

I-ISSN 2590-7379 (Electrónico)

# Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 41, Suplemento No. 1 - Parasitología médica

Mayo de 2021, Bogotá, D.C., Colombia, S.A.



**Portada:** *Strongyloides venezuelensis*, segmento posterior de una hembra partenogenética grávida, se pueden observar la vulva, el ano y algunos huevos, 40X.

Microscopio óptico invertido, Motic™, con cámara Moticom Pro™

Jairo Tobar, Daniel Ramos-Sarmiento, Diana Tayupanta, Melina Rodríguez y Fabián Aguilar  
Área de Parasitología y Bioterios, Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Leopoldo Izquieta Pérez, Quito, Ecuador

# Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 41, Suplemento No. 1 - Bogotá, D.C., Colombia - Mayo de 2021

## Comité Editorial

<b>EDITORES</b>	<b>LUIS ALBERTO GÓMEZ</b> Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia	<b>CARLOS ARTURO HERNÁNDEZ</b> Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia	<b>RUBÉN SANTIAGO NICHOLLS</b> Organización Panamericana de la Salud Washington, D.C., Estados Unidos
<b>EDITORES ASOCIADOS</b>	<b>ENRIQUE ARDILA</b> Academia Nacional de Medicina Bogotá, D.C., Colombia	<b>JULIÁN ALFREDO FERNÁNDEZ-NIÑO</b> Universidad del Norte Barranquilla, Colombia	<b>ERIKA SANTAMARÍA</b> Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia
	<b>JOSÉ MORENO-MONTOYA</b> Fundación Santa Fe de Bogotá Bogotá, D.C., Colombia	<b>OMAR SEGURA</b> Federación Médica Colombiana Bogotá, D.C., Colombia	<b>ORLANDO TORRES-FERNÁNDEZ</b> Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia
	<b>LEONARD MUNSTERMANN</b> Yale University School of Medicine New Haven, CT, Estados Unidos	<b>MAGDALENA WIESNER</b> Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia	

## Comité Científico

<b>ARNOLDO BARBOSA</b> Universidad del Tolima Ibagué, Colombia	<b>ANDRÉS DE FRANCISCO</b> Organización Panamericana de la Salud Washington, D.C., Estados Unidos	<b>JOHN MARIO GONZÁLEZ</b> Universidad de los Andes Bogotá, D.C., Colombia
<b>ANTONIO BERMÚDEZ</b> Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia	<b>FERNANDO DE LA HOZ</b> Universidad Nacional de Colombia Bogotá, D.C., Colombia	<b>FELIPE GUHL</b> Universidad de los Andes Bogotá, D.C., Colombia
<b>JORGE H. BOTERO</b> Universidad de Antioquia Medellín, Colombia	<b>JOSÉ LUIS DI FABIO</b> Organización Panamericana de la Salud Washington, D.C., Estados Unidos	<b>ANTONIO IGLESIAS</b> Universidad Nacional de Colombia Bogotá, D.C., Colombia
<b>GUSTAVO ALONSO CABRERA</b> Universidad de Antioquia Medellín, Colombia	<b>JORGE HERNANDO DONADO</b> Universidad Pontificia Bolivariana Medellín, Colombia	<b>JORGE JARA</b> Organización Panamericana de la Salud Washington, D.C., Estados Unidos
<b>VÍCTOR CÁRDENAS</b> University of Arkansas Little Rock, AK, Estados Unidos	<b>CARLOS ANDRÉS FANDIÑO</b> Universidad del Valle Cali, Colombia	<b>ERNESTO JARAMILLO</b> Organización Mundial de la Salud Ginebra, Suiza
<b>ALBERTO CONCHA-EASTMAN</b> Guatapé, Colombia	<b>JOSÉ FIGUEROA</b> World Health Organization Ginebra, Suiza	<b>MARCELO LABRUNA</b> Universidade de São Paulo São Paulo, Brasil
<b>ZOILO CUÉLLAR</b> Academia Nacional de Medicina Bogotá, D.C., Colombia	<b>LUIS FERNANDO GARCÍA</b> Universidad de Antioquia Medellín, Colombia	<b>JAIRO LIZARAZO</b> Hospital Universitario Erasmo Meoz Cúcuta, Colombia
<b>LUIS GABRIEL CUERVO</b> Organización Panamericana de la Salud Washington, D.C., Estados Unidos	<b>ALBERTO GÓMEZ</b> Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, D.C., Colombia	<b>JUAN GUILLERMO McEWEN</b> Corporación para Investigaciones Biológicas Medellín, Colombia
<b>PATRICIA DEL PORTILLO</b> Corpogén Bogotá, D.C., Colombia	<b>ENRIQUE GONZÁLEZ</b> University of Texas Health Science Center at San Antonio San Antonio, TX, Estados Unidos	<b>ROBERTO MENDOZA</b> The Hospital for Sick Children Toronto, Ontario, Canada

RICARDO NEGRONI  
Hospital de Infecciosas  
Francisco Javier Muñiz  
Buenos Aires, Argentina

MARÍA TERESA OCHOA  
University of California Los Ángeles  
Los Ángeles, CA, Estados Unidos

JUAN P. OLANO  
University of Texas Medical Branch  
Galveston, TX, Estados Unidos

BLANCA RESTREPO  
University of Texas  
Brownsville, TX, Estados Unidos

GERZAIN RODRÍGUEZ  
Investigador Emérito  
Instituto Nacional de Salud  
Universidad de La Sabana  
Bogotá, D.C., Colombia

VÍCTOR E. REYES  
University of Texas Medical Branch  
Galveston, TX, Estados Unidos

GUSTAVO C. ROMÁN  
Methodist Neurological Institute  
Houston, TX, Estados Unidos

PEDRO ROMERO  
Ludwig Center for Cancer Research  
University of Lausanne  
Lausana, Suiza

ÁLVARO RUIZ  
Pontificia Universidad Javeriana  
Bogotá, D.C., Colombia

GIOCONDA SAN BLAS  
Instituto Venezolano de  
Investigaciones Científicas  
Caracas, Venezuela

ÁLVARO SANABRIA  
Hospital Pablo Tobón Uribe  
Medellín, Colombia  
Universidad de La Sabana  
Chía, Colombia

RICARDO SÁNCHEZ  
Universidad Nacional de Colombia  
Bogotá, D.C., Colombia

NANCY GORE SARAVIA  
Centro Internacional de Entrenamiento  
e Investigaciones Médicas  
Cali, Colombia

ROBERT TESH  
University of Texas  
GALVESTON, TX, ESTADOS UNIDOS

BRUNO TRAVI  
University of Texas  
Galveston, TX, Estados Unidos

GUSTAVO VALBUENA  
University of Texas  
Galveston, TX, Estados Unidos

JUAN MIGUEL VILLALOBOS  
Universidade Federal de Rondônia  
Porto Velho, Brasil

MOISÉS WASSERMAN  
Investigador Emérito  
Instituto Nacional de Salud  
Universidad Nacional de Colombia  
Bogotá, D.C., Colombia

---

CARLOS ARTURO HERNÁNDEZ  
Edición y corrección de estilo

LINDA GRACE MOLANO  
Asistencia editorial

MARTHA RENZA  
Corrección de estilo

ELIZABETH GUZMÁN  
Mercadeo digital

LUZ ÁNGELA SALGADO  
Diagramación

---

© Instituto Nacional de Salud

La revista *Biomédica* del Instituto Nacional de Salud es una publicación trimestral, eminentemente científica. Está amparada por la resolución número 003768 de 1981, emanada del Ministerio de Gobierno, y con tarifa postal reducida según resolución número 1128 del 5 de mayo de 1982.

Ninguna publicación, nacional o extranjera, podrá reproducir ni traducir sus artículos ni sus resúmenes sin previa autorización escrita del editor. Ni la revista, ni el Instituto asumen responsabilidad alguna por los puntos de vista expresados por los autores. La revista no publicará ningún tipo de propaganda comercial. Los nombres de equipos, materiales y productos manufacturados que eventualmente puedan mencionarse, no implican recomendación ni propaganda para su uso y sólo se mencionan como identificación genérica.

La revista *Biomédica* aparece reseñada en *Index Medicus/Medline de la National Library of Medicine*, en el *Science Citation Index Expanded (also known as SciSearch®)* y *Journal Citation Reports/Science Edition de Thomson Scientific*, en *SciELO Colombia (Scientific Electronic Library Online)*, en el índice de la *Literatura Latinoamericana en Ciencias de la Salud (LILACS)*, en la Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (*RedAlyC*), en el *Índice Mexicano de Revistas Biomédicas Latinoamericanas (Imbiomed)*, en *Scopus* de Elsevier B.V., en el *Sistema de Información Bibliográfica Regional Andina (SIBRA)*, en *CAB Abstracts*, *Review of Medical and Veterinary Entomology*, y forma parte del *Índice Nacional de Publicaciones Seriadas Científicas y Tecnológicas Colombianas* de Colciencias y del *Índice Latinoamericano de Revistas Científicas y Tecnológicas (LATINDEX)*.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD  
Avenida Calle 26 No. 51-20  
Apartado aéreo 80334 y 80080  
Bogotá, D.C., Colombia, S.A.

URL: <http://www.ins.gov.co>  
[biomedica@ins.gov.co](mailto:biomedica@ins.gov.co)



# Contenido

## Editorial

La Parasitología en Colombia: una visión panorámica <i>Sofía Duque, Adriana Arévalo, Rubén Santiago Nicholls</i> .....	5
---	---

## Reporte de caso

Tungiasis en el área urbana de Popayán, Colombia: reporte de caso <i>Alicia Ortega-Narváez, Luis Reinel Vásquez-Arteaga, Olga Cujar-Otero, Jehyson Madroñero-Daza, Ginna Cabra-Bautista</i> .....	8
Infección crónica por <i>Cystoisospora belli</i> en un paciente colombiano con HIV y cumplimiento deficiente de la terapia antirretroviral de gran actividad <i>Ana Luz Galván-Díaz, Juan Carlos Alzate, Esteban Villegas, Sofía Giraldo, Jorge Botero, Gisela García-Montoya</i>	17

## Artículo original

Identificación molecular de <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Entamoeba dispar</i> y <i>Entamoeba moshkovskii</i> en niños con diarrea en Maracaibo, Venezuela <i>Zulbey Rivero, Lisbeth Villarreal, Ángela Bracho, Carem Prieto, Rafael Villalobos</i> .....	23
Evaluación microscópica y molecular de <i>Strongyloides venezuelensis</i> en un ciclo de vida experimental utilizando ratas Wistar <i>Jairo Tobar, Daniel Ramos-Sarmiento, Diana Tayupanta, Melina Rodríguez, Fabián Aguilar</i> .....	35
Desacuerdo entre la PCR y la serología en el diagnóstico de la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> en donantes de una región endémica de Colombia <i>Liliana Torcoroma-García, Jhancy Rocío Aguilar, Marly Yojhana Bueno, Erika Marcela Moreno, Herminia Ramírez, Nelson Daza</i> .....	47
Frecuencia de enteroparásitos en primates Cebidae y Callitrichidae del Zoológico de Cali, Colombia: implicaciones zoonóticas <i>Jorge Iván Zapata-Valencia, Sebastián Ortega-Valencia, Yisther Katherine Silva- Cuero, Lina Sofía Castillo-Castillo, Laura Sofía Ortega-Ruiz, Adriana Cardona-Ortiz, Juliana Peña-Stadlin</i> .....	60
Detección de <i>Toxoplasma gondii</i> en agua para el consumo humano proveniente de jagüeyes del área rural del municipio de Sincelejo <i>Diana Marcela Campo-Portacio, Luisa Fernanda Guerrero-Velásquez, Angie Patricia Castillo-García, Kelly Orozco-Méndez, Pedro José Blanco-Tuirán</i> .....	82
Caracterización de un brote de malaria en una zona no endémica de la región costera del Ecuador <i>Diego Omar Morales, Paul Andrés Quinatoa, Jaen Carlos Cagua</i> .....	100
Evaluación del UMELISA CHAGAS® con la incorporación de nuevos péptidos monoméricos y quiméricos representativos de diferentes regiones de <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Idialis Hernández, Milenen Hernández, Jeny González, Ivonne Gómez, Orlando Zulueta, Grisell Ramos, Darien Ortega, Dunia Clara Bequer, Giosvany Ernesto Martínez, Aurora Delahanty</i> .....	113
Malaria en poblaciones con ocupación minera, Colombia, 2012-2018 <i>Daniela Salas, Dora Yurany Sánchez, Germán Achury, Fabio Escobar-Díaz</i> .....	121

## Comunicación breve

Infección natural con <i>Trypanosoma cruzi</i> en murciélagos capturados en Campeche y Yucatán, México <i>Marco Torres-Castro, Naomi Cuevas-Koh, Silvia Hernández-Betancourt, Henry Noh-Pech, Erendira Estrella, Belén Herrera-Flores, Jesús A. Panti-May, Etienne Waleckx, Javier Sosa-Escalante, Ronald Peláez-Sánchez</i> .....	131
---	-----

# Contents

## Editorial

Parasitology in Colombia: An overview <i>Sofía Duque, Adriana Arévalo, Rubén Santiago Nicholls</i> .....	5
---	---

## Case report

Tungiasis in the urban area of Popayán, Colombia: A case report <i>Alicia Ortega-Narváez, Luis Reinel Vásquez-Arteaga, Olga Cujar-Otero, Jehyson Madroñero-Daza, Ginna Cabra-Bautista</i> .....	8
Chronic <i>Cystoisospora belli</i> infection in a Colombian patient living with HIV and poor adherence to highly active antiretroviral therapy <i>Ana Luz Galván-Díaz, Juan Carlos Alzate, Esteban Villegas, Sofía Giraldo, Jorge Botero, Gisela García-Montoya</i> .....	17

## Original article

Molecular identification of <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Entamoeba dispar</i> , and <i>Entamoeba moshkovskii</i> in children with diarrhea from Maracaibo, Venezuela <i>Zulbey Rivero, Lisbeth Villarreal, Ángela Bracho, Carem Prieto, Rafael Villalobos</i> .....	23
Microscopic and molecular evaluation of <i>Strongyloides venezuelensis</i> in an experimental life cycle using Wistar rats <i>Jairo Tobar, Daniel Ramos-Sarmiento, Diana Tayupanta, Melina Rodríguez, Fabián Aguilar</i> .....	35
Disagreement between PCR and serological diagnosis of <i>Trypanosoma cruzi</i> infection in blood donors from a Colombian endemic region <i>Liliana Torcoroma-García, Jhancy Rocío Aguilar, Marly Yojhana Bueno, Erika Marcela Moreno, Herminia Ramírez, Nelson Daza</i> .....	47
Frequency of enteroparasites in Cebidae and Callitrichidae primates at the Zoológico de Cali, Colombia: Zoonotic implications <i>Jorge Iván Zapata-Valencia, Sebastián Ortega-Valencia, Yisther Katherine Silva- Cuero, Lina Sofía Castillo-Castillo, Laura Sofía Ortega-Ruiz, Adriana Cardona-Ortiz, Juliana Peña-Stadlin</i> .....	60
Detection of <i>Toxoplasma gondii</i> in water for human consumption from water wells ( <i>jagüeyes</i> ) in the rural area of the municipality of Sincelejo <i>Diana Marcela Campo-Portacio, Luisa Fernanda Guerrero-Velásquez, Angie Patricia Castillo-García, Kelly Orozco-Méndez, Pedro José Blanco-Tuirán</i> .....	82
Characterization of an outbreak of malaria in a non-endemic zone on the coastal region of Ecuador <i>Diego Omar Morales, Paul Andrés Quinatoa, Jaen Carlos Cagua</i> .....	100
Evaluation of UMELISA CHAGAS™ with the incorporation of new monomeric and chimeric peptides representative of different regions of <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Idialis Hernández, Milenen Hernández, Jeny González, Ivonne Gómez, Orlando Zulueta, Grisell Ramos, Darien Ortega, Dunia Clara Bequer, Giosvany Ernesto Martínez, Aurora Delahanty</i> .....	113
Malaria in populations with mining occupation, Colombia, 2012-2018 <i>Daniela Salas, Dora Yurany Sánchez, Germán Achury, Fabio Escobar-Díaz</i> .....	121

## Brief communication

Natural infection with <i>Trypanosoma cruzi</i> in bats captured in Campeche and Yucatán, México <i>Marco Torres-Castro, Naomi Cuevas-Koh, Silvia Hernández-Betancourt, Henry Noh-Pech, Erendira Estrella, Belén Herrera-Flores, Jesús A. Panti-May, Etienne Waleckx, Javier Sosa-Escalante, Ronald Peláez-Sánchez</i> .....	131
---	-----

## Editorial

### La Parasitología en Colombia: una visión panorámica

«Serré, fourmillant, comme un million d'helminthes,  
dans nos cerveaux ribote un peuple de Démons,  
et, quand nous respirons, la Mort dans nos poumons  
descend, fleuve invisible, avec de sourdes plaintes».  
*Au lecteur, Les fleurs du mal*, Charles Baudelaire (1821-1867)

«Oprimido, hormigueante, como un millón de helmintos,  
en nuestros cerebros bulle un pueblo de Demonios,  
y, cuando respiramos, la Muerte a los pulmones  
desciende, río invisible, con sordas quejas».  
*Al lector, Las flores del mal*, Charles Baudelaire (1821-1867)

En Colombia, las enfermedades tropicales endémicas, entre ellas las parasitosis humanas, han sido de interés como problemas de salud pública y como objeto de investigación desde comienzos del siglo XX hasta la fecha. El Instituto Nacional de Salud fue una de las instituciones pioneras en este campo, al desarrollar investigaciones y generar conocimiento científico, lo cual ha contribuido a comprender mejor la epidemiología de las enfermedades parasitarias en el país y a mejorar sus programas de control.

Entre los científicos colombianos que pueden ser considerados como precursores de la Parasitología en Colombia, se encuentran nombres ilustres que dejaron su huella en el Instituto, como César Uribe Piedrahita, Santiago Renjifo, Hernando Groot, Ernesto Osorno Mesa, Augusto Gast Galvis, Carlos Sanmartín Barberi y Augusto Corredor Arjona. Entre sus muchas contribuciones cabe destacar la demostración por primera vez de la existencia de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* en Colombia (1), el reporte del primer caso de leishmaniasis visceral en el país (2), el estudio de tripanosomas humanos y de animales (3), el primer estudio sobre la distribución de los triatominos domiciliarios vectores de la enfermedad de Chagas (4), y las primeras encuestas nacionales de prevalencia de toxoplasmosis (5) y de parasitismo intestinal (6).

En la segunda mitad del siglo XX, particularmente a partir de la década de 1960, surgieron en el país centros e institutos de investigación en Parasitología y Medicina Tropical vinculados a instituciones o a universidades públicas o privadas, como el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud, el Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical de la Universidad de los Andes, el Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales de la Universidad Industrial de Santander, el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, el Instituto Colombiano de Medicina Tropical, la Corporación para Investigaciones Biológicas, el Programa para el Estudio y Control de las Enfermedades Tropicales de la Universidad de Antioquia, el Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical de la Universidad del Tolima y el Grupo de Investigación en Parasitología Molecular de la Universidad

#### Citación:

Duque S, Arévalo A, Nicholls RS. La Parasitología en Colombia: una visión panorámica. *Biomédica*. 2021;41(Supl.1):5-7.

del Quindío, entre otros. Por otro lado, en 1965, se fundó la Asociación Colombiana de Parasitología y Medicina Tropical que congrega a los investigadores de esta área del conocimiento de estas organizaciones.

Todos estos centros, que gozan de reconocimiento nacional e internacional, han contribuido a la comprensión de las parasitosis, al conocimiento de sus agentes etiológicos, su ciclo de vida, su transmisión, su diagnóstico parasitológico, serológico y por detección de antígenos mediante diferentes metodologías que han evolucionado a lo largo del tiempo, desde los métodos parasitológicos hasta incorporar las aplicaciones de la biología molecular, la proteómica y la genómica. Asimismo, han enriquecido el conocimiento de sus manifestaciones clínicas, su terapéutica, los aspectos epidemiológicos, los factores de riesgo, y las intervenciones de prevención y control.

Las alianzas interdisciplinarias dentro de las instituciones y entre ellas –a nivel nacional e internacional– han permitido el desarrollo de la Parasitología y el entendimiento de los parásitos desde diferentes puntos de vista científicos, así como una aproximación integral a las parasitosis. Cabe destacar que los centros de investigación han colaborado con el Ministerio de Salud y Protección Social, así como con las autoridades departamentales y municipales de salud, para fortalecer los programas de control y eliminación de las parasitosis humanas, con el propósito de beneficiar a las poblaciones expuestas y vulnerables.

Las enfermedades parasitarias están íntimamente relacionadas con la pobreza y las deficientes condiciones de vida, como la falta de acceso al agua potable, al saneamiento básico, a la vivienda adecuada y a la educación. La mayoría de ellas se clasifican entre las enfermedades tropicales desatendidas y perpetúan el círculo vicioso de pobreza y enfermedad, porque contribuyen a disminuir la capacidad productiva y los ingresos de las personas afectadas y de sus familias. En algunos casos, como en los de las geohelmintiasis, la enfermedad de Chagas y la toxoplasmosis, las consecuencias crónicas de la infección durante la infancia se manifiestan en la adolescencia o en la edad adulta. Es evidente la relación de la malaria con algunas actividades ilícitas que se ejercen en ambientes selváticos, como la minería ilegal o el cultivo y procesamiento de la hoja de coca. El conflicto armado contribuyó al aumento de casos y a la aparición de brotes de algunas de estas enfermedades, como la leishmaniasis cutánea.

La recesión, el desempleo y el aumento de la pobreza –desastrosas consecuencias sociales y económicas de la pandemia del Covid-19– han deteriorado aún más las condiciones de vida de las poblaciones vulnerables y, en consecuencia, puede darse a mediano plazo un aumento de la incidencia y la prevalencia de las parasitosis endémicas.

El control o la eliminación de las enfermedades parasitarias y desatendidas requieren de un manejo integral que incluya los factores sociales y ambientales determinantes de la salud. Las ciencias de la Parasitología clásica y molecular deben complementarse, no solamente con otras ciencias biológicas y de la salud, sino también con las ciencias humanas y sociales. Solo así es posible lograr un control sostenible de las parasitosis endémicas que, además, contribuya a mejorar el nivel de vida de las poblaciones bajo riesgo.

Como todos los países miembros de la Organización de las Naciones Unidas, Colombia está comprometida con el logro de los objetivos de

desarrollo sostenible para el 2030. El objetivo 3, “Garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades” (7), incluye como una de sus metas la eliminación de la malaria y las enfermedades tropicales desatendidas. Siendo conscientes del impacto negativo que la pandemia ha tenido sobre los programas de control de las enfermedades parasitarias, una vez superada esta, uno de los mayores desafíos será el de recuperar el tiempo y los avances perdidos e intensificar las intervenciones para alcanzar la meta del objetivo 3 en el 2030.

Sofía Duque

Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia  
sduque@ins.gov.co

Adriana Arévalo

Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia  
aarevalo@ins.gov.co

Rubén Santiago Nicholls

Investigador Emérito, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia  
rsnichollso@gmail.com

## Referencias

1. Uribe C. Infección del *Rhodnius prolixus* (Sathl) por *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*. Bogotá: Editorial Minerva; 1929.
2. Gast A, Renjifo S. Leishmaniasis visceral. Estudio epidemiológico del primer caso diagnosticado en Colombia. Anales de la Sociedad de Biología de Bogotá. 1944;1-8.
3. Uribe C, Renjifo S, Groot H. Contribución al estudio de *Trypanosomas* humanos y de animales en Colombia. Revista de Higiene. 1949;34:3-95.
4. Corredor A, Santacruz MM, Páez S, Guatame LA. Distribución de los triatominos domiciliarios en Colombia. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 1990.
5. Juliao O, Corredor A, Moreno GS. Toxoplasmosis en Colombia. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 1988.
6. Corredor A, Arciniegas E. Parasitismo intestinal. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2000.
7. Organización de las Naciones Unidas. La Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible: una oportunidad para América Latina y el Caribe (LC/G.2681-P/Rev.3), Santiago: Organización de las Naciones Unidas; 2018. Fecha de consulta: 29 de mayo de 2021. Disponible en: <https://bibliotecadigital.ccb.org.co/handle/11520/23423>

## Reporte de caso

# Tungiasis en el área urbana de Popayán, Colombia: reporte de caso

Alicia Ortega-Narváez<sup>1</sup>, Luis Reinel Vásquez-Arteaga<sup>2</sup>, Olga Cujar-Otero<sup>3</sup>, Jehyson Madroñero-Daza<sup>4</sup>, Ginna Cabra-Bautista<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Lactancia Materna y Alimentación Complementaria, Departamento de Pediatría, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia

<sup>2</sup> Centro de Estudios en Microbiología y Parasitología - CEMPA, Departamento de Medicina Interna, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia

<sup>3</sup> Departamento de Pediatría, Hospital Susana López de Valencia, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia

<sup>4</sup> Secretaría de Salud Municipal, Popayán, Colombia

La tungiasis es una ectoparasitosis endémica en Latinoamérica y está asociada a factores de riesgo como la ruralidad, la pobreza y la convivencia con animales. Popayán, una ciudad al suroccidente de Colombia, fue históricamente afectada por la tungiasis, tanto así que a sus habitantes los apodan “patojos” debido a la forma de caminar de sus habitantes infestados por la pulga. Hoy la enfermedad se creía eliminada.

Se presenta el caso de un niño de 12 años procedente del área urbana de Popayán, que consultó por lesiones papulares de bordes circulares, centro negruzco y halo hiperqueratósico en ambos pies, de un mes de evolución. Por los hallazgos clínicos se sospechó tungiasis y se le administró ivermectina. Las lesiones se removieron quirúrgicamente y se enviaron para análisis parasitológico, el cual confirmó la presencia de *Tunga penetrans*. La evolución del paciente fue satisfactoria. La Secretaría de Salud Municipal de Popayán inspeccionó el domicilio del paciente y encontró perros migrantes del Pacífico colombiano en sus alrededores, algunos con lesiones sospechosas de tungiasis. Se documenta, así, el resurgimiento de esta enfermedad en el área urbana, probablemente debido a la migración de animales desde las zonas rurales. Es importante reconocer la existencia de la pulga en zonas rurales y urbanas, hacer el diagnóstico médico y reportar los casos a los entes de vigilancia. Estas acciones permitirán ofrecer un apropiado manejo y control sanitario de esta ectoparasitosis desatendida en humanos y animales.

**Palabras clave:** *Tunga*; tungiasis; parásitos; Colombia.

## Tungiasis in the urban area of Popayán, Colombia: A case report

Tungiasis is an endemic ectoparasitosis in Latin America associated with risk factors such as rurality, poverty, and living with animals. In Popayán, a city in southwest Colombia, the disease was highly prevalent in the past, to such degree that its inhabitants were given the nickname of *patojo*, a word that describes the way of walking of people infested by the flea. However, it was believed eradicated at present.

We present the case of a 12-year-old boy living in the urban area of Popayán, who presented with a one-month history of papular lesions with circular edges, blackish center, and hyperkeratotic halo on both feet. Tungiasis was suspected based on the clinical findings and ivermectin was administered. The lesions were surgically removed and sent for parasitological analysis, which confirmed the presence of *Tunga penetrans*. The patient evolved satisfactorily. The *Secretaría de Salud Municipal de Popayán* carried out an inspection of the patient's home where migrant dogs from the Colombian Pacific were found in the surroundings, some with suspicious lesions of tungiasis.

We document here the resurgence of this pathology in urban areas, probably secondary to the migration of animals from rural areas. It is important to recognize the existence of the flea in rural and urban areas, make a medical diagnosis, and report cases to the surveillance entities to enable appropriate management and sanitary control of this neglected ectoparasitosis in humans and animals.

**Keywords:** *Tunga*; tungiasis; parasites; Colombia.

La tungiasis es una ectoparasitosis desatendida que afecta la piel y es producida por la hembra de *Tunga penetrans*. Esta pulga también se conoce como “nigua” (Argentina, Ecuador, Venezuela, Colombia y el Caribe), “pique” (Argentina, Chile, Uruguay y Paraguay), “chica” (Colombia y Venezuela), “kuti” (Bolivia) o “bicho do pé” (Brasil) (1-7). Es una enfermedad endémica en el África subsahariana, el Caribe y América Latina, donde tradicionalmente

**Recibido:** 06/10/2020

**Aceptado:** 31/01/2021

**Publicado:** 16/02/2021

### Citación:

Ortega-Narváez A, Vásquez-Arteaga LR, Cujar-Otero O, Madroñero-Daza J, Cabra-Bautista G. Tungiasis en el área urbana de Popayán, Colombia. *Biomédica*. 2021;41(Supl. 1): 8-16.  
<https://doi.org/10.7705/biomedica.5851>

### Correspondencia:

Alicia Andrea Ortega, Carrera 6B No 29AN-12, Barrio Alicante, Popayán, Colombia  
Teléfono: (316) 526 6537  
aliortega@unicauca.edu.co

### Contribución de los autores:

Todos los autores contribuyeron por igual a la revisión del caso y la literatura, y a la redacción y revisión crítica del manuscrito.

### Financiación:

El estudio se financió con recursos propios.

### Conflicto de intereses:

Los autores declaramos no tener conflictos de intereses.

se ha asociado a poblaciones que viven en zonas rurales en condiciones marginales y precarias. En las comunidades endémicas, la prevalencia puede llegar hasta el 30 % en la población general y el 85 % en los niños (3,8,9).

La tungiasis era común en Colombia. No obstante, su incidencia disminuyó gracias a factores como la aplicación de insecticidas, las mejoras en las viviendas y el uso de calzado (2). Hay tres publicaciones de casos de tungiasis en el país que describen pacientes de regiones rurales o selváticas o en condiciones de precariedad; dos corresponden a reportes de caso de pacientes provenientes de áreas rurales (10,11) y la otra es una serie de casos de indígenas de la región amazónica (12).

Popayán es una ciudad del suroccidente de Colombia que fue históricamente muy afectada por la tungiasis, pero ante la ausencia de casos reportados, actualmente la enfermedad se creía eliminada en el área urbana.

Se presenta el caso de un niño de 12 años procedente del área urbana de Popayán, con lo cual se documenta la persistencia de la enfermedad en la región, no solo en condiciones de ruralidad y pobreza, sino también en áreas urbanas con adecuadas condiciones de higiene.

### **Caso clínico**

Se trata de un niño de 12 años, originario y procedente de Popayán, que consultó por presentar lesiones cutáneas no pruriginosas ni supurativas en ambos pies, de un mes de evolución. El niño tenía antecedentes de asma y rinitis alérgica y su esquema de inmunizaciones estaba completo. El paciente residía en una casa del área urbana de Popayán, construida con cemento y piso de baldosa, convivía con sus padres, un hermano y dos perros; ninguno presentaba lesiones similares. En la región posterior de la casa, había un patio de tierra con algunos cerdos con los que el paciente no había tenido contacto. La familia tenía buenas prácticas de higiene, usaban calzado dentro de la casa la mayor parte del tiempo, contaban con todos los servicios públicos y un adecuado acceso a la atención en salud. No habían realizado viajes a áreas rurales recientemente, pero la madre refirió haber presentado tungiasis diez años atrás.

En el examen físico se evidenciaron tres lesiones papulares con un halo blanquecino y un punto negro central: una en el borde ungular del segundo dedo del pie derecho (figura 1), otra en el borde ungular del quinto dedo del pie izquierdo (figura 2) y otra en la planta del pie izquierdo (figura 3). No había dolor a la palpación, ni sangrado o supuración.

Con base en las características clínicas, se diagnosticó tungiasis, se le administró una dosis única de ivermectina de 200 µg/kg y se le hizo la extracción quirúrgica de las lesiones, las cuales se enviaron a estudio. El análisis parasitológico confirmó la presencia de restos de hembras adultas de *T. penetrans*, con huevos en su interior (figuras 4 y 5).

El manejo del caso se complementó con un estudio de campo adelantado por el servicio de sanidad ambiental de la Secretaría de Salud Municipal de Popayán, en el cual se determinó que se trataba del primer caso confirmado de tungiasis en la historia de Popayán. Se visitó el domicilio del paciente y se encontró que había cerdos y perros en buen estado de salud y sin lesiones de tungiasis. En los alrededores del domicilio, se encontraron granjas porcícolas y sobrepoblación de perros (más de uno por cada 10 habitantes), algunos de ellos procedentes de zonas rurales del Pacífico colombiano.

Los perros evaluados presentaban lesiones eritematosas y pruriginosas en las almohadillas interdigitales anteriores, sugestivas de *T. penetrans* por su localización anatómica, aunque esto no se confirmó mediante el diagnóstico parasitológico.

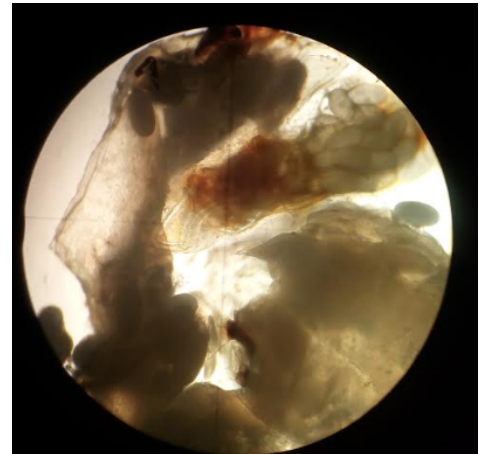
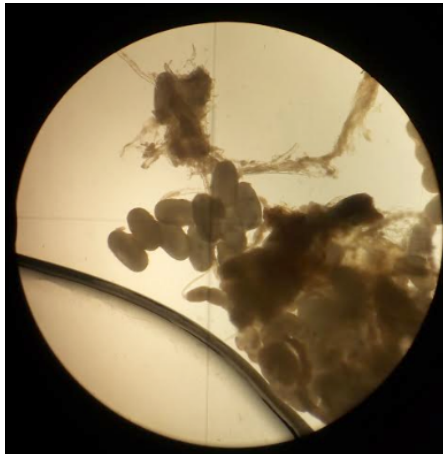
Al mes de la consulta inicial, el paciente fue valorado en un control y se evidenció la resolución total del cuadro, descartándose la presencia de nuevas lesiones. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de la madre del paciente para la publicación de este informe del caso y de las imágenes.



**Figuras 1 y 2.** Lesión típica de tungiasis en estadio 3a. Se observa una pápula translúcida con borde bien definido y circular, y en el centro, un área puntiforme color negro y halo hiperqueratósico.



**Figura 3.** Lesión típica de tungiasis en estadio 5. Se observa una pápula circular difusa, desecada, con punto negro central cubierto de costra



**Figuras 4 y 5.** Restos de *Tunga penetrans*. Se observan el vientre y la cloaca del parásito, con presencia de huevos en el interior y exterior. Sin coloración, 4X.

### Discusión

Se trata del primer reporte que confirma clínica y parasitológicamente la existencia de tungiasis en Popayán, una región tradicionalmente afectada, en la que la presencia de la enfermedad se había informado únicamente en documentos de historia y en su tradición oral (4,6,7). El sobrenombre de las gentes de Popayán es "patojo", término que



alude a personas con los pies torcidos o cojos, cuya forma de caminar imita la de los patos. *Tunga penetrans*, más conocida en la región como “nigua”, era muy frecuente en la ciudad y al introducirse en los pies impedía que los afectados caminaran normalmente, lo que dio origen al gentilicio (3,4,6,7).

El filósofo y escritor José Néstor Valencia Zuluaga relataba en su artículo “Nuestro pasado con las niguas” que, en su tesis de 1937, el médico francés Pierre Crouchet recogía cómo había constatado más de dos mil casos de tungiasis en Popayán, proponiendo que las niguas estaban relacionadas con la inteligencia de los “patojos”, información cuya fuente no pudo encontrarse (4).

La historia también cuenta que “Don Quijote de la Mancha” se habría escrito gracias a las “niguas”. Se dice que Cervantes se enfermó de tungiasis tras convivir con un amigo que llegó de Popayán infestado de pulgas; estas le habrían ocasionado a Cervantes un estado febril tan intenso que lo hizo imaginar las locas aventuras de su personaje (4).

La tungiasis influyó sobre la arquitectura y la cultura de esta ciudad colombiana conocida como la “Ciudad Blanca”. Todas las paredes de su centro histórico son blancas debido a que en la época en que las niguas abundaban se pintaron las fachadas con cal para erradicarlas. Además, eran frecuentes las piedras marfileñas incrustadas en las esquinas de las casas del centro de la ciudad, las cuales servían a sus habitantes para rascarse los pies (figura 6), tal como lo señala Horacio Dorado: “Era costumbre rascarse en las piedras de las calles” (7).



**Figura 6.** Piedras marfileñas en las esquinas de Popayán que servían a sus habitantes para rascarse y calmar el prurito producido por la tungiasis

Con el desarrollo de la ciudad, la pavimentación de carreteras, los insecticidas y el uso de calzado, la carga de tungiasis fue disminuyendo (4,6). El historiador Octavio Hernández Jiménez escribía: "A finales del siglo XX se habían habilitado los subterráneos con nuevos cuartos o viviendas, se habían pavimentado y ya no había terneros, vacas, perros o gallinas para guardar, se acabaron del todo las niguas" (6). Según estos relatos, la tungiasis parecía ser una enfermedad ya extinta en la ciudad de los patojos. Sin embargo, el caso descrito nos muestra lo contrario.

### **Epidemiología**

La tungiasis es una ectoparasitosis endémica en Latinoamérica; no obstante, en Colombia no hay datos sobre su frecuencia a nivel nacional. Solo se encontró un estudio en una población indígena amazónica que reportó una incidencia de tungiasis de 3 a 8 casos por cada 1.000 indígenas y compromiso del 62 % de los perros (2).

La prevalencia por edad sigue una distribución en forma de S, con un pico en niños entre 5 y 14 años y otro en ancianos (8). El paciente reportado se encontraba en el rango de edad considerado como pico para la tungiasis.

Los factores de riesgo típicos de la enfermedad incluyen la residencia en áreas rurales o costeras, la pobreza, el habitar en casas con piso de arena o tierra o caminar sobre suelos de tierra o arena, el no usar calzado, la mala higiene, el abandono social, y la falta de educación y de atención en salud (2,13). Contrario a ello, el paciente que reportamos vivía en una zona urbana en la que no se evidenciaban estos factores.

La tungiasis afecta un amplio espectro de animales, tales como perros, gatos, cerdos, vacas y ratas, por lo que los patrones de cohabitación entre animales y humanos tienen un papel fundamental en la dinámica local de transmisión de la enfermedad. Feldmeier, *et al.*, plantean el control de los criaderos y reservorios animales como estrategia para combatirla (8). En ciudades intermedias como Popayán, es frecuente encontrar patrones de convivencia con ganado bovino y porcino y con otros animales, factor que estuvo presente en el caso reportado, aunque en el domicilio del niño los animales se encontraban sanos. De todas maneras, dicha convivencia podría propiciar la transmisión de la enfermedad en este tipo de ciudades.

En algunos estudios en África se ha evidenciado que la tungiasis ha empezado a extenderse más allá de las áreas rurales como consecuencia de la construcción de carreteras y el aumento de la movilidad humana, lo que ha permitido que *T. penetrans* viaje largas distancias desde el área rural hasta las urbes; además, la movilización de los reservorios animales ha sido clave para esto (8). Este mecanismo podría explicar el probable resurgimiento actual de la tungiasis en el área urbana de Popayán, ya que el análisis de campo evidenció la migración de perros del área rural hacia la zona urbana, los cuales podrían actuar como reservorios de *T. penetrans* y transmitir la enfermedad a animales y humanos de la ciudad.

### **Clínica**

Las manifestaciones de la tungiasis están asociadas con el ciclo de vida de la pulga hembra dentro del huésped. Cerca del 99 % de las lesiones ocurre en los pies debido a que la pulga salta un máximo de 20 cm y los sitios más afectados son las regiones periungulares, los pliegues interdigitales y las plantas (9,13,14). Las lesiones incluyen pápulas, nódulos o placas únicas o múltiples, grisáceas o

marrones, caracterizadas por una triada clínica clásica que comprende un punto negro central, correspondiente a la cloaca, un halo translúcido alrededor, que es el abdomen lleno de huevos, y un área de hiperqueratosis periférica como reacción al cuerpo extraño en la piel circundante (14-16).

La reacción inflamatoria que se desarrolla alrededor de la pulga enterrada es la causante de la sintomatología de la tungiasis, caracterizada por eritema, edema, prurito, dolor y calor locales, la cual, a medida que progresa, aumenta la frecuencia de la sobreinfección bacteriana (8,13). La llamada clasificación de Fortaleza, propuesta en el 2013, describe la historia natural de la tungiasis humana y la divide en cinco etapas (14). Según esta clasificación, en el presente caso las lesiones se encontraban en estadio 3a (figuras 1 y 2) y 5 (figura 3).

### **Complicaciones**

La tungiasis es una enfermedad que puede generar gran morbilidad, aguda y crónica. Algunas de las complicaciones más frecuentes son abscesos, úlceras profundas, flemones, linfangitis, osteomielitis, neuritis ascendente, fascitis, gangrena y sepsis, y su asociación con micosis profundas y tétanos. Puede llevar a la necrosis de tejidos blandos, de ligamentos o de huesos, y provocar la autoamputación de los dedos con la consecuente deformidad y alteración de la marcha (8,13,14,17).

La tungiasis grave es común en áreas con gran frecuencia de reinfección, en donde las condiciones de higiene son precarias, y es más frecuente en niños y ancianos (8,9). Es una enfermedad que puede generar discapacidad y pérdida de la calidad de vida (8,9,14). Afortunadamente, el paciente reportado cursó con una enfermedad leve y no tuvo ninguna complicación.

### **Diagnóstico**

El diagnóstico se hace con base en los hallazgos clínicos a partir de la morfología y la topología de las lesiones, teniendo en cuenta los posibles factores de riesgo y la historia natural de la enfermedad (14). Mediante dermatoscopia, se puede visualizar la triada clínica clásica característica, el exoesqueleto y, en ocasiones, los huevos de la pulga (16).

El diagnóstico histopatológico no está indicado de forma rutinaria. Sin embargo, se puede hacer biopsia de las lesiones, la cual puede evidenciar en el tejido áreas de hiperqueratosis, paraqueratosis, acantosis y espongirosis; a veces, es posible visualizar la morfología de la pulga y sus huevos (9,14,18). En este paciente se logró el diagnóstico parasitológico y se observaron *T. penetrans* adultas con huevos en su interior.

Entre los diagnósticos diferenciales se encuentran verrugas, infecciones y abscesos piógenos, micosis profundas, paroniquia aguda, reacción a cuerpo extraño, escabiosis, miasis, larva *migrans*, melanoma, quiste dermoide y mordedura o picadura de otros artrópodos (2,18).

### **Tratamiento**

El tratamiento definitivo es la extracción quirúrgica de las lesiones, procedimiento que debe llevarse a cabo bajo condiciones de asepsia y tan pronto se haga el diagnóstico, por el riesgo de sobreinfección bacteriana; además, deben retirarse todas las lesiones completamente, pues la persistencia de cualquier resto provoca una reacción inflamatoria intensa. En las áreas rurales, es común el uso de métodos de extracción no estériles, con instrumentos como agujas y espinas (9,14,18).

Tras la extracción, se recomienda aplicar un antibiótico tópico para evitar la sobreinfección bacteriana (9,18). Además, existe riesgo de infección por *Clostridium tetani* debido a que *T. penetrans* puede recoger esporas de estas bacterias, que también pueden adquirirse en extracciones que no se hacen con la debida asepsia, por lo cual en algunas publicaciones se recomienda aplicar profilaxis para tétanos a aquellos pacientes infectados que no hayan sido vacunados (2,8,9,18). En el caso reportado, se empleó un método de extracción estéril y el niño tenía su esquema completo de vacunación, por lo que no fue necesaria la aplicación del toxoide tetánico.

