

Uso de la técnica inmuno-radiométrica (IRMA) en *Anopheles* de Colombia para la identificación de esporozoitos de *Plasmodium*.

Sócrates Herrera V., M.D.¹, Marco Fidel Suárez, M. Sc.², Gloria Inés Sánchez, Bact.³, Martha L. Quiñones, Biol.⁴ y Myriam de Herrera, Bact.⁵.

RESUMEN

El método inmuno-radiométrico (IRMA) que utiliza anticuerpos monoclonales con especificidad por la proteína CS de los esporozoitos de *Plasmodium falciparum*, se usó en el presente trabajo para determinar las tasas de infección de mosquitos del género *Anopheles* (obtenidos en diversas regiones endémicas maláricas de Colombia. De las especies estudiadas, *A. albimanus*, *A. darlingi*, *A. allopha* y *A. neomaculipalpus* mostraron infecciones por *P. falciparum*. Sólo las dos primeras habían sido incriminadas previamente como vectoras. Adicionalmente, *A. albimanus* fue el único positivo para *P. vivax*. El método IRMA permitió en un corto tiempo y sobre un número reducido de mosquitos determinar algunos probables vectores en el país.

El paludismo es una de las principales causas de morbimortalidad en 10% de las Unidades Regionales de Salud de Colombia. Se considera que 85% del área del país (970 849 km²) reúne las condiciones para la transmisión de malaria y allí habita 65% de los colombianos (aproximadamente 18 millones de personas) con riesgo de enfermar de paludismo en cualquier momento. Sin embargo, de esta población, 13 millones ocupan regiones de mediano y bajo riesgo, donde la

prevalencia anual es menor a 1 por 1000. Lo anterior hace que la enfermedad sea un problema prioritario de salud para 4 millones de habitantes (18% de población) de áreas rurales marginales o de colonización¹.

El componente entomológico en el estudio de la malaria en Colombia es extremadamente complicado por la gran variedad de especies de anofelinos existentes, sus distintos hábitos y la diversidad ecológica misma del territorio. Los vectores de malaria frecuentemente se han clasificado como especies de importancia primaria y secundaria con base sobre todo en las correlaciones entre su distribución geográfica y la presencia de transmisión, lo cual algunas veces es incierto y además subjetivo. En esta clasificación varias especies de anofelinos se han incriminado como transmisores de malaria en Colombia; tres se consideran de importancia primaria: *A. albimanus*, *A. darlingi* y *A. nuñeztovari*; y otras cuatro de importancia secundaria: *A. lepidotus*, *A. neivai*, *A. pseudopunctipennis* y *A. puntimacula*^{2,3}. Otros mosquitos: *A. allopha*, *A. evansae* y *A. strodei* se pueden citar sin pruebas de capacidad vectorial, a pesar de su tendencia antropofílica.

La determinación de las especies de *Anopheles* comprometidas en transmitir malaria se basa en observar la presencia de esporozoitos en las glándulas salivales de mosquitos hembras para conocer los índices de infección⁴. En Colombia estos índices esporozoíticos en poblaciones naturales de mosquitos se han determinado por este método que requiere personal capacitado y grandes limitaciones técnicas: es poco sensible, no es específico y no se puede usar sino con un número reducido de mosquitos vivos. Todo esto lo hace poco práctico en regiones donde la transmisión la mantienen vectores con índices esporozoíticos por debajo de 1%⁵.

Recientemente Zavala y col⁶ establecieron un método inmunológico para identificar los esporozoitos en las glándulas salivales de anofelinos, basados en el uso de anticuerpos monoclonales producidos contra una proteína mayor presente en la superficie de los esporozoitos de varias especies de *Plasmodium*^{7,8}. Este método, fundamentado en una prueba

1. Profesor Auxiliar, Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
2. Coordinador, Grupo de Entomología, Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria, Bogotá, Colombia.
3. Asistente de Investigación, Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
4. Bióloga, Grupo de Entomología, Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria, Bogotá, Colombia.
5. Instructora, Departamento de Patología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

inmuno-radiométrica (IRMA), que permite descubrir los esporozoitos y la identificación rápida de la especie de *Plasmodium* en mosquitos frescos o secos⁹, se empleó en el presente trabajo para estudiar las tasas de infección en anofelinos provenientes de varias regiones del país.

