</sup> & José Antonio de Diego<sup>3</sup>

#### SUMMARY

There are scarce reports about lesions and pathological alterations by *Trypanosoma cruzi* infections on opossums (*Didelphis virginiana*), considered some of the most important reservoir hosts for *T. cruzi* in western Mexico. After two serological analyses (Serodia and IHA), 12 (24%) of 50 collected opossums in two small towns in western Mexico were positive for the presence of *T. cruzi*. Eight had some kind of organ alterations: four with alterations in only one organ, three in two organs and one with alterations in three organs. Splenomegaly was the most common alteration in the examined opossums. In light of the present findings, it is possible that organ alterations on studied opossums may have been associated with *T. cruzi* infections.

**Palabras clave:** Chagas disease, opossum, *Trypanosoma cruzi*, organic alterations, Mexico.

#### RESUMEN

Hay escasos informes sobre lesiones y alteraciones patológicas de las infecciones por *Trypanosoma cruzi* en zarigüeyas (*Didelphis virginiana*), consideradas algunos de los reservorios más importantes para *T. cruzi* en el oeste de México. Utilizando de dos análisis serológicos (Serodia e IHA), 12 (24%) de 50 zarigüeyas capturadas en dos pequeños pueblos en el occidente de México fueron positivas para la presencia de *T. cruzi*. Ocho tenían algún tipo de alteraciones de órganos: cuatro con alteraciones en un solo órgano, tres en dos órganos y uno con alteraciones en tres órganos. La esplenomegalia fue la alteración más común en las zarigüeyas examinadas. A la luz de los actuales resultados, es posible que las alteraciones de órganos en zarigüeyas estudiadas, puedan haber estado asociadas con las infecciones por *T. cruzi*.

**Palabras clave:** Enfermedad de Chagas, zarigüeyas, *Trypanosoma cruzi*, alteraciones orgánicas, México.

*Trypanosoma cruzi*, the causative agent of acute and chronic myocarditis (Chagas disease) in humans and dogs, is commonly reported in wildlife reservoir hosts. In Mexico, at least 30 animal species infected by *T. cruzi* have been recorded (Solís-Franco *et al.*, 1997, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **92**: 163-164; Velasco-Castrejón & Rivas-Sánchez, 2008, *Bol. Med. Hosp. Inf. Méx.* **65**: 57-79), many of them from the western area of Mexico (including the states of Nayarit, Colima, Michoacán and Jalisco), which is considered one of the most epidemiologically important areas for the transmission of *T. cruzi* to hosts (human or animals) because of the presence of important vector species of triatomines in the

area (Ramsey *et al.*, 2003, En: *Iniciativa para la vigilancia y el control de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana*. Eds: Ramsey J. M., Tello-López Á., Pohls J. L. Instituto Nacional de Salud Pública, México). Among those studies devoted to reservoir hosts, few have reported alterations to the organs and lesions of the tissues of hosts infected by *T. cruzi*. Jaime-Andrade *et al.* (1997, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **30**: 337-340) reported a scientific curiosity, an acute Chagas cardiopathy case in a polar bear (*Ursus maritimus*) from a zoo in western Mexico. By contrast, Martínez-Ibarra *et al.* (2006, *Acta Bioq. Clín. Latinoam.* Sup. 3, p. 294) briefly reported a more common animal, a specimen of opossum (*Didelphis*

<sup>1</sup> Departamento de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Querétaro. Santiago de Querétaro, Querétaro, México.

<sup>2</sup> Área de Entomología Médica. Centro Universitario del Sur. Universidad de Guadalajara. Ciudad Guzmán, Jalisco, México.

<sup>3</sup> Unidad de Parasitología y Medicina Tropical. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.

\*Autor de correspondencia: aibarra@cusur.udg.mx

*virginiana*), with a digestive alteration (megacolon) from a nearby geographic area. The aim of this study was to increase knowledge of *T. cruzi* infection on the organs and tissues of opossums, a classic Mexican reservoir host of that protozoan.

From January 2007 to September 2008, every two months over two consecutive nights, specimens of opossums were searched in and around two small villages (La Milpilla, 20° 10' N, 103° 24' W; La Villita, 20° 10' N, 103° 23' W) of the municipality of Teocuitatlán de Corona, in the state of Jalisco, an area of western zone of Mexico where human, reservoir hosts as well as vectors have previously been recorded infected by *T. cruzi* (Martínez-Ibarra *et al.*, 2006, *Op. cit.*). Live traps (Tomahawk Live Trap Co., Tomahawk, Wisconsin, USA) were used to capture the animals. Traps were baited with a piece of bread covered with canned tuna fish conserved in oil. They were placed at sunset and collected at sunrise since opossums have nocturnal feeding habits (Jiménez-Guzmán *et al.*, 1999, *Pub. Biol. FCB/UANL* **18**: 28-30). Collected animals were transported to the laboratory, where blood tests were undertaken. From each animal, a drop of blood was obtained and directly examined under a microscope for searching for *T. cruzi*. Also, 5 to 10 mL of blood was collected and sera were kept in an icebox before serological testing. Serological tests of Serodia (Latex Particle Agglutination, Fujirebio Diagnostics, Inc., Seguin, TX) (sensitivity of 100%, specificity of 99.8%) and indirect hemagglutination (IHA; Wiener lab, Buenos Aires, Argentina) (sensitivity of 67% and specificity of 99.8%), were applied to evaluate the presence of anti-*T. cruzi* antibodies. In order to establish a possible relationship between infection by *T. cruzi* and pathological alterations, all captured opossums were euthanized by electric shock and their organs obtained. The heart, brain, intercostal muscle, liver, spleen, bladder and esophagus were examined histologically. All tissues were formalin-fixed, embedded in paraffin and stained with hematoxylin and eosin.

Eleven (22%) opossums were positive for the presence of *T. cruzi* by direct blood examination, confirmed when tested with Serodia and with IHA. One additional opossum was positive only by Serodia and HIA and three only by Serodia test.

Eight (66.66%) of those 12 positive opossums for two serological tests to *T. cruzi* had some anatomic/pathological alterations: four specimens had one organ that underwent alteration (cardiomegaly,

megaesophagus, hepatomegaly), three had two affected organs (splenomegaly + megabladder and splenomegaly + cardiomegaly) and one had three affected organs (splenomegaly + cardiomegaly + hepatomegaly). The presence of pseudocysts in the histological samples was not observed. Non anatomic/pathological alterations were recorded between those opossums not positive to *T. cruzi*.

Blood examination proved to be almost as useful for detecting opossums infected with *T. cruzi* as IHA was. Blood examination seems to be a useful method for the detection of infected specimens in field conditions. The percentage of infected *D. virginiana* opossums was low compared with those percentages reported from the same species in other areas: 53.9% in southeastern Mexico (Ruiz-Piña & Cruz-Reyes, 2002, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **97**: 613-620), 52% in six southwestern and southern states in the USA (Brown *et al.*, 2010, *Vector Borne Zoonotic Dis.* **10**: 757-763) and 37.5% in Louisiana (Barr *et al.*, 1991, *J. Parasitol.* **77**: 624-627). Since infection of opossums seems to occur mainly by oral route (Yaeger, 1971, *J. Parasitol.* **57**: 1375-1376) it is noteworthy the apparent influence of infection rates of the triatomine species present in the study area on the percentages of infected opossums, as previously established for *D. virginiana*, sympatrically collected with *Triatoma dimidiata* in southeastern Mexico (Ruiz-Piña & Cruz-Reyes, 2002, *Op. cit.*). Similarly, *D. virginiana* can be found in the distribution areas of *Triatoma sanguisuga* in southwestern and southern states of the USA, a triatomine species recently found with infection rates from 34.5 to 55.6% (Dorn *et al.*, 2007, *Emerg. Infect. Dis.* **13**: 605-607; Kjos *et al.*, 2009, *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **9**: 41-50). By contrast, opossums collected in our study area were collected sympatrically with some specimens of *Meccus longipennis*, which had lower (25.7%) infection rates by *T. cruzi* (Martínez-Ibarra *et al.*, 2010, *Biomedica*, **30**: 140-145). More than 60% of opossums infected by *T. cruzi* developed some kind of potentially deadly pathological alteration (Fidalgo-Álvarez *et al.*, 2003, *Patología Médica Veterinaria*. Universidad de León. León, España). This relationship has been also documented for *D. virginiana* opossums in USA (Barr *et al.*, 1991, *Op. cit.*). More studies on some other populations of opossums are necessary to know more about the relationship between *T. cruzi* infections and pathological alterations on those members of Didelphidae.