Ningún medicamento ha demostrado ser efectivo en el tratamiento de la tungiasis (9,13). La ivermectina se ha empleado ampliamente con base en la observación anecdótica de su efectividad; sin embargo, en un estudio clínico aleatorizado, se documentó que el uso de ivermectina no era más efectivo que el placebo (19). En estudios recientes se ha evaluado la efectividad del tratamiento tópico con una dimeticona conocida como NYDA™, con resultados esperanzadores. La dimeticona se aplica sobre el cono abdominal trasero de la pulga que sobresale por encima de la piel, ya que allí terminan y empiezan varios sistemas vitales del parásito, con lo que se ataca sus sistemas respiratorio, digestivo y genital (3). La tungiasis es una enfermedad desatendida y falta evidencia sobre este tipo de tratamiento. En el paciente reportado, las lesiones mejoraron tras la extracción total, aunque también recibió una dosis de ivermectina.

### **Prevención**

La prevención basada en la mejora de las condiciones de vida y el control de los factores de riesgo modificables son los únicos medios disponibles para combatir la transmisión y la infestación (8,9). En un estudio en la Amazonia colombiana, se demostró que el cambio de piso de tierra por piso sólido, la humectación y rociado con piretroides, más un tratamiento simultáneo y oportuno de humanos y reservorios, han dado resultados favorables en la población intervenida (2). El uso de calzado cerrado es una buena medida en aquellas poblaciones en donde no es frecuente usarlo, así como la autoexploración diaria para detectar lesiones incipientes; estas medidas son factores de protección que disminuyen la presencia de tungiasis (20). En otros estudios se ha evaluado la efectividad del Zanzarin™, un repelente de origen vegetal que contiene aceite de coco, extracto de jojoba y *Aloe vera*, el cual reduce la tasa de ataque, la intensidad de la infestación y la morbilidad asociadas con la tungiasis (21,22).

### **Conclusión**

Se presenta el caso de un paciente con tungiasis, procedente de un área urbana, lo que evidencia el resurgimiento de la enfermedad en la ciudad, probablemente por la migración de animales desde zonas rurales.

Es posible que exista un subregistro de esta enfermedad y de su reporte a los entes de vigilancia, debido al desconocimiento que hay sobre ella y la falta de sospecha diagnóstica. Es necesario implementar acciones para un manejo adecuado de esta condición tanto en humanos como en animales, así como brindar educación en la prevención, hacer búsqueda activa de los focos de tungiasis en áreas urbanas y llevar a cabo el control sanitario. En este reporte se demuestra el resurgimiento de la tungiasis en la ciudad de los “patojos” y, probablemente, en otras urbes.

## Agradecimientos

A la Secretaría de Salud Municipal de Popayán.

## Referencias

1. Maco V, Tantaleán M, Gotuzzo E. Evidence of tungiasis in pre-hispanic America. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:1-16. <http://doi.org/10.3201/eid1705.100542>
2. Miller H, Rodríguez G. Tungiasis en población indígena del departamento de Vaupés: epidemiología, clínica, tratamiento y prevención. *Biomédica.* 2010;30:215-37. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v30i2.185>
3. Miller H, Trujillo-Trujillo J, Mutebi F, Feldmeier H. Efficacy and safety of dimeticone in the treatment of epidermal parasitic skin diseases with special emphasis on tungiasis: An evidence-based critical review. *Brazilian J Infect Dis.* 2020;24:170-7. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.01.004>
4. Valencia JN. Nuestro pasado con las niguas. *Ánfora.* 1994;2:42-4. <https://doi.org/10.30854/anf.v2.n3.1994.493>
5. Muehlen M, Heukelbach J, Wilcke T, Winter B, Mehlhorn H, Feldmeier H. Investigations on the biology, epidemiology, pathology and control of *Tunga penetrans* in Brazil: II. Prevalence, parasite load and topographic distribution of lesions in the population of a traditional fishing village. *Parasitol Res.* 2003;90:449-55. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0877-7>
6. Hernández O. De niguas, pulgas y chinches. Fecha de consulta: 1 de septiembre de 2020. Disponible en: <https://www.espaciosvecinos.com/rastros/de-niguas-pulgas-y-chinches/>
7. Dorado H, Alarcón AM. Popayán en Columnas de Papel. Primera edición. Popayán: Dorado H; 2009. p. 83-5.
8. Feldmeier H, Heukelbach J, Ugbomoiko US, Sentongo E, Mbabazi P, von Samson-Himmelstjerna G, et al. Tungiasis—A neglected disease with many challenges for global public health. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e3133. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003133>
9. Heukelbach J. Revision on tungiasis: Treatment options and prevention. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2006;4:151-7. <https://doi.org/10.1586/14787210.4.1.151>
10. Herrera SE, Ochoa A, Escobar M, Correa LA. Tungiasis - reporte de un caso. *Rev Asoc Colomb Dermatol.* 2004;12:63-6.
11. Díaz CJ, Escandón-Vargas K. Tungiasis in a Colombian patient. *Brazilian J Infect Dis.* 2017;21:484-5. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.12.010>
12. Miller H, Ocampo J, Ayala A, Trujillo J, Feldmeier H. Very severe tungiasis in Amerindians in the Amazon lowland of Colombia: A case series. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13:1-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007068>
13. Feldmeier H, Sentongo E, Krantz I. Tungiasis (sand flea disease): A parasitic disease with particular challenges for public health. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;32:19-26. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1725-4>
14. Eisele M, Heukelbach J, van Marck E, Mehlhorn H, Meckes O, Franck S, et al. Investigations on the biology, epidemiology, pathology and control of *Tunga penetrans* in Brazil: I. Natural history of tungiasis in man. *Parasitol Res.* 2003;90:87-99. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0817-y>
15. Hoon KS, Fernández MF, Buján MM, Cervini AB, Laffargue J, Pierini AM. Tungiasis. Presentación de un caso clínico. *Arch Argent Pediatr.* 2011;109:e82-4. <https://doi.org/10.5546/aap.2011.e82>
16. Criado PR, Landman G, Reis VMS, Belda W Jr. Tungiasis under dermoscopy: *In vivo* and *ex vivo* examination of the cutaneous infestation due to *Tunga penetrans*. *An Bras Dermatol.* 2013;88:649-51. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20132071>
17. Kehr JD, Heukelbach J, Mehlhorn H, Feldmeier H. Morbidity assessment in sand flea disease (tungiasis). *Parasitol Res.* 2007;100:413-21. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0348-z>
18. Heukelbach J. Tungiasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2005;47:307-13. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652005000600001>
19. Heukelbach J, Franck S, Feldmeier H. Therapy of tungiasis: A double-blinded randomized controlled trial with oral ivermectin. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99:873-6. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000800015>

20. Tomczyk S, Deribe K, Brooker SJ, Clark H, Rafique K, Knopp S, *et al.* Association between footwear use and neglected tropical diseases: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e3285. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003285>
21. Thielecke M, Raharimanga V, Rogier C, Stauss-Grabo M, Richard V, Feldmeier H. Prevention of tungiasis and tungiasis-associated morbidity using the plant-based repellent zanzarin: A randomized, controlled field study in rural Madagascar. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:e2426. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002426>
22. Buckendahl J, Heukelbach J, Ariza L, Kehr JD, Seidenschwang M, Feldmeier H. Control of tungiasis through intermittent application of a plant-based repellent: An intervention study in a resource-poor community in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e879. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000879>

Case report

## Chronic *Cystoisospora belli* infection in a Colombian patient living with HIV and poor adherence to highly active antiretroviral therapy

Ana Luz Galván-Díaz<sup>1</sup>, Juan Carlos Alzate<sup>2,3</sup>, Esteban Villegas<sup>3</sup>, Sofía Giraldo<sup>3</sup>, Jorge Botero<sup>2,4</sup>, Gisela García-Montoya<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Microbiología Ambiental, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Unidad de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas- Universidad de Santander, Medellín, Colombia

<sup>3</sup> Unidad de Investigación Clínica, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia

<sup>4</sup> Grupo de Parasitología, Facultad de Medicina; Corporación Académica para el Estudio de las Patologías Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>5</sup> Centro Nacional de Secuenciación Genómica, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

**Received:** 07/12/2020

**Accepted:** 26/04/2021

**Published:** 27/04/2021

**Citation:**

Galván-Díaz AL, Alzate JC, Villegas E, Giraldo S, Botero J, García-Montoya G. Chronic *Cystoisospora belli* infection in a Colombian patient living with HIV and poor adherence to highly active antiretroviral therapy. *Biomédica*. 2021;41(Supl.1):17-22. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5932>

**Corresponding author:**

Ana Luz Galván-Díaz, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Ciudad Universitaria, Calle 67 No 53-108, bloque 5-410, Medellín, Colombia  
Teléfono: (574) 219 5495  
[ana.galvan@udea.edu.co](mailto:ana.galvan@udea.edu.co)

**Author contributions:**

Ana Luz Galván-Díaz and Juan Carlos Alzate: description of the case, analysis and discussion of the information  
Esteban Villegas and Sofía Giraldo: clinical patient care and description of the case  
Jorge Botero: description of the case and analysis of the information  
Gisela García-Montoya: analysis and discussion of the information  
All authors participated in the preparation and edition of the manuscript.

**Funding:**

This work was supported by the Colombian *Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación*. *Colciencias Grant (Convocatoria para Proyectos de Ciencia, Tecnología e Innovación en Salud 2017-Project ID 1115-777-57608)*.

**Conflicts of interest:**

The authors declare no conflict of interest.

*Cystoisospora belli* is an intestinal Apicomplexan parasite associated with diarrheal illness and disseminated infections in humans, mainly immunocompromised individuals such as those living with the human immunodeficiency virus (HIV) or acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). An irregular administration of highly active antiretroviral therapy (HAART) in HIV patients may increase the risk of opportunistic infections like cystoisosporiasis. We describe here a case of *C. belli* infection in a Colombian HIV patient with chronic gastrointestinal syndrome and poor adherence to HAART. His clinical and parasitological cure was achieved with trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. Although a reduction in the number of *C. belli* cases has been observed since the use of HAART, this parasite still has to be considered as a differential diagnosis of diarrheal disease in HIV/AIDS patients. Effective interventions enhancing adherence to HAART should be included in HIV patient care programs.

**Keywords:** Apicomplexa; diarrhea; HIV; acquired immunodeficiency syndrome; antiretroviral therapy, highly active; Colombia.

### Infeción crónica por *Cystoisospora belli* en un paciente colombiano con HIV y cumplimiento deficiente de la terapia antirretroviral de gran actividad

*Cystoisospora belli* es un parásito intestinal del filo Apicomplexa asociado con enfermedades diarreicas e infecciones diseminadas en humanos, principalmente en individuos inmunocomprometidos, como aquellos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) o el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida). El cumplimiento inadecuado de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) puede aumentar el riesgo de infecciones oportunistas, incluida la cistoisosporiasis. Se describe el caso de infección por *C. belli* en un paciente colombiano con HIV, que presentó un síndrome gastrointestinal crónico e incumplía el tratamiento con la TARGA. Después del diagnóstico parasitológico, el paciente fue tratado con trimetoprim-sulfametoxazol, lográndose la recuperación clínica y la cura parasitológica. Aunque se ha observado una reducción en el número de casos de *C. belli* desde la implementación de la TARGA, este parásito aún debe considerarse en el diagnóstico diferencial de las enfermedades diarreicas en pacientes con HIV/sida. Los programas de atención deben incluir intervenciones efectivas que potencien el cumplimiento de la TARGA en estos pacientes.

**Palabras clave:** Apicomplexa; diarrea; VIH; síndrome de inmunodeficiencia adquirida; terapia antirretroviral altamente activa; Colombia.

*Cystoisospora belli* is an obligate intracellular Apicomplexan parasite from the family Sarcocystidae responsible for human cistoisosporiasis, an intestinal cosmopolitan infection that is more frequent in tropical and subtropical regions (1-3). Although it was originally described in the genus *Isoospora*, the identification of morphological, biological, and genetic differences between species from nonmammalian and mammalian hosts led to the creation of the genus *Cystoisospora* (4), which includes mammalian species with facultative heteroxeny, oocysts containing two sporocysts with four sporozoites each, no Stieda bodies in sporocysts, and the ability to produce monozytic tissue cysts in intermediate or paratenic hosts (1,5,6).

*Cystoisospora belli* has a fecal-oral transmission cycle (3). Human hosts become infected through the ingestion of sporulated oocysts present in water or contaminated food. After consumption, the oocysts excyst in the small bowel and release sporozoites which invade enterocytes where the parasite multiplies asexually (endodyogeny) and sexually within the parasitophorous vacuole (2,3,7). *Cystoisospora belli* can also infect epithelial cells of bile ducts and gallbladder, especially in severely immunocompromised patients. Its life cycle is completed by the generation of an immature oocyst via fertilization of a female gamete (macrogamont) by a male gamete (microgamont) (2,3,7,8). Oocysts are excreted in stool and sporulate in the environment where they can survive for months.

*Cystoisospora belli* oocysts are generally bell-shaped, their size is 17-37 x 8-21 µm, and they have a very thin and smooth oocyst wall (3). Some sporozoites encyst in extra-intestinal organs (spleen, liver, mediastinal, trachea-bronchial, and mesenteric lymph nodes) and in intestinal lamina propria, particularly in immunosuppressed humans, producing monozytic tissue cysts (2,3,7,9). Until now, paratenic or intermediate hosts have not been identified in *C. belli*'s life cycle.

Cystoisosporiasis is characterized by watery diarrhea, abdominal pain, fever, nausea, anorexia, significant weight loss, and may lead to dehydration and cachexia (3,7). Eosinophilia, steatorrhea, and the presence of Charcot-Leyden crystals are also common in *C. belli* infection (3). Symptoms are more severe in patients with immunity alterations, especially AIDS, but also in those with organ transplants subjected to immunosuppressive therapy, as well as patients with Hodgkin's disease, leukemia, and HTLV infection, among others (2,3,7). Immunocompetent hosts usually develop self-limited watery diarrhea and cases are mostly related to travelers from endemic areas.

Cystoisosporiasis therapy involves supportive treatment (fluid, electrolyte, and nutritional support) and antibiotics, trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) or cotrimoxazole, being the drugs of choice (3,8). Recurrence reports are common, which makes the infection difficult to eradicate and favoring its chronicity.

Despite its global distribution, *C. belli* is particularly endemic in tropical and subtropical areas from low-income countries in the Caribbean, Central and South America, Africa, and South-East Asia (3,10). Prevalence rates are significantly higher in HIV-infected patients compared to HIV-negative ones with values ranging between 0.4% and 28% (3). Data from endemic areas also vary among countries with prevalences ranging from 1.1% to 30% in South America (3). *Cystoisospora belli* epidemiology has been poorly evaluated in Colombia; the few studies conducted report prevalence rates between 0.06% and 8% in patients living with HIV and children (11-15) (table 1). Here we describe a case of chronic diarrhea due to *C. belli* in a Colombian patient living with HIV and poor adherence to HAART.



**Table 1.** *Cystoisospora belli* prevalence data from studies in Colombia

Author	City	Population	Prevalence (%)	Reference
López, <i>et al.</i> , 1999	Bogotá	HIV patients	1.9	(11)
Arzuza, <i>et al.</i> , 2003	Cartagena	HIV patients	7.9	(12)
Botero, <i>et al.</i> , 2004	Medellín	HIV patients	1.9	(13)
Carmona, <i>et al.</i> , 2013	Turbo	Children	0.06	(14)
Lucero-Garzón, <i>et al.</i> , 2015	Florencia	Children	8	(15)

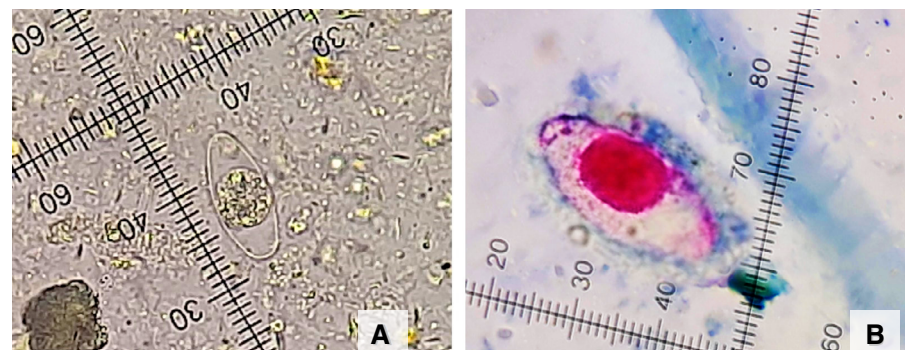
## Case report

We report a 57-year-old heterosexual man diagnosed with HIV nine years ago. He has two children and no stable partner and he currently attends a care program for people living with HIV. He lives in an urban area of Caucaasia municipality in Antioquia, Colombia. The town is located 270 Km from Medellín, it is 150 meters above sea level, with an average temperature of 25°C to 32°C and a tropical monsoon climate. The patient works in different trades related to auto mechanics. He was admitted to the care program on July 3, 2018, and restarted the HIV second-line regimen of zidovudine/lamivudine/lopinavir/ritonavir (AZT/3TC-LPV/r).

In the anthropometry evaluation, mild malnutrition (BMI=17.92) was reported but no other antecedents or comorbidities, except active smoking. He had received vaccination against hepatitis B, influenza, and pneumococcus a year earlier. Due to his history of poor adherence to antiretroviral therapy, follow-up was established to ensure treatment success.

He consulted with a four-month history of diarrhea, abdominal distension, flatulence, subjective weight loss, rectal bleeding, and hematochezia, but no fever. Gastrointestinal symptoms coincided with the start of the HAART. Initially, these symptoms were associated with the enhanced protease inhibitor included in the highly active antiretroviral therapy cocktail and, therefore, appropriate recommendations were given to improve gastrointestinal tolerance to these drugs.

Besides, a parasitological study was requested to identify the infectious etiology of the clinical syndrome. *Cystoisospora belli* oocysts were detected by microscopic analysis of direct saline and iodine wet mounts of the patient's stool (figure 1A) along with the modified Ritchie sedimentation method. The diagnosis was confirmed by using the Kinyoun stain technique (figure 1B).



**Figure 1.** Immature *Cystoisospora belli* oocyst with one sporoblast. **A.** Direct saline wet mount. 400X. **B.** Immature *Cystoisospora belli* oocyst with one sporoblast. Kinyoun stain, 1,000X.

At the time of the diagnosis, the patient's HIV viral load was <40 copies/ml and his CD4 T lymphocytes count was 465 cells/mm<sup>3</sup>. The hematological parameters were normal and he was negative for hepatitis C (antibodies) and hepatitis B (antigens and antibodies).

The patient was prescribed trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP/SMX) DS 160/800 mg every 12 hours for two weeks and then every 24 hours for the same period. A full recovery of the gastrointestinal symptoms was achieved and the anthropometric data of the patient indicated a eutrophic nutritional status (BMI=19.21) and a weight gain of 6 kg since the last control.

### **Ethical considerations**

The study protocol followed the ethical guidelines of the 2013 Declaration of Helsinki. All approvals observed the ethical standards set by the Ministry of Health of Colombia (Resolution 008430 of 1993). The patient signed an informed consent explaining the purposes, benefits, and risks of the study. The patient's data were kept in confidentiality. The *Universidad de Antioquia* Bioethics Committee approved the investigation protocol (official document N° 17-06-760).

### **Discussion**

Diarrhea is a frequent and often inadequately treated complication in people living with HIV, which contributes to the reduced life quality and survival of these patients. It is estimated that 50% - 60% of AIDS patients have diarrhea at some point during their illness (16) and nearly 90% of them in developing countries (17). Hence, the etiology of this symptom should be carefully studied to reduce the morbidity and mortality associated.

Although HAART has significantly reduced the incidence of most opportunistic infections, parasite-related diarrhea remains a common problem in patients living with HIV, particularly in developing countries where they are probably underestimated (10,18). *Cystoisospora belli* is one of the parasites most frequently associated with diarrhea in patients living with HIV. During the 90s, *C. belli* cases were described worldwide, however, in the HAART era, cystoisosporiasis cases have concentrated in tropical and subtropical areas of developing countries (10). A recent global systematic review and meta-analysis of parasite prevalence in patients living with HIV showed a heavy burden of *Cryptosporidium*, microsporidia, and *Cystoisospora* infection, especially in low-income countries and sub-Saharan Africa (10). The few studies found in Latin American countries indicate that the epidemiology of this parasite is poorly known in our continent.

Here, we present a *C. belli* infection case associated with chronic diarrhea in a Colombian patient from Cauca municipality where tropical monsoon climate facilitates the sporulation of the parasite oocysts and their transmission to humans. Additional factors are probably related to an increased risk of *C. belli* infection including the lack of access to sanitation facilities and safe water usually present in this region of the country. Sanitation conditions are determinant factors for cystoisosporiasis incidence and permanence.

The patient's poor adherence to HAART is an issue of concern. Irregular administration of HAART in patients living with HIV not only reduces the likelihood of optimal viral suppression but also increases the risk of opportunistic infections such as cystoisosporiasis. Therefore, adherence to

treatment has become crucial in the clinical and public health management of HIV infection (19). Unfortunately, adverse drug reactions are one of the main causes for HAART discontinuation; several adverse effects related to the HAART drug cocktail components are known, among them protease inhibitors (19). Initially, gastrointestinal symptoms in our patient were thought to be related to the HAART therapy, but parasitological analysis confirmed the infectious etiology of the syndrome detecting *C. belli* oocysts in his stool.

*Cystoisospora belli* chronicity could be related to infection persistence possibly associated with the reactivation of the tissue cysts formed by the parasite in extra-intestinal organs or in the lamina propria of the intestine (3). Cystoisosporiasis recurrences are increasingly observed in patients living with HIV/AIDS, particularly in those who do not respond properly to the treatment (20). The standard treatment for *C. belli* infection is oral trimethoprim-sulfamethoxazole for 7 to 10 days in immunocompetent patients; however, immunosuppressed patients usually need longer treatment schedules or high doses, as well as maintenance therapy with cotrimoxazole to prevent relapses, which occur in nearly 50% of patients following discontinuation of initial therapy (21).

In this case, the patient recovered from the symptoms and responded well to the treatment administered after the parasitological diagnosis. Persistent infection was most likely due to the absence of an effective treatment given the late detection of *C. belli*. One of the major problems associated with the diagnosis of intestinal parasites, including *C. belli*, is the intermittent shedding of their oocyst in the feces favoring false-negative results. Generally, multiple samples collected on non-consecutive days improve the sensitivity of the direct parasitological analysis (21).

## Conclusion

Although cystoisosporiasis is considered a rare condition, it should be considered in the differential diagnosis of chronic diarrhea in immunosuppressed individuals, especially HIV/AIDS patients from tropical and subtropical regions. This report addresses the importance of a correct and timely parasite diagnosis to improve patients' outcomes. Laboratory technicians must be trained on parasite identification and the factors that improve the sensitivity of diagnostic techniques. Finally, the availability of parasite DNA will allow us to carry out future molecular studies regarding species confirmation and parasite's genetic diversity in our population thus contributing to the knowledge of its biology.

## Acknowledgments

We thank the *Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB*, care program for people living with HIV and the medical staff in charge of the patient.

## References

1. Barta JR, Schrenzel MD, Carreno R, Rideout BA. The genus *Atoxoplasma* (Garnham 1950) as a junior objective synonym of the genus *Isospora* (Schneider 1881) species infecting birds and resurrection of *Cystoisospora* (Frenkel 1977) as the correct genus for *Isospora* species Infecting Mammals. *J Parasitol.* 2005;91:726-7. <https://doi.org/10.1645/GE-3341.1>
2. Resende DV, Assis DC, Ribeiro MFB, Cabrine-Santos M, Frenkel JK, Correia D, *et al.* Ultrastructural aspects of *Cystoisospora belli* (syn. *Isospora belli*) in continuous cell lines. *Microsc Res Tech.* 2014;77:472-8. <http://doi.wiley.com/10.1002/jemt.22372>
3. Dubey JP, Almeria S. *Cystoisospora belli* infections in humans: The past 100 years. *Parasitology.* 2019;146:1490-527. <https://doi.org/10.1017/S0031182019000957>

4. Frenkel JK. *Besnoitia wallacei* of cats and rodents: With a reclassification of other cyst-forming isosporoid coccidia. J Parasitol. 1977;63:611. <https://doi.org/10.2307/3279560>
5. Frenkel JK, Smith DD. Determination of the genera of cyst-forming coccidia. Parasitol Res. 2003;91:384-9. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0969-4>
6. Lindsay DS, Houk AE, Mitchell SM, Dubey JP. Developmental biology of *Cystoisospora* (Apicomplexa: Sarcocystidae) monozyotic tissue cysts. J Parasitol. 2014;100:392-8. <https://doi.org/10.1645/13-494.1>
7. Oliveira-Silva MB, Lages-Silva E, Resende DV, Prata A, Ramírez LE, Frenkel JK. *Cystoisospora belli*: *In vitro* multiplication in mammalian cells. Exp Parasitol. 2006;114:189-92. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.03.004>
8. Rowan DJ, Said S, Schuetz AN, Pritt BS. A case of *Cystoisospora (Isospora) belli* infection with multiple life stages identified on endoscopic small bowel biopsies. Int J Surg Pathol. 2020;28:884-6. <https://doi.org/10.1177/1066896920901589>
9. Lindsay DS. *Cystoisospora* species insights from development *in vitro*. Front Vet Sci. 2019;5:335. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00335>
10. Wang ZD, Liu Q, Liu HH, Li S, Zhang L, Zhao YK, et al. Prevalence of *Cryptosporidium*, microsporidia and *Isospora* infection in HIV-infected people: A global systematic review and meta-analysis. Parasit Vectors. 2018;11:28. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2558-x>
11. López MC, Moncada LI, Murcia MI, Saravia J, Nicholls RS. Frecuencia de parásitos intestinales en pacientes VIH+ en la ciudad de Santa Fe de Bogotá. Revista de la Facultad de Medicina. 1999;47:9-12.
12. Arzuza O, Arroyo B, Villegas S, Rocha A, Díaz H. Infecciones parasitarias intestinales en pacientes positivos para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en la ciudad de Cartagena de Indias, Colombia. Infectio. 2003;7:2003.
13. Botero JH, Montoya MN, Vanegas AL, Díaz A, Navarro-i-Martínez L, Bornay FJ, et al. Frecuencia de microsporidiosis intestinal en pacientes positivos para VIH mediante las técnicas de Gram cromotropo rápido y PCR. Biomédica. 2004;24:375-84. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v24i4.1287>
14. Carmona-Fonseca J, Correa-Botero A. Parásitos intestinales, desnutrición y condiciones de vida de niños en Urabá (Colombia): soledad y olvido. Rev Salud Ambient. 2013;13:108-19.
15. Lucero-Garzón TA, Álvarez-Motta LA, Chicue-López JF, López-Zapata D, Mendoza-Bergaño CA. Parasitosis intestinal y factores de riesgo en niños de los asentamientos subnormales, Florencia-Caquetá, Colombia. Rev Fac Nac Salud Pública. 2015;33:171-80. <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v33n2a04>
16. Sherman DS, Fish DN. Management of protease inhibitor-associated diarrhea. Clin Infect Dis. 2000;30:908-14. <https://doi.org/10.1086/313826>
17. Shimelis T, Tassachew Y, Lambiyi T. *Cryptosporidium* and other intestinal parasitic infections among HIV patients in southern Ethiopia: Significance of improved HIV-related care. Parasit Vectors. 2016;9:270. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1554-x>
18. Derouin F, Lagrange-Xelot M. Treatment of parasitic diarrhea in HIV-infected patients. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008;6:337-49. <https://doi.org/10.1586/14787210.6.3.337>
19. Duran S, Spire B, Raffi F, Walter V, Bouhour D, Journot V, et al. Self-reported symptoms after initiation of a protease inhibitor in HIV-infected patients and their impact on adherence to HAART. HIV Clin Trials. 2001;2:38-45. <https://doi.org/10.1310/R8M7-EQ0M-CNPW-39FC>
20. Batista F, Miranda L, Silva MB, Taborda RL, Soares MC, Matos N. Chronic *Cystoisospora belli* infection in an HIV/AIDS patient treated at the specialized assistance service in Porto Velho County - Rondônia. Rev Soc Bras Med Trop. 2019;52:e20180204. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0204-2018>
21. Lagrange-Xélot M, Porcher R, Sarfati C, de Castro N, Carel O, Magnier JD, et al. Isosporiasis in patients with HIV infection in the highly active antiretroviral therapy era in France. HIV Med. 2008;9:126-30. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1293.2007.00530.x>

Artículo original

## Identificación molecular de *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* y *Entamoeba moshkovskii* en niños con diarrea en Maracaibo, Venezuela

Zulbey Rivero<sup>1,2</sup>, Lisbeth Villareal<sup>3</sup>, Ángela Bracho<sup>2</sup>, Carem Prieto<sup>4,5</sup>, Rafael Villalobos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Parasitología, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela

<sup>2</sup> Laboratorio de Parasitología, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador

<sup>3</sup> Laboratorio Clínico del Servicio Autónomo, Hospital Universitario de Maracaibo, Maracaibo, Venezuela

<sup>4</sup> Departamento de Investigación, Universidad Católica de Cuenca, Cuenca, Ecuador

<sup>5</sup> Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas "Dr. Félix Gómez", Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela

**Introducción.** Las amebas no patógenas *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii* y *Entamoeba bangladeshi* son morfológicamente idénticas a *Entamoeba histolytica*, parásito responsable de la amebiasis, por lo cual se necesitan técnicas moleculares para diferenciarlas.

**Objetivo.** Determinar la frecuencia de las diferentes especies de *Entamoeba* mediante reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) en muestras fecales de niños menores de cinco años con diarrea, provenientes de Maracaibo (Venezuela).

**Materiales y métodos.** Se recolectó una muestra fecal por individuo en 75 niños con diarrea (grupo de casos) y en 25 niños sin diarrea (grupo control). Las heces se evaluaron mediante examen microscópico, método de concentración de formól-éter y PCR múltiple anidada en una sola ronda para identificar *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*. Además, se hizo una encuesta en la que se recopilaron los datos demográficos, signos, manifestaciones clínicas y estrato socioeconómico de los niños.

**Resultados.** El 48 % de los participantes (38 del grupo de casos y 10 del grupo de control) tenían enteroparásitos. Solo en las muestras de cuatro de los niños, se encontraron quistes del complejo *Entamoeba* (tres en el grupo de casos y uno en el de control). Mediante PCR se amplificaron nueve muestras (9 %) para la detección de las amebas estudiadas. En el grupo de casos se registraron tres (28,13 %) de *E. histolytica*, cuatro (30,50 %) de *E. dispar* y una (9,37 %) de *E. moshkovskii*, en tanto que solo una (25 %) muestra amplificó para *E. dispar* en el grupo de control.

**Conclusión.** En general, predominó *E. dispar*; sin embargo, todos los infectados con *E. histolytica* se detectaron en el grupo de niños con diarrea y se detectó el primer caso de *E. moshkovskii* en la región.

**Palabras clave:** *Entamoeba*; *Entamoeba histolytica*; reacción en cadena de la polimerasa multiplex; niño; diarrea; Venezuela.

### Molecular identification of *Entamoeba histolytica*, *E. dispar*, and *E. moshkovskii* in children with diarrhea from Maracaibo, Venezuela

**Introduction:** *Entamoeba histolytica* is an amebiasis-producing parasite. However, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, and *Entamoeba bangladeshi* are non-pathogenic amoebae morphologically identical to it and, therefore, molecular techniques are required for their differentiation.

**Objective:** To determine the frequency of *Entamoeba* species by polymerase chain reaction (PCR) in fecal samples from children under five years with diarrhea from Maracaibo (Venezuela).

**Materials and methods:** A fecal sample per individual was collected from 75 children with diarrhea (case group) and 25 children without diarrhea (control group). Stools were evaluated by microscopic examination, formol-ether concentration method, and nested-multiplex PCR in a single round for the identification of *E. histolytica*, *E. dispar*, and *E. moshkovskii*. In addition, a survey was conducted in which demographic data, signs, clinical manifestations, and socioeconomic status were registered.

**Results:** In total, 48% of the children (38 from the case group and 10 from the control group) had intestinal parasites. Only four children presented cysts of the *Entamoeba* complex in their samples (three from the case group and one from the control group). By means of PCR, nine samples (9%) amplified for the studied amoebae. In the case group, three (28.13%) amplified for *E. histolytica*, four (30.50%) for *E. dispar*, and one (9.37%) for *E. moshkovskii* while only one (25%) sample amplified for *E. dispar* in the control group.

**Recibido:** 21/05/2020

**Aceptado:** 23/11/2020

**Publicado:** 04/12/2020

#### Citación:

Rivero ZC, Villareal L, Bracho A, Prieto C, Villalobos R. Identificación molecular de *Entamoeba histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* en niños con diarrea en Maracaibo, Venezuela. *Biomédica*. 2021;41(Supl.1): 23-34.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.5584>

#### Correspondencia:

Zulbey Rivero, Ciudadela Universitaria, Calle Nueva, Portoviejo, Ecuador  
Teléfono: (593) (96) 907 2567  
zulbeyrivero@gmail.com

#### Contribución de los autores:

Zulbey Rivero: concepción y diseño de la investigación y redacción del manuscrito  
Lisbeth Villareal: recolección de datos, análisis e interpretación de resultados  
Ángela Bracho: contribuciones sustanciales a la concepción y el diseño del estudio y redacción del manuscrito  
Carem Prieto y Rafael Villalobos: interpretación de resultados y revisión crítica de contenido

#### Financiación:

Este proyecto fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico bajo el número CONDES-0490-13.

#### Conflicto de intereses:

Los participantes del proyecto manifiestan no tener ninguna relación económica, personal o política, ni conflictos de intereses financieros o académicos, que puedan influir en su juicio.

**Conclusion:** In general, *E. dispar* predominated. Nevertheless, all those infected with *E. histolytica* were detected within the group of children with diarrhea and we reported the first case of *E. moshkovskii* in the region.

**Keywords:** *Entamoeba*; *Entamoeba histolytica*; multiplex polymerase chain reaction; child; diarrhea; Venezuela.

*Entamoeba histolytica* es un parásito protozoario causante de la amebiasis en humanos. Esta infección afecta principalmente a personas que viven en deficientes condiciones de higiene en los países en desarrollo, donde es endémica; los niños menores de cinco años son los más propensos a desarrollarla. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que, aproximadamente, 500 millones de personas están infectadas con el parásito y el 10 % de ellas presenta amebiasis invasiva. Esta parasitosis es considerada un importante problema de salud pública, pues llega a producir cuadros de disentería amebiana que, de no ser tratados, pueden llevar al paciente a la deshidratación y hasta la muerte (1-3).

Ngobeni, et al., señalan que el término *ameba* engloba las especies pertenecientes a los géneros *Entamoeba*, *Endolimax* e *Iodamoeba*; entre ellas, se destaca *Entamoeba histolytica*, única ameba intestinal que se reconoce como patógena, pues es la causante de la amebiasis. Las restantes especies que pueden encontrarse en la luz del intestino incluyen *Entamoeba dispar*, *E. moshkovskii*, *E. bangladeshi*, *E. hartmannii*, *E. coli*, *E. polecki*, *Endolimax nana* e *Iodamoeba butschlii*, consideradas no patógenas (4).

Existen otras especies de *Entamoeba*, como *E. gingivalis*, que se encuentra principalmente en la cavidad oral humana, y que también se ha encontrado en Egipto en el aparato genitourinario de usuarias de dispositivos anticonceptivos intrauterinos (5), y *E. nuttalli*, que prevalece en primates no humanos, aunque fue detectada en un cuidador de un zoológico en Bélgica (6).

Las amebas del género *Entamoeba* comparten muchas características morfológicas y biológicas, pero se caracterizan, en particular, por poseer cromatina adosada a la membrana nuclear interna y presentar dos formas evolutivas durante su ciclo de vida: los trofozoítos o formas vegetativas y los quistes o formas de resistencia (7). Los trofozoítos y quistes de *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii* y *E. bangladeshi* son morfológicamente indistinguibles entre sí y, por consenso, se las ha agrupado en el llamado complejo *Entamoeba* (2,8).

El diagnóstico de la amebiasis comúnmente se hace mediante el examen coprológico y la detección al microscopio de quistes o trofozoítos que morfológicamente corresponden a *E. histolytica* o, menos frecuentemente, mediante biopsia de tejido mucoso. Sin embargo, el reconocimiento de *E. dispar* y la detección de *E. moshkovskii* en seres humanos, además del registro de una nueva especie, *E. bangladeshi*, ha complicado el diagnóstico, pues todas son morfológicamente idénticas, aunque diferentes desde el punto de vista genético y bioquímico (9,10).

El examen microscópico de materia fecal presenta serias limitaciones, especialmente, la incapacidad de distinguir entre *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii* y *E. bangladeshi*, y el hecho de que solo puede confirmarse la presencia de *E. histolytica* cuando las muestras presentan trofozoítos hematófagos, situación que es bastante infrecuente (9). En este sentido, los métodos moleculares como la PCR han demostrado una mayor sensibilidad de detección comparados con otras técnicas de diagnóstico de la amebiasis,



por lo que se ha convertido en la prueba de referencia para el diagnóstico de la amebiasis intestinal (3).

No se encontraron publicaciones previas sobre la prevalencia de *E. moshkovskii* en Venezuela y existe muy poca información en cuanto a la prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar* en el país. En ese contexto, el objetivo del presente estudio fue determinar mediante métodos moleculares la frecuencia de estas amebas en niños del municipio Maracaibo, estado Zulia (Venezuela), y determinar la asociación de dicha frecuencia con la presencia o ausencia de diarrea.

## **Materiales y métodos**

### ***Diseño del estudio, población y muestra***

Se diseñó un estudio de tipo descriptivo, prospectivo y transversal. La población incluyó a todos los niños menores de cinco años con diarrea (área de urgencias) y sin diarrea (triaje de pediatría) atendidos en el Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo, entre enero y julio de 2014.

Se recolectaron 100 muestras de heces frescas de la siguiente manera: 75 de niños menores de cinco años con diarrea aguda, considerados como el grupo de casos, y 25 muestras de heces de niños menores de cinco años sin diarrea, considerados como el grupo de control. Los criterios de inclusión en el grupo de casos fueron: niños menores de cinco años, de cualquier sexo, con diarrea, atendidos en el área de urgencias del Hospital y que no hubieran recibido tratamiento antiparasitario en los dos meses anteriores. Los niños evaluados fueron estratificados por grupos etarios según la clasificación de Quintero (11).

Se hizo una encuesta respondida por representantes de todos los niños incluidos en el estudio, para recabar los datos demográficos de edad, sexo y procedencia, y los signos y síntomas de diarrea, presencia de deshidratación, vómito y fiebre. Posteriormente, se hizo la estratificación socioeconómica según Graffar y modificada por Méndez, *et al.* (12).

### ***Análisis parasitológico***

Se recolectó una muestra fecal por niño. Para ello, a cada representante se le entregó un envase recolector plástico nuevo, limpio, de boca ancha y tapa de rosca (sin preservativos), y se le dieron en forma oral y escrita las recomendaciones necesarias para la correcta recolección de la muestra fecal.

Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Parasitología de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad del Zulia, donde se hizo el examen macroscópico y el microscópico de la muestra fecal, así como la prueba con el método de concentración de formól-éter (13). Los resultados del examen coproparasitológico fueron entregados a los representantes de los niños. Una porción de la muestra fue congelada a -20 °C para efectuar posteriormente el análisis molecular (PCR) en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas "Dr. Félix Gómez", con el fin de detectar *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*.

### ***Análisis molecular***

La extracción y purificación del ADN genómico de *Entamoeba* spp. se llevó a cabo en el Laboratorio de Parasitología de la Escuela de Bioanálisis

de la Universidad del Zulia, utilizando un procedimiento estandarizado que incorporó algunos pasos de protocolos de lisis enzimática y choque térmico, y mecánicos, descritos previamente por Rivero, et al. (14).

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 40,0 µl con 8 µl de solución tampón para PCR 10X, 2,4 µl de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) 25,0 mmol/L; 1 µl de la mezcla de desoxirribonucleótidos (5,0 mmol/L de cada uno); 0,5 µl de GoTaq™ polimerasa de Promega (5 UI/µl); 4 µl de la mezcla de oligonucleótidos (50 pmol de cada iniciador) y 15,0 µl del ADN de muestra.

Como controles de referencia, se emplearon la cepa HM-1:IMSS de *E. histolytica*, la cepa SAW760 de *E. dispar*, y la cepa Laredo de *E. moshkovskii*, todas gentilmente donadas por Graham Clark del *London School of Hygiene and Tropical Medicine*. En estos casos, se utilizaron 6 µl de ADN para los pruebas de amplificación por PCR de los controles y, además, se utilizó un control negativo de reacción que solo contenía 1 µl de agua.

Como blanco genómico, se utilizó la secuencia de genes similares al ARNr 16S, con un fragmento específico para el género *Entamoeba* y los fragmentos específicos (iniciadores) para las especies *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* (Eurofins Genomics) descritos por Khairnar, et al. (15) (cuadro 1). La identidad de las secuencias de oligonucleótidos utilizados y el peso molecular de los fragmentos esperados fueron confirmados en la BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Se siguió un protocolo de PCR múltiple anidada, estandarizado por los autores del presente estudio para ser efectuado en una sola reacción a partir del protocolo original de Ngui, et al. (16), en el que se hizo el anidado de la región específica para el género *Entamoeba* de genes similares al ARNr 16S. Este incluyó una desnaturalización inicial a 94 °C durante 10 minutos, seguida de 15 ciclos con los siguientes pasos: desnaturalización a 94 °C durante un minuto, apareamiento a 56 °C durante un minuto y extensión a 72 °C durante 1:15 minutos (no se obtuvo el producto para ser verificado en gel de agarosa). En la misma amplificación, se programaron 25 ciclos del siguiente esquema: a 94 °C durante un minuto, a 48 °C durante un minuto, a 72 °C durante 1:15 minutos y, por último, a 72 °C durante 10 minutos. En este paso, se empleó la PCR múltiple para la caracterización genética de *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*, y se obtuvieron fragmentos de 439 pb, 174 pb y 553 pb. Los tubos Eppendorf se mantuvieron a 4 °C hasta salir del equipo. Todas las muestras fueron corridas en un termociclador Eppendorf (PTC-100 Peltier Thermal Cycler™).

**Cuadro 1.** Oligonucleótidos iniciadores utilizados para las especies *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* y *Entamoeba moshkovskii*

Parásito	Nombre del iniciador	Secuencia del iniciador (5' a 3')	Tamaño del producto (pb)
<i>Entamoeba</i> spp.	E-1	TAAGATGCAGAGCGAAA	≈ 800
	E-2	GTACAAAGGGCAGGGACGTA	
<i>E. moshkovskii</i>	Mos-1	GAAACCAAGAGTTTCACAAC	553
	Mos-2	CAATATAAGGCTTGGATGAT	
<i>E. histolytica</i>	EH-1	AAGCATTGTTTCTAGATCTGAG	439
	EH-2	AAGAGGTCTAACCGAAATTAG	
<i>E. dispar</i>	ED-1	TCTAATTTTCGATTAGAACTCT	174
	ED-2	TCCCTACCTATTAGACATAGC	



Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2,0 % en cámaras horizontales (Bio-Rad Laboratories). Como solución tampón de corrida, se utilizó solución amortiguadora de 89 mM de tris-borato y 2 mM de EDTA, pH: 8 (TBE), la corrida se llevó a cabo a 100 v/cm durante 30 minutos. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/ml), luego, se visualizaron en un transiluminador ultravioleta (Uvitec) y se fotografiaron con el sistema de fotodocumentación DigiDoc UVP™. Se incluyó un marcador de peso molecular de 100 pb DNA Ladder de Promega.

### **Análisis estadístico**

La frecuencia de las amebas en relación con las variables estudiadas se expresó con la distribución de frecuencias absolutas y con porcentajes. Para el análisis de los resultados obtenidos, se utilizó el programa estadístico SPSS™, versión 17 (SPSS Inc., Chicago, Ill, USA). Se empleó la prueba estadística de ji al cuadrado, el test exacto de Fisher o la correlación de Spearman, según correspondiese, para las pruebas de significación estadística entre las variables en estudio. El valor de  $p < 0,05$  se aceptó como estadísticamente significativo (17).