MATERIALES Y METODOS

Mosquitos. Los ejemplares para examen fueron mosquitos muertos, completos, colectados con cebo humano por los grupos zonales del Servicio de la Erradicación de la Malaria (SEM), en el intra o peridomicilio, o cuando reposaban en las paredes de las viviendas en áreas maláricas endémicas de distintas regiones de Colombia (Figura 1), durante los meses de mayo a septiembre de 1985 e identificados por los entomólogos del SEM. Para cada mosquito se anotaron los datos de especie, fecha y localidad de captura, cebo utilizado y presencia o ausencia de sangre ingerida.

Identificación de esporozoitos. Cada mosquito completo se colocó en un pozo de una microplaca rígida de poliestireno de 96 huecos con fondo en forma de U (Cooke-Dynatech®). En seguida se agregaron 30 µl de una solución salina amortiguada de fosfatos, que contenía 1% de albúmina bovina y

0.5% de nonidet P-40 (PBS-BSA-NP) y luego se llevó al congelador a -20°C hasta su uso.

Antes del ensayo se descongelaron las placas y se trituraron los mosquitos utilizando pipetas Pasteur selladas. Cada pozo se diluyó a 180 µl con PBS que contenía únicamente BSA al 1%. En cada microplaca se dejaron 4 pozos vacíos para los controles positivos y negativos.

Los esporozoitos se identificaron mediante la técnica IRMA con anticuerpos monoclonales producidos contra esporozoitos de *P. falciparum* y *P. vivax* suministrados por la Universidad de Nueva York. Para realizar el ensayo se tomaron 30 µl de la dilución de cada mosquito y se transfirieron desde la placa rígida hasta un pozo correspondiente en una microplaca flexible de polivinilo revestida antes con los anticuerpos monoclonales. El procedimiento se continuó aplicando con toda exactitud el método descrito por Zavala y col⁶. Por último, los ensayos se leyeron en un contador de radioactividad gamma, Multigamma II (LKB). En los ensayos de identificación de *P. falciparum*, se usó como control positivo una mezcla de mosquitos infectados en el laboratorio, mientras que para *P. vivax* se empleó un péptido recombinante de la proteína circumesporozoito (proteína r-CS) ambos suministrados también por la Universidad de Nueva York.

RESULTADOS

Se estudiaron 6367 mosquitos de 18 especies diferentes para determinar la presencia de esporozoitos de *P. falciparum* (Cuadro 1); en 4.100 de ellos también se investigaron esporozoitos de *P. vivax*.

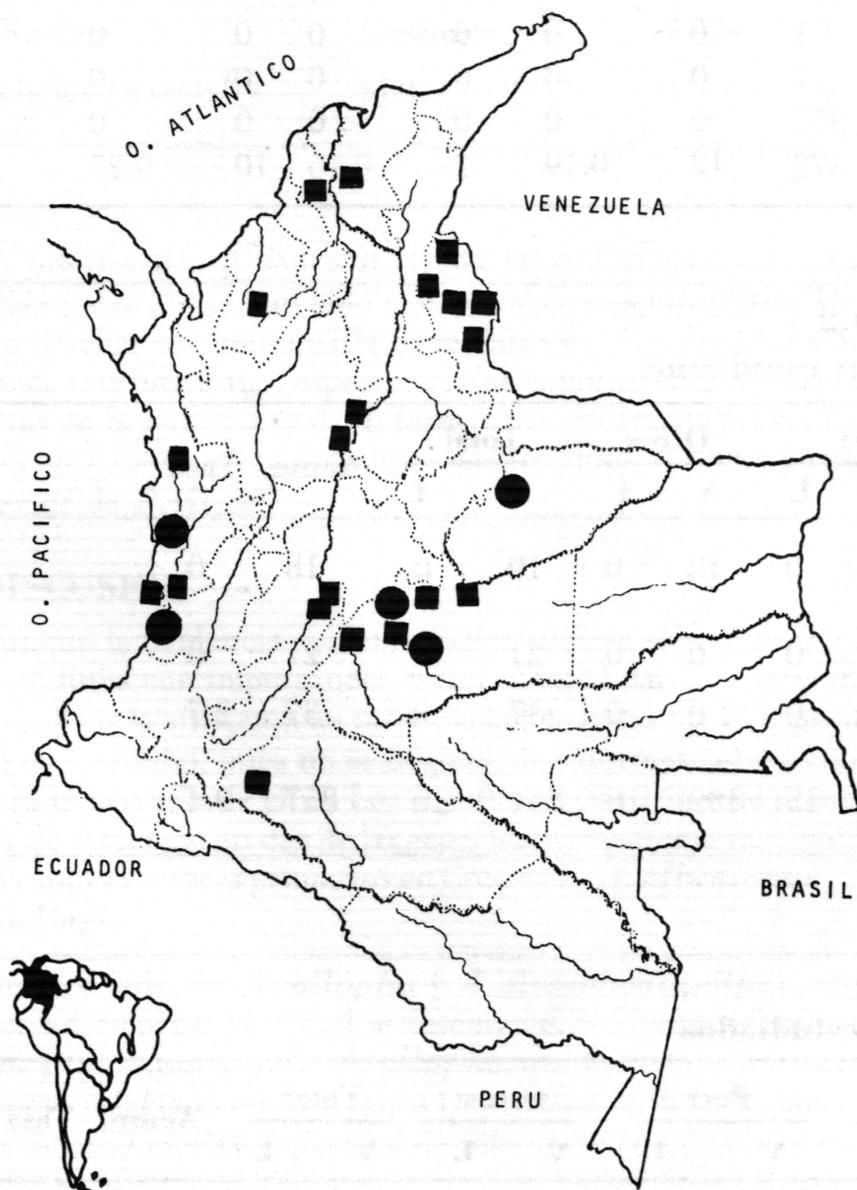
Se encontraron 4 especies infectadas con *P. falciparum*: *A. albimanus*, *A. darlingi*, *A. allopha* y *A. neomaculipalpus*, mientras *A. albimanus* fue el único positivo para *P. vivax*.