Recibido el 19/11/2010  
Aceptado el 05/03/2011

## Primer registro de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) en áreas remotas del estado Bolívar

### *First record of Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) in remote areas of Bolívar State

Yasmin Rubio-Palis<sup>1,2</sup>, Hernán Guzmán<sup>3</sup>, Jairo Espinoza<sup>4</sup>, Lya Cárdenas<sup>5</sup>, Mariapia Bevilacqua<sup>5</sup> & Domingo Medina<sup>5</sup>

#### RESUMEN

Se reporta por primera vez la presencia de *Aedes aegypti* (L.) en un área remota del territorio indígena de la cuenca del río Erebató, municipio Sucre, estado Bolívar. Se colectó un ejemplar adulto durante un estudio de vigilancia entomológica para malaria utilizando la trampa Mosquito Magnet™ y en el horario comprendido entre las 21:30 y 01:30 horas. Este hecho constituye una alarma ante el riesgo de introducción de esta especie en áreas selváticas y posteriormente del dengue, lo cual podría tener graves efectos en la salud de la población indígena.

**Palabras clave:** *Aedes aegypti*, trampa Mosquito Magnet, estado Bolívar, Venezuela

#### SUMMARY

*Aedes aegypti* (L.) is first recorded from a remote area in the amerindian territory of the Erebató river basin, Sucre Municipality, Bolívar State. One specimen was collected during the malaria entomological surveillance using the Mosquito Magnet™ trap between 21:30 and 01:30 hrs. This finding alerts about the risk of the introduction of *Ae. aegypti* in selvatic remote areas and subsequent introduction of dengue, which might have a major health impact among the amerindian population.

**Key words:** *Aedes aegypti*, Mosquito Magnet trap, Bolívar State, Venezuela

*Aedes aegypti* (L.) es el principal vector de dengue en las Américas y frecuentemente es considerado como un mosquito urbano (Christophers, 1960, *Aedes aegypti* (L.) The Yellow Fever Mosquito; Tinker, 1963, Proc. 50<sup>th</sup> Meeting New Jersey Mosquito Extermination Assoc., 364-371). En Venezuela se desconoce la distribución geográfica a nivel de localidades de *Ae. aegypti*, pero se sospecha que está presente en todos los centros urbanos ubicados por debajo de los 2000 metros sobre el nivel del mar (Barrera *et al.*, 2000, *Rev. Panam. Salud Pública*. **8**: 225-233). Sin embargo, Soper (1935, *Revista de Higiene*. **4**: 47-84) señala que este mosquito era el responsable de la transmisión de fiebre amarilla en áreas rurales del nordeste de Brasil, más aún, existen reportes de infestaciones con *Ae. aegypti* en áreas rurales de Colombia, Brasil y México para

mediados del siglo pasado (Nelson *et al.*, 1984, WHO/VBC/84.890; Soper, 1967, Bull Wld Hlth Org. **36**: 536-538). La colonización por esta especie de pueblos y ciudades ubicadas en áreas selváticas es mas reciente. Así tenemos por ejemplo que la introducción de *Ae. aegypti* en la ciudad de Manaus, Brasil ocurrió en 1996 y la primera epidemia de dengue se registró en 1998 (Pinheiro & Tadei, 2002, *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **44**: 245-250), mientras que en Venezuela se reportaron las primeras epidemias de dengue en Puerto Ayacucho, estado Amazonas en 1995 (Boletín Epidemiológico, Dirección Regional de Salud, estado Amazonas) y en Tumeremo, estado Bolívar en 2001 (Boletín Epidemiológico, Instituto de Salud Pública, estado Bolívar). Sin embargo, no existen reportes de infestación por *Ae. aegypti* o casos de dengue en áreas selváticas remotas. En el presente trabajo se reporta

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

<sup>2</sup> BIOMED, Universidad de Carabobo. Maracay, Venezuela.

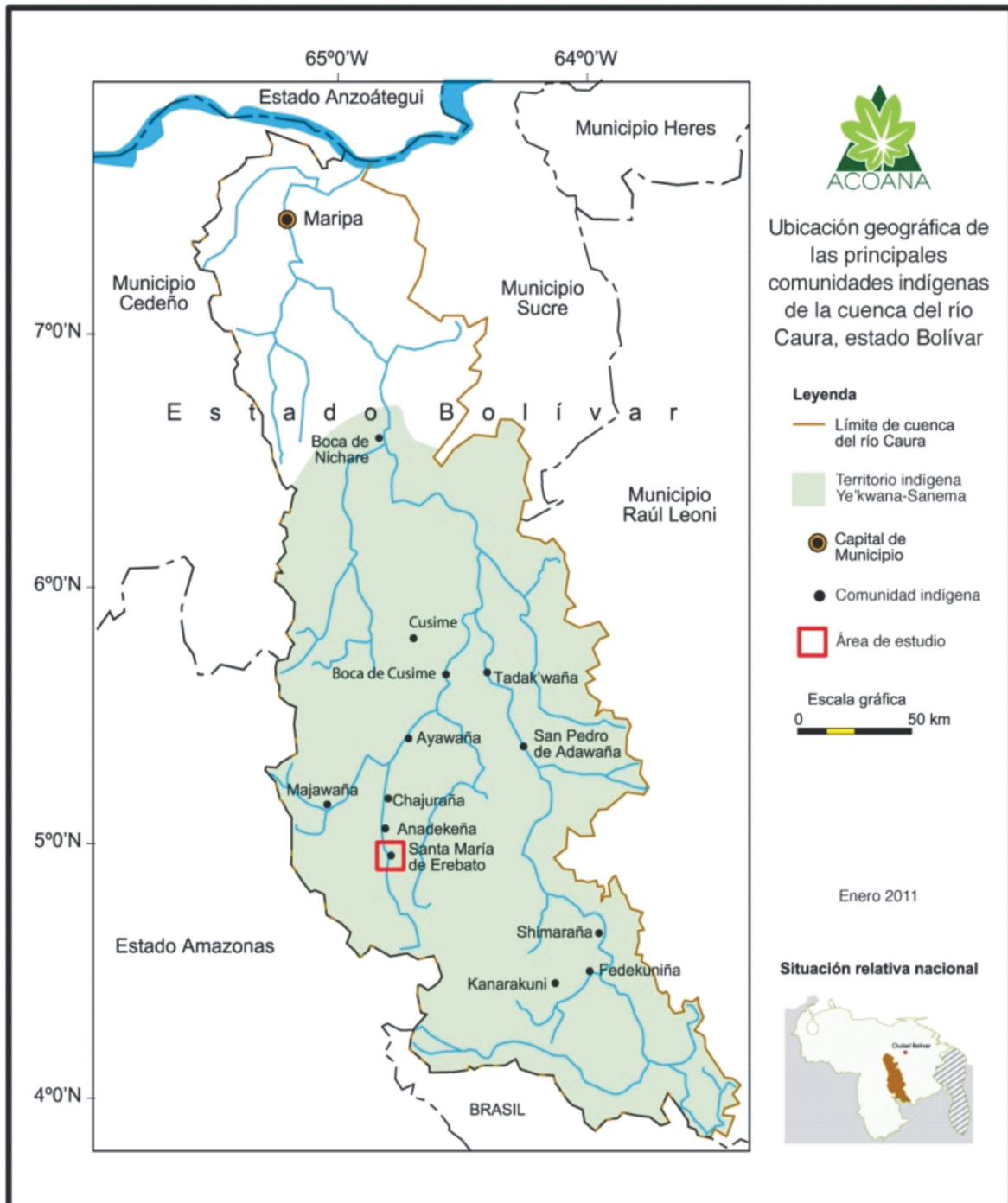
<sup>3</sup> Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldón", Ministerio del Poder Popular para la Salud. Maracay, Venezuela.

<sup>4</sup> Comunidad indígena Santa María de Erebató, estado Bolívar, Venezuela.

<sup>5</sup> Asociación Venezolana para la Conservación de Áreas Naturales (ACOANA), Caracas, Venezuela

\*Autor de correspondencia: rubiopalis@gmail.com

**Fig. 1. Ubicación geográfica de Santa María de Erebató en la Cuenca del río Erebató, estado Bolívar, Venezuela.**



por primera vez la presencia de *Ae. aegypti* en Santa María de Erebató, municipio Sucre, estado Bolívar.