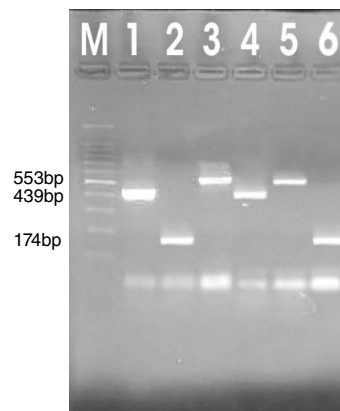
### **Consideraciones éticas**

El estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del Hospital. Por tratarse de una investigación no terapéutica en la que se emplearon muestras fecales de niños menores, los padres autorizaron la entrega de la muestra mediante un consentimiento informado y dieron la información necesaria para la encuesta. Se guardó en absoluta confidencialidad la información de los pacientes.

### **Resultados**

La mediana de edad de los niños estudiados fue de  $3 \pm 1,093$  años, siendo el menor de cinco meses y el mayor de cinco años. En total, participaron 38 niñas (31 en el grupo de casos y siete en el grupo de control) y 62 varones (42 en el grupo de casos y 18 en el grupo de control). El 48 % de los niños (38 del grupo de casos y 10 del grupo de control) presentaron enteroparásitos según el examen microscópico directo o por concentración. Mediante este procedimiento, se detectaron quistes del complejo *Entamoeba* en las muestras fecales de tres (4,6 %) individuos del grupo de casos y de uno (7,1 %) del grupo de control.

Como resultado de la PCR aplicada a las 100 muestras, se amplificaron nueve muestras biológicas (figura 1), distribuidas de la siguiente manera: tres muestras con *E. histolytica*, cinco con *E. dispar* y una con *E. moshkovskii*.



M: marcador de peso molecular. 1: control de referencia de *Entamoeba histolytica* (HM-1: IMSS). 2: control de referencia de *Entamoeba dispar* (SAW 760). 3: control de referencia de *Entamoeba moshkovskii* (cepa Laredo). 4, 5 y 6: ADN extraído de muestras de heces de pacientes positivos para cada una de las amebas estudiadas

**Figura 1.** Identificación por PCR de *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* y *Entamoeba moshkovskii*

**Cuadro 2.** Resultados de la PCR por especie de *Entamoeba* en el grupo de casos y en el de control

Especies parasitarias	Grupo estudiado	
	Casos	Control
	n	n
<i>Entamoeba histolytica</i>	3	0
<i>Entamoeba dispar</i>	4	1
<i>Entamoeba moshkovskii</i>	1	0
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>1</b>

En el cuadro 2 se presentan los resultados de la PCR según los grupos de casos y controles. Se encontraron ocho muestras positivas en el grupo de casos, tres correspondían a *E. histolytica*, cuatro a *E. dispar* y una a *E. moshkovskii*, en tanto que, en el grupo de control, solo se detectó un individuo con *E. dispar*; no hubo casos de infección simultánea por dos o más especies de las amebas estudiadas entre los niños evaluados.

Los parásitos que se encontraron simultáneamente con *E. histolytica* fueron los helmintos *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiura*, pero no se la encontró asociada con ningún protozooario intestinal. En los niños con *E. dispar*, se presentó la mayor cantidad de asociaciones. Se observó en conjunto con *Blastocystis* sp. (16,6 %), con protozoarios como *E. coli* (33,3 %), *E. nana* (16,6 %) y *Giardia lamblia* (16,6 %), y con helmintos como *A. lumbricoides* (16,6 %). En el caso de *E. moshkovskii*, esta no se observó asociada a ningún otro parásito. Se detectaron infecciones exclusivas por *E. histolytica* y *E. dispar*, un caso de cada una, sin asociación con ningún helminto o protozooario intestinal.

Mediante el examen microscópico solo se observaron cuatro muestras positivas para el complejo *Entamoeba*, todas pertenecientes al grupo de preescolares. Una vez efectuado el procesamiento por PCR, se detectó un mayor número de casos, con nueve niños positivos y presencia de estas amebas tanto en el grupo de lactantes mayores como en el de lactantes menores, además de algunos casos más entre los mismos preescolares. En general, se encontró un predominio de las amebas en el grupo de niños entre dos y cinco años, con 3 % para *E. histolytica* y 4 % para *E. dispar*. Apenas un caso de *E. dispar* se detectó en lactantes mayores. Cabe destacar que el único caso de *E. moshkovskii* correspondía a un lactante menor (seis meses). No se encontró una diferencia significativa en esta variable ( $p>0,05$ ).

En cuanto a la prevalencia de las amebas por sexo, se apreció que la mayoría de los casos de infección por *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* se detectó en el sexo masculino, aunque no se determinó una diferencia significativa ( $p>0,05$ ).

En cuanto a las variables de prevalencia de las amebas y el estrato socioeconómico de los niños, se evidenció que todos los casos de infección por *E. histolytica* correspondían a niños en situación de pobreza crítica, en tanto que los casos de *E. dispar* se encontraron repartidos entre los dos estratos más pobres de la escala (pobreza relativa y crítica), y el único caso de *E. moshkovskii* detectado pertenecía el estrato de pobreza relativa.

## Discusión

La mayoría de los estudios epidemiológicos sobre la infección por *E. histolytica* se desarrollaron antes de la descripción de las especies del complejo *Entamoeba*. Por ello, existe una clara necesidad de desarrollar

estudios epidemiológicos para distinguir entre las especies de amebas y determinar la verdadera prevalencia de la infección por *E. histolytica*. En el presente estudio, se lograron identificar mediante PCR *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* en las heces de niños menores de cinco años con y sin diarrea, atendidos en el Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo.

En las muestras analizadas, predominó la especie *E. dispar* (cinco muestras), seguida de *E. histolytica* (tres muestras). Estos resultados coinciden con el estudio previo de Bracho, *et al.* (18), en niños con diarrea atendidos en el Hospital, en el que predominaron las infecciones por *E. dispar*. Estos autores refieren que, en seis muestras, identificaron ADN de *E. dispar* y, en dos, ADN de *E. histolytica*, y en ninguna hubo asociación entre las amebas estudiadas.

En un estudio en comunidades rurales al noreste de Suráfrica, se registraron prevalencias de 4,1 % de *E. histolytica*, de 14,7 % de *E. dispar* y de 15,9 % de *E. moshkovskii* (19). Sharbathkori, *et al.* (20), determinaron la prevalencia de *Entamoeba* spp. en niños con disentería de Irán y encontraron *E. histolytica* y *E. dispar* en dos (2/25) y tres (3/25) muestras, respectivamente. Asimismo, en Colombia, López, *et al.* (21), hicieron estudios para diferenciar el complejo *E. histolytica*-*E. dispar* mediante la detección de Gal-GalNac-lectina y PCR. Sus resultados arrojaron una prevalencia de 0,6 a 1,4 % para *E. histolytica* y de 15 a 17 % para *E. dispar*. En múltiples estudios basados en pruebas de biología molecular a nivel internacional, se señala el predominio de las infecciones por *E. dispar* frente a las de *E. histolytica* (8,22-25).

Algunos estudios en la población general a nivel nacional e internacional contrastan con estos resultados. Es el caso de Mora, *et al.* (26), quienes establecieron la prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar* en pacientes con diarrea de Cumaná (Venezuela), mediante PCR, y reportaron una prevalencia de *E. histolytica* de 6,3 % y de *E. dispar* de 4,44 %, detectando cuatro casos de infecciones mixtas. Los más afectados por ambas especies fueron niños y jóvenes. Ngui, *et al.* (16), estudiaron comunidades rurales de Malasia y refieren que la infección con *E. histolytica* (75,0 %; 39/52) fue la más común, seguida de *E. dispar* (30,8 %; 18/52) y *E. moshkovskii* (5,8 %; 3/52). De estos casos, 33 (63,5 %) individuos presentaban solo *E. histolytica*, 10 (19,2 %) portaban exclusivamente *E. dispar* y tres (5,8 %) solo *E. moshkovskii*; seis muestras (11,5 %) presentaron infección mixta de *E. histolytica* y *E. dispar*. Asimismo, Roshdy, *et al.* (27), mediante PCR múltiple anidada y PCR en tiempo real de pacientes con disentería en un hospital del Cairo, Egipto, encontraron 10,3 % de prevalencia de *E. histolytica* y 8,7 % de *E. dispar*, y no detectaron casos de *E. moshkovskii*.

En el presente estudio, solo se detectó un caso de *E. moshkovskii* en un niño de seis meses de edad con diarrea. Es importante resaltar que este es el primer informe de *E. moshkovskii* en niños de la región zuliana y en el país. El primer reporte de esta ameba en humanos fue recogido por Haque, *et al.* (28), en una niña de Bangladesh. Estudios posteriores en ese mismo país revelaron una prevalencia de *E. moshkovskii* del 21 % en niños de dos a cinco años mediante herramientas moleculares (29).

En Latinoamérica hay muy pocas referencias sobre la detección de *E. moshkovskii* en humanos; solo en Ecuador, Colombia, Brasil y Venezuela se han hecho investigaciones sobre esta especie. Levecke (30) refiere que, de 674 muestras de una comunidad rural al sur de Ecuador, solo 101 contenían quistes del complejo *Entamoeba*; sin embargo, mediante PCR-RLHB se detectaron 22,8 % casos de *E. dispar*, en tanto que no se

encontraron infecciones por *E. histolytica* ni *E. moshkovskii*. Bachkanji (31) evaluó mediante PCR 150 muestras de niños de 0 a 10 años del estado Sucre (Venezuela), que al microscopio resultaron positivas para el complejo *Entamoeba*, en tanto que utilizando herramientas moleculares el 19,30 % de ellas amplificó para *E. histolytica*, el 4 % para *E. dispar* y el 4,70 % presentó asociación de ambas amebas, pero no se detectó *E. moshkovskii*.

En el estudio de López, et al. (32), en un área rural del centro de Colombia, se encontró mediante PCR múltiple una frecuencia del 49,1 % (89/181); al diferenciar por especie, el 23,2 % (42/181) de las muestras fue positivo para *E. dispar*, el 25,4 % (46/181), para *E. moshkovskii* y, el 0,55 % (1/181), para *E. histolytica*; además, se observaron infecciones mixtas de *E. dispar* y *E. moshkovskii* en 4,42 % (8/181) de las muestras. Asimismo, Soares, et al. (33), estudiaron pacientes que asistían a un sistema de salud pública en Bahía (Brasil), mediante técnicas moleculares e inmunológicas. Por microscopía, se encontró una prevalencia de 0,49 % del complejo *Entamoeba* en 273 de 55.218 pacientes. De estos 273 individuos con microscopía positiva, solo 90 aceptaron participar en el estudio, entre los cuales, el 8,9 % (8/90) fueron positivos para *E. histolytica* por serología. En las muestras analizadas por PCR, el 80 % (72/90) fueron positivas para *E. dispar*, aunque no fue posible identificar *E. histolytica* ni *E. moshkovskii* y, en el resto de las muestras (18/90), no hubo amplificación. Puede concluirse entonces que, de los países mencionados, solo en Colombia se había reportado la presencia de *E. moshkovskii*.

Es importante mencionar el estudio realizado por Ngui, et al. (34), en el cual se examinaron 504 muestras fecales de humanos y perros mediante microscopía y PCR en Malasia, se encontró que la especie más común era *E. dispar* (26,5 %; 13/49), seguida por *E. histolytica* y *E. moshkovskii* (con 20,4 % para cada especie). En los animales, *E. moshkovskii* (46,7 %) fue la especie más común, seguida por *E. histolytica* y *E. dispar*, con 20,0 % y 13,3 %, respectivamente. Todo ello demuestra la presencia de la especie patógena de *Entamoeba* en perros, los que podrían ser un reservorio o un huésped mecánico para la amebiasis humana.

Al evaluar la presencia de las amebas en los dos grupos estudiados, se encontró que *E. histolytica* solo se detectó en el grupo de niños con diarrea y no en el grupo control. *E. dispar*, considerada como una especie no patógena, sí se encontró en ambos grupos de estudio, aunque en porcentajes diferentes. El único caso de *E. moshkovskii* también fue detectado en el grupo de niños con diarrea.

A pesar de que el número de individuos estudiados en el grupo control fue menor, es importante señalar que *E. histolytica* solo se detectó en el grupo de casos. Si bien la literatura científica refiere la posibilidad de individuos asintomáticos con *E. histolytica* (portadores asintomáticos) (35-37), en el presente estudio no se detectó esta situación, pues todos los pacientes infectados presentaban diarrea. Es innegable la capacidad patogénica de *E. histolytica*, como se ha demostrado en múltiples publicaciones (38-41), y en este caso, la coincidencia del hallazgo del parásito y la diarrea confirman esta premisa. Samie, et al. (19), refieren que solo *E. histolytica* estuvo asociada estadísticamente con diarrea en su estudio sobre la distribución de *Entamoeba* en comunidades rurales de Suráfrica. La diarrea en los niños infectados por *E. dispar* y *E. moshkovskii* podría explicarse por la asociación con otros enteroparásitos que la producen (por ejemplo, *G. lamblia*), situación observada en el presente estudio.

Los estudios de Ugboke, *et al.* (42), indican que las enfermedades diarreicas parasitarias de importancia para la salud pública son la amebiasis (*Entamoeba histolytica*), la criptosporidiosis (*Cryptosporidium* spp.) y la giardiasis (*G. lamblia*), lo que puede comprobarse por el predominio de las amebas encontradas en este estudio en el grupo de niños con diarrea, a pesar de que no todas las amebas identificadas se consideran patógenas.

Mediante el examen microscópico, solo se observaron cuatro muestras positivas para el complejo *Entamoeba*, todas en el grupo de preescolares. Una vez efectuado el procesamiento por PCR, se logró evidenciar un mayor número de casos, resultando positivos nueve niños, con casos tanto en el grupo de lactantes mayores como en el de lactantes menores, además de algunos más dentro del grupo de los preescolares, lo que era predecible, pues la detección del ADN parasitario mediante PCR es mucho más sensible que la microscopía (3,8,27,33).

En cuanto a la presencia de las amebas según la edad, en general, se encontró un predominio en el grupo de los preescolares, con 3 % para *E. histolytica* y 4 % para *E. dispar*. Sin embargo, no se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre las variables.

Los resultados del presente estudio difieren de los de Rivero, *et al.* (14), en individuos de una comunidad del estado Zulia, en el que se detectaron casos de estas amebas en los menores de dos años, lo que pudiera explicarse por los cuidados maternos que reciben estos niños, así como por el efecto protector contra *E. histolytica* que confieren el calostro y la leche materna en los lactantes (43,44).

Se observó una total congruencia entre los resultados microscópicos del complejo *Entamoeba* y los de la PCR. Los cuatro casos detectados mediante microscopía también fueron positivos por PCR, y fueron dos de *E. histolytica* y dos de *E. dispar*. Por supuesto, dado que la PCR es un método más sensible y específico, con ella se detectaron cinco casos más que no habían sido diagnosticados mediante el examen microscópico. Esto difiere de lo informado por Bracho, *et al.* (18), quienes no observaron coincidencia entre los resultados del examen directo de heces y los resultados por PCR en niños del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo. En este estudio, mediante el examen microscópico no se detectaron muestras con *E. histolytica* y *E. dispar*, en tanto que mediante PCR, ocho muestras amplificaron para alguna de las especies de amebas. Los autores consideraron factible que las formas evolutivas de dichas amebas se encontraran en muy poca cantidad o parcialmente destruidas, por lo que no pudieron ser detectadas mediante microscopía y sí mediante PCR, que es una técnica mucho más sensible.

Aunque las especies estudiadas se encontraron en los niños pertenecientes a los estratos de pobreza relativa y pobreza crítica, el mayor porcentaje (seis casos) se encontró entre aquellos en situación de pobreza crítica. Esto permite relacionar la presencia de estas amebas, especialmente la patógena *E. histolytica*, con las peores condiciones de vivienda de todos los estratos, los ingresos más bajos y el menor grado de instrucción de los padres de familia. Se hace hincapié en las condiciones de la vivienda, principalmente, ya que son las más relacionadas con las condiciones sanitarias. Según la escala de Graffar, en el estrato V, el tipo de vivienda corresponde a un rancho con condiciones sanitarias marcadamente inadecuadas. Estos resultados coinciden con los de otros estudios a nivel

nacional e internacional (25,34,45-47) en los que se ha encontrado que los parásitos intestinales están asociados principalmente a las malas condiciones higiénicas, el escaso saneamiento del entorno y la precariedad socioeconómica de las familias.

En conclusión, predominó la especie *E. dispar* entre los niños estudiados; sin embargo, los casos de *E. histolytica* se detectaron solo en el grupo de niños con diarrea y en situación de pobreza crítica. Además, se encontró la primera evidencia de infección por *E. moshkovskii* en humanos en Venezuela, lo que requiere la continuación de estudios similares en otras comunidades.

### Agradecimientos

A Nancy Guillén, del Instituto Pasteur en París, Francia, institución que donó todos los iniciadores utilizados. A Clark del *London School of Hygiene and Tropical Medicine*, por la donación de las cepas de referencia para el control.

### Referencias

- Ríos-Uil J, Mercadillo-Pérez P, Yuil de Ríos E, Ríos-Castro M. Amebiasis cutánea. Conceptos actuales. *Rev Med Hosp Gen Mex.* 2012;75:114-22.
- Cui Z, Li J, Chen Y, Zhang L. Molecular epidemiology, evolution, and phylogeny of *Entamoeba* spp. *Infec Genet Evol.* 2019;75:104018 <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104018>
- Carrero J, Reyes-López M, Serrano-Luna J, Shibayama M, Unzueta J, León-Sicairos N, et al. Intestinal amoebiasis: 160 years of its first detection and still remains as a health problem in developing countries. *Int J Med Microbiol.* 2020;310:151358. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.151358>
- Ngobeni R, Samie A, Moonah S, Watanabe K, Petri WA, Gilchrist C. *Entamoeba* species in South Africa: Correlations with the host microbiome, parasite burdens, and first description of *Entamoeba bangladeshi* outside of Asia. *J Infect Dis.* 2017;216:1592-600. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix535>
- Foda AA, El-Malky MM. Prevalence of genital tract infection with *Entamoeba gingivalis* among copper T 380A intrauterine device users in Egypt. *Contraception* 2012;85:108-12. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2011.04.006>
- Leveck B, Dorny P, Vercammen F, Visser LG, van Esbroeck M, Vercruysse J, et al. Transmission of *Entamoeba nuttalli* and *Trichuris trichiura* from nonhuman primates to humans. *Emerg Infect Dis.* 2015;21:1871-2. <https://doi.org/10.3201/eid2110.141456>
- Botero D, Restrepo M. Parasitosis humanas. 4ª edición. Medellín: Ediciones Corporación para Investigaciones Biológicas; 2012. p. 725.
- Najafia A, Mirzaeia A, Kermandania A, Abdia J, Ghaderic A, Naserifara R. Molecular identification of *Entamoeba histolytica* from stool samples of Ilam, Iran. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2019;63:145-7. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.01.003>
- Rivero de Rodríguez Z. Detección de *Entamoeba moshkovskii* en humanos: un nuevo problema diagnóstico en la amebiasis. *Kasmera.* 2013;41:42-9.
- Gilchrist CA. *Entamoeba bangladeshi*: An insight. *Trop Parasitol.* 2014;4:96-8. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.138536>
- Quintero R. Crecimiento y desarrollo psicológico al niño venezolano. *Puericultura Atención Primaria en Salud* infanto-juvenil. Maracaibo: Ediciones Psicopediátricas; 2001. p. 7-10.
- Méndez H, De Méndez MC. Sociedad y Estratificación: Método Graffar-Méndez Castellano. Caracas: Editor Fundacredesa; 1994. p. 206.
- Melvin D, Brooke M. Métodos de laboratorios para el diagnóstico de parasitosis intestinales. México: Editorial Interamericano; 1971. p. 198.
- Rivero Z, Bracho A, Calchi M, Díaz I, Acurero E, Maldonado A, et al. Detección y diferenciación de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* mediante reacción en cadena de la polimerasa en individuos de una comunidad del Estado Zulia, Venezuela. *Cad Saúde Pública.* 2009;25:151-9. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2009000100016>

15. Khairnar K, Parija S. A novel nested multiplex polymerase Chain Reaction (PCR). Assay for differential detection of *E. histolytica*, *E. dispar* and *moshkovskii* DNA in stool samples. BMC Microbiol. 2007;7:47. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-47>
16. Ngui R, Angal L, Fakhrurrazi S, Ai Lian Y, Ling L, Ibrahim J, et al. Differentiating *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* using nested polymerase chain reaction (PCR) in rural communities in Malaysia. Parasit Vectors. 2012;5:187. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-187>
17. Wayne D. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Cuarta edición. México, D.F.: Limusa Wiley; 2002. p. 665.
18. Bracho A, Rivero de Rodríguez Z, Arraiz N, Villalobos R, Urdaneta H. Detección de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* mediante PCR, en niños menores de cinco años con diarrea, en Maracaibo, Venezuela: estudio preliminar. Invest Clin. 2013;54:373-81.
19. Samie A, Mahlaule L, Mbatl P, Nozaki T, ElBakri A. Prevalence and distribution of *Entamoeba* species in a rural community in northern South Africa. Food Waterborne Parasitol. 2020;18:e00076. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2020.e00076>
20. Sharbatkhori M, Nazemalhosseini-Mojarad E, Cheraghali F, Maghsoudloord FS, Taherkhani H, Vakili MA. Discrimination of *Entamoeba* spp. in children with dysentery. Gastroenterol Hepatol Bed Bench. 2014;7:164-7.
21. López O, López M, Corredor V, Echeverri C, Pinilla A. Differentiation of *Entamoeba histolytica* from *Entamoeba dispar* using Gal/GalNAc-lectin and polymerase chain reaction. Rev Med Chile. 2012;140:476-83. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872012000400008>
22. Calegar DA, Nunes BC, Monteiro KJ, Santos JP, Toma HK, Gomes TF, et al. Frequency and molecular characterisation of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, and *Entamoeba hartmanni* in the context of water scarcity in northeastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016;111:114-9. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150383>
23. Abid T. Molecular identification of some species of *Entamoeba* isolated from patients with diarrhea in Afak city/Qadisiyah governorate using real-time PCR technique. Int J Recent Sci Res. 2016;7:11207-11.
24. Bahrami F, Haghghi A, Zamini G, Khademerfan M. Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* in faecal samples using nested multiplex PCR in west of Iran. Epidemiol Infect. 2019;147:E96. <https://doi.org/10.1017/S0950268819000141>
25. Saidin S, Abu Bakar A, Mohd Zain BM. Prevalence and associated risk factors of *Entamoeba histolytica*, *E. dispar* and *E. moshkovskii* infection among Orang Asli communities in Slim River, Perak. JSML. 2020;8:22-35.
26. Mora L, García A, De Donato M, Urdaneta H. Estudio epidemiológico y molecular de cepas de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en pacientes con diarrea en Cumaná, estado Sucre, Venezuela. Invest Clin. 2008;49:225-37.
27. Roshdy MH, Abd El-Kader NM, Ali-Tammam M, Fuentes I, Mohamed MM, El-Sheikhand NA, et al. Molecular diagnosis of *Entamoeba* spp. versus microscopy in the Great Cairo. Acta Parasitol. 2017;62:188-91. <https://doi.org/10.1515/ap-2017-0022>
28. Haque R, Ali I, Clark C, Petri W. A case report of *Entamoeba moshkovskii* infection in a Bangladesh child. Parasitol Inter. 1998;47:201-2.
29. Ali IKM, Hossain MB, Roy S, Ayeh-Kumi PF, Petri Jr W, Haque R, et al. *Entamoeba moshkovskii* infections in children, Bangladesh. Emerg Infect Dis. 2003;9:580-4. <https://doi.org/10.3201/eid0905.020548>
30. Leveck B, Dreesen L, Barrionuevo-Samaniego M, Ortiz WB, Praet N, Brandt J, et al. Molecular differentiation of *Entamoeba* spp. in a rural community of Loja province, South Ecuador. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2011;105:737-9. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.08.010>
31. Bachkanji AB. Identificación molecular de especies de *Entamoeba* en muestras fecales provenientes de pacientes del anexo pediátrico del "Hospital Luis Razetti" de Barcelona, Estado Anzoátegui y su relación con síntomas clínicos. (disertación). Anzoátegui: Universidad de Oriente; 2011.
32. López M, León C, Fonseca J, Reyes P, Moncada L, Olivera M, et al. Molecular epidemiology of *Entamoeba*: First description of *Entamoeba moshkovskii* in a rural area from central Colombia. PLoS ONE. 2015;14:1-11 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140302>

33. Soares NM, Azevedo HC, Pacheco FTF, De Souza JN, Del-Rei RP, Teixeira MCA, et al. A cross-sectional study of *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii* complex in Salvador, Bahia, Brazil. *Biomed Res Int*. 2019;2019:7523670. <https://doi.org/10.1155/2019/7523670>
34. Ngui R, Hassan N, Soffyan N, Mohd-Shaharuddin N, Chang Li Y, Shuan C, et al. Copromolecular study of *Entamoeba* infection among the indigenous community in Malaysia: A first report on the species-specific prevalence of *Entamoeba* in dogs, *Acta Tropica*. 2020; 204:105334. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105334>
35. Castro AA, Bacalhau F, Silva FF, Avillez C, Batalheiro J. *Entamoeba histolytica* como causa de diarreia crônica. *Rev Bras Med Fam Comunidade*. 2019;14:1917. [https://doi.org/10.5712/rbmfc14\(41\)1917](https://doi.org/10.5712/rbmfc14(41)1917)
36. Aguilar-Solís BE, Sánchez-Rodríguez A, Sael-Lima M, Álvarez-Trejo VE. Amebiasis vulvar. *Dermatol Rev Mex*. 2017;61:142-6.
37. Blessmann J, Ali IK, Nu PA, Dinh BT, Viet TQ, Van AL, et al. Longitudinal study of intestinal *Entamoeba histolytica* infections in asymptomatic adult carriers. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4745-50. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.10.4745-4750.2003>
38. Andrade A, Santana T. *Entamoeba histolytica* como causa da amebíase. *Rev Saúde Meio Ambiente*. 2020;10:133-9
39. Aguilar-Rojas A, Castellanos-Castro S, Matondo M, Giai Q, Varet H, Sismeiro O, et al. Insights into amebiasis using a human 3D-intestinal model. *Cell Microbiol*. 2020;22:e13203. <https://doi.org/10.1111/cmi.13203>
40. Hernández C, Moreno J, Olarte M, Meza E, Regalado J. Amebiasis intestinal: infección que prevalece. *Ibn Sina*. 2020;11:1-11.
41. Saavedra E, Olivos A. Amebiasis. *Ciencia*. 2017;68:14-7.
42. Ugboko HU, Nwinyi OC, Oranusi SU, Oyewal JO. Childhood diarrhoeal diseases in developing countries. *Heliyon*. 2020;6:e03690 <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03690>
43. Haque R, Mondai D, Kirkpatrick B, Akter S, Farr B, Sack B, et al. Epidemiologic and clinical characteristics of acute diarrhea with emphasis on *Entamoeba histolytica* infections in preschool children in an urban slum of Dhaka, Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;69:398-405.
44. Akisu C, Aksoy U, Cetin H, Ustun S, Akisu M. Effect of human milk and colostrum on *Entamoeba histolytica*. *World J Gastroenterol*. 2004;10:741-2. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i5.741>
45. Devera R, Aguilar K, Maurera R, Blanco Y, Amaya I, Velásquez V. Parasitosis intestinales en alumnos de la escuela básica nacional: "San José de Cacahual". San Félix, Estado Bolívar, Venezuela. *Rev Academia*. 2016;15:35-46.
46. Cociancica P, Torrusio S, Zonta ML, Navone G. Risk factors for intestinal parasitoses among children and youth of Buenos Aires, Argentina. *One Health*. 2020;9:100116 <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100116>
47. Gholipoor Z, Khazan H, Azargashb E, Youssefi M, Rostami A. Prevalence and risk factors of intestinal parasite infections in Mazandaran province, North of Iran. *Clin Epidemiol Global Health* 2020;8:17-20. <https://doi.org/10.1016/j.cegh.2019.03.010>



Original article

## Microscopic and molecular evaluation of *Strongyloides venezuelensis* in an experimental life cycle using Wistar rats

Jairo Tobar, Daniel Ramos-Sarmiento, Diana Tayupanta, Melina Rodríguez, Fabián Aguilar  
Área de Parasitología y Bioterios, Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Leopoldo Izquieta Pérez, Quito, Ecuador

**Introduction:** *Strongyloides venezuelensis* is a nematode whose natural host is rats. It is used as a model for the investigation of human strongyloidiasis caused by *S. stercoralis*. The latter is a neglected tropical disease in Ecuador where there are no specific plans to mitigate this parasitic illness.

**Objective:** To evaluate the stages of *S. venezuelensis* in an experimental life cycle using Wistar rats.

**Materials and methods:** Male Wistar rats were used to replicate the natural biological cycle of *S. venezuelensis* and describe its morphometric characteristics, as well as its parasitic development. Furthermore, the production of eggs per gram of feces was quantified using two diagnostic techniques and assessment of parasite load: Kato-Katz and qPCR.

**Results:** Viable larval stages (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>) could be obtained up to 96 hours through fecal culture. Parthenogenetic females were established in the duodenum on the fifth day post-infection. Fertile eggs were observed in the intestinal tissue and fresh feces where the production peak occurred on the 8<sup>th</sup>. day post-infection. Unlike Kato-Katz, qPCR detected parasitic DNA on days not typically reported.

**Conclusions:** The larval migration of *S. venezuelensis* within the murine host in an experimental environment was equivalent to that described in its natural biological cycle. The Kato-Katz quantitative technique showed to be quick and low-cost, but the qPCR had greater diagnostic precision. This experimental life cycle can be used as a tool for the study of strongyloidiasis or other similar nematodiasis.

**Keywords:** *Strongyloides*; Nematoda; life cycle stages; intestinal diseases, parasitic; Wistar rats; Ecuador.

### Evaluación microscópica y molecular de *Strongyloides venezuelensis* en un ciclo de vida experimental utilizando ratas Wistar

**Introducción.** *Strongyloides venezuelensis* es un nematodo cuyo huésped natural son las ratas. Se utiliza como modelo para la investigación de la estromiloidiasis humana producida por *S. stercoralis*. Esta última es una enfermedad tropical desatendida que afecta al Ecuador, donde no existen planes específicos para mitigar esta parasitosis.

**Objetivo.** Evaluar experimentalmente los estadios del ciclo de vida de *S. venezuelensis* utilizando ratas Wistar.

**Materiales y métodos.** Se emplearon ratas Wistar macho para replicar el ciclo biológico natural de *S. venezuelensis* y describir sus características morfológicas y su desarrollo parasitario. Además, se cuantificó la producción de huevos por gramo de heces mediante dos técnicas de diagnóstico y valoración de carga parasitaria: Kato-Katz y qPCR.

**Resultados.** Se obtuvieron estadios larvarios viables (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>) hasta las 96 horas del cultivo fecal. En el duodeno se establecieron hembras partenogenéticas a partir del quinto día de la infección. Se observaron huevos fértiles en el tejido intestinal inspeccionado y en las heces frescas, en las que el pico de producción ocurrió al octavo día de la infección. A diferencia del método Kato-Katz, la qPCR detectó ADN parasitario en días que usualmente no se reportan.

**Conclusiones.** La migración larvaria de *S. venezuelensis* dentro del ratón en un ambiente experimental fue equivalente al descrito en un ciclo biológico natural. El método cuantitativo de Kato-Katz dio resultados inmediatos a más bajo costo, pero la qPCR tuvo mayor precisión diagnóstica. Este ciclo de vida experimental puede usarse como una herramienta para el estudio de la estromiloidiasis u otras nematodiasis similares.

**Palabras clave:** *Strongyloides*; Nematoda; estadios del ciclo de vida; parasitosis intestinales; ratas Wistar; Ecuador.

Received: 03/07/2020

Accepted: 14/02/2020

Published: 14/12/2020

#### Citation:

Tobar J, Ramos-Sarmiento D, Tayupanta D, Rodríguez M, Aguilar F. Microscopic and molecular evaluation of *Strongyloides venezuelensis* in an experimental life cycle using Wistar rats. Biomédica. 2021;41(Supl.1):35-46.  
<https://doi.org/10.7705/biomedica.5650>

#### Corresponding author:

Daniel Ramos-Sarmiento, Área de Parasitología y Bioterios, Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Leopoldo Izquieta Pérez, Iquique N14-285 y Yaguachi, Quito, Ecuador  
Teléfono: (593) (96) 197 2884  
danielrs2012@gmail.com

#### Author contributions:

All authors actively participated in the conception and outline of the work, the writing of the manuscript, the critical review of the content, and the approval of the final version of the manuscript.

#### Funding:

The study was supported by the Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT), Ecuador (Grant number 20130372, 2013).

#### Conflicts of interest:

None

*Strongyloides* is a genus of helminths made up of about 50 species of which mainly two, *S. stercoralis* and *S. fülleborni*, are gastrointestinal parasites that may be affecting up to 3,700 million people across the world (1,2). In Latin America, the disease is underestimated due to generally unreliable diagnosis methods. However, there are regions, including Ecuador, that have reported a prevalence between 0,7 % and 4.1 % depending on the ecosystems (3,4). Thus, it is important to acknowledge this parasitic illness as a latent public health risk, especially for inhabitants of underdeveloped areas with precarious health conditions and immunosuppressed patients. For these reasons, strongyloidiasis has been recognized as a tropical neglected disease by the World Health Organization.

Strongyloidiasis is a zoonotic disease produced by *S. stercoralis*, a nematode that lives on the ground as part of its life cycle and can enter the human organism through the skin mainly if the person is barefoot. The parasite has been detected in species such as dogs and primates and it may be accidentally transmitted to humans upon contact with infected faeces (5,6).

The disease may remain asymptomatic for a long time, eventually producing itchiness or hives as the parasite moves under the skin, as well as cough, wheezing, and chronic bronchitis during the infectious stage in lungs or abdominal pain and diarrhea during the intestinal infectious stage. It may also produce autoinfection in the perianal area or in the bowel. The adult larvae penetrate the mucosa, mature, and produce eggs that enter into the lymphatic system and the general circulation and are scattered everywhere in the body where they hatch causing sepsis in various tissues (7). The infection may be fatal in cases of immunodeficiency and diagnosis is established through genome amplification in stool samples, serologic tests, and direct microscopy. Ivermectin, thiabendazol, and albendazole are used in the treatment (8).

*Strongyloides venezuelensis* and *S. ratti*, which infects rats, have a lifecycle and migration pattern similar to *S. stercoralis*, except they cause no autoinfection and they do not excrete larvae in the faeces. Both parasites exhibit transmammary transmission in different phases. The most notorious difference among both species is that *S. venezuelensis* is less pathogenic than *S. ratti* as a high larval concentration is needed for developing the disease and *S. ratti* larval development is faster, to the point that free living mature females and males may be detected (9). Thus, *S. venezuelensis* can be used in inference-based studies to improve the strategies for strongyloidiasis control. A detailed experimental study of the *S. venezuelensis* biological cycle can optimize molecular biology analyses, as well as the knowledge on parasite-host interactions for therapeutic assays to obtain heterologous antigens and develop immunological techniques (10-13).

In this study, we evaluated by microscopic and molecular analyses of *S. venezuelensis* in an experimental life cycle using Wistar rats housed in artificial tropical conditions in an animal facility in Quito, Ecuador. The standardization of this parasite as a model for strongyloidiasis allowed us to describe the morphological and morphometric characteristics of the parasite during its different stages both inside and outside the host. Additionally, we were able to evaluate different diagnostic techniques to detect the parasite in faeces and quantify the progress of the infection when evaluating the presence of eggs in stools.

## Materials and methods

### Animals

We used male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) obtained from Charles River Laboratories, USA, kept in the experimental animal facility at the *Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Dr. Leopoldo Izquieta Pérez* in Quito, Ecuador, at 29°C, 35% humidity, 12/12 light-dark cycle, and 2,850 masl altitude.

The animals selected were 8 weeks old and weighed between 120 and 180 g. Once the experiment ended, the rats were sacrificed using deep intraperitoneal sedation with 10 mg/kg of xylazine (Dormi-Xyl™, 2) and 60 mg/kg of ketamine (Ket-A-100™) for cervical dislocation.

### Infection of biomodels

Healthy biomodels were inoculated with 3,000 infective L<sub>3</sub> larvae (iL<sub>3</sub>) in the inner side of the leg subcutaneous tissue. The inoculated larvae's morphology was typically filariform with acceptable motility to light and viability over 95%. The parasites were obtained from the Institute of Biological Sciences at the *Universidade Federal de Minas Gerais*, Brazil.

The rodents were kept in a cage with wood chips, *ad libitum* access to water, and a food ration of 15 g/animal/day. On the 5<sup>th</sup>. day post-infection, the rats were transferred to a metabolic cage. The cage ground had two strips of absorbent paper moistened with distilled water over which a wire net with a 1 cm<sup>2</sup> aperture was placed to separate the feces from the cage floor and the rats.

### Bronchoalveolar lavage for parasite recovery

For the confirmation of larval migration to the lungs, we used bronchoalveolar lavage in a group of infected animals on the 2<sup>nd</sup>. day post-infection. After euthanasia, dissection was carried out making a 2 cm incision along the middle line in the ventral area of the trachea at one-third cm from the entrance to the thorax. An N° 18 catheter was introduced and fixed with a knot using silk thread.

To develop the bronchoalveolar lavage, 5 ml of phosphate-buffered saline 1X (PBS) with 0.6 mm ethylene-diamine-tetraacetic acid (EDTA) was introduced through the catheter. The fluid obtained was transferred to polypropylene tubes placed on ice. The same procedure was repeated until a total volume of 15 ml was collected, then the tubes were centrifuged at 455g for 15 min at 4°C. The supernatants were discarded and the pellets suspended in 3 ml of RPMI at 4°C to then be transferred to a 24-well culture tissues plate. The cultured plate was observed on the inverted microscope to verify the presence of *S. venezuelensis* larvae.

### Egg counting in feces

From the 5<sup>th</sup>. day post-infection, the feces of the infected rats kept in the cages on dampened paper were collected daily. We took a 5 g previously homogenized sample from the pool of feces to count the number of eggs using the Kato-Katz method with a 41.7 mg template (14,15). The slides were immediately observed with 100X magnification in an optical microscope (Motic, Hong Kong, China) coupled to the Images Plus 2.0™ software (Motic, Hong Kong, China) for the morphometric analyses. The total eggs observed were counted and the final value was multiplied by 24 to calculate de number of eggs per gram of feces.

### **Stool culture and larvae maturation**

For egg hatching and larval maturing at the first, second, and third stages we used the feces culture obtained from each cage. The feces were mixed with fine-grained vermiculite and sterile water in 28% of the initial stool weight and the culture was then incubated at 28°C.

We collected the larval stages with the modified Baermann technique (15,16). The stool cultures were wrapped in six layers of gauze. Each wrap was suspended over sterile water at 42°C contained in cone-shaped crystal cups and maintained idle for 60 minutes to allow the mobilization of the larvae towards the cup bottom by thermotropism. We eliminated three-fourth parts of the supernatant with a suction pump and one-fourth of the remaining parts was homogenized and transferred to a 10 ml test tube. The tubes were centrifuged for 3 min at 600g and the excess liquid was eliminated leaving approximately 2 ml of the supernatant liquid with sediment. The content was homogenized and 2 µl were extended on a slide twice. The slide was visualized at 40X magnification in an optical microscope (Motic, Hong Kong, China) coupled to the Images Plus 2.0™ software (Motic, Hong Kong, China) for the morphometric study.

To study the larval stages, we used the modified Baermann technique 24, 48, 72, and 96 hours after preparing the stool culture. The percentage of larval stages was estimated by visual differentiation and the counting of larvae with motility by calculating the relative frequency percentage for each one of the time periods.

### **Analysis of parthenogenetic females**

After sacrificing the Wistar rats, we dissected the abdominal cavity, removed the duodenum opening lengthwise, and carefully chopped it. The intestinal tissues were placed over six layers of gauze and the adult larvae were picked up after 3 hours using the modified Baermann method and 0.9% NaCl saline solution as a medium. The resulting fluid was discharged on tissue culture plates to visualize the presence of adult larvae with 40X magnification in an inverted microscope (Motic, Hong Kong, China) coupled to the Images Plus 2.0 software™ (Motic, Hong Kong, China) for their morphological analyses.

### **Molecular assays**

Feces samples from infected rats were collected in triplicate at the 1<sup>st.</sup>, 3<sup>rd.</sup>, 4<sup>th.</sup>, 5<sup>th.</sup>, 7<sup>th.</sup>, 8<sup>th.</sup>, 11<sup>th.</sup>, 15<sup>th.</sup>, 21<sup>st.</sup>, 28<sup>th.</sup>, and 31<sup>st.</sup> days post-infection and conserved in 2.5% potassium dichromate at -80°C until the DNA extraction process. The genomic DNA was extracted using the MagaZorb DNA Mini-Prep Kit™ (Promega, Madison, USA) following the manufacturer's protocols. The DNA was quantified in a NanoDrop2000™ spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) at 260–280 nm absorbance. As a positive control, we used a sample of *S. venezuelensis* eggs confirmed and quantified by the Kato-Katz method and as a negative control, DNA isolated from the *Ascaris suum*, *Trichuris trichiura*, and *Taenia saginata* tissues.

We performed qPCR with primers FW5'GAATTCCAAGTAAACGT AAGTCATTAGC-3', RV5' TGCCTCTGGATATTGCTCAGTTC-3', and FAMACACACCGGCCGTCGCTGC- BHQ1 to amplify 101 bp of the 18S rRNA region of *S. stercoralis* and *S. venezuelensis* (17) in a CFX96 Real-Time PCR Detection System Thermal Cycler™ (Bio-Rad, California, USA). Each reaction

was prepared in a total volume of 20  $\mu$ l containing 1  $\mu$ l of the sample, 10  $\mu$ l of Master Mix 2X of the GoTaq Probe qPCR Master Mix Kit™ (Promega, Madison, USA), 18  $\mu$ M of each primer, and 0.8  $\mu$ M of the FAM fluorophore. The qPCR included an initial denaturation at 95°C for 2 minutes, followed by 40 cycles (95 °C for 3 s, 60°C for 30 s, 72°C for 40 s), and a final elongation step at 72°C for 5 min. The data analysis was carried out using the CFX Manager Software™, version 3.1 (Bio-Rad, California, USA).

The qPCR results were considered negative if the values of the threshold cycle (Ct) were greater than 34 cycles. This value was the detectable limit of the serial dilutions with which the standard qPCR curve was constructed for the molecular quantification of the parasitic load.

### **Data analysis**

GraphPad Prism software™, version 6.01 (GraphPad Software Inc., California, USA) was used to estimate eggs per gram values on days post-infection and also to calculate the larval stages relative frequency percentage in stool cultures based on incubation hours.

### **Ethical considerations**

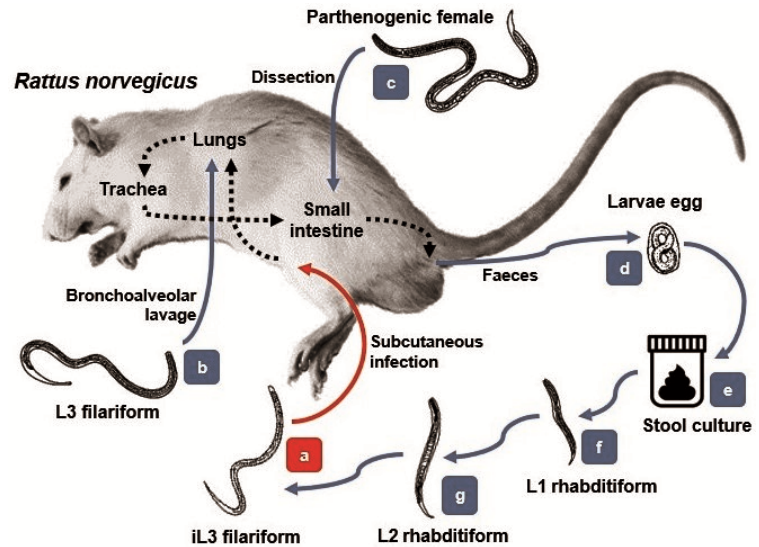
The methodology used was certified and approved by the experimental animal facility of the *Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Dr. Leopoldo Izquieta Pérez*. All the experimental procedures were carried out according to bioethical manuals of experimentation and animal welfare and adjusted to the three R principle, the supervision protocols, the five freedoms principles, and the criteria for humane endpoints, as well as the other recommendations established in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Institute of Laboratory Animal Resources and the National Research Council, USA.