De *A. albimanus* se analizaron 405 ejemplares colectados en la región de la costa atlántica y 908 de la costa pacífica. Sólo los mosquitos de este último lugar mostraron infecciones, pero las tasas de infección fueron diferentes para áreas geográficas distintas dentro de la región, pues en los mosquitos del Departamento del Chocó la tasa era 2.7% mientras que en los del Departamento del Valle fue 0.4% (Cuadro 2). Todos los mosquitos positivos se colectaron con cebo humano.

Anopheles darlingi fue positivo en especímenes colectados en la localidad de Caño Caribe, Municipio de Puerto Lleras (Meta), en el intra y peri-domicilio con tasas de infección de 0.1% y 0.06%, respectivamente (Cuadro 3). Estas tasas de infección tan bajas no guardan relación con la importancia epidemiológica conferida a esta especie.

Por el contrario, aunque *A. allopha* no se considera como vector primario en Colombia, 4 de 557 ejemplares de la localidad de Puerto Colombia, Municipio de Villavicencio (Meta), fueron positivos, tasa de 0.7%, similar a la de *A. albimanus* en la costa pacífica del Departamento del Valle (Cuadro 4).

Anopheles neomaculipalpus, no se tiene como un vector de importancia; sin embargo 1 de 26 ejemplares estudiados procedentes de la Intendencia del Casanare fue positivo para



CONVENCIONES:

- Cabeceras de municipios de las localidades estudiadas
- Localidades que presentan ejemplares positivos

Figura 1. Sitios de captura de mosquitos anofelinos. Cabeceras de municipios de las localidades estudiadas. Localidades que presentan ejemplares positivos.

Cuadro 1
Total de Especies Examinadas

Especie	COLECTADOS				INFECTADOS					
	No. total	Intra	Peri	Otros	Total	%	Intra	%	Peri	%
<i>albimanus</i>	1 313	39	691	583	5	0.38	1	2.56	4	0.58
<i>allopha</i>	1 110	361	628	121	4	0.36	0	0.00	0	0.64
<i>apicimacula</i>	8	0	1	7	0	0.00	0	0.00	0	0.00
<i>argyritarsis</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>brasiliensis</i>	136	37	82	17	0	0	0	0	0	0
<i>darlingi</i>	2 890	736	1 781	373	2	0.07	1	0.14	1	0.06
<i>evansae</i>	33	10	23	0	0	0	0	0	0	0
<i>fluminensis</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>lepidotus</i>	149	6	138	5	0	0	0	0	0	0
<i>mediopunctatus</i>	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>neivai</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>neomaculipalpus</i>	26	6	17	3	1	3.85	0	0	1	5.88
<i>nuñeztovari</i>	78	16	62	0	0	0	0	0	0	0
<i>oswaldoi</i>	194	20	172	2	0	0	0	0	0	0
<i>pseudopunctipennis</i>	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0
<i>punctimacula</i>	3	0	2	1	0	0	0	0	0	0
<i>rangeli</i>	18	4	13	1	0	0	0	0	0	0
<i>triannulatus</i>	399	7	35	357	0	0	0	0	0	0
Total	6 367	1 244	3 651	1 472	12	0.19	2	0.16	10	0.27