La comunidad de Santa María de Erebató (4.95° N - 64.8° E) está ubicada en la cuenca alta del

río Erebató, afluente principal del río Caura (Fig. 1). Es uno de los asentamientos indígenas de la etnia Ye'kwana más importantes de la región del Caura en términos de población (ca 407 habitantes) y tradición de asentamiento estable con servicios de salud,

educación, comunicación y pista de aterrizaje. Los registros climáticos para dicha localidad evidencian los promedios más altos de precipitación en la cuenca (3715 mm), con valores máximos promedio de hasta 4574, uno de los más altos registrados en toda la Guayana venezolana (Vargas & Rangel, 1996, *Scientia Guaianae*, **6**: 34-39). El paisaje se caracteriza por un sistema de lomeríos altos y bajos cubiertos por bosques ombrófilos de tierra firme, sobre suelos muy meteorizados, de fertilidad reducida, formados a partir de rocas meta-sedimentarias, volcánicas de naturaleza ácida y granitos. El río Erebató se agrupa entre los denominados “ríos de aguas negras” debido a su color oscuro, pobreza en electrolitos, pH ligeramente ácido y limitada materia orgánica en suspensión (García, 1996, *Scientia Guaianae*, **6**: 54-59). El acceso a esta comunidad es principalmente por vía fluvial, estimándose una distancia de recorrido desde Maripa (capital del municipio) hasta Santa María de Erebató de 400 km, lo que representa de tres a cuatro días en promedio la duración del viaje. Si bien en Santa María de Erebató hay pista de aterrizaje de tierra, la frecuencia de vuelos es muy baja estimándose un promedio de dos a cinco vuelos al año. De acuerdo con encuestas socio-económicas realizadas en Santa María de Erebató en el 2006, aproximadamente 40% (132) de las personas encuestadas indicaron que viajaban frecuentemente fuera de su comunidad. Entre estas, casi 64% (84) indicaron viajar tres veces o más al año a Maripa, incluyendo 30% (40) que indicaron viajar más de cuatro veces al año (Proyecto Wesoichay, datos no publicados).

En Mayo de 2009 se iniciaron las colectas mensuales de mosquitos utilizando la trampa Mosquito Magnet™ basada en monitores indígenas especialmente entrenados para la vigilancia entomológica comunitaria de malaria, en el marco de un estudio de largo plazo llamado Proyecto Wesoichay (Bevilacqua *et al.*, 2009,

*Bol. Malariol. Sal. Amb.* **49**: 53-71). En Julio de 2009 se colectó un espécimen de *Ae. aegypti* en el horario comprendido entre las 21:30 y 01:30 horas. Con base en los resultados de las encuestas socio-económicas, es posible señalar dos posibles vías de penetración de esta especie: en forma de huevos en recipientes provenientes de Maripa o Ciudad Bolívar o adultos en vuelos provenientes de Ciudad Bolívar. Este hallazgo reviste gran importancia debido al riesgo de introducción de esta especie y, posteriormente, del dengue en áreas remotas, lo cual podría tener graves efectos para la salud de la población indígena.

Se recomienda continuar la vigilancia entomológica en Santa María de Erebató a fin de determinar si *Ae. aegypti* ha colonizado esta área y es necesario aplicar las medidas preventivas o si la colecta de un adulto con el Mosquito Magnet™ representó una introducción aislada. Dado que esta especie es de hábitos diurnos, se plantea la necesidad de hacer colectas de 24 horas con el Mosquito Magnet™, a fin de coleccionar esta y otras especies de hábitos diurnos, así como la búsqueda de estadios inmaduros en criaderos artificiales.

#### AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue posible gracias al financiamiento del Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT-Contrato Número 200800777, Sub-proyecto Malaria-Componente Caura), la Delegación de la Unión Europea en Venezuela (DCI-NSAPVD/2008/ 166-318) y el International Development Research Centre (IDRC-Canadá) (Contrato Número 103696-006).

Recibido el 08/02/2011  
Aceptado el 28/02/2011



## Aportes al conocimiento de la distribución y biología de *Anopheles algeriensis* Theobald, 1903 en España

### Contributions to the knowledge of the distribution and biology of *Anopheles algeriensis* Theobald, 1903 in Spain

Rubén Bueno Marí, Alberto Bernués Bañeres, Francisco Alberto Chordá Olmos & Ricardo Jiménez Peydró

#### RESUMEN

En el presente trabajo se realiza una revisión de la ocurrencia de *Anopheles algeriensis* Theobald, 1903, potencial vector de la malaria, en España y se aportan nuevos datos acerca de su distribución. Asimismo se incluye información acerca de la afinidad interespecífica con otras especies de culícidos presentes en el área del Levante español estudiada. Por último, se remarca el elevado grado de sinantropía exhibido por la especie, por su posible interés ante la eventual aparición de ciclos puntuales de transmisión del paludismo en dicha región analizada.

**Palabras clave:** *Anopheles algeriensis*, malaria, enfermedades transmitidas por mosquitos, control de vectores, Salud Pública, España.

*Anopheles algeriensis* Theobald, 1903 es una especie típicamente paleártica que se encuentra ampliamente distribuida por Asia y Europa. Pese a que en la mitad norte del viejo continente su presencia ha sido evidenciada de forma puntual en diversos países como Austria, Hungría, Estonia, Moldavia, Ucrania, Rusia o Reino Unido, lo cierto es que la especie exhibe claramente una mayor ocurrencia en los países mediterráneos (Ramsdale & Snow, 2000. *Eur. Mosq. Bull.*, **7**: 1-26). Además, existen documentadas capturas de la especie en países norteafricanos como Argelia (Horsfall, 1972. *Mosquitoes: their bionomics and relation to disease*. 723 pp) o Marruecos (Gaud *et al.*, 1949. *Bull. Inst. Hyg. Maroc.*, **9**: 145-164).

Su primigenia detección en España en el año 1929 (Gil Collado, 1930. *EOS*, **6**: 329-347) ha sido

#### SUMMARY

In this paper we provided a review about the occurrence of the potential malaria vector, *Anopheles algeriensis* Theobald, 1903, in Spain with the addition of new distribution data. Furthermore information about interspecific affinity with other species of mosquitoes present in the study area is also included. Finally, due to the high synanthropic degree exhibited by *An. algeriensis*, it is important to analyze the potential interest of the species in order to prevent the eventual emergence of malaria transmission cycles in the region studied.

**Key words:** *Anopheles algeriensis*, malaria, mosquito-borne diseases, vector control, Public Health, Spain.

tradicionalmente considerada por diversos autores como una de las más interesantes (Torres Cañameres, 1979. *Rev. San. Hig. Pública*, **53**: 985-1002). Esto es debido a que dicha captura se produjo durante el desarrollo de una rutinaria campaña antipalúdica en la localidad granadina de Padul a 750 metros de altitud. Por tanto se trataba de un lugar alejado de las zonas costeras donde prefiere desarrollarse la especie (Martínez *et al.*, 2003. *Sistemas de control biológico de las poblaciones de mosquitos en zonas húmedas*. 53 pp) y que, en aquél entonces, esta región del sur de la Península Ibérica presentaba un destacado “anofelismo sin paludismo” que permitió suponer la baja antropofilia de la especie (Bueno Marí & Jiménez Peydró, 2008. *Rev. Esp. Salud Pública*, **82**: 467-479). Posteriormente, la inusual ocurrencia en zonas de elevada altitud fue también evidenciada en otros países

mediterráneos (Aitken, 1953. *The Anopheline fauna of Sardinia*. 57 pp).

Debido a la exigüidad y discontinuidad de sus capturas, el conocimiento de la biología de *An. algeriensis* es escaso y, en ocasiones, confuso. Se sabe que es una especie fundamentalmente exófila, pese a que en ocasiones se ha detectado la presencia de hembras en el interior de viviendas y establos, y que suele hibernar en forma de larva, si bien en áreas meridionales del entorno mediterráneo es común el hallazgo de larvas y adultos durante la época invernal (Becker *et al.*, 2010. *Mosquitoes and their control*. 577 pp), hecho que podría relacionarse con un posible homodinamismo de la especie en dichas latitudes. No obstante, la posible coincidencia de poblaciones heterodinámicas y homodinámicas de *An. algeriensis*, situación ya constatada para otros culícidos en la Península Ibérica (Bueno Marí *et al.*, 2010. *Rev. Col. Entomol.*, **36**: 235-241), tampoco puede descartarse. Por otra parte, el desarrollo preimaginal de *An. algeriensis* suele producirse en zonas de marjalería litorales y en canales salobres u oligosalobres con abundante vegetación helofítica y las hembras presentan habitualmente una tendencia zoofílica y un bajo rango espacial de vuelo, no alejándose en demasía de sus criaderos larvarios (Schaffner *et al.*, 2001. *The mosquitoes of Europe*. Computer program). Sin embargo, a pesar del marcado carácter zoofílico, durante las horas crepusculares de los meses veraniegos, las hembras también pueden acudir en gran número a alimentarse sobre el ser humano.