## **Results**

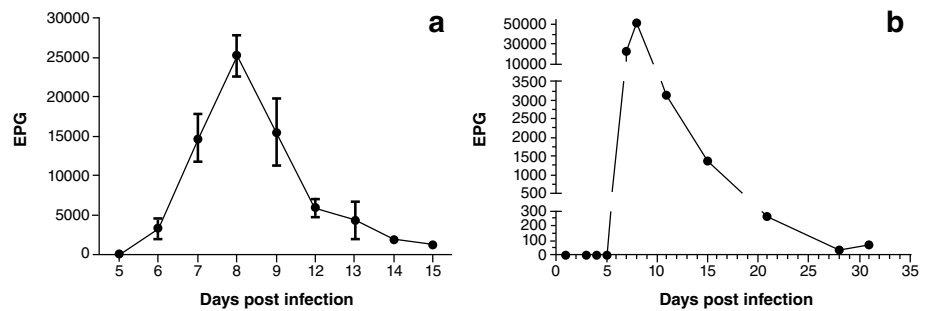
### **Experimental life cycle and detection of the parasite in Wistar rats**

After the subcutaneous inoculation to the experimental models, the iL<sub>3</sub> larvae (figure 1a) migrated through the tissues toward cardiac blood. After the 2<sup>nd</sup>. day post-infection, they were observed in the lungs (figure 1b) with similar morphologic features as those in the infective stage. The larvae then mobilized to the trachea during the next 24 to 48 hours as the animals had been indirectly swallowing them when feeding and hydrating. Afterwards, they migrated to the small intestine on the 5<sup>th</sup>. day post-infection where they matured to the adult form (figure 1c). In this stage, the parasites were hooked on the bowel tissue and the female larvae released many eggs in the stool by parthenogenesis (figure 1d).

Using the Kato-Katz technique, parasitic eggs were evidenced as of the 6<sup>th</sup>. day post-infection with a peak production on the 8<sup>th</sup>. day post-infection which then descended drastically on the 15<sup>th</sup>. day post-infection (figure 2a) and completely disappeared on the 28<sup>th</sup>. day post-infection. The molecular detection using qPCR allowed to amplify the DNA of the parasite between the 5<sup>th</sup>. and the 31<sup>st</sup>. day post-infection (figure 2b). The egg peak production occurred on the 8<sup>th</sup>. day post-infection according to microscope data. A positive correlation was found ( $r=0.97$ ) ( $p$ -value  $<0.05$ ) upon correlating the results of calculating the eggs per gram.



**Figure 1.** Experimental life cycle of *Strongyloides venezuelensis* in Wistar rats (*Rattis norvegicus*)

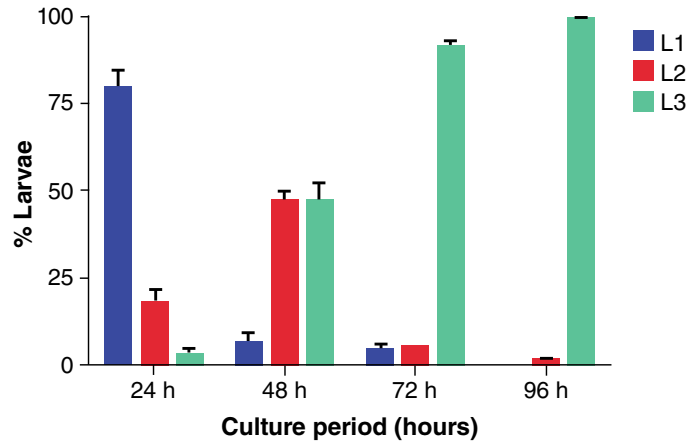


**Figure 2.** EPG values of *Strongyloides venezuelensis* on the different days post-infection. **a)** Kato-Katz technique analysis (average  $\pm$  standard error, n=18), **b)** qPCR assay results (EPG: Eggs per gram of feces)

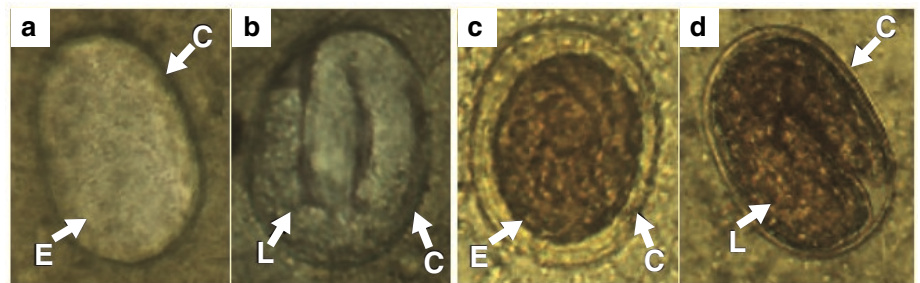
The stool of the infected animals was cultured for egg maturation throughout the different larval stages. As shown in figure 3, within the first 24 hours of incubation it was possible to detect 79% of L<sub>1</sub> larvae, 18% of L<sub>2</sub> larvae, and a maximum of 3% of iL<sub>3</sub> larvae. At 48 hours, 6% of L<sub>1</sub> larvae, 46% of L<sub>2</sub>, and 48% of iL<sub>3</sub> were observed. At 72 hours, 4% of L<sub>1</sub>, 5% of L<sub>2</sub>, and 91% of iL<sub>3</sub> were recovered, and, finally, at 96 hours, 1% of L<sub>2</sub> and 99% of iL<sub>3</sub> were found. The best time to recover infective stage larvae was at 96 hours of incubating stool cultures; those larvae were inoculated to preserve the experimental life cycle.

**Eggs morphometric evaluation**

The eggs observed in the feces had different stages of development. In some stool samples, we were able to differentiate granulated embryos (figure 4a,4c) and larval eggs (figure 4b, 4d) with larva moving inside. Both phases had an oval shape with symmetric polar points and presented a thin chitinous cortex with a smooth surface. Additionally, they (n=92) had an average length of 43.22  $\mu$ m (standard error=0.23  $\mu$ m) and a width of 28.8  $\mu$ m (standard error=0.15  $\mu$ m).

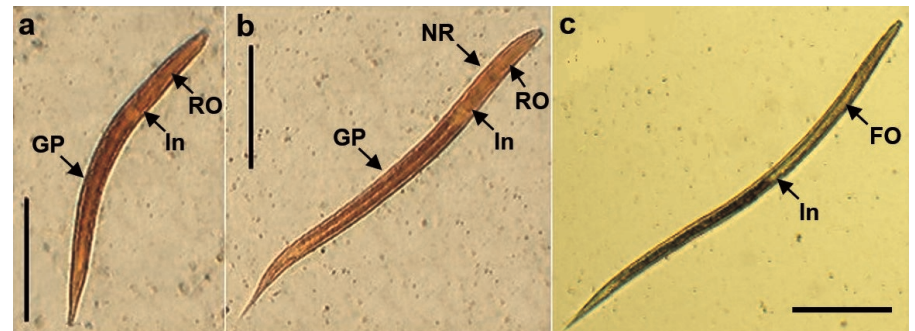


**Figure 3.** Bar graph of the relative frequency percentage of larval stages of *Strongyloides venezuelensis* in stool culture according to incubation hours



E: Embryo; C: Cortex; L: Larva

**Figure 4.** Development stages of *Strongyloides venezuelensis* eggs obtained in feces of infected Wistar rats. **a, c)** Granulated embryo eggs. **b, d)** Larval eggs. **a, b)** Without staining. **c, d)** Lugol staining.



RO: Rhabditiform oesophagus; FO: Filariform esophagus; NR: Nervous ring; In: Intestine; GP: Genital primordium

**Figure 5.** Stages of *Strongyloides venezuelensis* larvae obtained from cultures of infected Wistar rats' stool. **a)** First stage larva ( $L_1$ ). **b)** Second stage larva ( $L_2$ ). **c)** Third stage larva ( $L_3$ ) (scale bars: 100  $\mu$ m).

**Morphometric analysis of larval stages**

The  $L_1$  larvae (figure 5a) were characterized for having a rounded shape on the front end, a rhabditiform esophagus, and an intestine of approximately half of the total length. Additionally, a genital primordium was present in the central segment and the larvae ended in a pointed tail. They ( $n=58$ ) were 294.99  $\mu$ m (standard error=0.23  $\mu$ m) in length and 17.09  $\mu$ m in width (standard error=0.16  $\mu$ m) in the oesophagus-intestine divide.

The change to  $L_2$  larvae produced the enlargement of the entire body. They had a rhabditiform esophagus (figure 5b) accounting for approximately 30%

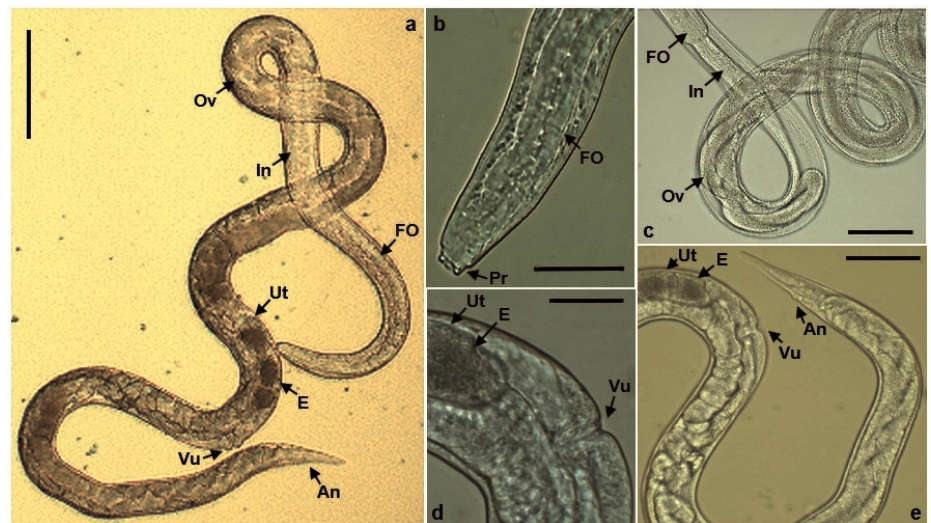


of the length of the parasite, which was joined to the intestine, and contained a nervous ring in the central part; a genital primordium was located in the middle (18,19). The L<sub>2</sub> larvae (n=29) presented a total length of 429.56 µm (standard error=6.85 µm) and a width in the esophagus-intestine division of 17.23 µm (standard error=0.29 µm).

Larvae in the third stage or iL<sub>3</sub> (figure 5c) presented a rounded front end, a long and filariform esophagus making up for half of the entire parasite dimension. The esophagus was connected to the intestine and ended in a typically sharpened tail. The L<sub>3</sub> (n=84) had a total length of 547.14 µm (standard error=3.74 µm) and a width in the esophagus-intestine division of 18.54 µm (standard error=0.08 µm).

### Parthenogenetic females' morphometric study

Adult parasites were found in the mucus of the small intestine of infected rats. Morphologically, the females (figure 6a) had a rounded front end with chitinous projections like teeth (figure 6b). A cylindrical filariform esophagus was observed, which made up approximately one-third of the body length and was connected to the intestine extending together with the ovary in a spiral shape throughout the parasite (figure 6c). Additionally, the uterus contained granulated embryo eggs along the vulva located on the ventral midline of the parasitic body (figure 6d). The tail was sharp and the anal hole was viewed at one side of its terminal area (Figure 6e). The parthenogenetic females (n=49), collected on the 8<sup>th</sup>. day post-infection, had a total length of 2.67 mm (standard error=26.21 µm) and a width at the esophagus-intestine division of 29.81 µm (standard error=0.23 µm).



FO: Filariform esophagus; In: Intestine; Ov: Ovary; Ut: Uterus; E: Egg; Vu: Vulva; An: Anus; Pr: Projections

**Figure 6.** Parthenogenetic female of *Strongyloides venezuelensis*. **a)** Entire view (scale bars: 100 µm). **b)** Head portion approach (scale bars: 20 µm). **c)** Middle portion view (scale bars: 50 µm). **d)** Sexual portion approach (scale bars: 20 µm). **e)** Last portion view (scale bars: 50 µm).

### Discussion

In this study, we modeled an experimental life cycle of *S. venezuelensis* in Wistar rats maintained on artificial tropical conditions corresponding to the Andean region of Ecuador at 2,850 masl. We were able to observe the biological cycle features, conduct microscopic and molecular diagnoses comparisons, establish morphometric relations, and describe the specific characteristics of the species during the different stages both inside and outside the host.



The methods of parasitic detection we detailed could be used for the diagnosis of homologous parasites such as *S. stercoralis* in humans. From the different qualitative tests, such as direct swabbing and coproparasitic methods with Lugol staining, and the quantitative assays, such as McMaster quantification, serodiagnostic tests (ELISA, IFAT, and immunoblot), or molecular amplification (10,11,20-22), we chose the Kato-Katz method as an immediate quantitative measurement technique given that *S. venezuelensis* eggs present an easily degradable thin chitinous membrane common in the Rhabditidae family (8,23). This technique allowed us to observe eggs in the feces as of the 6<sup>th</sup>. day post-infection reaching a maximum peak on the 8<sup>th</sup>. day post-infection with a progressive reduction from the 9<sup>th</sup>. to the 28<sup>th</sup>. day post-infection when none were detected anymore, which agrees with other studies where peaks occurred between the 6<sup>th</sup>. and the 8<sup>th</sup>. day post-infection and their expulsion took less than one month (10,11,22). The reduction in egg production as of the 9<sup>th</sup>. day post-infection may be attributed to the immune system of the host through the activity of the eosinophils present in the intestine mucosa (24), the B lymphocytes (25), the mastocytes activated by cytokine stimulus such as IL-3, IL-9, IL-18, and IgE and IgG immunoglobulins (26). We did not observe subclinical coinfections with *Syphacia muris*, an oxyurid nematode normally occurring in the gastrointestinal tract of rats, in any of the evaluation days (22).

We used qPCR to amplify a specific region of the 18s rRNA gene in the *Strongyloides* genus. Although with the Kato-Katz technique we did not manage to observe eggs on the 5<sup>th</sup>. day post-infection, the results observed by qPCR at this point indicated a small increase ( $\Delta C_t=3.68$  equal to 1.71 eggs per gram) compared to the negative control. Besides, although the shape of the egg production curve by qPCR was similar to that obtained with the Kato-Katz technique, the concentrations calculated by qPCR were markedly higher, especially on threshold days (7<sup>th</sup>. and 8<sup>th</sup>. day post-infection).

These values could be explained by the different diagnostic potential of microscopical and molecular tests. Moreover, immature parasites could be detected in the small intestine as of 60 hours of infection (27) after presumably maturing into adult parasites in a progressive manner, such as that seen for the *in vitro* larvae production. While in this study the 6<sup>th</sup>. day post-infection was not analyzed using qPCR, the microscopic observation of eggs at this point confirmed the presence of the parasite and the establishment of a biological cycle in the infected animals. However, on the last day of the study (31<sup>st</sup>. day post-infection), a small increase was observed in the relative quantity of eggs compared to the previous point (28<sup>th</sup>. day post-infection).

This may have indicated that the adult parasites housed in the intestine slightly increased the oviposition, but not until the necessary limit to be detected by direct microscopy, or that the detected levels could have corresponded to the adult parasites eliminated in the feces, a factor attributed to the immune response that increases the contraction of the intestinal walls favoring their removal (28). Given that this study analyzed the dynamic of the biological cycle until the 31<sup>st</sup>. day post-infection, it would be interesting to see the results of the analysis by qPCR after this point to determine the minimum possible amplification levels.

While it is true that the Kato-Katz method was less responsive than the qPCR, its ease of implementation, low cost, and the fact that it does not require sophisticated equipment facilitate its daily use in simple laboratories. Additionally, this technique showed high potential as a screening test for the

diagnosis of different nematode infections (29,30) such as schistosomiasis (15) and, therefore, it could be used in areas lacking the technological capacity or sufficient resources.

On the other hand, we were able to study the morphologic changes of *S. venezuelensis* stages during the experimental life cycle. *In vivo*, the iL<sub>3</sub> exhibited the typical migration and penetrated blood vessels after subcutaneous administration (2,9). Then, we found them in lung fluid using bronchoalveolar lavage on the 2<sup>nd</sup>. day post-infection, thus confirming they had reached the alveoli after breaking the capillary membrane and bronchial epithelium, an aggregation that caused small hemorrhages known as pulmonary petechiae (18).

Subsequently, they mobilized out of the organism across the trachea to the pharynx where the larvae were swallowed by the animals through food and water. Then, they typically migrated across the digestive tract and matured into adult parasites in the duodenal mucosa and the upper part of the jejunum. The eggs were produced via parthenogenesis by the female larvae and then expelled with the intestinal contents (2,9,31). Thus, the migration of *S. venezuelensis* was comparable to other parasites of the Secernentea class and similar to other species of the *Strongyloides* genus.

The most important difference between *S. stercoralis* and *S. ratti* resided in the capability to develop infective larvae in the large intestine apt to disseminate and create autoinfection and/or hyperinfections in the small intestine or other organs (7,9). *Ex vivo*, the production of larvae *in vitro* was related to the number of eggs per gram in feces and a larger production of larvae on the 8<sup>th</sup>. day post-infection. The larval development was asynchronous before reaching the 96 hours of stool culture incubation due to the progressive maturation of eggs produced by adult females (20). At that point, it was possible to find a greater proportion of L<sub>3</sub> larvae making it an ideal collection point of infective larvae that may be used in different studies.

In conclusion, this study describes the implementation of an experimental model of *S. venezuelensis* in a manageable and reproducible system. The biological cycle we standardized provides a study tool for parasitic biology, toxicology, host-parasite interactions, and the development of new technologies or therapies for strongyloidiasis management or other helminthiasis caused by nematodes of regional importance.

### Acknowledgments

The authors would like to thank Alan de Melo (*Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil*) for his support and kind donation of *S. venezuelensis* iL<sub>3</sub> larvae for this study. To the colleagues from the *Programa Nacional para el Abordaje Multidisciplinario de las Parasitosis Desatendidas en el Ecuador* (PROPAD), for their contribution to the accomplishment of this project. To José Manuel Pico, specialist from the experimental animal facility at INSPI LIP, for his revision and support in all the procedures to ensure due care and use of laboratory animals, and to Karen Llerena and Abigail May Davies for the revision of this article.

### References

1. Buonfrate D, Mena MA, Angheben A, Requena-Méndez A, Muñoz J, Gobbi F, et al. Prevalence of strongyloidiasis in Latin America: A systematic review of the literature. *Epidemiol Infect.* 2015;143:452-60. <https://doi.org/10.1017/S0950268814001563>

2. Viney ME, Lok JB. The biology of *Strongyloides* spp. Wormbook: The online review of *C. elegans* biology. 2015:1-17. Access date: 11-18-2019. Available from: <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.141.2>
3. Jacobsen KH, Ribeiro PS, Quist BK, Rydbeck BV. Prevalence of intestinal parasites in young Quichua children in the highlands of rural Ecuador. *J Health Popul Nutr.* 2007;25:399-405.
4. Reyes-Chacón JA. Evaluación del RT-PCR en el diagnóstico de 6 parásitos intestinales en un área con parasitismo de baja intensidad en el trópico, Ecuador. Quito: Universidad San Francisco de Quito; 2012. Available from: <https://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/2043>
5. Júnior AF, Gonçalves-Pires MR, Silva DA, Gonçalves ALR, Costa-Cruz JM. Parasitological and serological diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in domesticated dogs from southeastern Brazil. *Vet Parasitol.* 2006;136:137-45. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.10.022>
6. Mati VLT, Raso P, de Melo AL. *Strongyloides stercoralis* infection in marmosets: Replication of complicated and uncomplicated human disease and parasite biology. *Parasit Vectors.* 2014;7:579. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0579-2>
7. Nutman TB. Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. *Parasitology.* 2017;144:263-73. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000834>
8. Ruano AL. Óxido nítrico como modulador de la estrogiloidosis. Salamanca: Universidad de Salamanca; 2008. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=102628>
9. Viney M, Kikuchi T. *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*-rodent models of *Strongyloides* infection. *Parasitology.* 2017;144:285-94. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000020>
10. Chaves LA, Gonçalves ALR, Paula FM, Silva NM, Silva CV, Costa-Cruz JM, *et al.* Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for evaluation of faecal samples of immunosuppressed rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*. *Parasitology.* 2015;142:1715-21. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001298>
11. Marques PD, Malta FM, Meisel DMCL, Corral MA, Pinho JR, Costa-Cruz JM, *et al.* Diagnosis of the strongyloid nematode *Strongyloides venezuelensis* in experimentally infected rats. *J Helminthol.* 2016;90:422-7. <https://doi.org/10.1017/S0022149X15000528>
12. Viney M. *Strongyloides*. *Parasitology.* 2017;144:259-62. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001773>
13. Bosqui LR, Marques PD, de Melo GB, Gonçalves-Pires MR, Malta FM, Pavanelli WR, *et al.* Molecular and immune diagnosis: Further testing for human strongyloidiasis. *Mol Diagn Ther.* 2018;22:485-91. <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0340-1>
14. Organización Mundial de la Salud. Medios auxiliares para el diagnóstico de las parasitosis intestinales. Ginebra: OMS; 1994. Available from: <https://www.paho.org/es/documentos/medios-auxiliares-para-diagnostico-parasitosis-intestinales>
15. Girard de Kaminsky R. Métodos para laboratorios de atención primaria de salud. Segunda edición. Tegucigalpa: Universidad Nacional Autónoma de Honduras y Hospital-Escuela; 2003. Available from: <http://www.bvs.hn/Honduras/pdf/Manual%20Parasitologia%202007.pdf>
16. Rugai E, Mattos T, Brisola AP. A new technic for the isolation of nematode larvae from faeces; modification of Baermann's method. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 1954;14:5-8.
17. Verweij JJ, Canales M, Polman K, Ziem J, Brienen EAT, Polderman AM, *et al.* Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103:342-46. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.12.001>
18. Beaver PCh, Jung RC, Cupp EW. Rhabditida: *Strongyloides* y formas relacionadas. Parasitología clínica de Craig Faust. Tercera edición. México DF: Masson Doyma S. A.; 2003.
19. Mehlhorn H. Encyclopedia of parasitology. Third edition. New York: Springer. 2008.
20. Marra NM, Chiuso-Minicucci F, Machado GC, Zorzella-Pezavento SF, França TG, Ishikawa LL, *et al.* Migratory route of *Strongyloides venezuelensis* in Lewis rats: Comparison of histological analyses and PCR. *Exp Parasitol.* 2011;127:334-9. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.08.006>
21. Gonçalves ALR, Silva CV, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Antigen, antibody and immune complex detection in serum samples from rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*. *Exp Parasitol.* 2012;130:205-8. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.01.007>
22. Paula FM, Sitta RB, Malta FM, Gottardi M, Corral MA, Gryscek RCB, *et al.* Parasitological and molecular diagnosis in experimental *Strongyloides venezuelensis* infection. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2013;55:141-3. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000200015>

23. Vieira FM, Lima SS, Bessa EC. Morfologia e biometria de ovos e larvas de *Strongyloides* sp. *grassi*, 1879 (*Rhabditoidea: Strongyloididae*) parasito gastrointestinal de *Hydrochaeris hydrochaeris* (Linnaeus, 1766) (Rodentia: Hydrochaeridae), no Município de Juiz de Fora, Minas Gerais. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2006;15:7-12.
24. El-Malky M, Maruyama H, Hirabayashi Y, Shimada S, Yoshida A, Amano T, *et al.* Intraepithelial infiltration of eosinophils and their contribution to the elimination of adult intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis* in mice. *Parasitol Int.* 2003;52:71-9. [https://doi.org/10.1016/s1383-5769\(02\)00086-7](https://doi.org/10.1016/s1383-5769(02)00086-7)
25. El-Malky MA, Maruyama H, Al-Harathi SA, El-Beshbishi SN, Ohta N. The role of B-cells in immunity against adult *Strongyloides venezuelensis*. *Parasit Vectors.* 2013;6:148. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-148>
26. Sasaki Y, Yoshimoto T, Maruyama H, Tegoshi T, Ohta N, Arizono N, *et al.* IL-18 with IL-2 protects against *Strongyloides venezuelensis* infection by activating mucosal mast cell-dependent type 2 innate immunity. *J Exp Med.* 2005;202:607-16. <https://doi.org/10.1084/jem.20042202>
27. Takamura A. Migration route of *Strongyloides venezuelensis* in rodents. *Int J Parasitol.* 1995;25:907-11. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(95\)00014-s](https://doi.org/10.1016/0020-7519(95)00014-s)
28. Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:425-56. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141142>
29. Gabriel JA, Rueda MM, Canales M, Sánchez A. Utilidad del método Kato-Katz para diagnóstico de uncinarias: experiencia en una zona rural de Honduras, 2011. *Rev Med Hondur.* 2012;80:96-101.
30. Easton AV, Oliveira RG, Walker M, O'Connell EM, Njenga SM, Mwandawiro ChS, *et al.* Sources of variability in the measurement of *Ascaris lumbricoides* infection intensity by Kato-Katz and qPCR. *Parasit Vectors.* 2017;10:256. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2164-y>
31. Gonçalves ALR, Silva CV, Carvalho EFG, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Transmammary transmission of strongyloidiasis in immunosuppressed rats. *Neotrop Helminthol.* 2013;7:195-200. <https://doi.org/10.2307/3285443>

Original article

## Disagreement between PCR and serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in blood donors from a Colombian endemic region

Liliana Torcoroma-García<sup>1</sup>, Jhancy Rocío Aguilar<sup>1</sup>, Marly Yojhana Bueno<sup>2</sup>, Erika Marcela Moreno<sup>1</sup>, Herminia Ramírez<sup>3</sup>, Nelson Daza<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Programa de Maestría en Investigación en Enfermedades Infecciosas, Universidad de Santander, Bucaramanga, Colombia

<sup>2</sup> Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad de Santander, Bucaramanga, Colombia

<sup>3</sup> Escuela de Medicina, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

**Introduction:** Chagas' disease is the leading cause of infectious myocarditis worldwide. This infection caused by *Trypanosoma cruzi* is usually life-long and asymptomatic; however, the third part of infected people can develop severe or even fatal cardiomyopathy. As the parasitemia in the chronic phase is both low-grade and intermittent, *T. cruzi* infection is principally detected by serology, although this method has sensitivity and specificity limitations.

**Objective:** To determine the level of agreement between serologic and molecular tests in 658 voluntary blood donors from six provinces in the Colombian department of Santander.

**Materials and methods:** We evaluated an array of diagnostic technologies by cross-section sampling performing a serological double diagnostic test for *T. cruzi* antibody detection (*Chagas III ELISA*<sup>™</sup>, *BiosChile Group*, and ARCHITECT Chagas CMIA<sup>™</sup>, Abbott), and DNA detection by polymerase chain reaction (PCR). We collected the demographic, clinical, and epidemiological information of participants. The sample size was calculated using Epidat<sup>™</sup> and the statistical analysis was done with Stata 12.1<sup>™</sup>.

**Results:** PCR was six times more sensitive in detecting *T. cruzi* infection than ELISA/CMIA with prevalence values of 1.8% (12/658) and 0.3% (2/658), respectively, and kappa=0.28 (95%CI: -0.03 - 0.59). In contrast, serology showed a sensitivity of 16.7% (95%CI: 2.09 - 48.4) and a specificity of 100% (95%CI: 99.4 - 100). All seropositive samples were found to be positive by PCR.

**Conclusions:** The implementation of PCR as a complementary method for screening donors could reduce the probability of false negative and the consequent risk of transfusional-transmission of Chagas' disease, especially in endemic regions.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease; blood donors; serology; polymerase chain reaction.

### Desacuerdo entre la PCR y la serología en el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi* en donantes de una región endémica de Colombia

**Introducción.** La enfermedad de Chagas constituye la principal causa de miocarditis infecciosa en el mundo. Causada por *Trypanosoma cruzi*, la infección puede persistir toda la vida de manera asintomática y silenciosa, pero un tercio de los infectados desarrolla cardiomiopatía grave. Debido a que la parasitemia en la fase crónica es baja e intermitente, el diagnóstico se hace principalmente mediante la detección de anticuerpos (serología), método que tiene limitaciones de sensibilidad y especificidad.

**Objetivo.** Determinar la concordancia entre el diagnóstico serológico y molecular de *T. cruzi* en 658 donantes voluntarios de sangre del departamento de Santander, Colombia.

**Materiales y métodos.** Se hizo un estudio de evaluación de tecnologías diagnósticas con muestreo transversal, utilizando un doble diagnóstico serológico para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* (*Chagas III ELISA*<sup>™</sup>, *BiosChile Group*, y ARCHITECT Chagas CMIA<sup>™</sup>, Abbott) y la de ADN por PCR. Se recolectó la información demográfica, clínica y epidemiológica de los participantes. El tamaño de la muestra se estimó utilizando Epidat<sup>™</sup> y el análisis estadístico se hizo mediante Stata 12.1<sup>™</sup>.

**Resultados.** La sensibilidad de la PCR fue seis veces mayor que la de las pruebas de ELISA/CMIA, con prevalencias de 1,8 % (12/658) y 0,3 % (2/658), respectivamente, y kappa de 0,28 (IC<sub>95%</sub> -0,03 - 0,59). La sensibilidad serológica fue de 16,7 % (IC<sub>95%</sub> 2,09 - 48,4) y la especificidad de 100 % (IC<sub>95%</sub> 99,4 - 100). Todas las muestras seropositivas fueron positivas también en la PCR.

**Conclusiones.** El uso de la PCR como método complementario para la tamización de donantes podría reducir el riesgo de falsos negativos y disminuir los casos de transmisión transfusional de la enfermedad de Chagas, especialmente en regiones endémicas.

**Received:** 18/03/2020

**Accepted:** 04/03/2021

**Published:** 05/03/2021

**Citation:**

Torcoroma-García L, Aguilar-Jiménez JR, Bueno MY, Moreno-Moreno EM, Ramírez H, Daza N. Disagreement between PCR and serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in blood donors from a Colombian endemic region. *Biomédica*. 2021;41(Supl.1):47-59.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.5441>

**Corresponding author:**

Liliana Torcoroma-García, Programa de Maestría en Investigación en Enfermedades Infecciosas, Universidad de Santander, Campus Universitario Lagos del Cacique, Calle 70 No 55-210, Bucaramanga, Colombia  
Telephone: (577) 651 6500, extensions 1213 y 1214  
l.torcoroma@udes.edu.co

**Author contributions:**

Liliana Torcoroma-García: conception of the study, design of all the experiments, review of all the results and findings and writing of the manuscript  
Jhancy Rocío Aguilar: data collection and analysis and writing of the manuscript  
Marly Yojhana Bueno and Erika Marcela Moreno: responsible for all the PCR analysis and writing of the manuscript  
Herminia Ramírez and Nelson Daza: sample collection and ELISA assays.  
All authors contributed to and approved the final version of the manuscript.

**Funding:**

This study was supported by the *Vicerrectoría de Investigaciones - Universidad de Santander*, under grant 003-13.

**Conflicts of interest:**

The authors declare no conflicts of interest.

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*; enfermedad de Chagas; donantes de sangre; serología; reacción en cadena de la polimerasa

Chagas' disease is an infection caused by the hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* and it is considered one of the most significant neglected tropical diseases affecting 6 to 7 million individuals worldwide (1). In Latin America, this infection is reported as endemic in 21 countries leading to approximately 12,500 deaths per year and economic losses estimated at around USD\$ 1.2 billion (almost five times greater than the regional malaria burden) (2,3). In the last few decades, this disease has become a global phenomenon, principally led by large-scale human migrations from endemic and rural regions to urban and non-endemic countries (Europe, USA, Canada, and Japan, among others) (4). In Colombia, the prevalence of *T. cruzi* infection has been estimated at 700,000 to 1,200,000 cases with the country's eastern departments being the most affected: Arauca (21.1%), Casanare (10%), and Santander (6.3%) (5).

*Trypanosoma cruzi* infection commonly exhibits a prolonged asymptomatic course (indeterminate phase), which can progress to severe chronic heart and digestive system disease or death in approximately 30% of cases. These clinical characteristics can delay the etiological diagnosis making it difficult to determine the real epidemiological impact of the infection.

Current Chagas' disease treatments are mainly aimed at the control of acute infection with good results in terms of parasite clearance. However, for the chronic phase, there is still no treatment to cure the infection or to prevent its progression (6). In the long term, the treatment in the indeterminate disease is most cost-effective than the therapy in the chronic phase when moderate to severe cardiomyopathy is established (7). In these cases, benznidazole decreases parasitic load and reduces heart injury (7). Consequently, it is important to rethink the epidemiological control measures for Chagas' disease and to develop and implement better methods for the detection of the etiological agent improving, therefore, the timely diagnosis and treatment of infected people before tissue damage or parasite transmission occurs (8).

As parasitemia is both low-grade and intermittent in the chronic phase of the infection, the diagnosis is based on the detection of anti-*T. cruzi* by serological methods (9), but currently, there is not an ideal serological test or gold standard (10). However, the systematic screening of asymptomatic individuals (such as blood donors) is performed via the indirect detection of specific antibodies generated against the parasite in serum samples processed by methods such as ELISA and CMIA. Nevertheless, sensitivity and specificity limitations have been reported for this method in endemic regions where seronegativity has been described in patients diagnosed by direct methods and clinical findings (serosilent patients) (11-14). These disagreements between direct and serological techniques represent a serious risk of contagion, especially among recipients of blood or its components.

Molecular detection of the parasite's nuclear or kinetoplast DNA by PCR has been described as highly sensitive and specific and it is especially useful in the indeterminate and chronic phases of the infection. Unfortunately, the optimization and standardization of these methods have been difficult, with disagreements in results commonly found in comparison studies (15-17), and there is no commercial PCR assay for Chagas' disease available yet.

In comparative studies in blood donors, discordant results in serological and conventional, or even real-time PCR tests, have been reported in the third part of infected individuals (8,15,18). In enzootic infections as Chagas' disease, the seroconversion phenomena can occur in endemic areas associated with evolution adaptation mechanisms for parasite tolerance through parasitemia control or the absence of a fully-developed immune response, which is not necessarily equivalent to parasite clearance (8,19,20). Consequently, the parasitological cure could be established based on negative results in specific molecular tests more than by negative seroconversion (8).

In this context, we conducted a comparative study of the results obtained with two commercial serological (ELISA and CMIA) and molecular (in-house PCR) tests performed in 658 voluntary blood donors from the department of Santander, Colombia, an endemic region for Chagas' disease. The results of both assays were then compared showing a better performance of the molecular method in terms of sensitivity.

## **Materials and methods**

### **Materials**

We used a QIAamp DNA Blood MiniKit™ (Qiagen) for whole DNA extraction from blood. GoTaq Flexi™, dNTPs Mix™, 5X Buffer GoTaq Flexi™, and 25 mM of MgCl were purchased from Promega. We also used a Mastercycler Nexus™ (Eppendorf), a Wide Mini-Sub Cell GT Cell Horizontal Electrophoresis Chamber™, and a NanoDrop ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer™ (Thermo Fisher Scientific). The PowerPac HC™ and the Gel Doc XR +Gel Documentation System™ were acquired from Bio-Rad. The Gene Ruler 1 kb and the 6X DNA Loading Dye were purchased from Thermo Fisher Scientific. Agarose and SYBR Safe DNA Gel Stain™ were purchased from Invitrogen Life Technologies. All the reagents and the water used were ultrapure.

### **Study design**

We evaluated the diagnostic technologies by cross-sectional sampling performing a serological double diagnostic for *T. cruzi* antibody detection and DNA detection by PCR. Blood samples were prospectively collected from 658 voluntary donors who had participated in blood donation campaigns organized by a blood bank from a third-level hospital in Santander.

All the volunteers completed two self-reported questionnaires: one for blood bank-donor selection and the other to collect specific information for the study. To prevent unintentional double registrations, we excluded individuals previously sampled in the study. Relevant demographic, clinical, and epidemiological information was also collected. Consecutive sampling was performed over approximately twelve months (June, 2013, to May, 2014) until reaching the previously-determined sample size, which was calculated using Epidat 4.1™ software taking into consideration the reported prevalence for *T. cruzi* infection in the blood bank (5%) with 95% confidence level and 5% minimum precision.

### **Inclusion and exclusion criteria**

We selected individuals who signed the informed consent, complied with the Colombian blood donor standards, and provided all the specific information required for the study variables.

### **Blood samples**

Whole blood and serum samples for molecular and serological tests were collected on the same day by phlebotomy in 5 ml Vacutainer™ sterile tubes with EDTA or without anticoagulant, respectively. Serum samples were separated within two hours of collection and kept at -20°C until serological processing. EDTA-supplemented blood samples were preserved at 4°C and protected from light until DNA extraction. The serology and DNA extraction procedures were completed within 15 days of collection.

### **DNA extraction**

DNA extraction from EDTA-supplemented blood samples was performed using a QIAmp DNA Blood Mini Kit™ (QIAGEN) following the manufacturers' protocol slightly modified. Briefly, 200 µl of blood were washed twice with STE solution (100 mM NaCl; 10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 1 mM EDTA) on the sample-equilibrated column to reduce the ionic strength and to optimize DNA extraction. The quality of the extracted DNA was confirmed using 1% agarose electrophoresis and its concentration was determined on a NanoDrop ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer™ (Thermo Fisher Scientific), and quantified with the NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer Software™ (Thermo Fisher Scientific). As controls, we used 300 µl of each whole blood sample on Whatman No. 3 filter paper stored in 1.5 ml sterile plastic tubes at -20°C.

### **Polymerase chain reaction (PCR)**

PCR assays were performed using the forward TckDNA121F (5'-AAATAATGTACGGGGGAGATGCATGA-3) and the reverse TckDNA122R (5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3') primer sequences described by Sturm, *et al.* (21). These oligonucleotides were designed based on conserved regions of the *T. cruzi* 9813 strain and V101 clone kinetoplast DNA (GenBank accession number 311875422) and synthesized by Invitrogen Life Technologies.

For the PCR, we used total DNA and control samples from patients as templates. We optimized the PCR reagent concentrations and running conditions based on amplicon efficiency and specificity parameters. The positive DNA controls used for the PCR assays were: a) genomic material extracted from an axenic LIT culture of *T. cruzi* I (Tcl) SYLVIO-X10 strain epimastigotes, and b) total DNA isolated from EDTA-blood samples obtained from clinically confirmed patients with chagasic cardiomyopathy. All samples were processed in duplicate in two independent experiments and all positive PCR samples were confirmed in triplicate.

The quality, sensitivity, and specificity of the DNA amplification were assessed using 1.5% DNA agarose electrophoresis assays stained with 1X SYBR Safe™ (Invitrogen Life Technologies), then visualized using a 302 nm UV transilluminator, and documented with a Gel Doc XR+ Gel Documentation System™ (BioRad).

### **Anti-*T. cruzi* antibodies**

We screened the serum samples for anti-*T. cruzi* antibodies using a *Chagas III* ELISA Kit™ (*BiosChile Group*) and retested using an ARCHITECT Chagas CMIA Kit™ (Abbott) following the manufacturer's instructions. Samples with results above the cutoff value in both ELISA and CMIA tests were considered positive and confirmed by Western Blot. The absorbance cutoff values were below 0.3 in all the analyses performed. Sera from patients with chronic chagasic cardiomyopathy were utilized as positive controls.



### **Statistical analysis**

The personal, clinical, and epidemiological data of the donors, as well as their serological and PCR results, were recorded in a database with the Epidata 3.1. software. Frequency distribution, central tendency, and dispersion statistics were calculated for the quantitative variables and proportions for the qualitative variables. The association between the independent variables and the infection and the normality of the continuous data were evaluated using the chi-square and Shapiro Wilk tests, respectively. The agreement between ELISA/CMIA and PCR was calculated by means of the kappa coefficient. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of the serological tests were calculated taking the PCR as the defined reference test. All statistical analyses were carried out using Stata 12.1™.

### **Ethical considerations**

The study was approved by the Ethics and Research Committee at *Universidad de Santander* and by the Ethics Committee of the hospital to which the blood bank is affiliated and conducted according to the current Colombian legislation (Resolution 8430 of 1993) and the Helsinki Declaration. All participants signed an informed consent form.

To guarantee confidential data handling, information was coded. All assays using donor samples were performed in accordance with defined quality control standards. Blood donors identified during screening as *T. cruzi* seropositive were referred for medical attention and follow-up testing including hemoculture and Western Blot.

## **Results**

### **Study population**

The main demographic characteristics of the study population (place of residence, sex, age, and occupation) are shown in table 1. The study population (658 voluntary donors) was composed mainly of young people (50% aged 18 to 24, average age: 28.9 years  $\pm$  10.1 SD), males (59.4%, n=391), O blood type (61.2%, n=403), Rh+ (60.5%, n=399), students (56.5%, n=372), and residents in several Santander municipalities (93.3%, n=614) 75% of them located in Chagas' disease-endemic areas.

The provinces of Guanentá (n=380), Comunera (n=164), and Yariguíes (n=28) provided 86.9% (n=572) of the collected samples, mainly from the towns of San Gil (n=338), Socorro (n=152), and Barrancabermeja (n=27), correspondingly (figure 1). The remaining donors (3.3% non-residents) came from other Colombian departments also endemic for Chagas' disease according to the National Public Health Surveillance System (6): 1.4% (n=9) from Boyacá; 1.1% (n=7) from Bolívar; 0.3% (n=2) from Magdalena; 0.3% (n=2) from Cesar; 0.2% (n=1) from Casanare, and 0.2% (n=1) from Sucre. The residence data of 17 donors were missing.

Risk factors were only reported by 7.1% (n=47) of the participants (table 2). Only 40.7% (n=268) had donated blood previously and a very low percentage (0.6%, n=4) had been bitten by a triatomine bug at some point in their lives.