Intra y Peri se refieren al domicilio

CUADRO 2
***Anopheles albimanus* estudiados**

Región	Departamento	Loc.	Intra		Peri		Otros		Total		Acum.	Tasa
			V	L	V	L	V	L	V	L		
Atlántico	Córdoba	1	0	0	0	0	18	0	19	0	18	0
	Antioquia	1	13	0	8	0	0	0	21	0	21	0
Pacífico	Chocó	1	0	0	37(1)	0	0	0	37	0	37	2.7
	Valle	1	25(1)	1	617(3)	15	199	0	841	16	857	0.4

V= Vacío; L= Lleno; (sangre ingerida)

Cuadro 3
***Anopheles darlingi* estudiados**

Región	Departamento	Loc.	Intra		Peri		Otros		Total		Acum.	Tasa
			V	L	V	L	V	L	V	L		
Atlántico	Magdalena	1	9	0	27	0	0	0	36	0	36	0
	Córdoba	1	1	0	1	0	0	0	2	0	2	0
Llanos Orientales	Meta	9	311(1)	24	1023(1)	38	44	16	1378	78	1456	0.07
Amazonas	Caquetá	2	0	0	6	0	0	0	6	0	6	0

Cuadro 4
Anopheles allopha (albitaris) estudiados

Región	Departamento	Loc.	Intra		Peri		Otros		Total		Acum.	Tasa
			V	L	V	L	V	L	V	L		
Atlántico	Antioquia	3	12	2	16	6	3	0	31	8	39	0
	N. Santander	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
Noroeste	Casanare	1	7	0	2	1	1	2	10	3	13	0
Llanos Orientales	Meta	9	303	5	487(4)	0	75	7	865	12	877	0.4
Amazonas	Caquetá	1	13	1	40	0	0	0	53	1	54	0

Cuadro 5
Anopheles neomaculipalpus estudiados

Región	Departamento	Loc.	Intra		Peri		Otros		Total		Acum.	Tasa
			V	L	V	L	V	L	V	L		
Noreste	Casanare	1	6	0	16(1)	0	0	0	22	0	22	4.5
Llanos Orientales	Meta	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0

P. falciparum (Cuadro 5). Todas las demás especies examinada hasta ahora han sido negativas para esporozoitos. Dentro de ellas se cuentan 194 ejemplares de *A. oswaldoi* y 309 de *A. triannulatus*, especies que se comunicaron como positivas en Brasil¹⁰ y 149 de *A. lepidotus* informado previamente con base en circunstancias epidemiológicas como posible vector de *P. vivax*³.

DISCUSION

Aunque la evidencia epidemiológica sugiere sólo unos pocos anofelinos con importancia vectorial en el país, es necesario visualizar la situación de infectividad de todas las 18 especies de este estudio, pues no se dispone de informes actualizados para la mayoría de ellas. Los resultados confirman la presencia de infección en dos de las especies previamente incriminadas como vectores primarios en Colombia, *A. albimanus* y *A. darlingi*.

De otro lado, en *A. allopha* y *A. neomaculipalpus*, cuyo verdadero papel vectorial se desconoce, se vieron infecciones por *P. falciparum*. En *A. allopha*, que se encontró naturalmente infectado en los Llanos Orientales, se debe destacar el hecho que mostró capacidad de infectarse con *P. vivax* en el laboratorio¹¹ y que comparte su distribución geográfica con *A. darlingi*, este último incriminado como vector primario responsable de la transmisión. La importancia real de esta especie como vector de malaria así como la de *A. neomaculipalpus* amerita posterior estudio.

En los presentes resultados contrasta el hecho que algunas de las especies que se encontraron negativas en este estudio, se

informaron como positivas en trabajos similares de Brasil¹⁰. Sobre las demás especies no es posible deducir conclusiones definitivas.

Estos datos son preliminares, pues la investigación se aplicó a los *Anopheles* disponibles en un momento dado, sólo para valorar la técnica IRMA, sin haber un diseño con objetivos epidemiológicos específicos.

Para el estudio epidemiológico de la malaria en regiones como las incluidas en el presente trabajo, se hace absolutamente necesaria la utilización de técnicas que como la de IRMA, con sensibilidad y especificidad altas, permitan el estudio masivo de mosquitos. Los resultados muestran índices de infección significativamente más bajos que los descritos en artículos donde se empleó la misma técnica^{9,10}, lo cual autoriza a afirmar que las especies que aquí se hallaron infectadas, podrían ser vectoras muy eficientes para transmitir la malaria en el país. Además, el ensayo mostró niveles de actividad que sugieren que los mosquitos positivos poseían una carga baja de esporozoitos.