En cuanto al interés médico, pese a que es cierto que no se le considera un importante vector palúdico por sus inclinaciones hematofágicas y su baja abundancia relativa, cabe mencionar que en condiciones de laboratorio se ha conseguido constatar la capacidad de *An. algeriensis* para transmitir *Plasmodium falciparum* Welch, 1897 (Becker *et al.*, 2010. *Op. cit.*). En este sentido, se sabe que la cercanía entre focos de cría de *An. algeriensis* y asentamientos humanos ha derivado en epidemias locales de malaria en países de clima semidesértico como Argelia, donde esta especie fue la única hallada en los alrededores de las poblaciones afectadas e incluso llegó constatarse el hallazgo de dos hembras con ooquistes de plasmidios (Horsfall, 1972. *Op. cit.*).

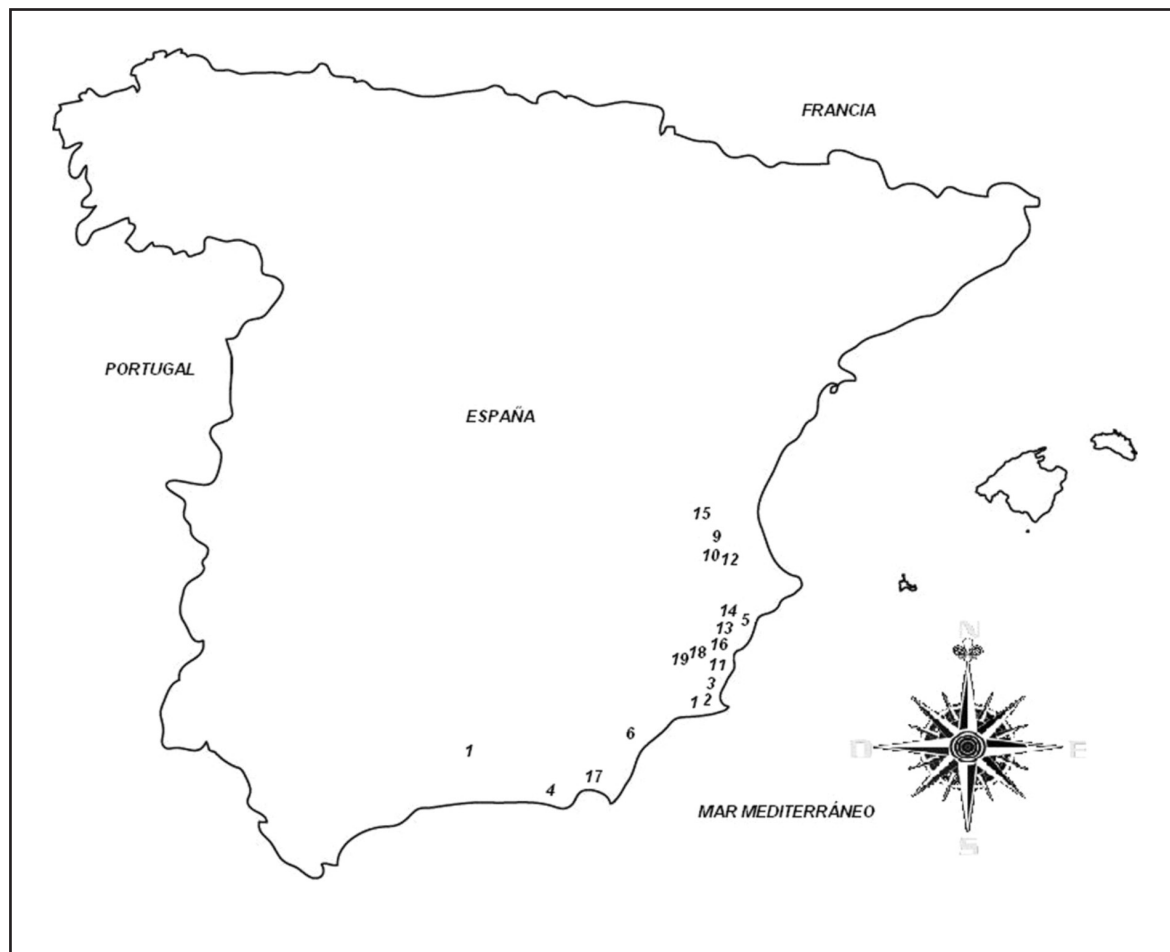
En la Tabla I se presentan, no solo las escasas referencias existentes acerca de la actividad de *An.*

*algeriensis* en España, sino también las inéditas capturas derivadas de un continuo muestreo larvario llevado a cabo en la zona del Levante español en los años comprendidos entre 2005 y 2010. La técnica empleada para la recolección de estados inmaduros fue la conocida como “dipping”, consistente en la introducción de un recipiente de 350 mL de capacidad, denominado “dipper”, en el medio hídrico del cual se desee obtener una alícuota y cuya utilización para dicho fin está ampliamente contrastada (Service, 1993. *Mosquito Ecology. Field Sampling Methods*. 988 pp.). Con el objetivo de sistematizar la obtención de datos, el esfuerzo muestral se fijó en 10 minutos que incluían la búsqueda y captura de larvas en cada punto de muestreo (Bueno Marí, 2011. *Bioecología, diversidad e interés epidemiológico de los culícidos mediterráneos (Diptera, Culicidae)*. 425 pp.). Entre los nuevos hallazgos, cabe destacar la cita más norteña de la especie a nivel de la Península Ibérica junto a la realizada recientemente por Osório *et al.* (2010. *Eur. Mosq. Bull.*, **28**: 187-193) en el distrito portugués de Portalegre. Por otra parte, el estudio global de los datos de la incidencia estacional de la especie respalda el multivoltinismo ya descrito. Respecto a la afinidad interespecífica, Becker *et al.* (2010. *Op. cit.*) apuntan que la especie suele coexistir en los biotopos larvarios frecuentemente con *Anopheles maculipennis* Meigen, 1812 y *Uranotaenia unguiculata* Edwards, 1913, mientras que de manera esporádica lo haría con *Anopheles claviger* (Meigen, 1804), *Culex hortensis* Ficalbi, 1889 y *Culex theileri* Theobald, 1903. Nosotros hemos detectado elevados porcentajes de cohabitación larvaria con *Ochlerotatus caspius* (Pallas, 1771) (21,3%), *Culex territans* Walker, 1856 (20,2%) y *Culex pipiens* Linnaeus, 1758 (19,2%), y también puntualmente en asociación con *An. claviger* (13,4%), *Culiseta subochrea* (Edwards, 1921) (8,6%) y *Culex impudicus* Ficalbi, 1890 (8,3%). Además, cabe destacar que nuestras colectas de la especie se situaron tanto en ambientes naturales alejados de la actividad humana, como en colecciones hídricas con importantes asentamientos humanos a menos de 500 metros de distancia. En este sentido, es importante indicar que *An. algeriensis* fue el anofelino que presentó un mayor grado de sinantropía, mostrando un valor del Índice de Nourteva (Nuorteva, 1963. *Ann. Entomol. Fenn.*, **29**: 1-49) igual a 14,5. Esta última situación, requiere de una exhaustiva vigilancia ante la posibilidad de que, en el marco del actual progresivo aumento de la malaria importada en España, se inicien ciclos locales y puntuales de transmisión palúdica (Bueno

**Tabla I. Información referente a las capturas de *An. algeriensis* en España. a Numero de representación en la Fig. 1. b Datos extrapolados a partir de la localidad de captura.**