**Table 1.** Demographic characteristics of the study population

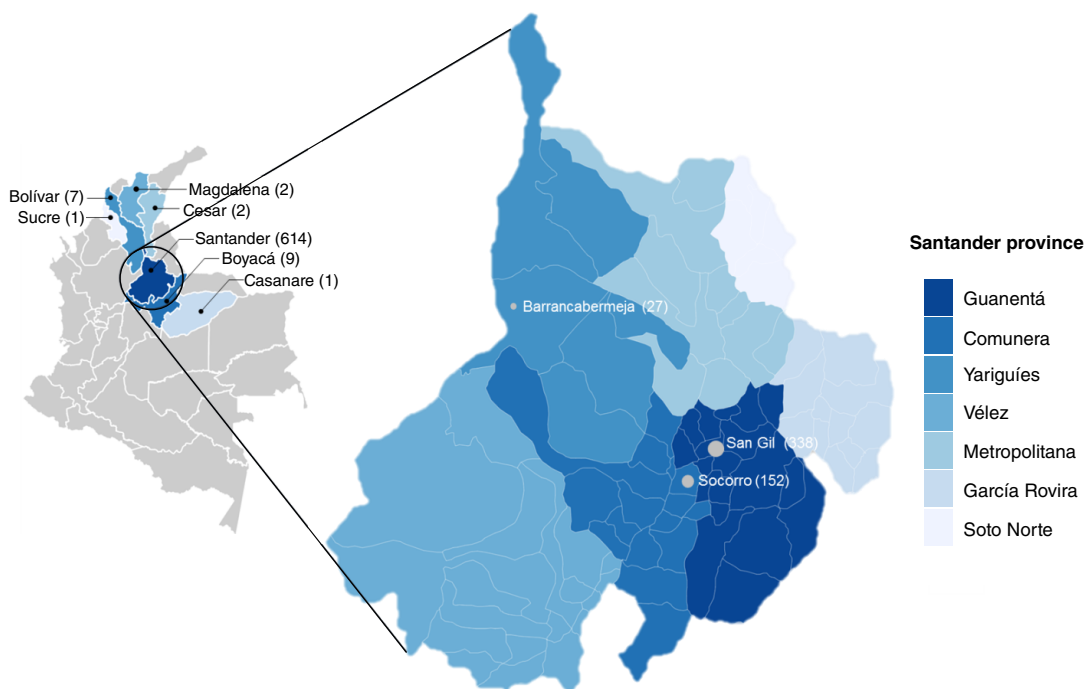
Department	Province	Sex				Age				Occupation*				
		F		M		X	SD	Student		Employed		Unemployed <sup>1</sup>		
		n	%	n	%			n	%	n	%	n	%	
Santander		614	93.3	257	39.0	357	54.2	29.4 ± 10.3	359	54.5	233	35.4	10	1.5
	Comunera	164	24.9	75	11.3	89	13.5	26.0 ± 7.0	127	19.3	33	5.0	2	0.3
	García Rovira	8	1.2	-	-	8	1.2	24.2 ± 2.8	8	1.2	-	-	-	-
	Guanentá	380	57.7	168	25.5	212	32.2	31.7 ± 11.2	196	29.8	166	25.2	8	1.2
	Metropolitana	21	3.2	6	0.9	15	2.3	25.7 ± 6.7	9	1.4	12	1.8	-	-
	Soto Norte	1	0.2	1	0.2	-	-	22.0 -	1	0.2	-	-	-	-
	Vélez	1	0.2	-	-	1	0.2	21.0 -	-	-	1	0.2	-	-
	Yariguíes	28	4.3	4	0.6	24	3.6	22.0 ± 1.4	15	2.3	13	2.0	-	-
	Not reported	11	1.7	3	0.5	8	1.2	29.1 ± 13.8	3	0.5	8	1.2	-	-
Other departments <sup>2</sup>	-	27	4.1	6	0.9	21	3.2	22.7 ± 1.7	13	2.0	12	1.8	-	-
Missing data	-	17	2.6	4	0.6	13	2.0	-	-	-	-	-	-	-
		658	100	267	40.6	391	59.4	28.9 ± 10.1	372	56.5	245	37.2	10	1.5

n: Number; F: Female; M: Male

\* 31 Missing data

<sup>1</sup> Unemployed: Retired and housewife people

<sup>2</sup> Other Colombian departments: Endemic [Boyacá 1.4% (n=9), Bolívar 1.1% (n=7), Magdalena 0.3% (n=2); Cesar 0.3% (n=2); Casanare 0.2% (n=1), Sucre 0.2% (n=1)], and non-endemics (n=5)



Missing data (n=17); non-endemic departments (n=5)

**Figure 1.** Colombian map of sample collection sites and zoom into Santander department and its provinces. )

**Table 2.** Association between risk factors for transfusion-transmissible infections and PCR positive results for *Trypanosoma cruzi*

Variable	n=658	%	PCR (+)/(-)	p value*
Tattoo <12 months	18	2.8	0/18	0.56
Travel to endemic regions <sup>1</sup> <6 months	8	1.2	0/8	0.70
Transfusion <12 months	5	0.8	0/5	0.76
Biological accident <6 months	9	1.4	0/9	0.68
Hallucinogenic drug use <12 months	5	0.8	0/5	0.76
Bitten by kissing bug (triatomine)	4	0.6	1/3	0.001

<sup>1</sup> Endemic regions for leishmaniasis, dengue, malaria or yellow fever

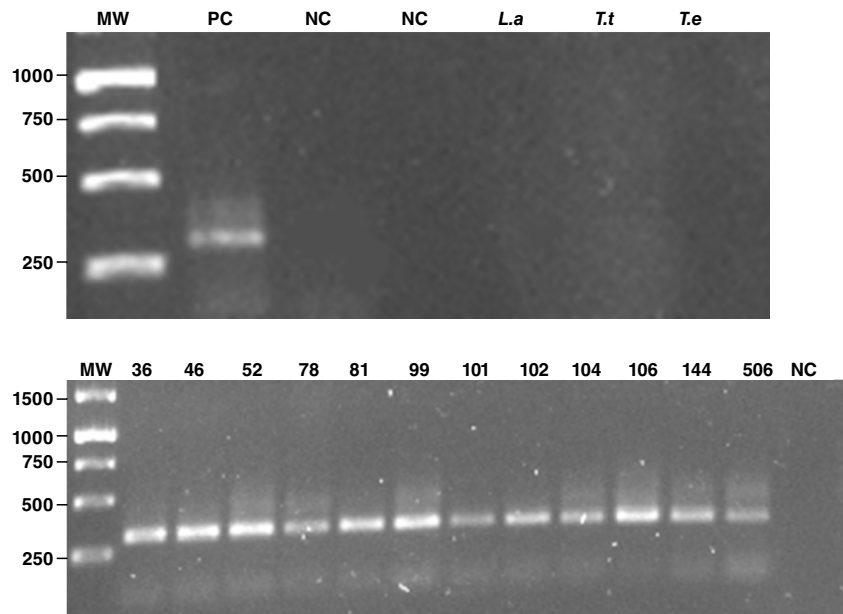
\* p<0.05: statistically significant

### DNA isolation and amplification

For PCR assays, total DNA was isolated from whole blood samples and concentrations between 40 and 70 ng/ $\mu$ l were obtained and used as templates. The amplification assays were performed using the oligonucleotide pair described by Sturm, *et al.* (21). To increase the 330 bp *T. cruzi*-kDNA amplicon production and the specificity of the test, the reagent concentrations and cycling parameters used were optimized as indicated in the supplementary material (table S1). The sensitivity of the optimized PCR was estimated at 12.5ng/ $\mu$ l of DNA (equivalent to 1 cell/ $\mu$ l) using total DNA samples isolated from *T. cruzi* cultures as templates at various concentrations. Non-target-size bands were generated employing *T. theleri*, *T. evansi*, and *Leishmania amazonensis* genomic material as DNA templates to confirm a 100% specificity for the optimized test (figure 2A).

### Serological vs molecular test

We found 0.3% (n=2) of samples positive for *T. cruzi* antibodies in serum with both serological methods (*Chagas III* ELISA Kit™ from *BiosChile Group* and ARCHITECT Chagas CMIA Kit™ from Abbott). Conversely, in the molecular analysis, we found a total of 12 samples (1.8%) (figure 2B). We did not find false positives as all the positive serological results (n=2) also exhibited the specific amplicon band by PCR thus allowing us to estimate a 100% specificity for the serological techniques used. According to the PCR results, a 1.8% (n=12) *T. cruzi* infection prevalence was calculated for the study population. Using the kappa coefficient, the agreement between the serological and molecular results was calculated at 0.28 (95%CI: -0.03 - 0.59) and the following serology parameters were estimated using the molecular assay as the defined reference test: Sensitivity, 16.7% (95%CI: 2.09 - 48.4); specificity, 100% (95%CI: 99.4 - 100); PPV, 100% (95%CI: 15.8 - 100), and NPV, 98.5% (95%CI: 97.2 - 99.3) (table 3).



MW: Molecular Weight Gene Ruler 1Kb DNA Ladder; PC: Positive control (*Trypanosoma cruzi* culture total DNA extraction); NC: Negative control; L.a: *Leishmania amazonensis*. T.t: *Trypanosoma theleri*; T.e: *Trypanosoma evansi*

**Figure 2.** PCR products in 1.5% agarose electrophoresis gel. **A.** Control DNA samples. **B.** Positive PCR assays from donor DNA samples (36, 46, 52, 78, 81, 99, 101, 102, 104, 106, 144, and 506).

**Table 3.** Sensitivity, specificity, predictive values and concordance of serological tests as compared to PCR for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in blood donors from a Colombian endemic region

Diagnostic test*	PCR (+)	PCR (-)	Total
Serological			
(+)	2	0	2
(-)	10	646	656
Total	12	646	658

\*Kappa coefficient: 0.28 (95%CI: -0.03-0.59); sensitivity: 16.7% (95%CI: 2.09-48.4); specificity: 100% (95%CI: 99.4-100); positive predictive value (PPV) 100% (95%CI: 15.8-100), and negative predictive value (NPV) 98.5% (95%CI: 97.2-99.3)

To determine possible associations, the twelve donors who tested positive by either PCR or serology were characterized using parameters such as their place of residence, sex, occupation, and relevant epidemiologic backgrounds (triatomine bite or previous donation) (table 2). It is noteworthy that 83% (10/12) of the individuals who tested positive for *T. cruzi* infection by PCR came from the province of Guantán (San Gil), 75% (9/12) were male, and 33% (4/12) had previously donated blood. One of the two individuals who tested positive by both serology and PCR assays (sample 78) reported having previously suffered a triatomine bite (table 2).

## Discussion

In endemic areas of many Latin American countries, *T. cruzi* is primarily transmitted by contact with the feces of infected blood-sucking triatomine bugs (vector-borne). However, transmission by transfusion remains significant, principally due to the dispersal of the infection beyond the geographical borders of insect vectors, which alters the infection's epidemiological dynamics (4). Control efforts in the region have been centered on vector control and the implementation of protocols and regulations for compulsory blood donor screening. The prevalence of *T. cruzi* infection among blood bank donors has shown a great variation, with rates varying between 1.3% and 51% (22). In Colombia, the seroprevalence in blood donors has been reported between 0.09% and 2.1% depending significantly on the region studied (23-28), with an estimated 5% in the nation's general population (27). In Santander, the *T. cruzi* infection rate for voluntary blood donors has been reported at around 0.53% (28).

Currently, blood safety depends primarily on the sensitivity of the laboratory screening tests, as well as on the implementation of progressively more stringent donor eligibility criteria. However, due to the largely asymptomatic course of *T. cruzi* infection and its characteristic low parasitemia, in its late stages, the diagnosis is traditionally carried out using two or more serologic tests for specific IgG antibody detection (9). In blood bank screening, the most commonly-used methods are those based on enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) and chemiluminescent microparticle immunoassays (CMIA), with more complex techniques, such as indirect immunofluorescence (IFI) and immunoblotting, generally being used for confirmatory purposes. Previously, high specificity and sensitivity levels (up to 95% of IFI standards) have been reported for ELISA and CMIA assays, as well as a high reproducibility of ELISA, IFI, and indirect hemagglutination (IHA) (29,30), but they also exhibit limitations that should be considered and analyzed through comparative studies with modern complementary techniques (29). For example, the false seropositive results reported in these tests have been explained by the cross-reactivity with other hemoflagellate protozoa such as *Leishmania* spp. or *Trypanosoma rangeli* (29,31). Additionally, and most preoccupying, multiple studies have reported seronegativity in patients who are symptomatic for

Chagas' disease and exhibit molecular evidence of *T. cruzi* infection (i. e. who are PCR-positive) (12,31,32).

Here we conducted a comparative study of two methods for serological screening of specific *T. cruzi* antibodies (*Chagas III ELISA Kit™* from BiosChile Group and ARCHITECT Chagas CMIA Kit™ from Abbott) and a molecular technique using the in-house PCR protocol previously described by Sturm, *et al.* (21). The tests were applied to 658 voluntary blood donors from a Chagas' disease-endemic region (Santander, Colombia) with a reported 6.3% *T. cruzi* infection prevalence (5) and great diversity in domestic and wild triatomine insects (11 different species of which seven are involved in Chagas' disease transmission) (5,33).

Our results showed that the molecular method was six times more sensitive than the ELISA and CMIA assays at detecting *T. cruzi* infection in blood samples. These results are in agreement with previous studies documenting a better performance for molecular methods in terms of sensitivity and specificity, especially for parasite detection in blood samples from chronic patients and cases of doubtful serological tests (8,11-14,18,31). Thus, in patients with cardiac (12) and/or digestive abnormalities (13), which are characteristic of chagasic infection with low parasitemia, PCR appeared to be an efficient method for *T. cruzi* DNA detection even for doubtful (8,11) or serologically negative cases (8,12,13).

Comparative studies of serological results and molecular PCR test performed in a cross-sectional blood donor cohort evidenced low antibody levels or discordant test results in one third of the seropositive samples (8,18). These results were explained by parasite tissue sequestration after the resolution of acute infection leading to a low-grade and intermittent parasitemia in indeterminate and chronic infection stages (8,18-20). These phenomena can be also accompanied by a low antigenic stimulus with a resulting low antibody production or even seroconversion (19-20). The association of antibody levels with peripheral parasitemia was previously described in blood donor studies (8,15), parameters that were also correlated with the severity of the chagasic cardiomyopathy (8). These authors concluded that in endemic areas a minor proportion of the infected individuals are able to control the circulating parasite in the blood (8), but does not necessarily represent its elimination. Consequently, the absence of reliable biomarkers to identify the parasite persistence is a major obstacle to understand the natural history of chagasic cardiomyopathy and determine the true impact of the disease.

The performance of the molecular method can be explained by the fact that PCR is based on direct detection of parasite DNA while immunological tests are strongly dependent on the patient's immune status and the time since infection. They also rely heavily on the technical conditions under which the assays are performed (for example, antigen, parasite lineage, or developmental stage, among others) (31,32). Therefore, despite chronic infection, some patients are unable to develop an antibody response detectable by conventional serology. This phenomenon could be more common than expected as revealed by previous reports in endemic nations such as Argentina, Bolivia, Venezuela, and Brazil (12,13,33). Some of its possible causes include: a) window-phase or very low antibody titers in the early stage of infection (34); b) inability of some *T. cruzi* strains to induce specific antibody production (35); c) HIV co-infection causing decreased antigen presentation due to virus tropism on CD4<sup>+</sup> T-, dendritic, and natural

killer cells, and the consequent impairment of their antibody secretion (36); d) non-responder phenomenon or persistent antibody-negative (immunosilent) carriers who are unable to produce a detectable humoral response and present appropriate antigens (possibly associated with CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell depletion due to the affinity of the thymus as a *T. cruzi*-infection target), as well as the reduction of IL-2 (a pivotal cytokine in cellular memory immunity and antigen recognition) (34,35), and e) procedural testing errors.

Currently, PCR protocols using different targets such as repeated satellite sequences (11), Tc24 flagella proteins 3' end ORF (37), or kinetoplast DNA (21) have been described. The PCR described by Sturm, *et al.* (21), uses a specific primer pair for the amplification of a 330 bp fragment from kDNA minicircles resulting in a highly sensitive (70% to 100%) and specific (96.5% to 100%) method due to the high copy-number of the mitochondrial genome (10,000 to 30,000 minicircles and their respective four copies in the variable region). Additionally, this protocol was also reported to exhibit specificity of 100% compared to other kinetoplastid genera (*Crithidia luciliae*, *Leptomonas collosoma*, *Herpetomonas mariadeanei*, *Endotrypanum* spp., *Blastocrithidia culicis*, *Leishmania tarentolae*, and *T. rangeli*) (21), which explains why we selected and optimized the method to use it as the molecular test. The modified PCR results in an increase in sensitivity and specificity rates.

In the present study, all positive samples by serology (2/658) were also positive by PCR (two true positive results), however, 10 samples were only found positive using the molecular assay (10 false negatives by serology). Given that four of the PCR-positive donors had previously donated blood, an apparent epidemiological risk is evident for transfusion-transmission associated with possible false negatives from serology.

In the correlation analysis of *T. cruzi* PCR-positive donors and the independent variables (table 2), the triatomine bite was the only variable that showed a statistically significant association ( $p < 0.001$ ); this risk factor was reported by 33.3% (4/12) of the PCR-positive individuals and 10/12 (83.3%) of these positive donors were residents in Guanentá, a highly endemic area for Chagas' disease (table 1).

Regarding serological methods, 96% sensitivity and 99% specificity levels have been estimated for screening ELISA assays (38). Specifically for the Chagas III ELISA kit from the BiosChile Group an 82% to 99% specificity and a 99% sensitivity have been reported (39,40), and the test has also shown an excellent concordance with other ELISA tests, such as the Chagas test IIC V.1 (Research Institute in Health Sciences at *Universidad Nacional de Asunción*, Paraguay) and the Chagatest ELISA (Wiener) (40), with a kappa index of 0.92. However, in aboriginal communities in the Venezuelan States of Bolívar and Delta Amacuro, the ELISA Chagas III (BiosChile) method had a poor performance in detecting specific *T. cruzi*-IgG antibodies (41). A significant performance disagreement has also been reported for commercial ELISA results for *T. cruzi* antibody detection. In this regard, Guzmán-Gómez, *et al.* (42), analyzed 37 samples using five serological techniques and found that only one sample was positive with all techniques: one with four and nine with three. All samples were positive for at least two of the tests used but in a matrix of various combinations (42).

It is important to acknowledge that the population recruited in blood donor campaigns (as in this study) are demographically different from the conventional donors routinely attending blood banks and both of them differ

from the general population. Therefore, the prevalence registered in our study cannot be considered the Chagas' disease prevalence in the general population, mainly because the volunteer participants were mostly males, students, young, and unemployed (table 1); besides they were in good health and had healthy personal habits (28). It is possible, then, that a higher prevalence would be found in the general population in Santander from all age and sex groups, as well as normal occupational diversity.

However, our purposes were first, to compare the diagnostic utility of ELISA/CMIA and PCR techniques for Chagas' disease diagnosis; second, to determine the existence of a possible serosilent phenomenon in blood donors from Santander municipalities, and third, to emphasize the need to rethink progressively more restrictive donor eligibility criteria and increasingly sensitive blood donor screening methods like PCR. The implementation of a PCR test, as described herein, could be used as a complementary method for screening blood donors thus reducing the risk of false-negative results and Chagas' disease transmission by transfusion, especially in endemic regions such as the department of Santander in Colombia.

### Acknowledgements

We are grateful to Mr. Emile Blanchette for his help in proofreading the manuscript.

### References

1. World Health Organization. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Third WHO report on neglected tropical diseases. February, 2015. Accessed: March 19, 2018. Available at: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/152781/9789241564861\\_eng.pdf;jsessionid=404097E9D1CA2695A8D268A0464A0B12?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/152781/9789241564861_eng.pdf;jsessionid=404097E9D1CA2695A8D268A0464A0B12?sequence=1)
2. Hotez PJ, Dumonteil E, Heffernan MJ, Bottazzi ME. Innovation for the 'bottom 100 million': Eliminating neglected tropical diseases in the Americas. *Adv Exp Med Biol.* 2013;764:1-12. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4726-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4726-9_1)
3. Gunda R, Chimbari M, Mukaratirwa S. Assessment of burden of malaria in Gwanda District, Zimbabwe, using the disability adjusted life years. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13:244. <https://doi.org/10.3390/ijerph13020244>
4. Robertson LJ, Devleeschauwer B, De Noya BA, González ON, Torgerson PR. *Trypanosoma cruzi*: Time for international recognition as a foodborne parasite. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10:e0004656. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004656>
5. Instituto Nacional de Salud. Sivigila, República de Colombia. Accessed: May 16, 2017. Available at: <https://www.ins.gov.co/Direcciones/Vigilancia/Paginas/SIVIGILA.aspx>
6. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi Jr A, Rosas F, *et al.* Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *N Eng J Med.* 2015;373:1295-306. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507574>
7. Ramsey JM, Elizondo-Cano M, Sánchez-González G, Peña-Nieves A, Figueroa-Lara A. Opportunity cost for early treatment of Chagas disease in México. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e2776. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002776>
8. Buss LF, De Oliveira-da Silva LC, Moreira CH, Manuli ER, Sales FC, Morales I, *et al.* Declining antibody levels to *Trypanosoma cruzi* correlate with polymerase chain reaction positivity and electrocardiographic changes in a retrospective cohort of untreated Brazilian blood donors. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14:e0008787. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008787>
9. Pan American Health Organization. Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease. 2019. Accessed: December 7, 2020. Available at: [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/49653/9789275120439\\_eng.pdf?sequence=6&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/49653/9789275120439_eng.pdf?sequence=6&isAllowed=y)
10. Abras A, Gállego M, Llovet T, Tebar S, Herrero M, Berenguer P, *et al.* Serological diagnosis of chronic Chagas disease: Is it time for a change? *J Clin Microbiol.* 2016;54:1566-72. <https://doi.org/10.1128/JCM.00142-16>

11. Marcon GE, Andrade PD, De Albuquerque DM, Wanderley JS, De Almeida EA, Guariento ME, et al. Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic Chagasic patients and patients with doubtful serologies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002;43:39-43. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(02\)00366-8](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00366-8)
12. Salomone OA, Basquiera AL, Sembaj A, Aguerri AM, Reyes ME, Omelianuk M, et al. *Trypanosoma cruzi* in persons without serologic evidence of disease, Argentina. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:1558-62. <https://doi.org/10.3201/eid0912.030008>
13. Batista AM, Aguiar C, Almeida EA, Guariento ME, Wanderley JS, Costa SC. Evidence of Chagas disease in seronegative Brazilian patients with megaesophagus. *Int J Infect Dis*. 2010;14:974-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.05.017>
14. Alarcón B, Colmenares C, Díaz-Bello Z, Ruiz-Guevara R, Medina K, Muñoz-Calderón A, et al. Orally-transmitted Chagas disease: Epidemiological, clinical, serological and molecular outcomes of a school microepidemic in Chichiriviche de la Costa, Venezuela. *Parasite Epidemiol Control*. 2016;1:188-98. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2016.02.005>
15. Sabino EC, Lee TH, Montalvo L, Nguyen ML, Leiby DA, Carrick DM, et al. Antibody levels correlate with detection of *Trypanosoma cruzi* DNA by sensitive polymerase chain reaction assays in seropositive blood donors and possible resolution of infection over time. *Transfusion*. 2013;53:1257-65. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03902.x>
16. Moreira OC, Ramírez JD, Velázquez E, Dias-Melo MF, Lima-Ferreira C, Guhl F, et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial. *Acta Trop*. 2013;125:23-31. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.08.020>
17. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejía-Jaramillo AM, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5:e931. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000931>
18. Remesar M, Sabino EC, Del Pozo A, Mayer A, Busch MP, Custer B. Bimodal distribution of *Trypanosoma cruzi* antibody levels in blood donors from a highly endemic area of Argentina: What is the significance of low-reactive samples? *Transfusion*. 2015;55:2499-504. <https://doi.org/10.1111/trf.13180>
19. Chevillard C, Silva JP, Frade AF, Almeida RR, Pandey RP, Nascimento MS, et al. Disease tolerance and pathogen resistance genes may underlie *Trypanosoma cruzi* persistence and differential progression to Chagas disease cardiomyopathy. *Front Immunol*. 2018;9:2791. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02791>
20. Teixeira AR, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in Chagas disease: A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101:463-91. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000500001>
21. Sturm NR, Degrave W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: Use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol*. 1989;33:205-14. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(89\)90082-0](https://doi.org/10.1016/0166-6851(89)90082-0)
22. Schmunis GA. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: Status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion*. 1991;31:547-57. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1991.31691306255.x>
23. Behrend M, Beltrán M, Restrepo M, Kroeger A. Control de la enfermedad de Chagas en bancos de sangre de Colombia. *Biomédica*. 2002;22:39-45. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v22i1.1138>
24. Rocha LP, Hernández IP, Martínez DM, Castellanos YZ. *Trypanosoma cruzi*: prevalencia y factores de riesgo de seropositividad en donantes de sangre del Hemocentro y Unidad de Aféresis, Valledupar, Colombia, 2013-2014. *Med Lab*. 2014;20:529-42.
25. Flórez C, Guasmayan L, Cortés L, Caicedo A, Beltrán M, Muñoz L. Chagas disease and its seroprevalence in three departments of the Colombian Amazon. *Nova*. 2016;14:35-43.
26. Beltrán M, Hilarión LB, Berrío M, Bermúdez MI. Detección de anticuerpos para *Trypanosoma cruzi* en donantes de sangre. Caquetá, Colombia, 1995 a 2010. *Rev Salud Pública*. 2017;19:355-61. <https://doi.org/10.15446/rsap.v19n3.49627>
27. Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:17-30. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900005>



28. Daza N, Sánchez M, Vanegas T, Ortega I. Prevalencia de infecciones en donantes de sangre en la Universidad Industrial de Santander versus parques de la ciudad de Bucaramanga, 2014. *Médicas UIS*. 2016;29:55-60. <https://doi.org/10.18273/revmed.v29n3-2016006>
29. Flores M, Cruz I, Rodríguez M, Nieto J, Franco E, Gárate T, *et al.* Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28:284-93. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.07.005>
30. Castellanos YZ, Cucunubá ZM, Flórez AC, Orozco-Vargas LC. Reproducibilidad de pruebas serológicas para el diagnóstico de infección por *Trypanosoma cruzi* en mujeres embarazadas de una zona endémica de Santander, Colombia. *Biomédica*. 2014;34:198-206. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.1571>
31. Gomes ML, Galvao LM, Macedo AM, Pena SD, Chiari E. Chagas' disease diagnosis: Comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60:205-10. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.205>
32. Gutiérrez R, Angulo VM, Tarazona Z, Britto C, Fernandes O. Comparison of four serological tests for the diagnosis of Chagas disease in a Colombian endemic area. *Parasitology*. 2004;129:439-44. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005785>
33. Reyes M, Torres Á, Esteban L, Flórez M, Angulo VM. Risk of transmission of Chagas disease by intrusion of triatomines and wild mammals in Bucaramanga, Santander, Colombia. *Biomédica*. 2017;37:68-78. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3051>
34. Eiro C, Melisa D, Álvarez MG, Cooley G, Viotti RJ, Bertocchi GL, *et al.* The significance of discordant serology in Chagas disease: Enhanced T-cell immunity to *Trypanosoma cruzi* in serodiscordant subjects. *Front Immunol*. 2017;8:1141. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01141>
35. Bréniere SF, Poch O, Selaes H, Tibayrenc M, Lemesre J, Antezana G, *et al.* Specific humoral depression in chronic patients infected by *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop*. 1984;26:254-8. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651984000500005>
36. Tozetto TR, Vasconcelos DM, Ibrahim KY, Sartori AM, Bezerra RC, Freitas VL, *et al.* Role of *T. cruzi* exposure in the pattern of T cell cytokines among chronically infected HIV and Chagas disease patients. *Clinics*. 2017;72:652-60. [https://doi.org/10.6061/clinics/2017\(11\)02](https://doi.org/10.6061/clinics/2017(11)02)
37. Taibi A, Guevara A, Schöneck R, Yahiaoui B, Ouaisi A. Improved specificity of *Trypanosoma cruzi* identification by polymerase chain reaction using an oligonucleotide derived from the amino-terminal sequence of a Tc24 protein. *Parasitology*. 1995;111:581-90. <https://doi.org/10.1017/S0031182000077064>
38. Organización Panamericana de la Salud. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Accessed: April 22, 2019. Available at: <http://ops-uruguay.bvsalud.org/pdf/chagas19.pdf>
39. Añez N, Romero M, Crisante G, Bianchi G, Parada H. Valoración comparativa de pruebas serodiagnósticas utilizadas para detectar enfermedad de Chagas en Venezuela. *Bol Mal Salud Amb*. 2010;50:17-27.
40. Aria L, Acosta ME, Guillén Y, Rojas A, Meza T, Infanzón B. ELISA Chagas test IICS V. 1 evaluation for the diagnosis of Chagas disease. *Mem Inst Investig Cienc Salud*. 2016;14:7-13. [https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2016.014\(03\)07-013](https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2016.014(03)07-013)
41. Cermeño JR, Askew EC, Salazar FD. Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en comunidades indígenas de los estados Bolívar y Delta Amacuro, Venezuela. *Saber*. 2013;25:373-81.
42. Guzmán-Gómez D, López-Monteón A, De la Soledad Lagunes-Castro M, Álvarez-Martínez C, Hernández-Lutzon MJ, Dumonteil E, *et al.* Highly discordant serology against *Trypanosoma cruzi* in central Veracruz, México: Role of the antigen used for diagnostic. *Parasit Vectors*. 2015;8:466. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1072-2>

**Supplementary files****Table S1.** PCR parameters for *Trypanosoma cruzi* kDNA amplification

<b>Reagent parameters</b>		
<b>Reagent</b>	<b>This study</b>	<b>Sturm, et al., 1989</b>
MgCl	2.5 mM	-
KCl	50 mM	50 mM
Tris-HCl (pH 8.8)	10 mM	10 mM
dNTP mix	0.8 mM	1.5mM
Dithiothreitol	-	1mM
Sense primer	0.4 $\mu$ M	NR
Antisense primer	0.4 $\mu$ M	NR
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.1 U/ $\mu$ l	0.02-0.08 U/ $\mu$ l
DNA template	100 nM	NR
<b>Cycling parameters</b>		
<b>Step</b>	<b>Parameter</b>	<b>Parameter</b>
Initial denaturalization	5 minutes at 94°C	2 minutes at 94°C
Cycles	34X	34X
Denaturalization	40 seconds at 94°C	1 minute at 93°C;
Hybridization	40 seconds at 55°C	1 minutes at 37°C
Elongation	50 seconds at 72°C	1-2 minutes at 70°C
Final extension	10 minutes at 72°C	1-2 minutes at 70°C

NR: Not reported

Artículo original

## Frecuencia de enteroparásitos en primates Cebidae y Callitrichidae del Zoológico de Cali, Colombia: implicaciones zoonóticas

Jorge Iván Zapata-Valencia<sup>1</sup>, Sebastián Ortega-Valencia<sup>1</sup>, Yisther Katherine Silva-Cuero<sup>1</sup>, Lina Sofía Castillo-Castillo<sup>1</sup>, Laura Sofía Ortega-Ruiz<sup>1</sup>, Adriana Cardona-Ortiz<sup>1</sup>, Juliana Peña-Stadlin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia

<sup>2</sup> Área de Bienestar Animal, Fundación Zoológico de Cali, Cali, Colombia

**Recibido:** 06/02/2020

**Aceptado:** 30/03/2021

**Publicado:** 06/04/2021

### Citación:

Zapata-Valencia JI, Ortega-Valencia S, Silva-Cuero YK, Castillo-Castillo LS, Ortega-Ruiz LS, Cardona-Ortiz A, et al. Frecuencia de enteroparásitos en primates Cebidae y Callitrichidae del Zoológico de Cali, Colombia: implicaciones zoonóticas. *Biomédica*. 2021;41(Supl.1):60-81.  
<https://doi.org/10.7705/biomedica.5403>

### Correspondencia:

Jorge Iván Zapata-Valencia, Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Campus de San Fernando, Calle 3A No 36B-05, edificio 134, Cali, Colombia  
Teléfonos: (572) 558 1929 y (301) 431 8380; fax: (572) 514 0028  
[jorge.zapata@correounivalle.edu.co](mailto:jorge.zapata@correounivalle.edu.co)

### Contribución de los autores:

Jorge Iván Zapata-Valencia: coordinación general del proyecto, lectura de láminas y análisis de datos  
Sebastián Ortega-Valencia: montaje de muestras, lectura de láminas y análisis de datos  
Yisther Katherine Silva-Cuero, Lina Sofía Castillo-Castillo, Laura Sofía Ortega-Ruiz, Adriana Cardona-Ortiz: montaje de muestras, lectura de láminas y sistematización de datos  
Juliana Peña-Stadlin: coordinación del proyecto en el Zoológico de Cali  
Todos los autores participaron en la redacción, revisión y corrección del manuscrito.

### Financiación:

La Fundación Zoológico de Cali apoyó este proyecto con el uso de equipos del Laboratorio Clínico del Zoológico de Cali y, el Laboratorio de Parasitología de la Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad del Valle, con reactivos. La Fundación Zoológico de Cali facilitó la participación de los cuidadores de los animales en la toma de muestras y el salario de la investigadora Juliana Peña-Stadlin. El proyecto se hizo bajo la modalidad de presentación interna, por lo cual la Universidad del Valle permitió la asignación de tiempo para el investigador Jorge Iván Zapata-Valencia durante su desarrollo. Los demás gastos del proyecto corrieron por cuenta de los investigadores involucrados.

### Conflicto de intereses:

Los autores manifiestan que no existen conflictos de intereses.

**Introducción.** Los enteroparásitos pueden generar problemas en animales bajo cuidado humano en zoológicos y centros de acogida. Los animales silvestres presentan bajas cargas parasitarias, pero estas pueden ser mayores y llevar a manifestaciones clínicas cuando se trata de animales resguardados en recintos, lo que aumenta los gastos en tratamientos y cuidados médicos. Por otro lado, algunos enteroparásitos pueden causar infecciones zoonóticas en los cuidadores, los visitantes y otros animales del zoológico, así como afectar los programas de recuperación de especies amenazadas de extinción.

**Objetivos.** Determinar la presencia y prevalencia de enteroparásitos con potencial de transmisión zoonótica en primates de las familias Cebidae y Callitrichidae del Zoológico de Cali, entre septiembre y noviembre de 2017.

**Materiales y métodos.** Se hizo un estudio transversal prospectivo, para lo cual se recolectaron muestras seriadas de 50 individuos pertenecientes a siete especies de dos familias de primates y se analizaron mediante examen coprológico, flotación y coloración Kinyoun, entre septiembre y noviembre de 2017.

**Resultados.** Según su prevalencia, los géneros de parásitos hallados en las siete especies de primates evaluadas, fueron *Blastocystis* spp., *Trichomonas* spp., *Giardia* spp., *Entamoeba* spp., *Strongyloides* spp., *Cyclospora* sp. y *Trichuris* sp.

**Conclusiones.** Por lo menos, seis de los géneros de parásitos identificados tienen implicaciones zoonóticas, lo cual hace necesario establecer las posibles vías de infección de los primates del Zoológico de Cali e implementar protocolos de manejo que reduzcan el riesgo de transmisión a los humanos y a otros animales de la colección. Además, se presenta la información relevante sobre el potencial zoonótico de los enteroparásitos hallados.

**Palabras clave:** animales de zoológico; primates; parásitos; zoonosis; Cebidae; Callitrichidae.

### Frequency of enteroparasites in Cebidae and Callitrichidae primates at the Zoológico de Cali, Colombia: Zoonotic implications

**Introduction:** Enteroparasites can cause problems in animals kept under human care in zoos and shelters. Wild animals have low parasitic loads but when sheltered in closed places they can be higher and lead to clinical manifestations, which increases the cost of medical treatments and care. On the other hand, some enteroparasites can represent a potential risk of zoonotic infection for their animal keepers, visitors, and other zoo animals. In addition, they could affect recovery programs for endangered species.

**Objectives:** To establish the presence and prevalence of potentially zoonotic enteroparasites in primates of the Cebidae and Callitrichidae families at the *Zoológico de Cali* from September to November, 2017.

**Materials and methods:** We conducted a prospective cross-sectional study. Serial samples from 50 individuals belonging to seven species and two primate families were analyzed by ova and parasite test, flotation, and Kinyoun stain between September and November, 2017.

**Results:** In order of frequency, the parasite genera found in the seven primate species evaluated were *Blastocystis* spp., *Trichomonas* spp., *Giardia* spp., *Entamoeba* spp., *Strongyloides* spp., *Cyclospora* sp., and *Trichuris* sp.

**Conclusions:** At least six of the parasite genera found have potential zoonotic implications. It is necessary to establish what are the infection sources at the *Zoológico de Cali* and implement management protocols to reduce the risk of transmission to both humans and other animals in the collection. Additionally, we offer relevant information on the zoonotic potential of each of the enteroparasites found.

**Keywords:** Animals, zoo; primates; parasites; zoonoses; Cebidae; Callitrichidae.

Los primates no humanos se encuentran amenazados por acciones como la reducción drástica de sus hábitats, la fragmentación de los bosques, la caza ilegal y el tráfico de fauna silvestre, lo que lleva a que cerca del 60 % esté en peligro de extinción (1-5). Las especies neotropicales representan el 34 % de las especies de primates del planeta (4).

Colombia ocupa el quinto lugar de diversidad de primates no humanos del Nuevo Mundo (2), pero varias especies endémicas están amenazadas (1). Para mitigar este impacto, el Zoológico de Cali participa en programas de educación ambiental, conservación y recuperación de especies amenazadas, y recibe animales mediante el intercambio con otros zoológicos o el rescate de manos de los traficantes de fauna silvestre por parte de las autoridades ambientales.

Es frecuente encontrar una alta prevalencia de parásitos y comensales intestinales que causan morbilidad y mortalidad en los primates bajo cuidado humano (6,7). Los parásitos intestinales más comúnmente reportados son organismos unicelulares, hongos, nematodos, platelmintos y acantocéfalos, y es común que los animales tengan dos o más especies simultáneamente. Las prevalencias de algunos de ellos llegan a más del 35 % y varían en el tiempo debido a factores bióticos y abióticos (8-12).

El parasitismo intestinal en los primates no humanos puede causar síntomas como diarrea, cólicos, vómitos, prolapso rectal, fiebre, daño mecánico, malabsorción de nutrientes, pérdida de electrolitos y, en casos graves, obstrucción intestinal, lo que provoca la pérdida de su condición corporal y cambios de comportamiento que indican que su enfermedad cursa de manera grave y que, incluso, puede llevarlos a la muerte (9) y afectar los programas de recuperación de especies en peligro.

Algunas especies de *Cryptosporidium* presentes en animales bajo cuidado humano (11) pueden ocasionar infecciones intestinales y extraintestinales en niños e individuos inmunocomprometidos (12,13). *Entamoeba histolytica* en primates y humanos y *E. nuttalli* en primates se consideran extremadamente patógenas y causan infecciones extraintestinales que pueden ser mortales (14-16). *Strongyloides* spp. se ha informado como una causa importante de morbilidad en animales bajo cuidado humano, lo que incrementa los gastos de atención médica (17), en tanto que *Blastocystis* spp. y *Giardia* spp. son frecuentes en animales silvestres y en aquellos bajo cuidado humano, incluidos los primates no humanos, así como en el hombre, lo cual revela su potencial zoonótico (18-23).

En este estudio, se determinaron la presencia y la prevalencia de enteroparásitos con potencial de transmisión zoonótica en primates de las familias Cebidae (*Cebus capucinus*, *Sapajus apella* y *Saimiri sciureus*) y Callitrichidae (*Cebuella pygmaea*, *Saguinus leucopus*, *S. oedipus* y *S. fuscicollis*) del Zoológico de Cali, entre septiembre y noviembre de 2017.

## **Materiales y métodos**

El estudio, de tipo transversal prospectivo, se llevó a cabo en el Zoológico de Cali, entre septiembre y noviembre del 2017. El zoológico está situado en el bosque municipal, a orillas del río Cali, en la ciudad de Santiago de Cali (Valle del Cauca, Colombia), a una altura de 1.000 m.s.n.m. y con una precipitación anual promedio de 1.483 mm. Alberga alrededor de 2.500 animales, el 21 % de ellos mamíferos. Las dos familias de primates tenían 50 individuos distribuidos en 19 recintos con uno a nueve individuos cada uno.

En total, fueron 32 hembras (64 %), 13 machos (26 %) y cinco individuos sin sexo determinado (10 %).

Los cuidadores recolectaron en tres ocasiones las muestras de materia fecal de cada recinto, con intervalos inferiores a dos semanas entre recolecciones, empleando una técnica aséptica, guantes y recipientes limpios en cada ocasión. En los recintos ocupados por grupos no era posible realizar el muestreo de forma individual, por lo que se tomaron hasta cuatro muestras frescas simultáneas que se consideraron representativas del total de los animales de esa unidad de muestreo (17). Las muestras se recogían de aquellas deposiciones que estuvieran sobre el piso de concreto del recinto, evitando las que estaban sobre la tierra o el césped.

Los recipientes se rotularon adecuadamente y se llevaron al laboratorio del zoológico antes de una hora al cabo de la recolección. Se procesaron para la detección de enteroparásitos por examen coprológico directo (solución salina y lugol), concentración por flotación con sulfato de cinc y tinción ácido-alcohol resistente (Kinyoun) y se observaron con objetivos de 10X, 40X y 100X, según la técnica (24). La identificación se hizo con base en las características morfológicas de los microorganismos.

Los resultados se ingresaron en una base de datos en Excel, y se determinaron frecuencias y medidas de tendencia central. Con el paquete IBM SPSS™, statistics (versión 23), se estudió si había asociación o independencia entre las variables “familia de primate” e “infección” en cada una de las parasitosis encontradas, empleando la prueba exacta de Fisher con un nivel de significación estadística establecido ( $\alpha$ ) de 0,05.

### **Aspectos éticos**

El estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Revisión Ética con Animales en Experimentación de la Universidad del Valle mediante el Acta No. 001-017 del 31 de mayo de 2016, y por la Fundación Zoológico de Cali.

### **Resultados**

Se tomaron muestras seriadas completas en 16 recintos, todos positivos para parasitismo intestinal en el momento del estudio y se descartaron tres recintos en los cuales se hospedaban diez animales, ya que en ellos no fue posible tomar la totalidad de las muestras del seriado. Así, el grupo evaluado quedó conformado por 40 individuos y el 100 % presentó una entidad parasitaria, por lo menos.

En cuanto a la riqueza parasitaria por especie de primate, *Saguinus leucopus* (Callitrichidae) fue la que presentó la mayor variedad de parásitos (dos nematodos *Trichuris* sp. y un adulto sin identificar, y seis protozoos de *Giardia* spp., *Cyclospora* spp., *Blastocystis* spp., *Trichomonas* spp., *Entamoeba* spp., y uno sin identificar). Le siguieron *Saimiri sciureus* (Cebidae), con cuatro parásitos (*Blastocystis* spp., *Trichomonas* spp., *Entamoeba* spp. y *Strongyloides* spp.), *Sag. oedipus*, con tres (*Giardia* spp., *Blastocystis* spp. y *Trichomonas* spp.) y *Cebuella pygmaea* (Callitrichidae), con tres (*Blastocystis* spp., *Trichomonas* spp. y *Entamoeba* spp.). Por último, los cébidos *Cebus capucinus* (*Blastocystis* spp.) y *Sapajus apella* (*Giardia* spp.), y el calitricido *Sag. fuscicollis* (*Blastocystis* spp.), presentaron un tipo de enteroparásito.

En el análisis etario, la mayor prevalencia de infección se presentó en los animales mayores de 11 años, seguidos de los menores de un año y los

de 13 meses a 5 años (cuadro 1). El microorganismo de mayor frecuencia según el número de individuos parasitados fue *Blastocystis* spp., seguido por *Trichomonas* spp., *Giardia* spp., *Entamoeba* spp. (*E. histolytica*/*E. dispar*/*E. moskovskii*/*E. nuttalli*), *Strongyloides* spp., *Cyclospora* sp. y *Trichuris* sp. Por otro lado, en el análisis por recintos, los parásitos o comensales intestinales más prevalentes fueron *Blastocystis* spp., *Trichomonas* spp., *Entamoeba* spp. (*E. histolytica*/*E. dispar*/*E. moskovskii*/*E. nuttalli*) y *Giardia* spp. Los de menor frecuencia fueron *Strongyloides* spp., *Trichuris* sp. y *Cyclospora* sp. (cuadro 2).

En las 22 hembras, los 13 machos y los 5 individuos de sexo indeterminado, se identificaron agentes parasitarios o comensales. Al analizar el número de recintos y la cantidad de especies parasitarias en cada uno de ellos, así como el número de especies parasitarias en las dos familias de primates, se pudo apreciar que el monoparasitismo era la condición más frecuente tanto en los recintos como por familia, seguido por el poliparasitismo de dos y tres especies, y con menor frecuencia, el poliparasitismo de cuatro especies. En los cuadros 3 y 4 se pueden apreciar las asociaciones entre las diferentes especies de parásitos en los individuos con infecciones múltiples por familia y por recinto.