Por último, se debe ratificar la importancia del método inmu-no-radiométrico en este tipo de estudios entomológicos, pues en el presente trabajo permitió confirmar la importancia vectorial de dos especies y sugerir la participación secundaria de otras dos. Sin embargo, los resultados obtenidos se deben analizar con prudencia, teniendo en cuenta que como se examinaron mosquitos completos los esporozoitos identificados podrían no estar aún en las glándulas salivales y que estos informes sólo son importantes a la luz de otros datos epidemiológicos.

SUMMARY

A total of 6 367 mosquitoes of 18 different anopheline species and 4100 of them studied using the IRMA technique for the presence of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* sporozoites respectively.

Anopheles albimanus and *A. darlingi*, previously incriminated as malaria vectors were found infected as well as *A. allopha* and *A. neomaculipalpus*, two species that had never been incriminated. These results demonstrate the usefulness of this technique for entomological studies.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros agradecimientos a los doctores R.S. Nussenzweig y F. Zavala de la Universidad de Nueva York por la constante colaboración y asesoría; igualmente a los doctores Alejandro Rodríguez y Adolfo Gómez L. del SEM. El presente trabajo fue realizado con financiación del Programa Especial para Entrenamiento e Investigación en Enfermedades Tropicales de la Organización Mundial de la Salud (TDR-OMS-Banco Mundial-PNUD) contrato 820231, de la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA), contrato E-Col 4252 y del Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria, SEM.

REFERENCIAS

1. Rodríguez, A., Suárez, M.F. & Quiñones, M.: Programa de control de paludismo. Documento interno 02-86. Dirección de Campañas Directas, Ministerio de Salud, Bogotá, mayo de 1985.

2. Ferro, V.: Revisión de los recursos aplicables a la lucha contra el paludismo. *Rev ENSP* (Medellín), 1979, **5**: 11-18.
 3. Quiñones, M.L., Suárez, M.F., Rodríguez, A., Fleming, G.A. & Galvis, L.E.: Comportamiento de *Anopheles (Kerteszia) lepidotus* Zavortink, 1973 y su incriminación como posible vector de malaria en el Departamento del Tolima, Colombia. *Biomédica*, 1984, **4**: 5-13.
 4. Macdonald, G.: The analysis of the sporozoite rate. *Trop Dis Bull*, 1952, **49**: 569-585.
 5. Warren, M., Mason, J. & Habbs, J.: Natural infections of *Anopheles albimanus* with *Plasmodium* in a small malaria focus. *Am Trop Med Hyg*, 1975, **24**: 545-546.
 6. Zavala, F., Gwadz, R.W., Collins, F.H., Nussenzweig, R.S. & Nussenzweig, V.: Monoclonal antibodies to circumsporozoite proteins identify the species of malaria parasites in infected mosquitoes. *Nature*, 1982, **299**: 737-738.
 7. Cochrane, A.H., Santoro, F., Nussenzweig, V., Gwadz, R.W. & Nussenzweig, R.S.: Monoclonal antibodies identify the protective antigens of sporozoites of *Plasmodium knowlesi*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, **79**: 565.
 8. Nardin, E.H., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R.S. et al: Circumsporozoite proteins of human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *vivax*. *J. Exp Med*, 1982, **156**: 20-30.
 9. Collins, F.H., Zavala, F., Graves, et al: First field trial of an immunoradiometric assay for the detection of malaria sporozoites in mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*, 1984, **33**: 538-543.
 10. Arruda, M. de, Carvalho, M.B., Nussenzweig, R.S., Maracic, M., Ferreira, A.W. & Cochrane, A.H.: Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. *Am J Trop Med Hyg*, 1986, **35**: 873-881.
 11. Collins, W.E., Warren, M., Skinner, J.C. & Sutton, B. B.: Infectivity of two strains of *Plasmodium vivax* to *Anopheles albimanus* mosquitoes from Colombia. *J Parasitol*, 1985, **71**: 771-773.

QUIERE SABER
QUIEN SE
INTERESA POR
SU PRODUCTO?
MUY FACIL:
UTILICE EL
"SERVICIO DE
RESPUESTA COMERCIAL
DE ADPOSTAL



El "Servicio de Respuesta Comercial", le permite hacer investigaciones de mercado, encuestas de opinión, pedidos por correo, y en general obtener la información que usted requiere para sus negocios!



CORREO DE COLOMBIA

llega seguro y a tiempo!

MAYOR INFORMACION: TELS. 2415531 Y 2828842