Fecha	Coordenadas N	Coordenadas O	Altitud (m)	Estados capturados	Localidad	Referencia	Fig.1 <sup>a</sup>
? 1929	37°01' 27.5" <sup>b</sup>	3°37' 36.2" <sup>b</sup>	750	Hembras	Padul (Granada)	Gil Collado, 1930. <i>EOS</i> , <b>6</b> : 329-347	1
Noviembre 1944	37°33' 21.1" <sup>b</sup>	0°56' 21.4" <sup>b</sup>	158 <sup>b</sup>	Hembras y larvas	Escombreras (Murcia)	Clavero & Olavarría, 1944. <i>Rev. San. Hig. Pública</i> , <b>17</b> : 624-628.	2
Junio 1946	37°44' 37.1" <sup>b</sup>	0°50' 59.3" <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	Larvas	Los Alcázares (Murcia)	Clavero & Romeo, 1947. <i>Rev. San. Hig. Pública</i> , <b>21</b> : 7-13.	3
Octubre 1946	37°44' 53.1" <sup>b</sup>	3°01' 21.1" <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	Larvas	Adra (Almería)	Clavero & Romeo, 1947. <i>Op. cit.</i>	4
Marzo 1947	38°19' 18.3" <sup>b</sup>	0°30' 45.5" <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	Larvas	Agua Amarga-Alicante (Alicante)	Clavero & Romeo, 1948. <i>Rev. San. Hig. Pública</i> , <b>22</b> : 101-104.	5
Noviembre 1947	37°14' 57.1" <sup>b</sup>	1°47' 54.1" <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>	Hembras	Palomares-Cuevas de Vera (Almería)	Clavero & Romeo, 1948. <i>Op. cit.</i>	6
-	37°42' 21.6" <sup>b</sup>	0°51' 07.5" <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	Larvas	Marina del Carmolí-Cartagena (Murcia)	Martínez <i>et al.</i> , 2003. Sistemas de control biológico de las poblaciones de mosquitos en zonas húmedas. 55 pp.	7
Junio y Julio 2003	36°53' 26.4" <sup>b</sup>	6°23' 02.4" <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	Hembras	Doñana (Huelva)	Ruiz ( <i>comunic. pers.</i> )	8
Octubre 2005	39°14' 58.3"	1°05' 38.9"	327	Larvas	Cofrentes (Valencia)	Presente trabajo	9
Octubre 2005	39°06' 56.8"	1°03' 10.6"	455	Larvas	Jarafuel (Valencia)	Presente trabajo	10
Abril 2006	37°52' 34.1"	0°48' 18.1"	23	Larvas	Pilar de Horadada (Alicante)	Presente trabajo	11
Mayo 2006	39°06' 18.3"	0°45' 49.7"	217	Larvas	Quesa (Valencia)	Presente trabajo	12
Junio 2006	38°19' 48.1"	0°43' 44.2"	159	Larvas	Aspe (Alicante)	Presente trabajo	13
Junio 2006	38°19' 58.9"	0°43' 39.7"	163	Larvas	Aspe (Alicante)	Presente trabajo	14
Junio 2007	39°27' 29.9"	1°21' 51.8"	667	Larvas	Venta del Moro (Valencia)	Presente trabajo	15
Agosto 2008	38°08' 26.9"	0°45' 22.8"	34	Larvas	Dolores (Alicante)	Presente trabajo	16
Mayo y Octubre 2008 / Abril y Julio 2009	36°42' 11.1" <sup>b</sup>	2°42' 10.1" <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	Larvas	Punta Entinas Sabinar- El Ejido / Roquetas de Mar (Almería)	Ruiz & Gálvez, 2010. <i>Bases técnicas para el control de culicidos en Punta Entinas-Sabinar</i> . 46 pp.	17
Junio 2010	38°13' 22.5"	1°41' 18.0"	317	Larvas	Calasparra (Murcia)	Presente trabajo	18
Junio 2010	38°16' 51.8"	1°28' 36.1"	224	Larvas	Cieza (Murcia)	Presente trabajo	19

**Fig. 1.** Ubicación geográfica de las capturas de *An. algeriensis* en España. Nota: ver tipificación de los puntos de recolección en Tabla I.



Marí & Jiménez Peydró, 2010. *Gac. Sant.*, **24**: 347-353) tal y como se ha evidenciado recientemente tras la aparición del primer caso de paludismo autóctono desde el año 1961 presumiblemente transmitido, en este caso, por *Anopheles atroparvus* Van Thiel, 1927 (Santa-Olalla *et al.*, 2010. *Euro Surveill.*, 15 (41) <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19684> [Consultado: 2011, Marzo, 14]).

(BOS) otorgado por el Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España. Asimismo también se agradece a la Conselleria de Medi Ambient, Aigua, Urbanisme i Habitatge de la Generalitat Valenciana, la concesión de los permisos pertinentes para la captura de insectos en enclaves hídricos protegidos de dicha región.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto de investigación CGL 2009-11364

Recibido el 17/03/2011  
Aceptado el 11/05/2011

## Primera descripción del hábitat acuático de *Simulium guianense* s.l. (Diptera: Simuliidae) en el área endémica de oncocercosis, al sur de Venezuela

### First description of the *Simulium guianense* s.l. larval habitat in the Amazonian focus of onchocerciasis, southern Venezuela

Nestor Villamizar<sup>1</sup>, José Cortez<sup>1</sup>, Oscar Noya Alarcón<sup>2</sup>, Marisela Escalona<sup>1</sup>, Carlos Botto<sup>1,2</sup> & María Eugenia Grillet<sup>3</sup>

#### RESUMEN

*Simulium guianense sensu lato* es el vector de *Onchocerca volvulus* en el foco amazónico de oncocercosis, al sur de Venezuela. En esta nota presentamos la primera identificación geográfica, caracterización ecológica y descripción del paisaje del hábitat acuático de las formas pre-adultas de este complejo de especies, en el área de transmisión de esta parasitosis. Las larvas y pupas de esta especie fueron muestreadas sobre plantas Podostemaceas presentes en un raudal de aguas claras (pH= 7, conductividad = 158 umhos/cm, y caudal = 0.12 m<sup>3</sup>/s) del río Orinoquito, en el área de la Reserva de Biosfera del Alto Orinoco-Casiquiare. El paisaje del área de muestreo correspondió a un bosque húmedo ombrófilo macrotérmico y el raudal del río estudiado fluye sobre una planicie aluvial de sustrato de arena y gravas de cuarzo. El presente hallazgo contribuirá con la estratificación epidemiológica de la endemia y orientará las medidas de eliminación de la oncocercosis al sur de Venezuela.

**Palabras clave:** *Simulium guianense*, criadero, oncocercosis, Amazonas, Venezuela.

En este reporte presentamos la primera descripción del hábitat acuático de *Simulium guianense* Wise sensu lato (Diptera: Simuliidae), principal vector de *Onchocerca volvulus* Leuckart, agente causante de la oncocercosis al sur de Venezuela. La caracterización del hábitat de este insecto se hace en base a tres muestreos realizados en marzo 2006, enero 2008 y febrero 2009 (época de transición sequía – lluvia), donde un total de 66 larvas y 53 pupas (38♀, 15♂) fueron colectadas sobre sustrato vegetal sumergido, en el raudal “Liomita a Bora” del río Orinoquito,

#### SUMMARY

*Simulium guianense sensu lato* is the main vector of *Onchocerca volvulus* in the Amazonian onchocerciasis focus, southern Venezuela. Here, we present the first report of the pre-adult aquatic habitat spatial distribution as well as the landscape and the habitat ecological characterization of this species complex within the endemic area. Larvae and pupae were collected on submerged aquatic plants (Podostemaceas) located in a waterfall (pH = 7, conductivity = 158 umhos/cm, discharge = 0.12 m<sup>3</sup>/s) of the Orinoquito river, in the Upper Orinoco-Casiquiare Biosphere Reserve. These results will help with the epidemiological stratification and control program of the onchocerciasis in southern Venezuela.

**Key words:** *Simulium guianense*, breeding sites, onchocerciasis, Amazonas, Venezuela.

principal afluente del Orinoco, en el área de la Reserva de Biosfera Alto Orinoco-Casiquiare (2° 18' 56" N; 64° 23' 2" O; 205 msnm., Fig. 1). Las fases inmaduras de *S. guianense* s.l. fueron colectadas sobre plantas acuáticas fanerógamas (Malpighiales: Podostemaceae) pertenecientes al género *Marathrum Tul* sp. (“algas de río”) y presentes en el raudal mencionado (Fig. 2). El ancho de la sección del río muestreada fue de unos 2 m, con un caudal aproximado de 0.12 m<sup>3</sup>/s, fondo de laja, aguas de pH neutro y baja conductividad (158 umhos/cm). El río Orinoquito es un río de segundo