**Cuadro 1.** Distribución etaria de primates Cebidae y Calitrichidae analizados y total de individuos parasitados

Edad	n	Total de individuos	%
0-12 meses	4	5	80
13 meses a 5 años	8	10	80
6-10 años	9	13	69,2
≥11 años	8	9	88,8
Indeterminada	2	3	66,7

**Cuadro 2.** Prevalencia de parásitos en primates Cebidae y Calitrichidae por número de individuos infectados y su distribución por recintos en valores absolutos y porcentajes

Parásito	Parásitos o comensales por número de individuos (N=40) n (%)	Parásitos o comensales por recintos (N=16) n (%)
<i>Blastocystis</i> spp.	30 (75)	14 (84,2)
<i>Trichomonas</i> spp.	11 (27,5)	5 (31,3)
<i>Giardia</i> spp.	11 (27,5)	3 (18,8)
<i>Entamoeba</i> spp. ( <i>Entamoeba histolytica</i> / <i>E. dispar</i> / <i>E. moskovskii</i> / <i>E. nuttalli</i> )	10 (25)	4 (25)
<i>Strongyloides</i> spp.	6 (15)	1 (6,3)
<i>Cyclospora</i> sp.	2 (5)	1 (6,3)
<i>Trichuris</i> sp.	1 (2,5)	1 (6,3)

**Cuadro 3.** Prevalencia de parasitismo en primates Cebidae y Calitrichidae por sexo y número de individuos, en valores absolutos y porcentajes

Análisis por sexo				
Sexo	Animales por sexo n	Tipo de parasitismo	n	%
Hembras	22	Monoparasitismo	14	63,6
		Poliparasitismo, 2 especies	2	9,1
		Poliparasitismo, 3 especies	2	9,1
		Poliparasitismo, 4 especies	4	18,2
Machos	13	Monoparasitismo	5	38,5
		Poliparasitismo, 2 especies	6	46,2
		Poliparasitismo, 3 especies	1	7,7
		Poliparasitismo, 4 especies	1	7,7
Indeterminado	5	Monoparasitismo	5	100

**Cuadro 4.** Asociación de especies en individuos con poliparasitismo y su distribución por recintos

Tipo de infección	Total de recintos afectados (N=16)	Número de recintos por tipo de parasitismo	Parásitos	%
	n	n		
Monoparasitismo	7	6	<i>Blastocystis</i> spp.	42,8
		1	<i>Giardia</i> spp.	
Poliparasitismo, 2 especies	4	2	<i>Blastocystis</i> spp. <i>Trichomonas</i> spp.	25
		2	<i>Blastocystis</i> spp. <i>Entamoeba</i> spp.	
Poliparasitismo, 3 especies	4	1	<i>Trichuris</i> sp. <i>Giardia</i> spp. <i>Trichomonas</i> spp.	25
		1	<i>Blastocystis</i> spp. <i>Cyclospora</i> spp. Protozoo sin identificar	
		1	<i>Blastocystis</i> spp. <i>Entamoeba</i> spp. Nematodo adulto sin identificar	
		1	<i>Blastocystis</i> spp. <i>Trichomonas</i> spp. <i>Giardia</i> spp.	
Poliparasitismo, 4 especies	1	1	<i>Blastocystis</i> spp. <i>Entamoeba</i> spp. <i>Strongyloides</i> spp. <i>Trichomonas</i> spp.	6,2

Al comparar los parásitos según la cantidad de especies huéspedes que pueden infectar, *Blastocystis* spp. se encontró en un mayor número de especies de primates, con seis distintas especies de huéspedes en las dos familias de primates no humanos del Nuevo Mundo. *Trichomonas* spp. se encontró en cuatro especies de primates, en tanto que *Giardia* spp. y *Entamoeba* spp. se encontraron en tres huéspedes cada una y, *Trichuris* sp., *Cyclospora* sp. y *Strongyloides* spp., solo en una especie cada una (cuadro 5). Al comparar la cantidad de especies parasitarias encontradas en cada especie de primate, *Sag. leucopus* (n=8) presentó seis distintos parásitos (*Trichuris* sp., *Giardia* spp., *Cyclospora* sp., *Blastocystis* spp., *Trichomonas* spp. y *Entamoeba* spp.), siendo los de mayor diversidad de microorganismos, mientras que la menor variedad de parásitos ocurrió en *Sag. fuscicollis* (n=1), *C. capucinus* (n=6) y *Sap. apella* (n=9), con una especie de parásito cada uno (*Blastocystis* spp. en las dos primeras especies y *Giardia* spp. en la otra) (figura 1 y cuadro 5).

En los recintos en los que se obtuvieron las tres muestras seriadas, mediante el primer examen se diagnosticaron infecciones parasitarias en siete (43,8 %), en tanto que los otros nueve recintos fueron negativos. De estos últimos, ocho fueron positivos en la segunda muestra. El acumulado de positivos para las dos primeras muestras fue del 93,8 %. En el recinto que albergaba al grupo de individuos de *Sap. apella*, las dos primeras muestras fueron negativas y, en la tercera, el resultado fue positivo para *Giardia* spp. (cuadro 6). De los tres recintos en los que solo se recolectó una muestra, dos fueron positivos para *Blastocystis* spp. y el otro fue negativo.

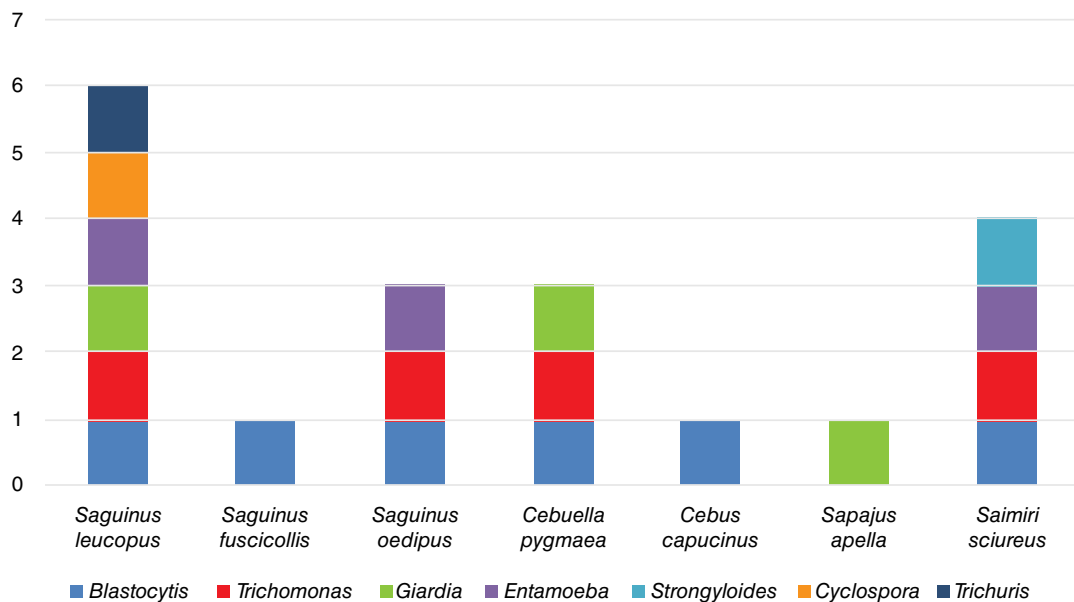
En la prueba exacta de Fisher, tomando como muestra el número de recintos, (n=16), se encontró que las variables “familia de primate” y cada una de las parasitosis encontradas no tenían asociación estadísticamente significativa, es decir, eran independientes.

**Cuadro 5.** Número de individuos positivos Vs. número total de individuos por parásito para las diferentes especies de las familias Cebidae y Callitrichidae del Zoológico de Cali

Especie	<i>Blastocystis</i> spp.	<i>Trichomonas</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.	<i>Entamoeba</i> spp.	<i>Strongyloides</i> spp.	<i>Cyclospora</i> sp.	<i>Trichuris</i> sp.
<i>Callitrichidae</i>							
<i>Saguinus leucopus</i>	7 (8)	3 (8)	1 (8)	2 (8)	0 (8)	2 (8)	1 (8)
<i>Saguinus fuscicollis</i>	1 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
<i>Saguinus oedipus</i>	4 (4)	1 (4)	0 (4)	2 (4)	0 (4)	0 (4)	0 (4)
<i>Cebidae</i>							
<i>Cebuella pygmaea</i> *	6 (6)	1 (6)	1 (6)	0 (6)	0 (6)	0 (6)	0 (6)
<i>Cebus capucinus</i>	6 (6)	0 (6)	0 (6)	0 (6)	0 (6)	0 (6)	0 (6)
<i>Sapajus apella</i>	0 (9)	0 (9)	9 (9)	0 (9)	0 (9)	0 (9)	0 (9)
<i>Saimiri sciureus</i>	6 (6)	6 (6)	0 (6)	6 (6)	6 (6)	0 (6)	0 (6)
<b>Total</b>	<b>30 (40)</b>	<b>11 (40)</b>	<b>11 (40)</b>	<b>10 (40)</b>	<b>6 (40)</b>	<b>2 (40)</b>	<b>1 (40)</b>

El número en paréntesis corresponde al total de individuos de la especie.

\* No se incluyeron los primates sin el seriado completo.



**Figura 1.** Diversidad de enteroparásitos (riqueza de especies parásitas) en los primates de las familias Cebidae y Callitrichidae en el Zoológico de Cali (*Blastocystis* spp., *Trichomonas* spp., *Giardia* spp., *Entamoeba* spp., *Strongyloides* spp., *Cyclospora* sp. y *Trichuris* sp.)

**Cuadro 6.** Muestras de materia fecal positivas en las distintas tomas del examen seriado (datos por recinto)

Muestra en la cual se detectaron los parásitos	Número de recintos positivos (N=16)* n	%	% acumulado
1	7	43,8	43,8
2	8	50,0	93,8
3	1	6,2	100,0

\* De los 19 recintos hubo tres en donde solo se obtuvo una muestra.

### Discusión

En el presente estudio se determinó la presencia y la prevalencia de enteroparásitos con potencial de transmisión zoonótica en primates de las familias Cebidae y Callitrichidae del Zoológico de Cali. En aquellos espacios con



más de un individuo, se consideró que el riesgo de exposición era similar para todos y que los resultados eran aplicables a todos los primates del recinto (17). La frecuencia de infección parasitaria en las especies de primates evaluadas fue del 100 %, similar a lo reportado en otros zoológicos en Perú (7) y Colombia (25), ambas mayores del 95 %, pero mayor que la reportada en otros zoológicos de Bélgica (17), China (18), Medellín (26), España (27) y Costa Rica (28), así como en estudios con animales silvestres libres en Costa Rica (29), Perú (30) y Colombia (31), todos con frecuencias entre el 25 y el 75 %.

Cabe destacar el estudio de Fajardo, *et al.*, realizado también en el Zoológico de Cali, en el cual se encontró una prevalencia de parasitismo mucho menor de *Entamoeba* spp. y uncinarias en *C. capucinus* (6,35 % cada uno), en tanto que no se encontró parasitismo en los ejemplares de *Sag. leucopus* (32). Es importante mencionar que, en algunos de los trabajos referenciados, se utilizó una única toma de muestra (1,7,25,30), lo que permite pensar que la sensibilidad en el diagnóstico de las infecciones con bajas cargas parasitarias fue menor, mientras que, en este trabajo, se evaluaron muestras seriales para todos los recintos, con el fin de mejorar la sensibilidad del examen directo y de la coloración.

Debe señalarse que los animales que el Zoológico de Cali recibe por intercambio o decomiso entran en cuarentena en un área independiente, durante la cual se les hacen diversas evaluaciones clínicas periódicas para establecer su estado de salud, incluidos exámenes sanguíneos y estudios seriados de materia fecal. Pasado este periodo, se aplica el protocolo para su introducción como individuos fundadores y no se los introduce en grupos ya establecidos para, así, garantizar la inocuidad de los nuevos individuos que se integran a la colección del Zoológico.

Como los parásitos detectados en los primates evaluados en este estudio son transmitidos principalmente por agua y alimentos, con excepción de *Strongyloides* spp., que penetra por la piel, es importante señalar que el Zoológico cuenta con su propia planta de potabilización de agua con cloro para el suministro a los diversos recintos; sin embargo, hay que tener en cuenta que varias especies de enteroparásitos presentan estructuras resistentes a la cloración del agua, por lo que para algunos animales especialmente propensos se ha establecido un protocolo de potabilización por ósmosis inversa que reduce el riesgo de infección por *Toxoplasma gondii* (33). Con respecto a las frutas y verduras que se emplean para la alimentación de los primates, estas se manejan con protocolos similares a los establecidos para la manipulación de los alimentos para consumo humano y son suministrados en bandejas plásticas que se lavan después de cada uso.

Por otra parte, el protocolo de manejo de enteroparásitos en el Zoológico de Cali implica la evaluación de cada recinto tres veces al año mediante examen coprológico directo y concentración. Cuando se encuentran individuos positivos, se establece el tratamiento y se evalúa la necesidad de tratar los recintos adjuntos; si hay individuos sintomáticos, por ejemplo, por diarrea, se hace el diagnóstico, se da tratamiento grupal y, solo en condiciones especiales, dadas las implicaciones sociales, se aísla al individuo para su manejo en la clínica bajo observación continua.

Los recintos de los primates en el Zoológico de Cali cuentan con una zona de manejo con superficies lavables, así como zonas con hierba para simular condiciones naturales. Debido a la dificultad de su lavado, estas zonas pueden actuar como reservorio para las formas infectivas de los parásitos

gastrointestinales, lo que facilita su permanencia y viabilidad en el tiempo, y la reinfección de los individuos, y explicaría las altas tasas de prevalencia halladas en este y otros estudios (3,17,21). Por otra parte, es difícil controlar el ingreso de animales, como pequeñas aves, roedores e insectos (cucarachas y moscas) a los recintos; estos animales pueden volverse parte de la dieta de los primates bajo cuidado humano y los convierte en un factor de riesgo de infección parasitaria (34,35).

La prevalencia general de helmintos en las dos familias de primates fue baja comparada con otros estudios, lo que se explicaría por las bajas cargas parasitarias de los individuos y porque el examen directo no es la mejor técnica para el diagnóstico de las infecciones por *Strongyloides* spp. Asimismo, podría tener relación con la propensión de los huéspedes a la infección, o con su comportamiento, y con los protocolos de manejo implementados en el zoológico (31,36). En estudios de cébidos en vida silvestre en Costa Rica (37,38) y Colombia (1,31), los parásitos de mayor frecuencia fueron helmintos, incluidos acantocéfalos, y con menor frecuencia, los protozoarios, hecho que algunos autores explican como resultado de la dieta de algunos de estos primates, la cual puede incluir invertebrados que servirían de huéspedes intermediarios para algunos de estos helmintos (31,37-39).

En cuanto a la frecuencia de monoparasitismo (43,8 %) hallada en los cébidos y calitricidos del Zoológico de Cali, esta fue similar a lo reportado en un estudio realizado en Costa Rica (60,8 %) (28), pero difiere de lo informado en estudios llevados a cabo en otros zoológicos (17,40). La elevada frecuencia de monoparasitismo podría indicar también que, aunque las fuentes de infección son pocas, la simplicidad de los ciclos de vida de los parásitos detectados, monoxénicos, y el hecho de que sus estadios quísticos (*Entamoeba* spp., *Blastocystis* spp., *Giardia* spp.) son infectivos una vez son excretados por el huésped, facilitan que un animal se reinfecte después del tratamiento, ya que en algunos de los recintos es difícil limpiar totalmente la materia fecal. Ahora bien, si se compara el poliparasitismo en estos primates (25 % como máximo) con el hallado en otros zoológicos, la frecuencia fue menor (41). Esto es importante porque las infecciones por múltiples especies parasitarias suelen causar cuadros clínicos más complicados en los individuos infectados y, por ende, aumentar los costos en tratamientos y cuidados.

El estrés causado por la permanencia en espacios restringidos y el contacto con seres humanos, se ha propuesto como una de las causas de la gran frecuencia de infecciones parasitarias intestinales en primates bajo cuidado humano. Se asocia con la reducción de la resistencia a las infecciones y el aumento de la cronicidad de estas parasitosis (42). Por ello, en el Zoológico de Cali se han intervenido los recintos siguiendo los protocolos establecidos en manuales de bienestar específicos para cada familia de primates (43-45), de manera que su diseño facilite un manejo y una interacción adecuados con el cuidador, y un mayor bienestar de los animales. Ello permitió que el Zoológico fuera certificado por la *Association of Zoos and Aquariums* (AZA) y la Asociación Latinoamericana de Parques Zoológicos y Acuarios (ALPZA). Además, se asigna un único cuidador para la alimentación y el aseo de los recintos para reducir el estrés en los animales a su cargo y el ingreso a las áreas de manejo se hace mediante motivación positiva, lo que se consigue con el diseño y la ambientación, y con estrategias de condicionamiento positivo como los premios.

Por último, cabe resaltar la utilidad del examen seriado de materia fecal que, en este caso, permitió detectar más del 90 % de los casos de infección en la segunda muestra evaluada, algo similar a lo reportado en otros estudios (28). En algunos de los primates no humanos del Nuevo Mundo, es frecuente que la muestra sea escasa o insuficiente para utilizar las técnicas rutinarias debido a la cantidad de materia fecal que expulsan, por lo cual la repetición de la toma de muestras múltiples en los recintos aumenta considerablemente la probabilidad de observar estadios parasitarios en el examen coprológico.

### **Sobre el potencial zoonótico de los parásitos hallados en primates *Cebidae* y *Callitrichidae***

Es importante resaltar el potencial zoonótico de algunos de los enteroparásitos encontrados en los primates del Zoológico de Cali, ya que podrían ser fuente de infección para sus cuidadores y para otros animales de la colección. En el caso de *Blastocystis* spp. y *Trichomonas* spp., no se ha definido claramente su papel en la enfermedad en animales y, a pesar de su elevada frecuencia en los primates evaluados, la mayoría estaban asintomáticos. Por su parte, *Giardia* spp. un protozoo frecuente en los animales del Zoológico de Cali, y es conocido su papel en la enfermedad animal y humana. En cuanto a *Strongyloides* spp., se presentó en pocos individuos de las dos familias de primates *Cebidae* y *Callitrichidae*; en el Zoológico se han presentado casos recurrentes de estrongiloidiasis crónica en lémures, que podrían ser un foco de infección para humanos.

Entre los enteroparásitos unicelulares, *Blastocystis* spp. es uno de los más frecuentemente hallados en muestras fecales de personas sintomáticas y asintomáticas (23,46). Sin embargo, todavía se debate su papel patogénico, aunque se han descrito casos de enfermedad diarreica y otros trastornos gastrointestinales y extraintestinales en personas en las que no se encuentra otro agente patógeno, incluidos el síndrome de colon irritable y la enfermedad inflamatoria del colon (46-49). A pesar de la elevada prevalencia en los animales del Zoológico de Cali y en otros, estos usualmente no presentan sintomatología, por lo que se sugiere que no es agente patógeno para los animales (48). Se han descrito 17 subtipos de *Blastocystis* spp. en diferentes huéspedes vertebrados, incluidos varios primates, y en el hombre (23,49-51) se han aislado 10 subtipos (ST1-ST9 y ST12) (52). *Blastocystis* spp. fue el parásito de mayor prevalencia en las dos familias de primates en este estudio (84,2 %), similar a lo reportado en otras investigaciones (23,49,50,53). También, se ha reportado en cébidos y calitrícidos en zoológicos y reservas naturales de Perú, Chile y Colombia (26,30,54-57). En los estudios en Colombia con técnicas moleculares, se halló una baja prevalencia de *Blastocystis* spp. en primates silvestres del Magdalena Medio (31), lo que indicaría que el estar bajo cuidado humano los expone a este organismo, en tanto que, en condiciones silvestres, tiene menor relevancia este parásito.

Se han llevado cabo algunos estudios de caracterización genética de *Blastocystis* spp., principalmente a partir de aislamientos provenientes de primates del Viejo Mundo (23,30,53,58,59). En algunos zoológicos europeos, se determinó que los ejemplares de la familia Callitrichidae (*Saguinus labiatus* y *Callithrix jacchus*) presentaban los subtipos 1 y 3, dos de los más frecuentes en humanos, mientras que los del Viejo Mundo presentaron los subtipos 1, 2, 3, 5 y 8, entre otros, y con prevalencias mayores que las observadas en los del Nuevo Mundo (58-61).

Aunque humanos y primates comparten diferentes subtipos, hay variación en la frecuencia de los patrones de alelos entre ellos en los humanos, predomina el alelo 4 del subtipo 1 y, en los primates, se encuentran seis alelos distintos, más frecuentes que el 1 y el 2. Al igual que en otras investigaciones (22,58,61), en un par de muestras de cuidadores de los zoológicos evaluados en uno de los estudios, se encontraron alelos que coincidieron con los observados en primates (alelos 2 y 6), lo que demuestra que puede haber transmisión zoonótica entre los animales y sus cuidadores. Esta situación es similar a la observada con el subtipo 3 y sus alelos, los cuales difieren entre humanos y primates, aunque en los primates ninguno de los alelos presenta una frecuencia dominante, lo que refleja que no hay una especificidad por estos huéspedes (60).

En otros estudios se ha demostrado la posible transmisión zoonótica de los subtipos 1, 2 y 8; este último es bastante raro en humanos, excepto en cuidadores de zoológicos (22,60,62). Aunque se comparten los subtipos, hay diferencias en los alelos entre los aislamientos de *Blastocystis* spp. de primates bajo cuidado humano y los de humanos. Sin embargo, no se ha determinado cuáles son los alelos circulantes en poblaciones silvestres y si también se presentan en humanos.

La tricomoniasis intestinal es frecuente en los vertebrados terrestres del Zoológico de Cali (anfibios, reptiles, aves y mamíferos) y se diagnostica rutinariamente en los controles periódicos de todos los animales de la colección en los que participan dos de los autores de este trabajo; sin embargo, parece ser de poca relevancia en los primates, aunque se han detectado individuos parasitados en vida silvestre y bajo cuidado humano. En Costa Rica se informó su presencia hasta en el 11 % de un grupo de cébidos silvestres (*C. capucinus*) (29) y, en el presente estudio, la frecuencia fue mayor, de 31 %.

Aunque en el momento del estudio ninguno de los animales infectados presentó alteraciones gastrointestinales, en el 2015 hubo en el Zoológico de Cali un caso fatal de tricomoniasis intestinal en un lémur (*Varecia variegata*) con diarrea crónica y linfangiectasia. Este individuo presentó una infección persistente con elevada carga parasitaria y fue tratado por uno de los autores sin lograrse la curación completa por resistencia al tratamiento con metronidazol. Por otra parte, en un primate del Nuevo Mundo de la familia Pitheciidae (*Callicebus moloch*), se reportó un caso de tricomoniasis invasiva que se manifestó con depresión, diarrea y deshidratación. La histopatología reveló la presencia de abundantes trofozoítos en diversas áreas del colon y en los ganglios linfáticos mesentéricos; el parásito se identificó mediante microscopía electrónica, sin evidencia de otro agente patógeno (63).

Actualmente, se aceptan nueve especies de *Trichomonas* diferenciadas principalmente por su morfología, muchas de ellas descritas en primates del Viejo y el Nuevo Mundo en un único reporte (64); entre ellas, está *Tritrichomonas mobilensis*, descrita en *Saimiri boliviensis boliviensis*, un primate del Nuevo Mundo (65). En uno de los estudios en que se han utilizado técnicas moleculares para determinar cuántas especies de *Trichomonas* intestinales infectan distintos huéspedes, se estudiaron 10 especies de primates del Viejo Mundo y un calitricido (*C. jacchus*); 25 aislamientos de dichos primates (*Hylobates syndactylus*, *Pan troglodytes*, *Lemur catta*, *Macaca silenus*, *M. nigra*, *Mandrillus sphinx* y *Semnopithecus entellus*) se agrupaban en varios grupos o linajes del género *Tetratrichomonas*, y los autores propusieron separarlos, por lo

menos, en ocho especies (64). En este mismo grupo, se alineó un flagelado aislado de un paciente humano con empiema pleural (66), en tanto que un aislamiento de *L. catta* se asoció con *T. gallinarum*, especie que se ha aislado de la cavidad oral, los bronquios y el esputo de seres humanos (67). Un aislamiento de *Otolemur garnettii* se asoció con *Hypotrichomonas acosta*, un flagelado encontrado en serpientes, y otro de *L. catta* se relacionó estrechamente con *Trichomitus batrachorum*, un género de anfibios y reptiles emparentado con *Hypotrichomonas* en Hypotrichomonadea (Parabasalia).

Por último, la secuencia de tres aislamientos de *Colobus angolensis*, *V. variegata* y *C. jacchus* fue muy similar a la reportada para *Pentatrachomonas hominis* en ganado y humanos (64). Estos hallazgos revelan que la diversidad de parabasálidos en primates es mayor de la estimada y plantea la necesidad de estandarizar las técnicas moleculares para la correcta identificación de los trichomonadidos intestinales presentes en primates bajo cuidado humano, ya que pueden tener potencial zoonótico, como se ha demostrado con *Tetratrachomonas* y *P. hominis*; esta última puede causar enfermedad bajo ciertas condiciones en animales silvestres bajo cuidado humano, en humanos y en animales domésticos (Núñez J, Zerpa R, Lucas CM, Lugo-Román LA, Gregory MJ, Maves RC, et al. *Pentatrachomonas hominis* is associated with diarrheal episodes in captive-bred owl monkeys (*Aotus nancymae*). 61st Annual Meeting. November 11-15, 2012. Atlanta, GA, USA: American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2012) (68-73). Es necesario caracterizar genéticamente las cepas de *Trichomonas* spp. circulantes en el Zoológico de Cali para conocer las especies, y poder establecer si hay riesgo zoonótico y las medidas que minimicen la transmisión a otros animales de la colección y a los cuidadores.

La prevalencia de *Entamoeba* spp. (25 %) indica que es un parásito importante en los primates de las familias Cebidae y Callitrichidae del Zoológico de Cali. Otros estudios en zoológicos reportan prevalencias de 28,9, 81,1 y 100 % (18,74,75).

En primates del Nuevo y el Viejo Mundo, se han descrito varias especies de este género, como *Entamoeba histolytica*, *E. nuttali*, *E. chattoni* (*E. polecki* de subtipo 2), *E. polecki*, *E. hartmanni*, *E. coli*, *E. moshkovskii* y *E. dispar*, de las cuales solo las dos primeras se han reportado como causantes de sintomatología intestinal y extraintestinal en algunos animales infectados (16,19,41,74-77). Entre las especies de primates consideradas, solo se ha reportado *E. chattoni* (*E. polecki* de subtipo 2) en uno del Nuevo Mundo (*Alouatta palliata*, Atelidae) en Costa Rica (78), pero su descripción se basó en la comparación morfológica y morfométrica, y no en técnicas moleculares que lo confirmaran.

Con el empleo de zimodemos y PCR, se han detectado infecciones por *E. nuttali* y *E. chattoni* (*E. polecki* de subtipo 2), mayoritariamente asintomáticas, en cuidadores de animales en zoológicos europeos (15,41,79). De ahí la importancia de la determinación molecular de las especies de *Entamoeba* observadas en los animales analizados en este estudio ya que, de tratarse de *E. nuttali* o *E. histolytica*, pueden llegar a causar enfermedad clínica, ocasionalmente fatal. Asimismo, es necesario establecer los factores de riesgo asociados a las infecciones en estos animales, para reducir la transmisión tanto entre los primates como a otras especies del zoológico (79) o a sus cuidadores (15).

En humanos, *G. duodenalis* es uno de los principales protozoos causantes de diarrea, especialmente en niños (80). Actualmente, se han identificado

ocho grupos (A-H) de esta especie, morfológicamente indistinguibles, pero genéticamente distintos, en diversos mamíferos (81), y algunos autores proponen separarlos como especies (82). Se ha visto que los grupos A y B de *G. duodenalis* tienen múltiples huéspedes y potencial zoonótico (83). Este protozoo se considera un agente patógeno importante en primates, en los que ocasiona diarrea y retraso en el crecimiento de animales jóvenes (9,74,84,85).

En distintos países, los primates del Nuevo y el Viejo Mundo en condición silvestre o bajo cuidado humano en zoológicos, presentan estos parásitos, con prevalencias hasta del 94 % (31,37,74,86-89). No obstante, son pocos los estudios moleculares de aislamientos provenientes de primates, destacándose los realizados en Italia y España en primates del Viejo Mundo, en los que se identificaron genotipos de *Giardia* spp. pertenecientes al grupo B, subgrupo BIV, también hallado en humanos (74,88-90), lo que sugiere que pueden tener potencial zoonótico.

Sin embargo, se ha demostrado que la transmisión de *Giardia* spp. puede ser antroponótica o zoonótica bidireccional, de manera que los primates pueden ser reservorios para el humano, pero los seres humanos también inciden en la contaminación ambiental con quistes de *Giardia* spp. (81,90). Hasta el momento no se han caracterizado genéticamente los aislamientos de *Giardia* spp. provenientes de primates en el Zoológico de Cali, por lo que se desconoce el verdadero riesgo zoonótico para los cuidadores y otros animales de la colección.

*Trichuris trichiura* es un nematodo que causa enfermedad en humanos y primates (91,92); se asume que solo esta especie infecta tanto a unos como a otros (93) y se reporta con frecuencia en primates no humanos del Nuevo y del Viejo Mundo en estado silvestre (29,30,93-95) o bajo cuidado humano (9,27,87,96,97), con prevalencias hasta del 100 % en algunas especies del Viejo Mundo, y entre 1,94 y 11,64 % en algunas del Nuevo Mundo bajo cuidado humano, incluidos cébidos y calitricidos (8).

En *S. fuscicollis* (Callitricidae) silvestres de Colombia y Brasil, se han encontrado prevalencias del 50 y el 14 %, respectivamente, en tanto que, en *Cebus versicolor* (Cebidae) silvestres de Perú y Brasil, se ha informado una de 64,3 % (29,30,96). En primates bajo cuidado humano en Colombia, *T. trichiura* se ha reportado en *S. leucopus* (54), y en Chile, en *C. albifrons* (57). En el Zoológico de Cali se detecta ocasionalmente en diversos mamíferos en coinfección con *Capillaria* sp., un helminto de aves.

En algunos estudios de caracterización de aislamientos de *Trichuris* sp. en primates no humanos del Viejo Mundo mediante diferentes marcadores moleculares, se detectó la presencia de *T. trichiura* (98,99). En un reporte de Uganda en primates silvestres de áreas de contacto frecuente con humanos, se encontraron varios linajes de *Trichuris* sp. con elevada variabilidad genética y evidencia de que, al menos, uno de ellos era compartido por humanos y primates no humanos, lo que podría significar que tiene potencial zoonótico (93,99).

En un estudio posterior, al analizar el genoma mitocondrial de aislamientos provenientes de humanos, cerdos y primates del Viejo Mundo bajo cuidado humano, se apreció una gran variabilidad y que los genotipos de primates y humanos formaban cinco y dos clados separados, respectivamente, distantes de los de cerdo. Se ha propuesto, entonces, que hay un complejo de especies crípticas que infectan a humanos y primates, y que algunas de ellas tienen

gran especificidad de huéspedes, pero otras pueden infectar a unos y otros (93,99). Aún se requieren estudios que permitan caracterizar genéticamente los parásitos encontrados en los primates no humanos del Nuevo Mundo para establecer si son especies distintas a *T. trichiura* y si tienen potencial zoonótico.

Otro parásito que se reporta con frecuencia en varios grupos de vertebrados, entre ellos los primates y el humano, es el nemátodo *Strongyloides* spp. (10,100-104). Hay tres especies descritas que infectan a los humanos; una es *S. stercoralis*, que se considera cosmopolita, y las otras dos presentan una distribución geográfica más restringida. *S. fuelleborni* causa zoonosis en primates y humanos de África y Asia, y *S. fuelleborni kellyi* infecta humanos de Papúa Nueva Guinea (104-106).

*Strongyloides stercoralis* puede cursar como una infección asintomática o causar cuadros clínicos complicados de hiperinfección o diseminación que pueden llegar a ser mortales, especialmente en animales jóvenes y en humanos inmunosuprimidos o con infección por el virus linfotrópico de células T humanas de tipo 1 (HTLV -1) (105-107). En el hemisferio occidental, solo se han informado dos casos humanos fatales de infección por *S. fuelleborni*, en Perú, en dos mujeres de 5 y 16 años, ambas positivas para infección con HTLV-1, que presentaron un cuadro diarreico, infección diseminada y sepsis bacteriana. El diagnóstico se basó en la identificación morfológica de los huevos en cadena con membrana envolvente y hembras adultas de vida libre con constricción posvulvar característica (106-108). Sin embargo, en Suramérica no se han descrito huéspedes naturales para *S. fuelleborni*.

Coincidente con los resultados del presente estudio, en primates no humanos del Viejo y del Nuevo Mundo bajo cuidado humano o silvestres, incluidos cébidos y calitricidos de Colombia, Ecuador, Perú, Chile y Costa Rica, se han presentado infecciones por *Strongyloides* spp. Con frecuencias que fluctúan entre 1,94 y 66 % (8,17,23,25,26,29,30,37,42,78,109-111). En cuanto a la infección en los del Nuevo Mundo, en algunos trabajos se ha reportado la presencia de *S. cebus* o *Strongyloides* sp. (42), pero sin que se hubieran empleado técnicas moleculares para establecer la especie involucrada en las infecciones detectadas. En Costa Rica se ha reportado en *C. capucinus*, *C. albifrons* y *C. apella*, silvestres y bajo cuidado humano, con prevalencias del 10 al 36 % (29,37,38). En zoológicos de Chile y Perú, se ha informado en cébidos y calitricidos (*Saguinus mystax*, *S. fuscicollis*, *S. sciureus*, *C. apella* y *C. albifrons*) (30,39,42,57) y, en Colombia, en grupos de *C. versicolor* y *S. leucopus* de vida silvestre, con prevalencias entre 18,8 y 62,5 % (1,31). *Callithrix penicillata* se ha empleado como un modelo biológico para evaluar la infección por *S. stercoralis* en individuos con inmunosupresión, lo que ha permitido observar que en estos primates la estrongiloidiasis se presenta con cuadros clínicos que van desde los no complicados hasta la condición grave, similar a lo que sucede en humanos (112), lo que demuestra que esta especie de primates es sensible a la infección por este nemátodo.

Debe tenerse en cuenta que la infección natural por *S. stercoralis* en primates silvestres del Viejo Mundo puede estar ligada al hecho de compartir su hábitat con humanos u otros animales que pueden portar el parásito, y además, que la infección puede llegar a causar una enfermedad fatal (113). Algunos estudios en estos primates, en los cuales se han empleado la caracterización y diferenciación molecular de *S. stercoralis* y *S. f. fuelleborni*, han revelado la variabilidad genética de este parásito y su carácter zoonótico (102,104,114). Una de las secuencias analizadas de *S. f. kellyi* es idéntica a

una secuencia de *S. cebus*. La información obtenida con este gen y la de las secuencias SSU, permite separar dos clados, uno conformado por *S. ratti*, *S. suis*, *S. venezuelensis*, *S. vituli* y *S. papillosus*, y el otro basado en las secuencias de *S. f. fueleborni*, que agrupa esta especie con secuencias idénticas de aislamientos de *S. stercoralis* a partir de humanos y perros, y de *Strongyloides* sp. de serpientes (102,112,115).

Con base en estos hallazgos, se propone que *S. f. kellyi* puede ser una especie (*Strongyloides kellyi*) independiente de *S. fueleborni* (104,112). A pesar de que se ha demostrado que los humanos pueden estar infectados con diversos genotipos de *S. stercoralis*, y de que hay transmisión zoonótica de esta y otras especies, es necesario continuar estudiando a los primates no humanos del Nuevo Mundo para aclarar si las especies de *Strongyloides* presentes en ellos también se comportan de manera similar a las encontradas en los del Viejo Mundo.

Comparada con la reportada en algunos estudios, la prevalencia de *Strongyloides* spp. en el Zoológico de Cali fue baja, lo que puede estar asociado con los esquemas de tratamiento programados para los animales y su efectividad. Asimismo, podría estar relacionada con el subdiagnóstico de aquellos animales con cargas parasitarias bajas que no son detectados con métodos de poca sensibilidad como el examen coprológico directo, lo que hace necesario la implementación de técnicas que mejoren el diagnóstico, como el cultivo en agar o el embudo de Baermann o, idealmente, pruebas moleculares o dispositivos como el Flotac que no se emplearon en este estudio (104,105,111,113,114).

En cuanto a la coccidia intestinal *Cyclospora cayetanensis*, se asocia con cuadros diarreicos en humanos, especialmente en países tropicales, donde afecta principalmente a niños y pacientes inmunosuprimidos, en tanto que en los países desarrollados se ha descrito principalmente en brotes por alimentos y como agente de diarrea del viajero (116). En primates no humanos, *Cyclospora* spp. se informa principalmente en los del Viejo Mundo, tanto silvestres como bajo cuidado humano en zoológicos, con prevalencias entre el 2,5 y el 68 % (27,117-120).

*Cyclospora cayetanensis* (121) fue la primera especie descrita en primates humanos; posteriormente se describieron tres nuevas especies (*C. cercopithecide*, *C. colobi* y *C. papionis*) en *Cercopithecus aethiops*, *Colobus guereza* y *Papio anubis* en estado silvestre, respectivamente (122). El integrante más reciente de este grupo de parásitos intestinales de primates es *C. macacae*, aislada de *Macaca mulatta* (119). En Colombia y en México, se han reportado unos pocos casos de *Cyclospora* spp. en especies de primates silvestres del Nuevo Mundo de la familia Atelidae (*Alouatta seniculus*, *A. pigra* y *Ateles geoffroyi*) (120,123). En ambos estudios la identificación se hizo mediante coloración ácido-alcohol resistente, pero no se hizo la caracterización molecular de los aislamientos. Hasta el momento, no se han reportado casos de transmisión de la infección por especies de *Cyclospora* de primates a humanos y, dado que este organismo está emparentado con *Eimeria*, es posible que tenga una gran especificidad de huéspedes, razón por la cual la infección cruzada sería muy rara (40,122).

Con base en la información disponible sobre el potencial zoonótico de los distintos parásitos observados en estos primates del Zoológico de Cali, se recomienda implementar técnicas de laboratorio que permitan identificar estas especies crípticas para contribuir al conocimiento de la



fauna parasitaria de los primates neotropicales y dar cuenta de la posible transmisión zoonótica en el parque. Queda por esclarecer si las diferencias entre familias y las infecciones por *Blastocystis* spp., más prevalente en calitricidos, y por *Giardia* spp. y *Strongyloides* spp., más frecuentes en cébidos, son hallazgos incidentales, o si hay alguna característica genética, inmunológica o de exposición que las explique; además, si varían según los periodos lluviosos o secos, o se mantienen a lo largo del año.

Se identificaron siete géneros parasitarios en primates Cebidae y Callitrichidae del Zoológico de Cali, con una mayor prevalencia de *Blastocystis* spp., *Giardia* spp. y *Trichomonas* spp., teniendo los dos primeros un potencial zoonótico considerable. El presente estudio reveló que los protocolos de evaluación periódica y el tratamiento oportuno seguidos en el zoológico parecen ser efectivos para reducir las infecciones por helmintos, ya que estas se presentaron en menor proporción. Dado que el monoparasitismo fue más frecuente, la presencia de las infecciones por parásitos unicelulares debe conducir a la evaluación de posibles fuentes de infección (alimentos, agua, calzado de los cuidadores y animales recién llegados al zoológico), para diseñar estrategias que minimicen su efecto.

Estos resultados demuestran que es necesario implementar técnicas de diagnóstico molecular para conocer de manera precisa las especies y los genotipos presentes en los animales de la colección, y dilucidar las fuentes de transmisión y los riesgos de zoonosis. Además, son de utilidad para los protocolos de vigilancia y tratamiento, encaminados a controlar la transmisión y el riesgo de contaminación entre los animales y sus cuidadores. Después de este estudio, se introdujeron cambios en el manejo de algunos recintos, como el reemplazo total y periódico del pasto y la tierra, así como la desinfección con vapor de las instalaciones y el aseo del calzado de los cuidadores. Aún está pendiente evaluar la efectividad de estas estrategias en la reducción de la contaminación y la infección por enteroparásitos.

Se demostró que el análisis seriado de muestras para el diagnóstico de parásitos intestinales en animales bajo cuidado humano, es útil para minimizar el subdiagnóstico que se puede presentar con la toma de una única muestra. Por último, teniendo en cuenta que estas especies de primates están en riesgo, el conocimiento de los parásitos que los afectan permite elaborar esquemas de tratamiento y control que garanticen animales aptos para reproducirse y programas para introducirlos en ecosistemas silvestres.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Zoológico de Cali y a la Universidad del Valle, por facilitar personal, equipos, reactivos e instalaciones sin los que no podría haberse llevado a cabo el estudio, y a los cuidadores de los animales del Zoológico de Cali, por su apoyo en la recolección de las muestras.

### Referencias

1. Acevedo-Garcés YA, Álvarez-Cardona J, Vargas-Valencia V, Hernández-Castro C, García-Montoya G, Soto-Calderón ID. Valoración clínica y parasitológica del tití gris (Primates: Cebidae: *Saguinus leucopus*) en dos poblaciones naturales presentes en San Carlos y San Rafael (Antioquia, Colombia). CES Med Vet Zootec. 2014;9:68-83.
2. Asociación Colombiana de Parques Zoológicos, Acuarios y Afines-ACOPAZOA. Studbook nacional y plan de manejo Tití gris (*Saguinus leucopus*- Günther 1876). Cuarta edición. Bogotá: ACOPAZOA; 2017. p. 89. Fecha de consulta: 20 de enero de 2020. Disponible en: [http://www.acopazoa.org/sites/default/files/docs\\_adjuntos/STUDBOOK%20NACIONAL%20Y%20PLAN%20DE%20MANEJO%202017.pdf](http://www.acopazoa.org/sites/default/files/docs_adjuntos/STUDBOOK%20NACIONAL%20Y%20PLAN%20DE%20MANEJO%202017.pdf)

3. Bonell WY, Álvarez MA, Roncancio NJ. Population density of *Saguinus leucopus* (Mammalia: Primates) and landscape characteristics in eastern Antioquia, Colombia. *Therya*. 2018;9:61-8. <https://doi.org/10.12933/therya-18-519>
4. Estrada A, Garber PA, Rylands AB, Roos C, Fernández-Duque E, Di Fiore A. Impending extinction crisis of the world's primates: Why primates matter. *Sci Adv*. 2017;3:e1600946. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600946>
5. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca. Plan de manejo para las especies de primates presentes en las áreas de distribución potencial del tití gris *Saguinus leucopus* en jurisdicción de la CAR. Bogotá: CAR; 2012. Fecha de consulta: 12 de enero de 2020. Disponible en: <https://www.car.gov.co/uploads/files/5bfc0d805d7a7a7.pdf>
6. Li W, Deng L, Yu X, Zhong Z, Wang Q, Liu X, et al. Multilocus genotypes and broad host-range of *Enterocytozoon bieneusi* in captive wildlife at zoological gardens in China. *Parasit Vectors*. 2016;9:395. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1668-1>
7. Mynářová A, Foitová I, Kváč M, Květoňová D, Rost M, Morrogh-Bernard H, et al. Prevalence of *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon* spp. and *Giardia intestinalis* in wild, semi-wild and captive orangutans (*Pongo abelii* and *Pongo pygmaeus*) on Sumatra and Borneo, Indonesia. *PLoS ONE*. 2016;11:e0152771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152771>
8. Guerrero F, Serrano-Martínez E, Tantaleán M, Quispe-Marco, Casas G. Identificación de parásitos gastrointestinales en primates no humanos del zoológico parque natural de Pucallpa, Perú. *Rev Inv Vet Perú*. 2012;23:469-76. <https://doi.org/10.15381/rivep.v23i4.962>
9. Li M, Zhao B, Li B, Wang Q, Niu L, Deng J, et al. Prevalence of gastrointestinal parasites in captive non-human primates of twenty-four zoological gardens in China. *J Med Primatol*. 2015;44:168-73. <https://doi.org/10.1111/jmp.12170>
10. Fagiolini M, Lia RP, Laricchiuta P, Cavicchio P, Mannella R, Cafarchia C, et al. Gastrointestinal parasites in mammals of two Italian zoological gardens. *J Zoo Wildl Med*. 2010;41:662-70. <https://doi.org/10.1638/2010-0049.1>
11. Gracenea M, Gómez MS, Torres J, Carné E, Fernández-Morán J. Transmission dynamics of *Cryptosporidium* in primates and herbivores at the Barcelona zoo a long-term study. *Vet Parasitol*. 2002;104:19-26. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00611-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00611-2)
12. Gu Y, Wang X, Zhou C, Li P, Xu Q, Zhao C, et al. Investigation on *Cryptosporidium* infections in wild animals in a zoo in Anhui province. *J Zoo Wildl Med*. 2016;47:846-54. <https://doi.org/10.1638/2015-0301.1>
13. Xiao LH, Fayer R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int J Parasitol*. 2008;38:1239-55. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.006>
14. Montenegro M, Sánchez-Negrette M, Lértora WJ. Diagnóstico histopatológico de entamoebiosis en un primate en cautiverio (*Alouatta caraya*). *Rev Vet*. 2010;21:59-62. <https://doi.org/10.30972/vet.2111870>
15. Levecke B, Dorny P, Vercammen F, Visser LG, van Esbroeck, Vercruysse J, et al. Transmission of *Entamoeba nuttalli* and *Trichuris trichiura* from nonhuman primates to humans. *Emerg Infect Dis*. 2015;21:1871-2. <https://doi.org/10.3201/eid2110.141456>
16. Tachibana H, Yanagi T, Akatsuka A, Kobayashi S, Kanbara H, Tsutsumi V. Isolation and characterization of a potentially virulent species *Entamoeba nuttalli* from captive Japanese macaques. *Parasitology*. 2009;136:1169-77. <https://doi.org/10.1017/S0031182009990576>
17. Levecke B, Dorny P, Geurden T, Vercammen F, Vercruysse J. Gastrointestinal protozoa in non-human primates of four zoological gardens in Belgium. *Vet Parasitol*. 2007;148:236-46. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.06.020>
18. Li J, Qi M, Chang Y, Wang R, Li T, Dong H, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* in captive wildlife at Zheng Zhou Zoo, China. *J Eukaryot Microbiol*. 2015;62:833-9. <https://doi.org/10.1111/jeu.12269>
19. Farzan A, Parrington L, Coklin T, Cook A, Pintar K, Pollari F, et al. Detection and characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. on swine farms in Ontario, Canada. *Foodborne Pathog Dis*. 2011;8:1207-13. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.0907>
20. Milozzi C, Bruno G, Cundom E, Mudry MD, Navone GT. Intestinal parasites of *Alouatta caraya* (Primates, Ceboidea): Preliminary study in semi-captivity and in the wild in Argentina. *Mastozool Neotrop*. 2012;19:271-8.