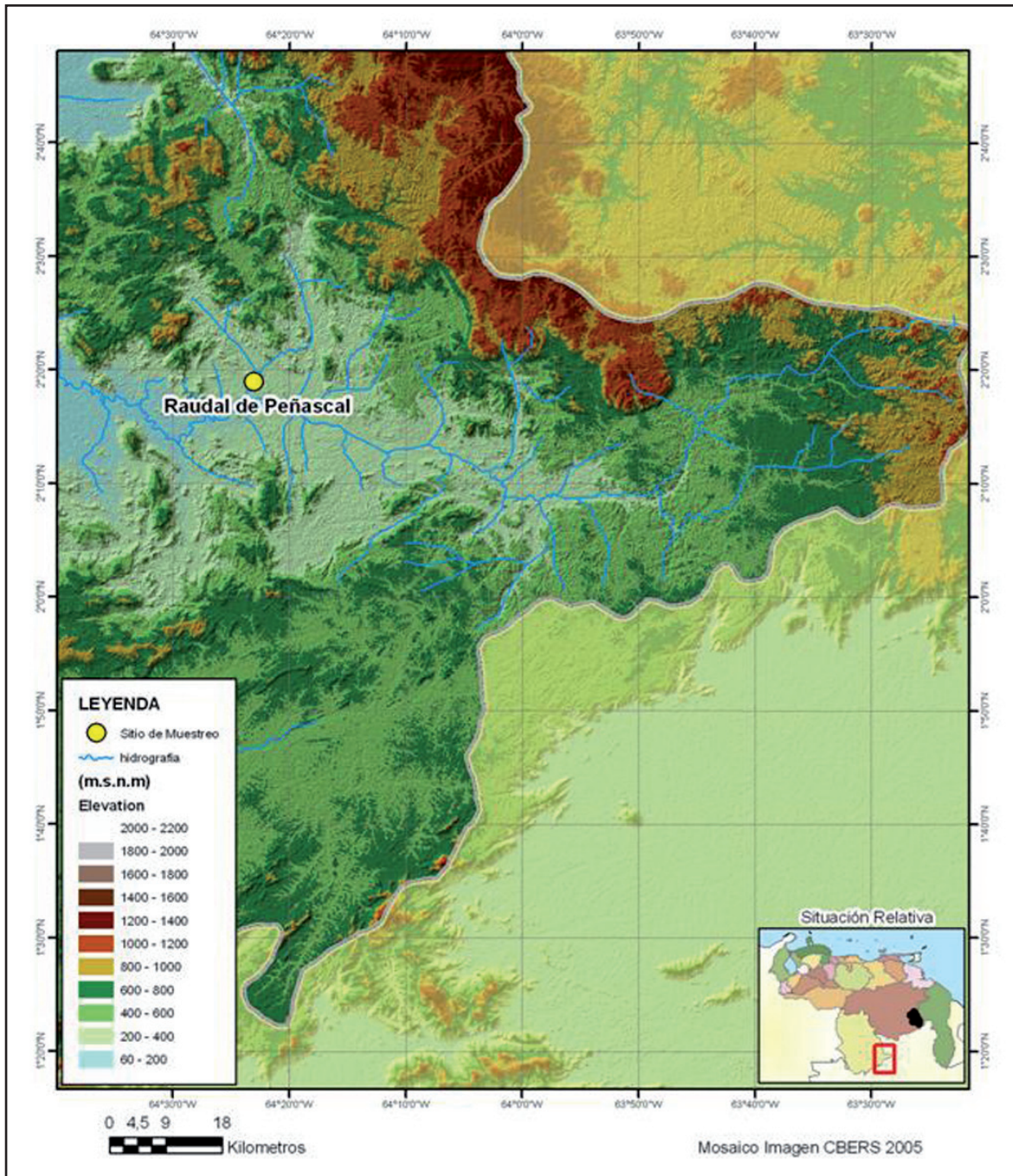
<sup>1</sup> Unidad Eco-epidemiología de la Oncocercosis, Servicio Autónomo C.A.I.C.E.T., Puerto Ayacucho, Estado Amazonas, Venezuela.

<sup>2</sup> Sección Ecología Parasitaria, Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

<sup>3</sup> Laboratorio de Biología de Vectores, Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Apartado 47058, Caracas 1041-A.

\*Autor de correspondencia: maria.grillet@ciens.ucv.ve

Fig. 1. Mapa del área de la Reserva de Biosfera del Alto Orinoco-Casiquiare (Estado Amazonas, Venezuela) mostrando el sitio de colecta ("Liomita a Bora") de inmaduros de *S. guianense* s.l. sobre el río Orinoquito. Se señala el raudal de Peñascal (río Orinoco) como referencia. Nótese la topografía, elevación, hidrografía y vegetación del área.



**Fig. 2.** Se muestran imágenes del raudal “Liomita a Bora” en el río Orinoquito y se señala el sustrato vegetal (Podostemaceas) sobre el cual se colectaron los inmaduros de *S. guianense s.l.*



orden y de aguas claras, que fluye por una topografía quebrada y pendiente, sobre planicie aluvial de sustrato de arena y gravas de cuarzo (pendiente  $< 4^\circ$ ), rodeada de colinas y lomeríos de hasta 320 m de altitud (pendiente 8-30°) sobre sustrato de tobas volcánicas, y en la vecindad de paisajes de montaña muy escarpada, con numerosas fallas y fracturas (pendiente  $> 60^\circ$ , Fig. 3). Este río corre en este sector en medio de un bosque húmedo ombrófilo macrotérmico que bordea sus riberas aunque no cubre su cauce, y el cual está constituido por una comunidad arbórea arbustiva de hasta 12-15 m de altura y 70-100% de cobertura del suelo, destacándose especies de árboles como *Inga* sp., *Guatteria subsessilis*, *Macrobium acaciifolium*, *Vismia guianensis*, *Petrea* sp., y palmas de los géneros *Attalea*, *Euterpe*, *Geonoma*, *Bactris*, *Astrocaryum* y *Socratea*.

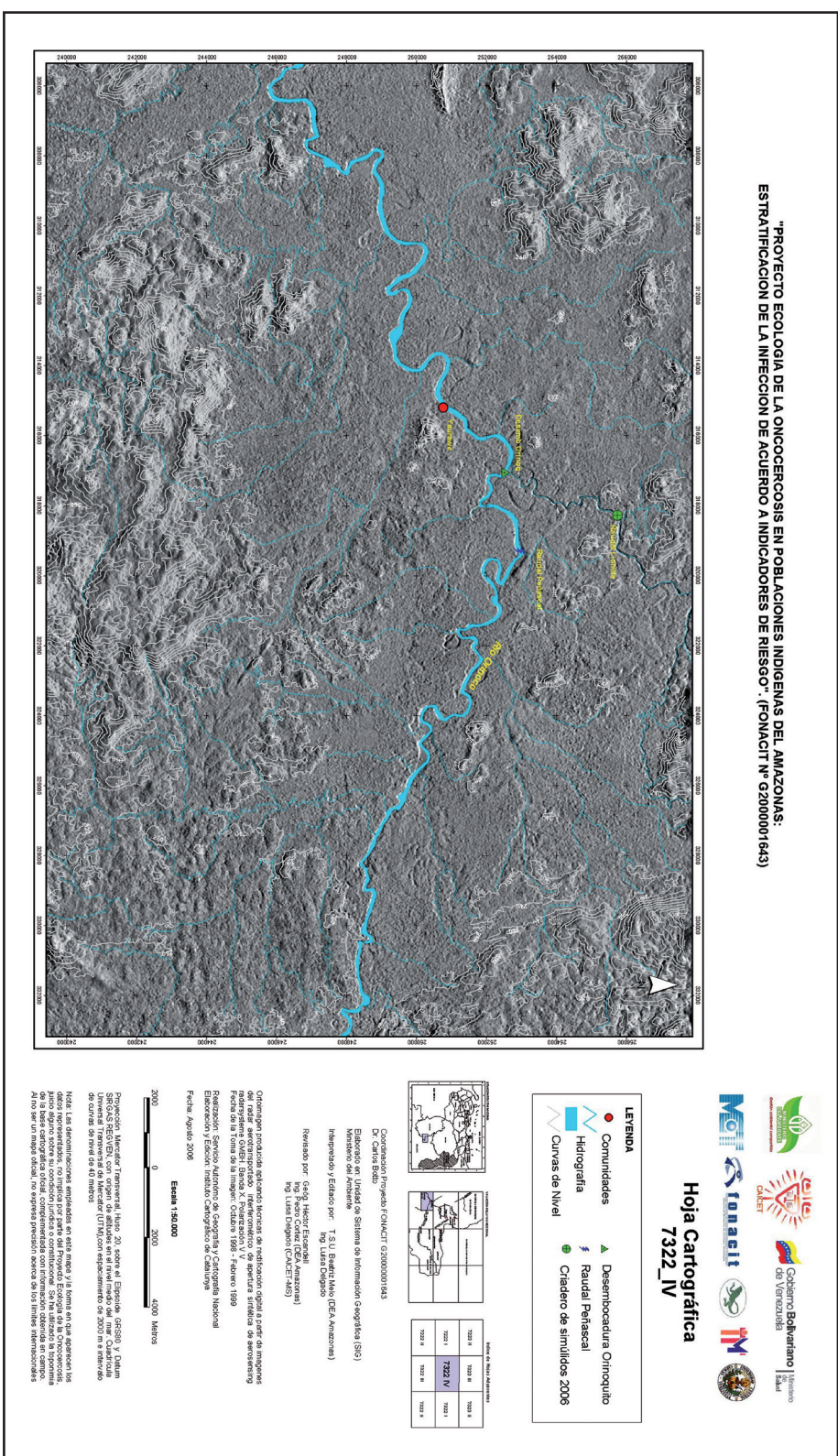
El clima del área de muestreo se caracteriza por presentar una temperatura media anual  $> 24^\circ\text{C}$  y una pluviosidad superior a los 2000 mm. El punto de colecta se ubico cercano a la comunidad conocida como Yaurawe y al raudal de Peñascal (Fig. 3), sitio este donde por primera y única vez, hace más de 20 años, se colectaron 6 pupas de *S. guianense s.l.*, sobre Podostemaceas, en el área de transmisión de oncocercosis (Tada, 1983. Shimoda Printing & Co., Kumamoto, Japan). En el pasado, los esfuerzos de colecta de inmaduros de esta especie en las zonas endémicas de oncocercosis habían sido infructuosos por las dificultades logísticas que brinda el estado Amazonas, y el hecho aquí corroborado que las hembras de *S. guianense s.l.* oviponen de manera

específica en zonas de raudales y rápidos de ríos grandes y de cascadas turbulentas.

Las hembras hematófagas de esta familia de insectos maduran sus huevos a partir de una comida sanguínea y los depositan en masas compactas sobre sustratos tales como rocas o piedras, plantas acuáticas y diversos tipos de vegetación sumergida o colgante presente en la corriente de quebradas y ríos de agua limpia y bien oxigenada (ambientes lóticos). La mayoría de las especies seleccionan ríos de tamaño y flujo variable, habitando el área erosiva y de flujo sostenido de la corriente de agua, con abundante materia orgánica fina en suspensión (alimento principal de las larvas) y apropiado sustrato expuesto en la corriente como medio de adhesión superficial de las larvas y pupas. Algunas especies pueden ser “especialistas” de hábitat, como lo ha demostrado ser *S. guianense s.l.*, ocurriendo sólo en un tipo particular de río; mientras que otras pueden ser “generalistas”, capaces de tolerar un amplio intervalo de condiciones ambientales.

La oncocercosis en el sur de Venezuela está presente en la zona del alto Orinoco, la Sierra de Parima, la Sierra de Unturán, y las zonas del alto Siapa y del alto Caura (Botto *et al.*, 1997. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**: 150-152; Vivas-Martínez *et al.*, 1998. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92**: 613-620; Botto *et al.*, 2005. *Parassitologia.* **47**: 145-150; Vivas-Martínez *et al.*, 2007. *Bol. Mal. Salud Amb.* **47**: 15-46; Botto *et al.*, 2011. *Encyclopedia Environ. Health.* **3**: 366-379). Esta área endémica, junto con la contigua de Brasil, conforma el llamado foco amazónico de oncocercosis, enfermedad que afecta principalmente al pueblo Yanomami. La infección causada por los nemátodos (gusanos redondos) pertenecientes a la especie *Onchocerca volvulus* es transmitida entre personas, en el foco amazónico, por la picada de pequeñas moscas pertenecientes a tres especies del género *Simulium*: *Simulium guianense* Wise *s.l.*, *S. incrustatum* Lutz / *S. limbatum* Knab y *S. oyapockense* Floch y Abonnenc *s.l.* (Basáñez *et al.*, 1988. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **82**: 597-611; Vivas-Martínez *et al.*, 1998. *Op. cit.*; Grillet *et al.*, 2001. *J. Med. Entomol.* **38**: 520-530). Las variaciones en la distribución espacial (altitud, paisaje, localidad, y tipo de río) y temporal (estación) en las actividades hematofágicas de estas especies, mayoritariamente antropofílicas (ingieren preferiblemente sangre humana), así como sus eficiencias vectoriales contrastantes contribuyen

Fig. 3. Imágen de radar (1:50.000) mostrando el área de colecta (“Liomita a Bora”) de inmaduros de *S. guianense* s.l. sobre el río Orinoquito. Se observa el río Orinooco y se señalan el raudal de Peñascal, el punto de colecta (flecha roja, punto de colecta (flecha verde) y comunidad de Yaurawe (rojo). Nótese la topografía e hidrografía del área.



de manera diferencial con la exposición y transmisión del parásito; en consecuencia, las variaciones en los niveles de endemicidad de la infección se asocian significativamente con la distribución espacial de estas especies (Vivas-Martínez *et al.*, 2007. *Op. cit.*; Basáñez *et al.*, 2009. *Adv. Parasitol.* **68**: 263-313; Botto *et al.* 2011. *Op. cit.*). De allí que el patrón epidemiológico de la oncocercosis en el sur de Venezuela sea heterogéneo, con áreas hipoendémicas presentes en las cuencas de los ríos Padamo y Mavaca, y zonas hiperendémicas presentes hacia las cuencas altas de los ríos Putaco y Orinoquito (Botto *et al.*, 2005. *Op. cit.*; Botto *et al.*, 2011. *Op. cit.*).

*Simulium guianense s.l.* ha sido incriminado como el principal vector de *O. volvulus* en las áreas hiperendémicas del foco, donde muestra una alta competencia vectorial (Basáñez *et al.*, 1988. *Op. cit.*; Basáñez *et al.* 2009. *Op. cit.*) y una densidad de picada baja (40 - 408 moscas paras / persona / día) y variable (Grillet *et al.*, 2001. *Op. cit.*; Grillet *et al.*, 2005. *Acta Tropica.* **94**: 139-158). En esta región, la especie ha sido colectada en fase adulta, en áreas montañosas, altiplanicies o zonas de sabana de altura, predominando entre los 200 – 400 msnm, y durante las transiciones estacionales (Grillet *et al.*, 2001. *Op. cit.*; Botto *et al.*, 2005. *Op. cit.*; Botto *et al.*, 2011. *Op. cit.*).

En la familia Simuliidae, diversas especies filogenéticamente cercanas presentan similitud morfológica, siendo muchas morfoespecies, especies crípticas o complejos de especies (conjunto de especies morfológicamente similares, pero genéticamente diferentes). *Simulium guianense s.l.* es un complejo de especies crípticas distribuido geográficamente en América del Sur en las regiones de Suriname, Guayana Francesa, el escudo Guayanés Venezolano, y el escudo Guayanés Brasileiro (Crosskey & Howard, 2004. Natural History Museum, London). Dentro de estos complejos de especies y a todo lo largo de su distribución geográfica, es posible observar variaciones en aspectos ecológicos (diversos requerimientos de hábitat) y biológicos (uso de diferentes hospedadores o fuentes de alimentación); en consecuencia, pueden coexistir poblaciones zoofilicas (ingiriendo preferiblemente sangre de otros mamíferos

y aves) y antropofilicas en simpatria (misma región) o en alopatría (distintas regiones), con las consecuentes implicaciones epidemiológicas en el caso de especies vectoras. Como un ejemplo, *S. guianense s.l.* ha sido colectado en el estado Bolívar, fuera del área de transmisión de *O. volvulus*, tanto en la sabanas de altura de la Gran Sabana (Hamada & Grillet, 2001. *Entomotropica.* **16**: 29-49; McCreadie *et al.*, 2003. *Hydrobiología.* **513**: 183-196), donde es zoofilico, como en las sabanas de tierras bajas de la región de los Pijiguaos, donde es antropofilico. En Brasil, cuatro cito-tipos o formas cromosómicas distintas han sido descritas dentro del complejo (Charalambous *et al.*, 1996. *Med. Vet. Entomol.* **10**: 111-120), aunque aun no han sido identificadas las formas asociadas a la transmisión de *O. volvulus*. En Venezuela, trabajos taxonómicos y ecológicos en curso al sur del río Orinoco esperan revelar e identificar cuál o cuáles son los cito-tipos del complejo *S. guianense s.l.* involucrados en la transmisión de este parásito, así como determinar la existencia de relaciones hábitat-especie-específicas dentro del complejo. Finalmente, la asociación de los simúlidos y de las poblaciones humanas afectadas con el ecosistema acuático de río es lo que le ha dado el nombre a la oncocercosis de “ceguera de los ríos”. De allí que la estratificación espacial de las zonas de riesgo de transmisión de esta infección en el área amazónica de Venezuela, junto con la identificación y estratificación espacial de los cuerpos de agua que habitan las formas inmaduras de *S. guianense s.l.* son aspectos críticos a considerar para la determinación del grado, extensión y cobertura espacial de la endemia, así como de las medidas de control y eliminación de la oncocercosis en el sur de Venezuela.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiese sido posible sin el apoyo logístico brindado por el Sr Humberto Martínez en el campo y por el apoyo financiero dado por el FONACIT (G-2000001643 y Red MC-2008000911-5).

Recibido el 01/04/2011  
Aceptado el 15/06/2011



## Revista de revistas

□ BALZOLA A. P., PÉREZ-MOLINA J. A., NORMAN F., NAVARRO M., MONGE-MAILLO B., DÍAZ-MENÉNDEZ M., GARCÍA J. P., FLORES M., CAÑAVATE C. & LÓPEZ-VÉLEZ R. (2010). **Chagas disease in latin american migrants. A spanish challenge.** (*Enfermedad de Chagas en inmigrantes latino americanos. Un reto español*). *Clin. Microbiol. Infect.* **17**: 1108-1113.