21. Matsubayashi M, Takami K, Kimata I, Nakanishi T, Tani H, Sasai K, et al. Survey of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. infections in various animals at a zoo in Japan. J Zoo Wildl Med. 2005;36:331-5. <https://doi.org/10.1638/04-032.1>
22. Geurden T, Goossens E, Levecke B, Vercammen F, Vercruyse J, Claerebout E. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in captive wild ruminants in Belgium. J Zoo Wildl Med. 2009;40:126-30. <https://doi.org/10.1638/2008-0152.1>
23. Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, et al. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. Vet Parasitol. 2010;169:8-17. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.032>
24. Carvajal H, Caro FF, Bonelo A. El diagnóstico directo en parasitología. 1ª edición. Cali: Editorial Universidad del Valle; 1995. p.14-6, 21-2.
25. Ortiz-Pineda MC, Pulido-Medellín MO, García-Corredor DJ. Identificación de parásitos gastrointestinales en mamíferos del Zoológico Guática (Tibasosa, Colombia). Pensamiento y Acción. 2019;26:31-44.
26. Oyola N, Zapata-Salas R, Torres-Lindarte GA, Ríos-Osorio LA, Zapata-Tamayo MA. Frecuencia de parásitos intestinales en fauna exótica y silvestre del Zoológico Santa Fe en Medellín - Colombia. CES Medicina. 2010;24:108-9.
27. Pérez G, Hitos A, Romero D, Sánchez M, Pontes A, Osuna A, et al. Intestinal parasitism in the animals of the Zoological Garden "Peña Escrita" (Almuñecar, Spain). Vet Parasitol. 2008;156:302-9. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.05.023>
28. Sibaja KD. Identificación de los parásitos gastrointestinales y ectoparásitos de animales silvestres en cautiverio en Costa Rica. Tesis. Costa Rica: Universidad Nacional de Costa Rica; 2006. Fecha de consulta: 6 de enero de 2020. Disponible en: <https://www.repositorio.una.ac.cr/handle/11056/12913>
29. Chinchilla M, Guerrero OM, Gutiérrez-Espeleta GA, Sánchez R, Valerio I. Parásitos en monos carablanca *Cebus capucinus* (Primates: Cebidae) de Costa Rica. Parasitol Latinoam. 2007;62:170-5. <https://doi.org/10.4067/S0717-77122007000200011>
30. Phillips KA, Haas ME, Brian WG, Yrivarren M. Survey of the gastrointestinal parasites of the primate community at Tambopata National Reserve, Peru. J Zool. 2004;264:149-51.
31. Rondón S, Ortiz M, León C, Galvis N, Link A, González C. Seasonality, richness and prevalence of intestinal parasites of three neotropical primates (*Alouatta seniculus*, *Ateles hybridus* and *Cebus versicolor*) in a fragmented forest in Colombia. Int J Parasitol Parasites Wildl. 2017;6:202-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2017.07.006>
32. Fajardo-Sánchez JE, Lasso-Narváez AM, Mera-Eraso CM, Peña-Stadlin J, Zapata-Valencia JI, Rojas-Cruz C. Enteroparásitos con potencial zoonótico en animales en cautiverio del zoológico de Cali, Colombia. Neotrop Helminthol. 2014;8:279-90.
33. Catão-Dias JL, Epiphany S, Kierulff MC. Neotropical primates and their susceptibility to *Toxoplasma gondii*: New insights for an old problem. In: Brinkworth J, Pechenkina K, editors. Primates, pathogens, and evolution. Developments in primatology: Progress and prospects. New York, NY: Springer; 2013. p. 253-89. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7181-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7181-3_9)
34. Casana C, Chávez A, Abad-Amerí D, Pinedo R. Prevalence of *Giardia* spp. in rodents (*Rattus* spp.) of a zoo in Metropolitan Lima. Rev Inv Vet Perú. 2019;30:1207-15. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i3.16606>
35. Oyeyemi OT, Agbaje MO, Okelue UB. Food-borne human parasitic pathogens associated with household cockroaches and houseflies in Nigeria. Parasite Epidemiol Contr. 2016;1:10-3. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2015.10.001>
36. Montoya C, Oyola N, Ocampo M, Polanco D, Ríos S, Paola M, et al. Evaluación del parasitismo intestinal en monos aulladores rojos (*Alouatta seniculus*) en rehabilitación en el CAVR-Ecosantafé, Jericó, Colombia. Rev Lasallista Investig. 2013;10:25-34.
37. Chinchilla M, Urbani B, Valerio I, Vanegas JC. Parasitosis intestinal en monos capuchinos cariblanco *Cebus capucinus* (Primates: Cebidae) de un área protegida en la provincia de Limón, noreste de Costa Rica. Int J Trop Biol. 2010;58:1335-46. <https://doi.org/10.15517/RBT.V58I4.5416>
38. Parr NA, Fedigan LM, Kutz SJ. A coprological survey of parasites in white-faced capuchins (*Cebus capucinus*) from Sector Santa Rosa, ACG, Costa Rica. Folia Primatol (Basel). 2013;84:102-14. <https://doi.org/10.1159/000348287>

39. Müller B. Determinants of the diversity of intestinal parasite community in sympatric New World primates (*Saguinus mystax*, *Saguinus fuscicollis*, *Callicebus cupreus*). Disertación. Hannover: Universidad Veterinaria de Hannover; 2007. Fecha de consulta: 6 de enero de 2020. Disponible en: [https://elib.tiho-hannover.de/receive/etd\\_mods\\_00001869](https://elib.tiho-hannover.de/receive/etd_mods_00001869)
40. Figueiroa Lyra De Freitas M, Bianque De Oliveira A, Dowell De Brito Cavalcanti M, Alves Oliveira R, Evêncio Sobrinho A. Perfil coproparasitológico de mamíferos silvestres en cautiverio en el estado de Pernambuco, Brasil. *Parasitol día (Santiago)*. 2001;25:121-5. <https://doi.org/10.4067/S0716-07202001000300009>
41. Levecke B, Dreesen L, Dorny P, Verweij JJ, Vercammen F, Casaert S, et al. Molecular identification of *Entamoeba* spp. in captive nonhuman primates. *J Clin Microbiol*. 2010;48:2988-990. <https://doi.org/10.1128/JCM.00013-10>
42. Panayotova-Pencheva MS. Parasites in captive animals: A review of studies in some European zoos. *Der Zoologische Garten*. 2013;82:60-71. <https://doi.org/10.1016/j.zoolgart.2013.04.005>
43. Souvignet T, Giorgiadis M, Drouet B, Quintard B. EAZA Best Practice Guidelines CAPUCHIN MONKEYS (*Sapajus* and *Cebus* sp.). First edition. Mulhouse, France: Edtr. Mulhouse Zoo; 2019.
44. Barrião-Ruivo E, Stevenson MF. Guía de buenas prácticas de EAZA para Callitrichidae. 3ª edición. Saint-Aignan, Francia: Edtr. Zoológico de Beauval; 2015.
45. Wolfensohn S, Honess P. Handbook of Primate Husbandry and Welfare. First edition. London Blackwell Publishing Ltd.; 2005. p. 168.
46. Stenzel DJ, Boreham PF. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev*. 1996;9:563-84. <https://doi.org/10.1128/CMR.9.4.563-584.1996>
47. Ajjampur SS, Tan KS. Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. - Interpreting results from *in vitro* and *in vivo* studies. *Parasitol Int*. 2016;65:772-9. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.007>
48. Skotarczak B. Genetic diversity and pathogenicity of *Blastocystis*. *Ann Agric Environ Med*. 2018;25:411-6. <https://doi.org/10.26444/aaem/81315>
49. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathog*. 2014;6:17. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-17>
50. Betts EL, Gentekaki E, Thomasz A, Breakell V, Carpenter AI, Tsaousis AD. Genetic diversity of *Blastocystis* in non-primate animals. *Parasitology*. 2018;145:1228-34. <https://doi.org/10.1017/S0031182017002347>
51. Abe N, Nagoshi M, Takami K, Sawano Y, Yoshikawa H. A survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan. *Vet Parasitol*. 2002;106:203-12. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00050-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00050-X)
52. Abe N, Zhiliang W, Yoshikawa H. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from primates. *Vet Parasitol*. 2003;113:321-5. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00081-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00081-5)
53. Noël C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho LC, et al. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: Implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J Clin Microbiol*. 2005;43:348-55. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.348-355.2005>
54. Carvajal-Rincón A, Galvis-Moreno CE. Valoración médica en micos tití gris (*Saguinus leucopus*, Familia: Cebidae) en tres zoológicos colombianos. Tesis. Bogotá, D.C.: Universidad de La Salle; 2007. Fecha de consulta: 14 de diciembre de 2019. Disponible en: [https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina\\_veterinaria/333/](https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/333/)
55. Jiménez PA, Jaimes JE, Ramírez JD. Summary of *Blastocystis* subtypes in North and South America. *Parasit Vectors*. 2019;12:376. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3641-2>
56. Abe N. Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. *Vet Parasitol*. 2004;120:235-42. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.01.003>
57. Barrios-López NS. Estudio coproparasitario en primates no humanos del Parque Zoológico de Quilpué, V Región, Chile. Tesis. Valdivia: Universidad Austral de Chile; 2005. Fecha de consulta: 14 de diciembre de 2019. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2005/fvb276e/doc/fvb276e.pdf>
58. Stensvold C R, Alfellani MA, Nørskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, et al. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int J Parasitol*. 2009;39:473-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.07.006>

59. Cian A, El Safadi D, Osman M, Moriniere R, Gantois N, Benamrouz-Vanneste S, et al. Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk. PLoS ONE. 2017;12:e0169659. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169659>
60. Alfellani MA, Jacob AS, Perea NO, Krecek RC, Taner-Mulla D, Verweij JJ, et al. Diversity and distribution of *Blastocystis* sp. subtypes in non-human primates. Parasitology. 2013;140:966-71. <https://doi.org/10.1017/S0031182013000255>
61. Stensvold CR, Alfellani M, Clark CG. Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. Infect Genet Evol. 2012;12:263-73. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.11.002>
62. Scicluna SM, Tawari B, Clark C G. DNA Barcoding of *Blastocystis*. Protist. 2006;157:77-85. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2005.12.001>
63. Bunton TE, Lowenstinaen LJ, Leininger DR. Invasive trichomoniasis in a *Callicebus moloch*. Vet Pathol. 1983;20:491-4. <https://doi.org/10.1177/030098588302000412>
64. Smejkalová P, Petrželková KJ, Pomajbíková K, Modrý D, Čepička I. Extensive diversity of intestinal trichomonads of non-human primates. Parasitology. 2012;139:92-102. <https://doi.org/10.1017/S0031182011001624>
65. Culberson DE, Pindak FF, Gardner WA, Honigberg BM. *Trichomonas mobilensis* n. sp. (Zoomastigophorea Trichomonadida) from the Bolivian squirrel monkey *Saimiri boliviensis boliviensis*. J Protozool. 1986;33:301-4. <https://doi.org/10.1177/030098588902600207>
66. Mantini C, Souppart L, Noël C, Duong TH, Mornet M, Carroger G, et al. Molecular characterization of a new *Tetratrichomonas* species in a patient with empyema. J Clin Microbiol. 2009;47:2336-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.00353-09>
67. Kutisova K, Kulda J, Cepicka I, Flegr J, Koudela B, Teras J, et al. Tetratrichomonads from the oral cavity and respiratory tract of humans. Parasitology. 2005;131:309-19. <https://doi.org/10.1017/S0031182005008000>
68. Bastos BF, Brener B, de Figueiredo MA, Leles D, Mendes-de-Almeida F. *Pentatrichomonas hominis* infection in two domestic cats with chronic diarrhea. JFSM Open Rep. 2018;4:2055116918774959. <https://doi.org/10.1177/2055116918774959>
69. Saha R, Singal A, Kaushik S, Das S. *Pentatrichomonas hominis* in an immunosuppressed patient with enteric manifestations. Eastern Journal of Medical Sciences. 2017;2:37-8. <https://doi.org/10.32677/EJMS.2017.v02.i02.005>
70. Li WC, Wang K, Zhang W, Wu J, Gu YF, Zhang XC. Prevalence and molecular characterization of intestinal Trichomonads in pet dogs in East China. Korean J Parasitol. 2016;54:703-10. <https://doi.org/10.3347/kjp.2016.54.6.703>
71. Mostegl MM, Wetscher A, Richter B, Nedorost N, Dinhopf N, Weissenböck H. Detection of *Tritrichomonas foetus* and *Pentatrichomonas hominis* in intestinal tissue specimens of cats by chromogenic *in situ* hybridization. Vet Parasitol. 2012;183:209-14. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.050>
72. Jongwutiwes S, Silachamroon U, Putaporntip C. *Pentatrichomonas hominis* in empyema thoracis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000;94:185-6. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(00\)90270-0](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90270-0)
73. Jo SH, Choi TY, Kim WB, Lee DW, Kang DY. A case report of *Trichomonas hominis* in ascitic and pleural fluids. K J Clin Pathol. 1992;12:79-83.
74. Berrilli F, Prisco C, Friedrich KG, Di Cerbo P, Di Cave D, De Liberato C. *Giardia duodenalis* assemblages and *Entamoeba* species infecting non-human primates in an Italian zoological garden: Zoonotic potential and management traits. Parasit Vectors. 2011;12:199. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-199>
75. Verweij JJ, Vermeer J, Brienen EA, Blotkamp C, Laeijendecker D, van Lieshout L, et al. *Entamoeba histolytica* infections in captive primates. Parasitol Res. 2003;90:100-3. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0808-z>
76. Verweij JJ, Polderman AM, Clark CG. Genetic variation among human isolates of uninucleated cyst-producing *Entamoeba* species. J Clin Microbiol. 2001;39:1644-6. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1644-1646.2001>
77. Sargeaunt PG, Patrick S, O'Keeffe D. Human infections of *Entamoeba chattoni* masquerade as *Entamoeba histolytica*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1992;86:633-4. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(92\)90162-6](https://doi.org/10.1016/0035-9203(92)90162-6)



78. Chinchilla-Carmona M, Guerrero-Bermúdez O, Gutiérrez-E GA, Sánchez-Porras R, Rodríguez-Ortiz B. Parásitos intestinales en monos congo *Alouatta palliata* (Primates: Cebidae) de Costa Rica. *Rev Biol Trop*. 2005;53:437-45.
79. Stedman NL, Munday JS, Esbeck R, Visvesvara GS. Gastric amebiasis due to *Entamoeba histolytica* in a dama wallaby (*Macropus eugenii*). *Vet Pathol*. 2003;40:340-2. <https://doi.org/10.1354/vp.40-3-340>
80. Einarsson E, Ma'ayeh S, Staffan SG. An up-date on *Giardia* and *Giardiasis*. *Curr Opin Microbiol*. 2016;34:47-52. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.019>
81. Thompson RCA. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol*. 2004;126:15-35. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.008>
82. Thompson RC, Monis P. *Giardia*—from genome to proteome. *Adv Parasitol*. 2012;78:57-95. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394303-3.00003-7>
83. Levecke B, Geldhof P, Claerebout E, Dorny P, Vercammen F, Cacciò SM, *et al*. Molecular characterisation of *Giardia duodenalis* in captive non-human primates reveals mixed assemblage A and B infections and novel polymorphisms. *Int J Parasitol* 2009;39:1595-601. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.05.013>
84. Kramer JA, Hachey AM, Wachtman LM, Mansfield KG. Treatment of *Giardiasis* in common marmosets (*Callithrix jacchus*) with tinidazole. *Comp Med*. 2009;59:174-9.
85. Chagas CR, González IH, Salgado PA, Rodrigues B, Ramos PL. *Giardia* spp., ten years of parasitological data in the biggest zoo of Latin America. *Ann Parasitol*. 2019;65:35-51. <https://doi.org/10.17420/ap6501.181>
86. Martínez-Díaz RA, Sansano-Maestre J, Martínez-Herrero MC, Ponce-Gordo F, Gómez-Muñoz MT. Occurrence and genetic characterization of *Giardia duodenalis* from captive nonhuman primates by multi-locus sequence analysis. *Parasitol Res* 2011;109:539-44. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2281-z>
87. Opara MN, Osuji CT, Opara JA. Gastrointestinal parasitism in captive animals at the Zoological Garden, Nekede Owerri, Southeast Nigeria. *Rep Opinion*. 2010;2:21-8.
88. de Lucio A, Martínez-Ruiz R, Merino FJ, Bailo B, Aguilera M, Fuentes I, *et al*. Molecular genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from symptomatic individuals attending two major public hospitals in Madrid, Spain. *PLoS ONE*. 2015;10:e0143981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143981>
89. Tungtrongchitr A, Sookrung N, Indrawattana N, Kwangsi S, Ongrotchanakun J, Chaicumpa W. *Giardia intestinalis* in Thailand: Identification of genotypes. *J Health Popul Nutr*. 2010;28:42-52. <https://doi.org/10.3329/jhpn.v28i1.4522>
90. Heyworth MF. *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite*. 2016;23:13. <https://doi.org/10.1051/parasite/2016013>
91. Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, *et al*. Soil-transmitted helminth infections: Ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet*. 2006;367:1521-32. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68653-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68653-4)
92. Eo KY, Seo MG, Lee HH, Jung YM, Kwak D, Kwon OD. Severe whipworm (*Trichuris* spp.) infection in the hamadryas baboon (*Papio hamadryas*). *J Vet Med Sci*. 2019;81:53-6. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0568>
93. Ghai RR, Simons ND, Chapman CA, Omeja PA, Davies TJ, Ting N, *et al*. Hidden population structure and cross-species transmission of whipworms (*Trichuris* sp.) in humans and non-human primates in Uganda. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8:e3256. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003256>
94. Albani A, De Liberato C, Wahid I, Berrilli F, Riley EP, Cardeti G, *et al*. Preliminary assessment of gastrointestinal parasites in two wild groups of endangered Moor Macaques (*Macaca maura*) from Sulawesi. *Int J Primatol*. 2019;40:671-86. <https://doi.org/10.1007/S10764-019-00114-W>
95. Agostini I, Vanderhoeven E, Beldomenico PM, Pfoh R, Notarnicola J. First coprological survey of helminths in a wild population of black capuchin monkeys (*Sapajus nigritus*) in northeastern Argentina. *Mastozool Neotrop*. 2018;25:269-81. <https://doi.org/10.31687/saremMN.18.25.2.0.11>
96. de Araújo FG, Bicca-Marques JC, Calegari-Marques C, de Farias EM, de O Azevedo MA. On the occurrence of parasites in free-ranging Callitrichids. *Neotrop Primates*. 1995;3:46-7
97. Rivero-Fernández J. Especies de *Trichuris* aisladas de primates de parques zoológicos de España. Tesis. Sevilla: Universidad de Sevilla; 2018.

98. Bölükbaş CS, Pekmezci GZ, Gürler AT, Açıci M, Umur Ş. Zoonotic *Trichuris trichiura* infections in non-human primates at Samsun Zoo, Turkey: First molecular characterization. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2014;20:161-4. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2013.9615>
99. Hawash MBF, Andersen LO, Gasser RB, Stensvold CR, Nejsun P. Mitochondrial genome analyses suggest multiple *Trichuris* species in humans, baboons, and pigs from different geographical regions. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9:e0004059. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004059>
100. Viney ME, Lok JB. The biology of *Strongyloides* spp. *Wormbook.* 2015;16:1-17. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.141.2>
101. Thamsborg SM, Ketzis J, Horii Y, Matthews JB. *Strongyloides* spp. infections of veterinary importance. *Parasitology.* 2017;144:274-84. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001116>
102. Barratt JLN, Lane M, Talundzic E, Richins T, Robertson G, Formenti F, et al. A global genotyping survey of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides fuelleborni* using deep amplicon sequencing. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13:e0007609. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007609>
103. Nutman TB. Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. *Parasitology.* 2017;144:263-73. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000834>
104. Jaleta TG, Lok JB. Advances in the molecular and cellular biology of *Strongyloides* spp. *Curr Trop Med Rep.* 2019;6:161-78. <https://doi.org/10.1007/s40475-019-00186-x>
105. Tantaleán VM, Sánchez P N, Perea CMI. Infección natural por *Strongyloides stercoralis* en *Pithecia monachus* (Primates, Pitheciidae). Primer reporte en el Perú. *Rev Inv Vet Perú.* 2018;29:1386-90. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i4.15197>
106. Terashima A, Canales M, Tello R, Mas-Coma S, Esteban G, Bargues M, et al. *Strongyloides fuelleborni*: reporte del primer caso clínico en el Perú. *Diagnóstico* 2000;39. Fecha de consulta: 12 de enero de 2020. Disponible en: <http://www.fihu.org.pe/revista/numeros/2000/julago00/199-203.html>
107. Flores-Casas N, Olivo-Inga Y, Saavedra-Alemán Z, Grados-Castillo J. Casos Clínicos. Infección diseminada por *Strongyloides fuelleborni*. *Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna.* 2001;14. Fecha de consulta: 12 de enero de 2020. Disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/spmi/v14n1/infecci%C3%B3n.htm>
108. Zerpa-Larrauri R, Espinoza-Blanco Y, Náquira C. Ciclo biológico de *Strongyloides fuelleborni*: imágenes y videos. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2014;31:390-2.
109. Torres Freile MF. Determinación de la prevalencia del parásito intestinal *Prosthenorchis* sp. en primates del nuevo mundo en los zoológicos y centros de rescate: Zoológico de Tarqui, Paseo de los Monos, Yanacocha y Misahualli. Tesis. Quito: Universidad de las Américas; 2014.
110. Botero LC, Fernández A, Forero N, Rosas S, Soler-Tovar D. Análisis retrospectivo de las enfermedades parasitarias del mono ardilla (*Saimiri sciureus*) en dos condiciones *ex situ* en el noroccidente de los Andes suramericanos. *Rev Med Vet.* 2011;22:85-93. <https://doi.org/10.19052/mv.557>
111. Tenorio-Mati VL, Raso P, de Melo AL. *Strongyloides stercoralis* infection in marmosets: Replication of complicated and uncomplicated human disease and parasite biology. *Parasit Vectors.* 2014;7:579. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0579-2>
112. Solórzano-García B, Pérez-Ponce de León G. Helminth parasites of howler and spider monkeys in México: Insights into molecular diagnostic methods and their importance for zoonotic diseases and host conservation. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2017;6:76-84. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2017.04.001>
113. Hasegawa H, Sato H, Fujita S, Nguema PP, Nobusue K, Miyagi K, et al. Molecular identification of the causative agent of human strongyloidiasis acquired in Tanzania: Dispersal and diversity of *Strongyloides* spp. and their hosts. *Parasitol Int.* 2010;59:407-13. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.05.007>
114. Dacal E, Saugar JM, Soler T, Azcárate JM, Jiménez MS, Merino FJ, et al. Parasitological versus molecular diagnosis of strongyloidiasis in serial stool samples: how many? *J Helminthol.* 2018;92:12-6. <https://doi.org/10.1017/S0022149X17000050>
115. Dorris M, Viney ME, Blaxter ML. Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes. *Int J Parasitol.* 2002;32:1507-17. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00156-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00156-X)

116. Eberhard ML, Owens JR, Bishop HS, de Almeida ME, da Silva AJ. *Cyclospora* spp. in drills, Bioko Island, Equatorial Guinea. *Emerg Infect Dis.* 2014;20:510-1. <https://doi.org/10.3201/eid2003.131368>
117. Legesse M, Erko B. Zoonotic intestinal parasites in *Papio anubis* (baboon) and *Cercopithecus aethiops* (vervet) from four localities in Ethiopia. *Acta Trop.* 2004;90:231-6. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.12.003>
118. Marangi M, Koehler AV, Zanzani SA, Manfredi MT, Brianti E, Giangaspero A, *et al.* Detection of *Cyclospora* in captive chimpanzees and macaques by a quantitative PCR-based mutation scanning approach. *Parasit Vectors.* 2015;8:274. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0872-8>
119. Li N, Ye J, Arrowood MJ, Ma J, Wang L, Xu H, *et al.* Identification and morphologic and molecular characterization of *Cyclospora macacae* n. sp. from rhesus monkeys in China. *Parasitol Res.* 2015;114:1811-6. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4367-5>
120. Roncancio-Duque N, Benavides Montaña JA. Parásitos intestinales en poblaciones pequeñas y aisladas de Mono aullador rojo (*Alouatta seniculus*) y Mono araña café (*Ateles hybridus*), Atelidae – Primates en el Magdalena Medio, Colombia. *Veterinaria y Zootecnia.* 2013;7:71-89.
121. Almeria S, Cinar HN, Dubey JP. *Cyclospora cayetanensis* and cyclosporiasis: An update. *Microorganisms.* 2019;7:E317. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090317>
122. Eberhard ML, da Silva AJ, Lilley BG, Pieniazek NJ. Morphologic and molecular characterization of new *Cyclospora* species from Ethiopian monkeys: *C. cercopithecii* sp.n., *C. colobi* sp.n., and *C. papionis* sp.n. *Emerg Infect Dis.* 1999;5:651-8. <https://doi.org/10.3201/eid0505.990506>
123. Eberhard ML, Njenga MN, DaSilva AJ, Owino D, Nace EK, Won KY, *et al.* A survey for *Cyclospora* spp. in Kenyan primates, with some notes on its biology. *J Parasitol.* 2001;87:1394-7. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[1394:ASFCSI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[1394:ASFCSI]2.0.CO;2)



Artículo original

## DetECCIÓN DE *Toxoplasma gondii* EN AGUA PARA EL CONSUMO HUMANO PROVENIENTE DE JAGÜEYES DEL ÁREA RURAL DEL MUNICIPIO DE SINCELEJO

Diana Marcela Campo-Portacio<sup>1,2</sup>, Luisa Fernanda Guerrero-Velásquez<sup>1</sup>, Angie Patricia Castillo-García<sup>1</sup>, Kelly Orozco-Méndez<sup>1</sup>, Pedro José Blanco-Tuirán<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Investigaciones Biomédicas, Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia

<sup>2</sup> Programa de Maestría en Biología, Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia

**Introducción.** La toxoplasmosis es una zoonosis que se transmite por vía oral al consumir alimentos contaminados con cualquier forma infectiva de *Toxoplasma gondii*. Su transmisión por agua ha sido documentada en varios países, incluido Colombia. Al no disponer de agua potable, la población rural de Sincelejo podría estar en riesgo de contraer toxoplasmosis por esta vía.

**Objetivo.** Evaluar la contaminación por *T. gondii* del agua para consumo humano proveniente de jagüeyes de la zona rural de Sincelejo y establecer su relación con diferentes determinantes sociales de la salud en el área de estudio.

**Materiales y métodos.** Mediante PCR anidada, se evaluaron 96 muestras de agua obtenidas en 48 fincas ubicadas en ocho corregimientos rurales de Sincelejo. En cada finca se obtuvieron dos muestras: una de agua cruda de jagüey y otra destinada al consumo directo. En cada finca se hizo una encuesta para recolectar información sobre características físicas de la vivienda, presencia de gatos, y disponibilidad de agua y sus usos. Las relaciones estadísticas se evaluaron con el test de Fisher.

**Resultados.** De las 96 muestras analizadas, 13 resultaron contaminadas con *T. gondii* (13,5 %): nueve de agua cruda y cuatro de agua para el consumo directo. No se encontró asociación estadística entre las muestras positivas y los determinantes sociales de la salud evaluados ( $p > 0,05$ ).

**Conclusión.** La población rural de Sincelejo podría estar en riesgo de contraer toxoplasmosis por el uso y consumo del agua proveniente de sus jagüeyes. La contaminación de estos cuerpos de agua por *T. gondii* puede estar influenciada por otros determinantes sociales de la salud no contemplados aquí.

**Palabras clave:** *Toxoplasma*; agua cruda; reacción en cadena de la polimerasa; determinantes sociales de la salud.

### Detection of *Toxoplasma gondii* in water for human consumption from water wells (jagüeyes) in the rural area of the municipality of Sincelejo

**Introduction:** Toxoplasmosis is an orally-transmitted zoonosis that may appear after consuming food contaminated with any infective form of *Toxoplasma gondii*. Its transmission by water has been reported in several countries including Colombia. The rural population of Sincelejo could be at risk of contracting toxoplasmosis through this route given that they lack potable water.

**Objective:** To evaluate *T. gondii* contamination in water for human consumption from water wells (jagüeyes) in the rural area of Sincelejo and establish its relationship with different social determinants of health in the study area.

**Materials and methods:** Using nested PCR we evaluated 96 water samples obtained from 48 farms located in eight rural townships in Sincelejo. We took two samples in each farm: one of raw water from water wells and the other intended for direct consumption. We conducted a survey on each farm to collect information on the physical characteristics of dwellings, the presence of cats, and the availability and uses of water. Statistical relationships were evaluated through Fisher tests.

**Results:** Of the 96 samples analyzed, 13 were contaminated with *T. gondii* (13.5%): Nine corresponded to raw water and four to water for direct consumption. No statistical association was found between the positive samples and the social determinants of health under evaluation ( $p > 0.05$ ).

**Conclusion:** The rural population of Sincelejo could be at risk of contracting toxoplasmosis through the use and/or consumption of water from its water wells. The contamination of these water bodies by *T. gondii* may be influenced by unstudied social determinants.

**Key words:** *Toxoplasma*; raw water; polymerase chain reaction; social determinants of health.

**Recibido:** 04/11/2020  
**Aceptado:** 03/04/2021  
**Publicado:** 06/04/2021

#### Citación:

Campo-Portacio DM, Guerrero-Velásquez LF, Castillo-García AP, Orozco-Méndez K, Blanco-Tuirán PJ. Detección de *Toxoplasma gondii* en agua para el consumo humano proveniente de jagüeyes del área rural del municipio de Sincelejo. Biomédica. 2021;41(Supl.1):82-99.  
<https://doi.org/10.7705/biomedica.5858>

#### Correspondencia:

Diana Marcela Campo-Portacio, Calle 15E No 6<sup>a</sup>-79, Sincelejo, Colombia  
Teléfono: (311) 618 3571  
marcelacampor@gmail.com

#### Contribución de los autores:

Diana Marcela Campo-Portacio, Luisa Fernanda Guerrero-Velásquez, Angie Patricia Castillo-García: planificación y ejecución de la investigación, recolección, análisis e interpretación de los datos y escritura del manuscrito  
Kelly Orozco-Méndez: análisis e interpretación de los datos y revisión crítica del contenido del manuscrito  
Pedro José Blanco-Tuirán: planificación de la investigación, análisis e interpretación de los datos y revisión crítica del contenido del manuscrito  
Todos los autores participaron en la aprobación de la versión final del manuscrito y asumen la responsabilidad frente a todos sus aspectos.

#### Financiación:

La investigación fue financiada con recursos propios del Grupo de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre, institución a la cual están afiliados los autores.

#### Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

La toxoplasmosis es una zoonosis que afecta a la población mundial. La evidencia sugiere que un tercio de la población está infectada, razón por la cual se considera un problema de salud pública con gran impacto socioeconómico en términos de morbilidad y costos por el cuidado de los enfermos (1).

La infección suele ser asintomática en la mayoría de los pacientes inmunocompetentes y, de llegar a desarrollar síntomas, estos son leves, inespecíficos y de resolución espontánea. Los más frecuentes incluyen dolor muscular, astenia, cefalea e inflamación de los ganglios linfáticos. La toxoplasmosis cobra mayor importancia clínica cuando es congénita o hay reactivación de la infección en pacientes inmunocomprometidos (2).

Su agente causal es el protozoo parásito *Toxoplasma gondii*, el cual infecta al hombre y a la mayoría de animales homeotermos. Los huéspedes definitivos de *T. gondii* son los felinos, pues son los únicos animales que pueden eliminar ooquistes, forma infectiva del parásito, en las heces y diseminar así la infección en el medio ambiente (3). Los humanos pueden adquirir el parásito por la ingestión de carne mal cocida infectada con quistes tisulares de *T. gondii* (con bradizoítos), por la ingestión de ooquistes (con esporozoítos) presentes en frutas y verduras sin lavar y agua sin tratar, o por transmisión vertical (4).

En Colombia, la vigilancia epidemiológica de la enfermedad está enfocada principalmente a la prevención de las manifestaciones clínicas importantes: toxoplasmosis congénita y reactivación en inmunocomprometidos. Sin embargo, ambas formas clínicas siguen siendo un problema de salud importante para el país. Cada año aparecen entre 2 y 10 casos de infección congénita por cada 1.000 nacidos vivos (5). Además, la toxoplasmosis cerebral en pacientes infectados con HIV sigue siendo un problema importante de salud (6-8).

Los estudios nacionales para determinar las principales vías por las cuales la población colombiana adquiere el parásito, son escasos. Se han hecho algunos para detectar el ADN del parásito en carnes de consumo humano en diferentes ciudades (9,10).

En cuanto a la vigilancia epidemiológica nacional del resto de fuentes de infección oral de toxoplasmosis, el panorama es bastante parecido. Mediante el análisis de determinantes sociales de la salud, se sabe que el consumo de agua sin tratar es un factor de riesgo que predispone a las mujeres gestantes a la primoinfección, comparado con el consumo de agua de botella o filtrada (11). En otro estudio, se reportó un brote de toxoplasmosis aguda transmitida por agua en 18 militares colombianos que prestaban su servicio en el municipio de La Macarena, Meta. En ellos, se detectó como factor de riesgo epidemiológico el haber consumido agua en malas condiciones de salubridad y con presencia de sedimentos, proveniente de un cuerpo de agua estancada ubicado en el área selvática en la que prestaban su servicio (12).

Se han hecho estudios nacionales con técnicas moleculares para evaluar la presencia de *T. gondii* en el agua de consumo (13,14). En uno realizado en el departamento del Quindío, se detectó *T. gondii* en 27 de 46 (58,6 %) muestras de agua evaluadas, de las cuales 10 correspondían a agua cruda superficial, 2 a agua de la planta de tratamiento, 12 se habían recolectado en la red de distribución y 3 en los hogares (15). En otro estudio en Bogotá, se detectó *T. gondii* en 5 de 7 muestras de agua de grifo evaluadas provenientes de los hogares de tres mujeres gestantes positivas para IgM y cuatro

gestantes negativas para IgM anti-toxoplasma (Pinzón ML, Herrera C, Gómez JE, Lora F, Arévalo A, Vanegas MC. Detección de ADN de *Toxoplasma gondii* en agua potable de Bogotá. Biomédica. 2011;31(Supl.3):241).

Por último, en un estudio en el municipio de Armenia se detectó ADN de *T. gondii* en cuatro muestras de agua provenientes de restaurantes escolares: dos de 10 muestras de agua de grifo (20 %) y dos de 30 muestras de agua hervida destinada a la elaboración de jugo de fruta (6,6 %). En este mismo estudio, se encontró que una de 12 muestras de jugo de guayaba evaluadas (8,3 %) resultó positiva por PCR para *T. gondii*. Coincidentemente, esta única muestra de jugo de fruta contaminada con ADN de *T. gondii* provenía de uno de los dos restaurantes donde la muestra de agua para la preparación de los jugos resultó positiva (16).

El escaso número de estudios encaminados a detectar el parásito causante de la toxoplasmosis en agua pone de manifiesto la falta de conocimiento y la subestimación del riesgo para las personas que tienen el hábito de consumir agua sin hervir o, en su defecto, agua cruda proveniente de cuerpos naturales o artificiales como los jagüeyes por falta de un sistema de abastecimiento de agua potable.

Otro agravante de la posible trasmisión de toxoplasmosis por medio del agua en Colombia, sobre todo en zonas rurales en las que no hay sistema de abastecimiento de agua potable, es que las normas vigentes se centran exclusivamente en la inspección y la vigilancia de la calidad del agua por parte de los prestadores del servicio público domiciliario de acueducto, dejando por fuera a los hogares que se abastecen de fuentes alternas como el agua lluvia, la de pozos subterráneos construidos de manera artesanal o los superficiales como los jagüeyes.

A nivel nacional, las principales normas sobre la calidad del agua son el Decreto 1575 de 2007 y la Resolución 2115 de 2007, por medio de los cuales se establece el Sistema para la Protección y Control de la Calidad del Agua para Consumo Humano. Estas mismas normas establecen que el control de la calidad del agua de los acueductos se ejerza por medio de las entidades nacionales, departamentales, municipales y distritales que forman parte del sistema, entidades que tienen la responsabilidad de velar porque los prestadores del servicio público domiciliario de acueducto cumplan con la reglamentación expedida en el marco del mismo sistema.

En el departamento de Sucre, la entidad encargada de registrar en línea los datos de las actividades de inspección, vigilancia y control de la calidad del agua para consumo humano, es el Departamento Administrativo de Seguridad Social en Salud de Sucre que, de conformidad con la Resolución 622 de 2020 emitida por el Ministerio de Salud y Protección Social y el Ministerio de Vivienda, Ciudad y Territorio, adopta el protocolo de inspección, vigilancia y control de la calidad del agua para consumo humano que suministran las entidades prestadoras del servicio público domiciliario de acueducto en la zona rural.

La mayor parte de la población rural de Sincelejo no posee acueducto, de manera que las actividades de inspección, vigilancia y control de la calidad del agua no se aplican en todo el territorio rural del municipio. Esta falencia del sistema pone en riesgo de contraer enfermedades transmitidas por consumo de agua no tratada a la población rural del municipio.

El consumo de agua sin tratar o tratada artesanalmente, tal como la proveniente de jagüeyes, podría considerarse un factor de riesgo que predispone tanto a personas como animales a contraer distintas enfermedades transmitidas por medio del agua, entre ellas, la toxoplasmosis, debido a la posibilidad de que la escorrentía arrastre ooquistes de *T. gondii* contenidos en heces de felinos infectados.

En ese contexto, en el presente estudio se detectó ADN de *T. gondii* mediante la amplificación del gen *B1* en muestras de agua de consumo humano y agua proveniente de jagüeyes del área rural de Sincelejo, con el objetivo de establecer la relación entre la contaminación del agua por *T. gondii* y diversos determinantes sociales de la salud en el área de estudio.

## Materiales y métodos

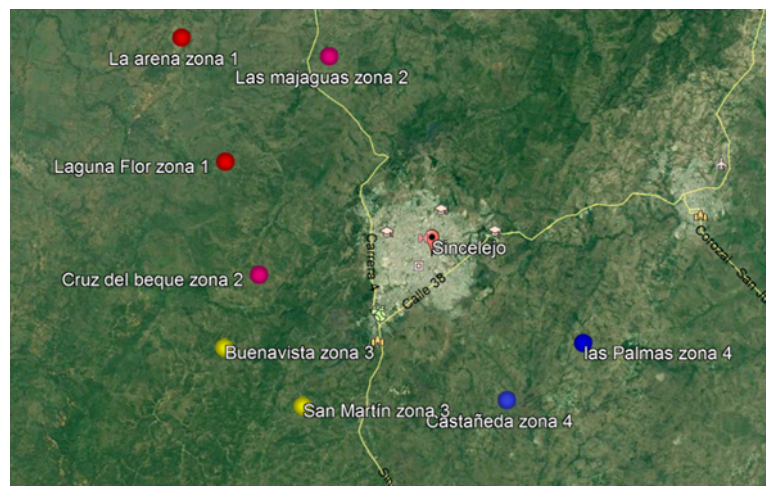
### Tipo de estudio

Se llevó a cabo un estudio de tipo descriptivo en el que se determinó la contaminación por *T. gondii* en muestras de agua destinadas al consumo humano en hogares con acceso directo a jagüeyes y aledaños a ellos, en la zona rural del municipio de Sincelejo.

### Área de estudio

El estudio se hizo en la zona rural del municipio de Sincelejo, departamento de Sucre, ubicado al noroeste del país a 9° 18" latitud norte y 75° 23" longitud oeste del meridiano de Greenwich. Sincelejo tiene una extensión total de 248,1 km<sup>2</sup>, de los cuales el 92,8 % (230,24 km<sup>2</sup>) son territorio rural repartido en 21 corregimientos. La temperatura media anual del municipio está cercana a los 32 °C, con una mínima de 28 °C y una máxima de 38 °C.

Sincelejo posee 300 jagüeyes, la mayoría distribuidos en la zona rural del municipio (17). En este estudio, se analizaron muestras de agua provenientes de 48 de ellos (16 %) ubicados en ocho corregimientos de la zona rural de Sincelejo, los cuales están agrupados en cuatro zonas geoeconómicamente similares según el Plan de Ordenamiento Territorial. Los corregimientos evaluados por zonas fueron: zona 1: La Arena y Laguna Flor; zona 2: Las Majaguas y Cruz del Beque; zona 3: Buenavista y San Martín, y zona 4: Castañeda y Las Palmas (figura 1).



Nota: cada par de corregimientos tiene asignado un color según la zona de estudio.  
Fuente: modificado de Google Earth

**Figura 1.** Zonas y corregimientos de muestreo

La selección de estos corregimientos y de los jagüeyes examinados se hizo mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia. Los criterios de selección fueron la cercanía del jagüey a la vía de acceso, lo cual se verificó con un recorrido virtual superficial del área del municipio de Sincelejo utilizando el programa Google Earth Pro 7.3.3.7786, y la accesibilidad al cuerpo de agua permitida por los habitantes del predio.

### **Tamaño de la muestra**

Se recolectaron 96 muestras de agua para consumo humano y labores domésticas. De estas 96 muestras de agua, 48 eran agua cruda de jagüey y 48 eran de agua tratada artesanalmente para el consumo directo. En cada corregimiento se tomaron 12 muestras de agua, seis de agua cruda proveniente de jagüeyes y seis tratadas artesanalmente de los hogares aledaños a los jagüeyes, cada una con un volumen de 5 litros (18). Las muestras se almacenaron en recipientes plásticos estériles y se transportaron desde el sitio de muestreo hasta el Laboratorio de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre, para su análisis.

**Concentración de las muestras.** Las muestras de agua se sometieron a un proceso previo de filtración con papel de filtro comercial (filtros de café) para eliminar partículas de gran tamaño. Luego se pasaron a través de membranas de celulosa con un tamaño de poro de 5  $\mu\text{m}$  en un equipo de filtración formado por una bomba de vacío, un papel filtro, un embudo y un matraz recolector de Erlenmeyer. Las muestras de agua cruda de jagüey se filtraron en dos volúmenes, cada uno de 2,5 litros, utilizando una membrana de celulosa para cada volumen. Las membranas de celulosa empleadas en la filtración se dispusieron en tubos Falcon™ de 15 ml para la posterior elución de ooquistes y la extracción de ADN.