Tropical Medicine & Clinical Parasitology. Infectious Diseases Department. Ramón y Cajal Hospital, Carretera de Colmenar km. 9, I. Madrid 28034. Spain.

La enfermedad de Chagas afecta millones de personas en América Latina y es la principal causa de la miocardiopatía y muerte por enfermedad cardiovascular en pacientes de 30-50 años. Como consecuencia de la inmigración se ha instalado en varios países europeos, donde además de los casos importados, las infecciones autóctonas surgen a través de la transmisión vertical y la donación de sangre/órganos. Todos los inmigrantes latinoamericanos atendidos en nuestra unidad fueron investigados para despistaje de la infección por *T. cruzi* (ELISA e IFI +/- PCR). Se les solicitó a todos los positivos un ECG y el eco-cardiograma, y la manometría esofágica, trago de bario y enema de bario se solicitaron de acuerdo con los síntomas. Todos los pacientes menores de 50 años, sin compromiso cardíaco grave y que no habían recibido previamente tratamiento correcto, fueron tratados con 5 mg / kg / día de benznidazol durante 60 días. Se hizo seguimiento con serología y PCR un mes después de finalizado el tratamiento y posteriormente cada seis meses. Se examinó un total de 1.146 latinoamericanos para *T. cruzi* (357 resultaron con serología positiva). El perfil típico de paciente fue una mujer boliviana, de origen rural, en su cuarta década de la vida, sin evidencia de afectación visceral. La tolerancia del tratamiento fue pobre (29,7%) efectuándose la interrupción del mismo debido a reacciones adversas. Entre las

personas con reacciones adversas (52%), las más frecuentes fueron de hipersensibilidad cutánea (68,7%), malestar gastrointestinal (20%) y trastornos del sistema nervioso (16,2%). La infección por *T. cruzi* ya no se limita a América Latina. Mala tolerancia del tratamiento puede limitar las opciones de tratamiento actuales. Son necesarios más datos epidemiológicos para estimar la magnitud de un problema de gran relevancia para la salud pública y la planificación de recursos de salud.

□ ROLÓN M., VEGAM. C., ROMÁN F., GOMEZ A. & ROJAS DE ARIAS A. (2010). **First report of colonies of sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in the Paraguayan Chaco, using a trained dog** (*Primer reporte de colonias de *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) selváticos, utilizando un perro entrenado.* *PloS NTD.* **5**: 1-7.

Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC/ Díaz Gill Medicina Laboratorial/Fundación Moisés Bertoni), Asunción, Paraguay.

A pesar de los esfuerzos de los Servicios de Control de los Vectores, el control de *Triatoma infestans* en la región del Gran Chaco, ha sido limitado por las persistentes reinfestaciones domésticas. En Paraguay, esta región es la de mayor endemicidad en el país, mostrando altos niveles de infestación dentro y fuera de la vivienda. Aún cuando se han encontrado *T. infestans* selváticos en el Chaco Boliviano y Argentino, búsquedas similares de poblaciones selváticas de esta especie en Paraguay a lo largo de los últimos 20 años, han sido infructuosas. Aquí presentamos un nuevo enfoque para detectar Triatominos selváticos utilizando un perro entrenado, lo cual confirmó con éxito la presencia de *T. infestans* y otras especies triatominas selváticas en Paraguay. Se colectaron un total de 22 especímenes de la “forma oscura” (en inglés “dark morph”) y 154 fueron confirmados como *T. infestans* a través del análisis del gen citocromo B. A través de este

análisis, unos de ellos fueron previamente reportados y un segundo fue un nuevo haplotipo. Los triatomíneos fueron capturados entre vegetación como ramas secas y huecos de árboles de diferentes especies como *Aspidosperma quebracho-blanco*, *Bulnesia sarmientoi* y *Stetsonia coryne*. Las colonias encontradas han sido pequeñas y sin infección aparente a *Trypanosoma cruzi*. Durante el estudio se encontraron también *Triatoma sordida* y *Triatoma guasayana* en ecotopo cercanos a los de *T. infestans*.

□ RAMÍREZ A., FAJARDO A., MOROS Z., GERDER M., CARABALLO G., CAMACHO D., COMACH G., ALARCÓN V., ZAMBRANO J., HERNÁNDEZ R., MORATORIO G., CRISTINA J. & LIPRANDI F. (2010). **Evolution of Dengue Virus Type 3 Genotype III in Venezuela: Diversification, rates and population dynamics** (*Evolución del Virus Dengue Tipo 3 Genotipo III en Venezuela: Diversificación, tasas y dinámica poblacional*). *Virol. J.* **7**: 329.

Laboratorio de Virología Molecular. Centro de Investigaciones Nucleares. Facultad de Ciencias, Igua 4225, 11400 Montevideo, Uruguay. Laboratorio de Biología de Virus, Centro de Microbiología y Biología Celular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela.

ANTECEDENTES: El virus del dengue (DENV) es un miembro del género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. DENV se componen de cuatro serotipos diferentes (DENV-1 a DENV-4) y cada serotipo se puede dividir en diferentes genotipos. En la actualidad, hay una dramática aparición del genotipo III DENV-3 en América Latina. Sin embargo, todavía tenemos un conocimiento incompleto de las fuerzas evolutivas que subyacen a la evolución de este genotipo en esta región del mundo. Con el fin de profundizar en el grado de variabilidad genética, las tasas y los patrones de evolución de este genotipo en Venezuela y la región de América del Sur, se llevó a cabo el análisis filogenético del DENV-3 genotipo III basado en un gran número ( $n = 119$ ) de las secuencias de genes de cepas aisladas en Venezuela desde el año 2001 hasta el 2008. RESULTADOS: El análisis filogenético reveló una evolución in situ del DENV-3, genotipo III, después de su introducción en la región de América Latina, observándose además que circulan tres grupos o conglomerados (en inglés "clusters") genéticos diferentes (A - C). Los análisis Bayesianos de inferencia coalescente revelaron una tasa de evolución de  $8,48 \times 10^{-4}$  sustituciones/ sitio/año (s/s/a) para las cepas del grupo A, compuesto en

su totalidad por las cepas aisladas en Venezuela. La sustitución de un aminoácido en la posición 329, del dominio III de la proteína E (A  $\rightarrow$  V), se encontró en casi todas las proteínas E desde las cepas del Cluster A. CONCLUSIONES: Se observó un cambio significativo en la evolución entre las cepas del DENV-3, genotipo III, que circularon en los primeros años de la introducción de este genotipo en el continente y las virus aislados en la región de América Latina en los últimos años. Se observó en Venezuela la presencia de cepas del DENV-3 de genotipo III pertenecientes a diferentes conglomerados genéticos, revelándose así varios eventos de introducción en este país. Se encontró que la tasa de evolución para las cepas del Cluster A que circulan en Venezuela es similar a la de otros, previamente establecidos para este genotipo en otras regiones del mundo. Esto sugiere una falta de correlación entre la tasa de sustitución DENV genotipo III y el modelo ecológico de propagación del virus.

□ INCANI R. N., HERNÁNDEZ M. & GONZÁLEZ M. E. (2010). **Hyperinfection by *Strongyloides stercoralis* probably associated with Rituximab in a patient with mantle cell lymphoma and hyper eosinophilia** (*Hiperinfección por *Strongyloides stercoralis* probablemente asociada a Rituximab en un paciente con linfoma de células del manto e hipereosinofilia*). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **52**: 221-224.

Departamento de Parasitología, Departamento de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia 2001, Venezuela. Centro de Especialidades Quirúrgicas, Guacara, Venezuela.

Se presenta el primer reporte hasta donde sepamos, de hiperinfección por *Strongyloides stercoralis* (HS) e hipereosinofilia asociado a inmunosupresión por Rituximab (la única droga recibida durante el último año y medio), en una paciente con linfoma de células del manto (LCM). La paciente tenía una historia de 3 años con LCM, y desarrolló 2 accesos de HS durante el 2008, incluyendo meningitis, neumonía y presencia de larvas de *S. stercoralis* en los pulmones. Se tuvo la oportunidad única de observar la citotoxicidad contra las larvas filariformes en la expectoración, luego del tratamiento con Ivermectina, mostrando inmovilización y muerte de las larvas, asociada a la presencia de eosinófilos adheridos a la cutícula de los parásitos.

## **BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL**

(ISSN-1690-4648)

(antes: Boletín de Malariología y Saneamiento Ambiental)

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

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

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

### **El Boletín está estructurado en nueve Secciones**

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



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



Gobierno **Bolivariano**  
de Venezuela

Ministerio del Poder Popular  
para la **Salud**