### **Elución de ooquistes**

Esta se hizo con el método descrito por Isaac-Renton, *et al.*, con algunas modificaciones (19). Los filtros se lavaron con 10 ml de PBS complementado con Tween 80 al 0,01 % y SDS al 0,01 % en tubos Falcon™ de 15 ml. Los tubos se colocaron en un agitador durante 30 minutos y después los filtros fueron retirados del tubo; la solución obtenida fue centrifugada a 4.500g durante 10 minutos. El gránulo obtenido se resuspendió en 10 ml de agua destilada y fue nuevamente centrifugado a 4.500g durante 10 minutos.

Los ooquistes de *T. gondii* se recuperaron mediante el método de flotación con solución azucarada usado por Sroka (18), con algunas modificaciones. El gránulo obtenido a partir de la elución fue resuspendido en 3 ml de solución de sacarosa compuesta por 53 g de sacarosa, 100 ml de agua destilada y 0,8 ml de fenol (gravedad específica de 1,15). Los tubos se centrifugaron y el sobrenadante fue recuperado y adicionado a un nuevo tubo Falcon™ en el que, posteriormente, se adicionaron 9 ml de PBS complementado con Tween 80 al 0,01 % y SDS al 0,01 %. Después de una última centrifugación, el gránulo (ooquistes) fue resuspendido en 500  $\mu\text{l}$  de solución tampón TE y almacenado en un tubo Eppendorf de 1,5 ml.

### **Extracción de ADN genómico**

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante el método de fenol-cloroformo.

### **Amplificación del control interno positivo**

Como control interno positivo, se amplificó ADN de bacterias, específicamente el gen *ARNr 16s*, con los cebadores 27F y 1492R, los cuales amplifican un fragmento de 1.500 pb. La mezcla de reacción estuvo conformada por 5 µl de solución tampón 5X incoloro, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl de DNTP, 0,125 µl de GoTaq™, 2 µl de ADN, 15,275 µl de agua ultrapura y 0,3 µl de cada iniciador para un volumen de reacción de 25 µl. El perfil térmico incluyó una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante dos minutos, de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, un alineamiento a 50 °C durante 30 segundos, una extensión a 72 °C durante un minuto y una extensión final a 72 °C durante cinco minutos. Se usó como control positivo ADN de rickettsias y, como control negativo, un volumen de agua ultrapura.

### **Amplificación del gen B1**

Para la amplificación de la región del gen *B1* de *T. gondii*, se usó la PCR anidada con dos conjuntos de cebadores descrita previamente (20). El proceso de amplificación se hizo en dos etapas; una primera ronda de amplificación de un fragmento de 193 pb con los cebadores toxo N1 y toxo C1, y una segunda mediante la amplificación de un fragmento de 96 pb con los cebadores toxo N2 y toxo C2. Los pares de cebadores empleados fueron sintetizados con la plataforma de Integrated DNA Technologies IDT™ y el proceso de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Veriti 96-Well Fas™ (Applied Biosystems).

La mezcla de reacción de la primera ronda se compuso de 5 µl de solución tampón 5X incolora, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl de DNTP, 0,125 µl de GoTaq™, 3 µl de ADN, 14,275 µl de agua ultrapura y 0,3 µl de cada iniciador, para un volumen de reacción de 25 µl. El perfil térmico de la primera ronda de amplificación incluyó una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante dos minutos, una de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, un alineamiento a 54 °C durante 30 segundos, una extensión a 72 °C durante 45 segundos y una extensión final a 72 °C durante cinco minutos. Como control positivo se usó ADN de *T. gondii* y, como control negativo, un volumen de agua ultrapura.

La mezcla de reacción de la segunda ronda de amplificación se compuso de 5 µl de solución tampón 5X incolora, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl de DNTP, 0,125 µl de GoTaq™, 3 µl de ADN (amplificación de primera ronda), 13,675 µl de agua ultrapura y 0,6 µl de cada iniciador, para un volumen de reacción de 25 µl. El perfil térmico de la segunda ronda de amplificación incluyó una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante dos minutos, una de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, un alineamiento a 54 °C durante 30 segundos, una extensión a 72 °C durante 30 segundos y otra final a 72 °C durante cinco minutos. Como control positivo se usó el producto de amplificación de la primera ronda del control positivo y, como control negativo, el producto de amplificación de la primera ronda del control negativo.

### **Visualización de los productos de la PCR**

Los productos de la PCR se separaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en solución tampón TBE 0,5X (tris-ácido bórico-EDTA) a 80 voltios durante 40 minutos. Los resultados se visualizaron en un fotodocumentador después de teñirlos con Gelstar®. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb, con el fin de determinar el tamaño de los fragmentos amplificados.

### **Análisis de los determinantes sociales de la salud**

Los determinantes sociales de la salud en los 48 lugares de muestreo se evaluaron mediante una encuesta compuesta por 15 preguntas para recolectar la información relacionada con cuatro de ellos: las características físicas de la vivienda, la presencia de gatos, la disponibilidad del agua y sus usos. Los resultados obtenidos en las encuestas se ingresaron en una base de datos diseñada en Excel 2013 y sirvieron para evaluar su asociación con la contaminación del agua por *T. gondii*.

### **Análisis estadístico de los datos**

Con base en los resultados obtenidos de las pruebas de laboratorio y las respuestas a la encuesta, se evaluó la asociación entre la contaminación del agua por *T. gondii* y los determinantes sociales de la salud analizados.

La asociación entre variables dicotómicas se evaluó mediante el test de Fisher con una tabla de contingencia 2 x 2. La asociación entre la contaminación del agua por *T. gondii* y los determinantes sociales de la salud con más de dos respuestas categóricas, se evaluó con el test exacto de Fisher y el paquete estadístico "fmsb library". Los dos análisis estadísticos se hicieron con el programa estadístico R™, versión 3.3.2.

## **Resultados**

### **Características del agua recolectada y los sitios de muestreo**

Las 96 muestras de agua recolectadas se caracterizaron por presentar baja salinidad, poca conductividad eléctrica y pH neutro (no se muestran los datos). Todas las muestras tenían poca turbidez, aunque las de agua cruda de jagüey eran ligeramente más turbias, comparadas con las tratadas artesanalmente. Por ello, fue necesario filtrarlas separadamente en dos volúmenes de 2,5 litros cada uno y emplear para cada volumen una membrana de celulosa diferente.

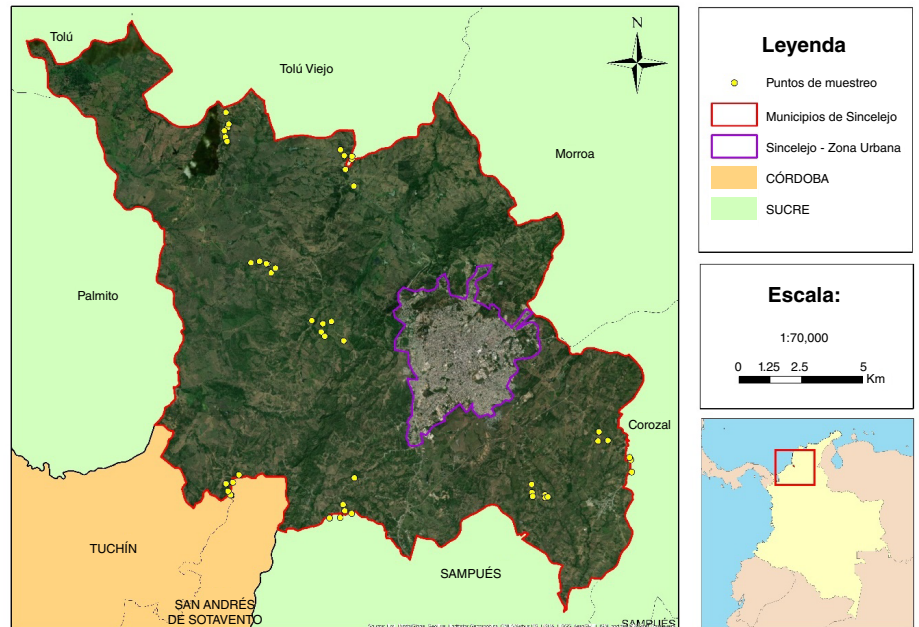
Los 48 sitios de muestreo se clasificaron como fincas o pequeñas parcelas ubicadas en la zona rural de Sincelejo (figura 2). Todos pertenecían al estrato social 1 y las viviendas estaban construidas en concreto (n=28), bahareque (n=10) y madera (n=1), así como con materiales mixtos (n=9). Todas las viviendas contaban con el servicio de electricidad y solo 10 tenían servicio de acueducto, por lo que la mayoría se abastecía con agua proveniente de los jagüeyes.

### **Amplificación del control interno positivo**

Para evaluar la integridad del ADN extraído, se hizo una prueba de amplificación de control interno positivo usando como molde el ADN extraído a partir de las 96 muestras de agua que fueron filtradas, con el fin de amplificar material genético de bacterias, específicamente un fragmento del gen *ARNr 16S*. Se consideraron positivas aquellas muestras a partir de las cuales se habría amplificado un fragmento de 1.500 pb de dicho gen.

De las 96 muestras analizadas, 90 amplificaron el fragmento deseado para la prueba de control interno de amplificación. En las seis restantes, fue necesario diluir 1/100 su ADN para lograr tal amplificación. Todas las muestras amplificaron para el control interno positivo (100 %) y se evaluaron molecularmente para determinar si estaban o no contaminadas con ADN de *T. gondii*.





Fuente: elaborada en ArcGIS

**Figura 2.** Ubicación de los lugares de muestreo

### **Detección molecular de contaminación por *T. gondii***

**Amplificación del gen B1.** Para la prueba de PCR anidada se utilizó como molde el ADN extraído de las 96 muestras de agua recolectadas en la zona rural del municipio de Sincelejo, con el fin de amplificar un fragmento del gen *B1* de *T. gondii*. Las muestras se consideraron positivas cuando, a partir de su ADN total, se habría amplificado un fragmento de 96 pb en la etapa anidada de la PCR. Fue posible detectar ADN de *T. gondii* en 13 de 96 (13.5%) muestras analizadas mediante PCR anidada, luego de visualizar en gel de agarosa los productos de amplificación.

### **Detección de *Toxoplasma gondii* por tipo de muestra**

De las 13 muestras de agua que resultaron positivas para contaminación por *T. gondii* (13,5 %), nueve correspondían a muestras de agua cruda de jagüeyes (18,8 %) y cuatro a muestras de agua tratadas artesanalmente (8,3 %). En los análisis estadísticos (test de Fisher), se encontró que la contaminación con *T. gondii* no dependió del tipo de agua analizada ( $p=0,2328$ ) (cuadro 1).

### **Detección de *Toxoplasma gondii* por lugares de estudio**

En cuanto a los lugares de recolección de las muestras, se encontró que la zona con mayor número de muestras contaminadas por *T. gondii* fue la 3, conformada por los corregimientos de Buenavista y San Martín, con seis muestras positivas (25 %), seguida por la zona 2 (Las Majaguas y Cruz del Beque), con cinco muestras positivas (20,8 %), en tanto que las zonas 1 (Laguna Flor y La arena) y 4 (Castañeda y Las Palmas) registraron una muestra positiva (4,2 %) cada una. El análisis estadístico no mostró asociación entre la contaminación por *T. gondii* y las zonas de muestreo ( $p=0,0606$ ).

Con respecto a los corregimientos, no se encontró una diferencia estadística en el número de muestras positivas para *T. gondii* por corregimiento ( $p=0,2944$ ). Los corregimientos con mayor número de muestras



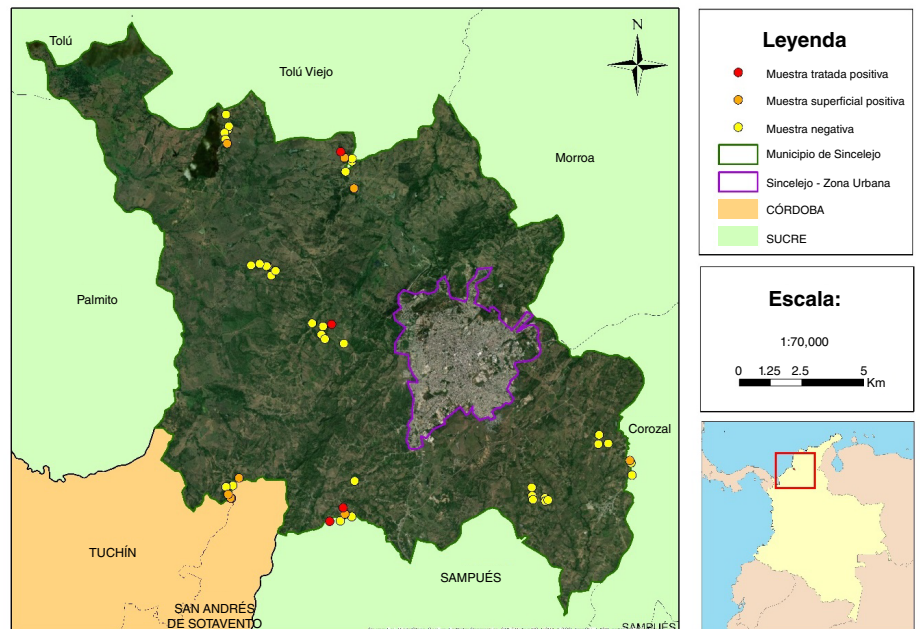
positivas fueron Buenavista, Las Majaguas y San Martín, cada uno con tres, seguidos por Cruz del Beque con dos, y por La Arena y Las Palmas, cada uno con una muestra positiva (cuadro 1 y figura 3).

**Asociación de la positividad con los determinantes sociales de la salud**

Dichos factores en los 48 lugares de muestreo se evaluaron mediante una encuesta que recopiló la información relacionada con las características físicas de la vivienda, la presencia de gatos, la disponibilidad del agua y sus usos. Dicha información sirvió para evaluar la asociación entre la contaminación del agua por *T. gondii* y los mencionados determinantes sociales de la salud, mediante un test de Fisher realizado en el programa estadístico R™, versión 3.3.2.

**Cuadro 1.** Detección de *Toxoplasma gondii* por tipo de muestra y lugares de recolección

Variable	Muestras evaluadas	Muestras positivas	%	IC <sub>95%</sub>	χ <sup>2</sup> (p)
Tipo de muestra					
Superficial	48	9	18,75	9,4 - 33,10	1,4235 (0,2328)
Tratada artesanalmente	48	4	8,33	2,70 - 20,87	
Zona de recolección					
1	24	1	4,17	0,22 - 23,12	7,3846 (0,0606)
2	24	5	20,83	7,94 - 42,71	
3	24	6	25,00	10,60 - 47,05	
4	24	1	4,17	0,22 - 23,12	
Corregimiento					
Laguna Flor	12	0	0,00	0 - 30,13	8,4523 (0,2944)
La Arena	12	1	8,33	0,44 - 40,25	
Cruz del Beque	12	2	16,67	2,94 - 49,12	
Las Majaguas	12	3	25,00	6,69 - 57,16	
Buenavista	12	3	25,00	6,69 - 57,16	
San Martín	12	3	25,00	6,69 - 57,16	
Castañeda	12	0	0,00	0 - 30,13	
Las Palmas	12	1	8,33	0,44 - 40,25	



Fuente: elaborada en ArcGIS

**Figura 3.** Distribución espacial de muestras de agua contaminadas con *Toxoplasma gondii*

**Cuadro 2.** Muestras contaminadas con *Toxoplasma gondii* según las características físicas de la vivienda

Variable	Fincas encuestadas	Muestras positivas		IC <sub>95%</sub>	$\chi^2$ (p)
		(n)	(%)		
Material de la vivienda					
Bahareque	10	4	40	13,69 - 72,63	
Concreto	28	7	25	11,43 - 45,22	
Madera	1	0	0	0,00 - 94,54	
Mixto	9	2	22	3,95 - 59,81	1,3855 (0,7089)
Material del piso de la vivienda					
Arena	12	6	50	25,38 - 74,62	
Cemento	25	5	20	7,61 - 41,30	
Cerámica	5	2	40	7,26 - 82,96	
Mixto	6	0	0	0,00 - 48,32	6,4774 (0,09056)

En cuanto a las características físicas de las viviendas, se encontró que la mayoría era de concreto (58,3 %), seguida de las de bahareque (20,8 %), y las de construcción mixta (18,8 %), es decir, con al menos dos de los materiales de construcción mencionados. El piso del 52,1 % de las viviendas era de plantilla de cemento, el 25 % tenía piso de arena, el 10,4 %, piso de cerámica y, el 12,5 %, piso de materiales mixtos (cuadro 2).

Al analizar el número de muestras positivas según estas dos variables, se encontró que las casas de concreto y aquellas con piso de arena registraron el mayor número de muestras positivas para contaminación con *T. gondii*, cada una con siete y seis muestras positivas, respectivamente. Sin embargo, el análisis estadístico indicó que la contaminación por *T. gondii* en el agua de consumo humano proveniente de jagüeyes no dependió del material de construcción de la vivienda ni del tipo de piso que tuvieran ( $p > 0,05$ ).

En cuanto a la presencia de gatos, se encontró que en 27 de las 48 fincas o parcelas visitadas había gatos como mascotas (56,25 %), pero en ellas solo se encontraron seis muestras positivas correspondientes a cuatro de agua superficial y a dos de agua tratada artesanalmente. La mayoría de las fincas en las que había gatos como mascota tenía máximo dos gatos (16 fincas uno, y ocho, dos) y solo en tres fincas se encontraron entre cuatro y nueve gatos. En las fincas donde solo había un gato se encontró el 50 % (tres de seis) de las muestras positivas para contaminación con *T. gondii*. Otro dato importante es que la finca con nueve gatos fue la única con las dos muestras positivas para contaminación por *T. gondii*.

En cuanto a la edad de los gatos, en la mayoría (12 de 27) de las fincas estos eran adolescentes, con edades entre los siete meses y los dos años de edad, y en ellas se reportaron la mayoría de las muestras de agua positivas para contaminación por *T. gondii* (5 de 6). De las 48 fincas encuestadas, solo en 12 había contacto de la familia con los gatos, en 26 se recogían las heces de las mascotas y en 16 merodeaban los gatos callejeros. El número de muestras positivas para cada una de estas variables de estudio difirió; sin embargo, al evaluar la dependencia de la contaminación del agua por *T. gondii* con cada una de las variables relacionadas con la presencia de gatos, no se encontró una asociación estadística ( $p > 0,05$ ). Dicho de otra manera, la contaminación por *T. gondii* en agua de jagüeyes y agua tratada artesanalmente en la zona de estudio no dependió de la presencia de gatos en las viviendas ni de los hábitos de higiene practicados en estos animales (cuadro 3).

**Cuadro 3.** Muestras contaminadas con *Toxoplasma gondii* según la presencia de gatos

Variable	Fincas encuestadas	Muestras positivas		IC <sub>95%</sub>	χ <sup>2</sup> (p)
		(n)	(%)		
Presencia de gatos					
Sí	27	6	22,22	9,38 - 42,73	
No	21	7	33,33	15,48 - 56,89	0,28299 (0,5947)
Número de gatos					
1	16	3	18,75	4,97 - 46,31	
2	8	1	12,50	0,66 - 53,32	
4	1	0	0	0,00 - 94,54	
8	1	2	100	5,46 - 100	
9	1	0	0	0 - 94,54	5,0472 (0,2825)
Edad de los gatos					
Bebés	9	1	11,11	0,58 - 49,33	
Adolescentes	12	5	41,67	16,50 - 71,40	
Jóvenes maduros	5	0	0	0,00 - 53,71	
Adultos	1	0	0	0,00 - 94,54	4,9821 (0,1731)
Contacto con gatos					
Sí	12	3	25	6,69 - 57,16	
No	36	10	27,78	14,79 - 45,43	4,5771e-31 (1)
Presencia de gatos callejeros					
Sí	16	4	25	8,33 - 52,59	
No	32	9	28,13	14,40 - 46,98	4,2147e-31 (1)
Recoge las heces					
Sí	26	8	30,77	15,09 - 51,90	
No	22	5	22,73		0,089265 (0,7651)

Con respecto a las variables relacionadas con el agua, se encontró que el 33,3 % de las fincas visitadas utilizaban el jagüey y otra fuente externa para abastecerse de agua (16 de 48 tenían suministro mixto). Se encontró, también, que solo 10 (20,8 %) viviendas estaban conectadas al suministro de agua potable de acueducto, en tanto que otras diez (20,8 %) se abastecían con agua transportada en carrotanques. En cuanto a la periodicidad del suministro de agua, la mayoría de las viviendas contaba con agua la mayor parte de los días del año, no porque estuvieran conectadas al acueducto, sino porque utilizaban diferentes fuentes para autoabastecerse. En el caso de las viviendas con servicio de acueducto, la mayoría tenía suministro de agua cada ocho días (cinco viviendas), otras todos los días (tres viviendas) y otras cada dos días (dos viviendas). En cuanto al lugar de almacenamiento del agua, el 58,3 % (28 de 48) de las viviendas encuestadas la almacenaba en tanques plásticos o de cemento, el 16,6 % tenía almacenamiento mixto, el 14,6 % en alberca de cemento, 8,3 % en alberca subterránea y 2 % en tinajas. Los tests de Fisher para comparar la contaminación del agua con *T. gondii* con las variables relacionadas con el agua, no evidenciaron dependencia entre dichas variables ( $p > 0,05$ ) (cuadro 4).

En cuanto a los usos del agua, se encontró que la mayoría de las viviendas (31 de 48: 64,6 %) consumía agua cruda, lo que evidencia el riesgo al que podría estar expuesta la población. El resto de viviendas consumía agua tratada artesanalmente (hervida, filtrada, en bolsa). Sin embargo, el análisis estadístico no evidenció dependencia entre la contaminación del agua por *T. gondii* y el tipo de agua consumido en la zona de estudio ( $p = 0,2722$ ), lo que indica que el consumo de agua tratada no sería un hábito que evite contraer la toxoplasmosis.

**Cuadro 4.** Muestras contaminadas con *Toxoplasma gondii* según el tipo de agua

Variable	Fincas encuestadas	Muestras positivas		IC <sub>95%</sub>	$\chi^2$ (p)
		(n)	(%)		
<b>Suministro de agua</b>					
Acueducto	10	1	10	0,52 - 5,88	
Carrotanque	10	3	30	8,09 - 64,63	
Jagüeyes	4	2	50	15,00 - 85	
Lluvia	5	3	60	17,04 - 92,7	
Mixto	16	3	18,75	4,97 - 46,31	
Pimpinas	2	1	50	9,45 - 90,55	
Pozo subterráneo	1	0	0	0 - 94,54	6,7938 (0,3403)
<b>Periodicidad del suministro de agua</b>					
Todos los días	16	5	31,25	12,13 - 58,5	
De 2 a 8 días	13	4	30,77	10,36 - 61,1	
Cada 15 días	3	0	0	0 - 69	
Cada 2 meses	3	0	0	0 - 69	
Cada 6 meses	1	0	0	0 - 94,54	
Anual	1	1	100	5,46 - 100	
Nunca	11	3	27,27	7,33 - 60,68	5,5226 (0,4787)
<b>Lugar de almacenamiento del agua</b>					
Alberca de cemento	7	3	42,86	11,81 - 79,7	
Alberca subterránea	4	0	0	0 - 60,42	
Tanques	28	7	25	11,43 - 45,2	
Tinas	1	0	0	0 - 94,54	
Mixto	8	3	37,5	10,24 - 74,1	3,2402 (0,5185)

El tipo de agua más utilizada para el lavado de los alimentos, así como para su preparación, era la suministrada por el acueducto (16 de 48 viviendas en cada ítem, es decir, 33,33 % por ítem). Es importante aclarar que, aunque no todas las fincas incluidas en el estudio contaban con este tipo de suministro, se encontraron viviendas con suministro mixto que utilizaban el agua del jagüey para los oficios diarios y, el agua transportada en pimpinas desde Sincelejo (que sí cuenta con acueducto de agua potable), para los alimentos. El uso de agua potable para el lavado y la preparación de alimentos no podría considerarse un hábito protector contra la toxoplasmosis en la zona de estudio, ya que según el test de Fisher, la contaminación con *T. gondii* no dependió del tipo de agua utilizado para lavar y preparar los alimentos ( $p > 0,05$ ).

En cuanto al agua para el riego de cultivos, el 31 (64,6 %) de las fincas aprovechaban exclusivamente las temporadas de lluvia para regar sus cultivos, en tanto que las 14 fincas restantes usaban de manera alternada el agua lluvia y el agua proveniente de los jagüeyes.

En el test Fisher para establecer la asociación entre la contaminación por *T. gondii* y el tipo de agua para el riego de cultivos, no se encontró dependencia alguna ( $p=1$ ), de manera que ninguno de los sistemas de riego podría haber incidido en la contaminación del agua por *T. gondii* en la zona de estudio (cuadro 5).

## Discusión

*Toxoplasma gondii* es el protozoo parásito intracelular obligado causante de una de las principales enfermedades zoonóticas a nivel mundial. Tiene un ciclo de vida que involucra tres formas infectivas: los taquizoítos, los quistes tisulares que contienen bradizoítos, y los ooquistes que contienen esporozoítos. Los ooquistes son extremadamente resistentes, ya que pueden sobrevivir durante meses en el medio ambiente e infectar a los humanos por medio del consumo de agua contaminada o no tratada; por ello, el agua se considera un posible vehículo de diseminación de la toxoplasmosis.

**Cuadro 5.** Muestras contaminadas con *Toxoplasma gondii* según los usos del agua

Variable	Fincas encuestadas	Muestras positivas		IC <sub>95%</sub>	$\chi^2$ (p)
		(n)	(%)		
<b>Tipo de agua para consumo</b>					
Cruda	31	9	29,03	14,8 - 48,2	
En bolsa	8	1	12,5	0,66 - 53,3	
Filtrada	1	1	100	5,46 - 100	
Hervida	5	2	40	7,26 - 82,9	
Mixta	3	0	0	0 - 69	5,1502 (0,2722)
<b>Agua para el lavado de alimentos</b>					
Acueducto	16	5	28,57	9,58 - 58	
Alberca de cemento	1	0	0	0 - 94,54	
Carrotanque	7	1	14,29	0,75 - 57,9	
En bolsa	1	0	0	0 - 94,54	
Jagüeyes	4	2	50	15,00 - 85	
Lluvia	7	3	42,86	11,8 - 79,7	
Pozo subterráneo	1	0	0	0 - 94,54	
Mixta	11	2	18,18	3,21 - 52,2	4,2225 (0,7538)
<b>Agua para la preparación de los alimentos</b>					
Acueducto	16	5	28,57	9,58 - 58	
Alberca de cemento	1	0	0	0 - 94,54	
Carrotanque	7	1	14,29	0,75 - 57,9	
En bolsa	1	0	0	0 - 94,54	
Jagüeyes	3	2	66,67	12,5 - 98,2	
Lluvia	10	4	40	13,7 - 72,6	
Pozo subterráneo	1	0	0	0 - 94,54	
Mixta	9	1	11,11	0,58 - 49,3	6,2232 (0,5139)
<b>Agua para el riego de los cultivos</b>					
Lluvia	34	9	26,47	13,5 - 44,7	
Mixta	14	4	33,33	6 - 75,89	2,3712e-31 (1)

A nivel mundial, se han reportado varios brotes de toxoplasmosis transmitida por el consumo de agua no filtrada y contaminada con ooquistes. El primer brote de toxoplasmosis aguda asociada al consumo de agua ocurrió en 1979, cuando 35 soldados de un batallón estadounidense entrenados en una jungla de Panamá consumieron agua de dos fuentes naturales localizadas en el lugar de entrenamiento (21). El segundo brote de toxoplasmosis aguda asociada al agua de consumo, ocurrió en 1995 en un área de Gran Victoria, Columbia Británica, población que se abastecía de una planta de desinfección que suministraba agua clorada, no filtrada, proveniente del reservorio Humpback (22). Una investigación posterior logró demostrar que el agua de aquel reservorio estaba contaminada con ooquistes de *T. gondii* presentes en las heces de los pumas que habitaban en el área. También, se encontró evidencia serológica de toxoplasmosis en gatos domésticos de Gran Victoria, con lo cual se concluyó que se había ocurrido un ciclo de toxoplasmosis endémica en el área (23).

Asimismo, en Santa Isabel do Ivai, en el estado de Paraná, Brasil, se documentó un brote de toxoplasmosis asociado al consumo de agua contaminada. El brote ocurrió entre noviembre de 2001 y enero de 2002; se reportaron 294 casos de toxoplasmosis aguda y se logró determinar que las personas habían consumido agua o helados preparados con agua de un reservorio presumiblemente contaminado con ooquistes de *T. gondii*, pues se encontró una gata que había vivido en la parte posterior del reservorio y en ese mismo lugar había tenido su cría hasta el momento del destete. Sin embargo, no se logró determinar serológicamente la toxoplasmosis en los felinos debido a que no pudieron ser capturados (24).

Entre el 2004 y el 2005, se reportó en India un brote de toxoplasmosis ocular adquirida en 248 pacientes. De ellos, 209 vivían en la ciudad de Coimbatore, razón por la cual se dedujo que todos habían utilizado el agua de la ciudad, cuyo aprovisionamiento provenía de pequeños ríos y corrientes que descendían de las colinas en el norte y el este de la ciudad. Se presumió que el agua usada por los pacientes era la fuente más probable de la infección con toxoplasmosis, aunque no se pudo determinar con precisión debido a que no se presentaron casos clínicos similares en el segundo semestre de 2005 (25).

En el 2009, en Colombia, se reportó un brote de toxoplasmosis aguda asociada al consumo de agua en 18 soldados que prestaban su servicio militar en el municipio de La Macarena, departamento del Meta. Se estableció, como posible factor de riesgo epidemiológico, el consumo de agua en malas condiciones y presencia de sedimentos provenientes de un cuerpo de agua léntico ubicado en el área selvática en la cual prestaban su servicio (12).

En el presente estudio, se detectó ADN de *T. gondii* mediante una PCR anidada en el 13,5 % de las muestras de agua de consumo humano provenientes de la zona rural del municipio de Sincelejo, así: agua cruda proveniente de jagüeyes (18,8 %) y agua tratada artesanalmente para el consumo directo (8,3 %). Aunque el porcentaje de muestras positivas por PCR fue bajo, y esta prueba no demuestra capacidad infectiva, los resultados positivos podrían ser un indicador del nivel de exposición del agua para consumo humano a protozoos patógenos como *T. gondii*. Asimismo, los resultados negativos para *T. gondii* no deben entenderse como indicadores de una baja exposición al riesgo de contraer toxoplasmosis por medio del agua, ya que es posible que estén más relacionados con la presencia de inhibidores de la PCR en muestras ambientales en las que se dificulta la extracción de ADN pues, como lo han señalado otros autores, la pared de los ooquistes de los protozoos es un blanco difícil para los métodos de extracción de ácidos nucleicos (15).

En la zona del estudio no había acceso directo a agua potable por no tener acueducto. Solo un corregimiento de los ocho visitados contaba con este servicio, por lo que la mayoría de los hogares se abastecían en fuentes alternas, como los jagüeyes, la lluvia, los pozos subterráneos e, incluso, agua no potable transportada en carrotanques. Estos determinantes sociales de la salud, sumados a la contaminación con *T. gondii* del agua, demuestran el potencial riesgo de contraer toxoplasmosis al que está sometida la población rural de Sincelejo.

En cuanto al tipo de agua analizada, las muestras de agua cruda de jagüey presentaron una turbidez ligeramente mayor a la de las muestras de agua tratada artesanalmente. Ambos tipos de muestras se sometieron al mismo proceso de concentración, pero las muestras de agua cruda de jagüey tuvieron que filtrarse separadamente en dos volúmenes, cada uno de 2,5 litros, lo que sugiere que las membranas de celulosa con un tamaño de poro de 5 µm dificultan el proceso de filtración de grandes volúmenes de agua, especialmente si la muestra trae gran cantidad de material en partículas, pero son útiles para retener partículas que superen el tamaño del poro, tal como los quistes de *T. gondii*, los cuales miden aproximadamente 12 µm.

Debido a la porosidad de los filtros usados en este estudio, es muy probable que se hayan obtenido también quistes de otros parásitos transmitidos por el agua, tales como *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. e, incluso, bacterias (en forma de agregados), que no fueron evaluadas en

este estudio, pero que pudieron haber obstruido la membrana microporosa, impidiendo el paso del volumen total de la muestra.

En cuanto a la contaminación con *T. gondii* por tipo de muestra, se encontró que nueve de 48 (18,8 %) muestras superficiales resultaron contaminadas con *T. gondii*, en tanto que solo en cuatro de las 48 (8,3 %) muestras de agua para consumo directo se encontró el parásito. A pesar de que el análisis no evidenció diferencias estadísticas, estos resultados permiten inferir que había más probabilidad de detectar el parásito causante de la toxoplasmosis en el agua superficial que en la almacenada en tanques herméticamente tapados o con algún tipo de seguridad.

Estos resultados son similares a los encontrados en un estudio llevado a cabo en la provincia de Lublin, Polonia, en el que se encontraron 31 (27,2 %) muestras de agua positivas para *T. gondii* de un total de 114 evaluadas por PCR. De estas 31 muestras positivas, 30 correspondían a agua de pozos poco profundos, y solo una a agua de un pozo profundo. Los autores señalan que las muestras de agua de los pozos poco profundos se tomaron al nivel más superficial y que dichos pozos, además, no se encontraban cubiertos por capas impermeables (18).

Nuestros resultados también se asemejan a los reportados en el noreste de Polonia, en donde se encontró que siete de 36 (19,4 %) muestras de agua de fuentes superficiales resultaron positivas para *T. gondii* por PCR. Esas siete muestras provenían de cuatro lagos, dos ríos y un estanque (26). En otro estudio en Serbia, tres de 20 muestras de agua de río resultaron positivas para *T. gondii* por PCR. Los lugares de muestreo que resultaron positivos estaban situados, uno en el Danubio y dos en el Drina (27).

Por ser cuerpos de agua superficial, los jagüeyes están permanentemente expuestos a recibir material contaminante. Por acción de la escorrentía pueden llegar hasta ellos ooquistes de *T. gondii* excretados por felinos infectados, lo que aumenta el riesgo de transmitir el parásito a quienes consumen dicha agua sin ningún tratamiento de desinfección. En los hogares incluidos en este estudio, el agua tratada artesanalmente y destinada al consumo directo se almacenaba en tanques tapados, lo que reduce el riesgo de contaminación y podría explicar la menor frecuencia de detección de *T. gondii* en este tipo de agua.

En un estudio en São Paulo, Brasil, se encontró que tres de 39 (7,7 %) muestras de agua superficial de ríos resultaron positivas para *T. gondii*. Todas se habían recolectado durante la época de lluvia, lo que según los investigadores indicaría una mayor presencia de contaminantes en los cuerpos de agua por acción de la escorrentía (28).

En cuanto a la frecuencia de detección de *T. gondii* por sectores de la zona de estudio, se encontró que aquellos con mayor número de muestras contaminadas fueron las zonas 3 y 2, conformadas por los corregimientos de Buenavista y San Martín, y Las Majaguas y Cruz del Beque, respectivamente. Aunque no hubo diferencia estadística entre el número de muestras positivas en estas zonas y el de las zonas 1 y 4, los resultados podrían asociarse con diferentes determinantes sociales de la salud, entre ellos la presencia de acueducto. El corregimiento de Castañeda, perteneciente a la zona 4, es el único corregimiento que posee acueducto, lo que mejora la calidad de vida de sus habitantes con el suministro de agua potable.

Para efectos del estudio, el servicio de acueducto en Castañeda implicaría una menor probabilidad de encontrar ADN de *T. gondii*, pues el tratamiento del agua habría eliminado restos biológicos del parásito. También debe señalarse que en las zonas 2 y 3 se encontró un mayor número de muestras de agua superficial positivas para *T. gondii* (7 de 9) que en las zonas 1 y 4 (2 de 9), lo que podría relacionarse con la presencia de felinos silvestres, lo cual no se evaluó en nuestro estudio.

En esta zona se ubican, entre otros, los corregimientos de San Martín y Buenavista, en los cuales se encuentran asentamientos indígenas cuya cultura está ligada a la preservación del medio ambiente (29). Además, según el Plan de Conservación de Felinos del Caribe Colombiano, se ha reportado la presencia de dos especies de felinos silvestres, *Leopardus pardalis* y *Leopardus wiedii*, en la subregión de Montes de María, y su distribución espacial se asocia con el estado de conservación del paisaje natural, de manera que los felinos son más abundantes en hábitats con menos intervención antrópica (30).

Por último, es posible que los felinos silvestres que circulan en la zona 3 hayan sido infectados por "carnivorismo" (sic) (forma de alimentación que permite obtener nutrientes a partir del consumo de carne o de animales presas), y sus heces podrían ser la fuente de contaminación con *T. gondii* de los cuerpos de agua superficial en esta zona. Sin embargo, en este estudio no se evaluó la seroprevalencia en felinos ni se detectaron parásitos en sus heces. En el estudio en Serbia se encontraron tres puntos de muestreo del río positivos para *T. gondii*, lo que según los investigadores podría relacionarse con la presencia de felinos. En el caso del Danubio, que pasa por una zona urbana, los gatos callejeros, asilvestrados o domésticos que ocasionalmente dejan sus hogares, serían la más probable fuente de ooquistes. En el caso del río Drina, este pasa por una zona rural próxima a los bosques serbios que alberga las especies de felinos silvestres lince (*Lynx Lynx*) y gato montés (*Felis silvestris*), los cuales podrían ser responsables de los ooquistes encontrados en el río (27).

En el presente estudio, se evaluó la relación entre cuatro determinantes sociales de la salud (características físicas de la vivienda, presencia de gatos, disponibilidad del agua y sus diferentes usos) y la frecuencia de detección de *T. gondii* en el agua. No se encontró ninguna relación estadística entre ellos, lo que quiere decir que en la zona de estudio dichos factores no inciden en la contaminación del agua con *T. gondii*. Es posible que allí estén interviniendo otros factores intermedios que no fueron evaluados en este estudio, como la cubierta de los tanques de almacenamiento del agua, la frecuencia con que se limpian y desinfectan, la disposición de las basuras, la frecuencia de la limpieza del patio de las fincas, la infestación por ratones y la presencia de otros animales domésticos, los cuales podrían ayudar a mantener activa la circulación de la toxoplasmosis en la zona.

Un dato importante encontrado en esta parte del estudio es que los determinantes sociales estudiados demuestran que la zona de estudio presenta muchas necesidades básicas insatisfechas, entre ellas la de un suministro de agua potable. Ante esta situación, la mayoría de las viviendas se abastecen de agua de forma mixta, es decir, de los jagüeyes y de fuentes alternas como agua lluvia, agua transportada en carro tanques e incluso de pimpinas de agua transportada desde la zona urbana de Sincelejo. Estas prácticas sumadas a los hábitos de consumir el agua cruda, usar el agua del jagüey para el lavado



de frutos de pancoger y usar el agua del jagüey para el lavado de los utensilios de cocina, podrían aumentar el riesgo de contraer toxoplasmosis, lo que comprometería la salud de neonatos de madres primoinfectadas y de personas inmunodeprimidas habitantes de la zona de estudio.

En cuanto a la presencia de gatos, a pesar de que no se encontró una asociación estadística con la frecuencia de detección de *T. gondii*, el hecho de que en la finca del corregimiento de Cruz del Beque en donde había ocho gatos como mascotas fuera la única con muestras positivas para *T. gondii* en los dos tipos de muestra, evidencia el riesgo de contraer toxoplasmosis de las personas en este hogar. Sin embargo, no es posible afirmar que la contaminación del agua encontrada en este punto de muestreo se deba exclusivamente a la presencia de los gatos, pues no se hicieron estudios serológicos en estos animales.

### Agradecimientos

Al Grupo de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre, por brindar las herramientas para la realización de este proyecto, y a Benito Gustavo Guerrero Hoyos, magíster en Ingeniería Ambiental, por su colaboración en la elaboración de los mapas georreferenciados para el muestreo.

### Referencias

1. Abu-Madi MA, Al-Molawi N, Behnke JM. Seroprevalence and epidemiological correlates of *Toxoplasma gondii* infections among patients referred for hospital-based serological testing in Doha, Qatar. *Parasit Vectors*. 2008;1:1-9. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-39>
2. Carrada TB. Toxoplasmosis: parasitosis reemergente del nuevo milenio. *Rev Mex Patol Clin*. 2005;52:151-62.
3. Sánchez R, Cobos D, Miranda A, Goya Y, Miranda A. Aspectos básicos sobre la patogenia, respuesta inmune y bioseguridad en el trabajo con el *Toxoplasma gondii*. *Correo Científico Médico*. 2012;16:1-16.
4. Simon A, Bigras M, Rousseau AN, Dubey JP, Ogden NH. Spatiotemporal dynamics of *Toxoplasma gondii* infection in Canadian lynx (*Lynx canadensis*) in western Québec, Canada. *J Wildl Dis*. 2013;49:39-48. <https://doi.org/10.7589/2012-02-048>
5. Gómez F. Estudio sobre la toxoplasmosis en Andorra y el Alt Urgell (tesis). Barcelona: Universidad de Barcelona; 2004.
6. Alvarado F. Toxoplasmosis en el Inmunosuprimido. *Rev Salud Pública*. 2002;4:31-4.
7. Lizarazo J, Castro F, De Arco M, Chaves C, Peña Y. Infecciones oportunistas del sistema nervioso central en pacientes con VIH atendidos en el Hospital Universitario Erasmo Meoz, Cúcuta, 1995-2005. *Infectio*. 2006;10:226-31.
8. Ávila G, González G. Algunas manifestaciones neurológicas del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) en pacientes del hospital universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva, 2001 -2004. *Acta Biológica Colombiana*. 2007;23:90-4.
9. Campo DM, Discuviche MA, Blanco PJ, Montero YM, Orozco KE, Assia YM. Detección de *Toxoplasma gondii* por amplificación del gen B1 en carnes de consumo humano. *Infectio*. 2014;18:93-9. <https://doi.org/10.1016/j.infect.2014.05.001>
10. Giraldo M. Toxoplasmosis. *Medicina & Laboratorio*. 2008;14:359-75.
11. Cortés J, Gómez J, Silva P, Arévalo L, Arévalo I, Álvarez M, et al. Guía de atención integral para la prevención, detección temprana y tratamiento de las complicaciones del embarazo, parto y puerperio: sección toxoplasmosis en el embarazo. *Infectio*. 2012;16:230-46. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(12\)70018-8](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(12)70018-8)
12. Pino LE, Salinas JE. Descripción de un brote epidémico de toxoplasmosis aguda en pacientes inmunocompetentes miembros de las fuerzas militares de Colombia durante operaciones de selva. *Infectio*. 2009;13:83-91. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(09\)70729-5](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(09)70729-5)

13. Arcia C. Detección molecular de comunidades microbianas en agua para el consumo humano en el municipio de sincelejo, Sucre- Colombia (tesis). Sincelejo: Universidad de Córdoba; 2016.
14. Sánchez C. Detección y caracterización molecular de los parásitos de interés en salud pública: *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayatanensis*, *Toxoplasma gondii* y *Entamoeba histolytica*, en agua cruda y tratada de cuatro plantas potabilizadoras del departamento de Nariño (Colombia) (tesis). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2017.
15. Triviño J, Lora F, Zuluaga J, Gómez, J. Detection by PCR of pathogenic protozoa in raw and drinkable water samples in Colombia. Parasitol Res. 2016;115:1789-97. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4917-5>
16. Luna JC, Zamora A, Hernández-Arango N, Muñoz-Sánchez D, Pinzón MI, Cortés-Vecino JA, et al. Food safety assessment and risk for toxoplasmosis in school restaurants in Armenia, Colombia. Parasitol Res. 2019;118:3449-57. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06473-w>
17. Ballut-Dajud G, Monroy-Pineda MC. Los jagüeyes del municipio de Sincelejo, Sucre, Colombia. Rev Colomb Cienc Anim. 2015;7:80-3. <https://doi.org/10.24188/recia.v7.n1.2015.426>
18. Sroka J, Wójcik-Fatla A, Dutkiewicz J. Occurrence of *Toxoplasma gondii* in water from wells located on farms. Ann Agric Environ Med. 2006;13:169-75.
19. Isaac-Renton J, Bowie WR, King A, Irwin GS, Ong CS, Fung CP, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. Appl Environ Microbiol. 1998;64:2278-80. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.6.2278-2280.1998>
20. Blanco PJ, Assia YM, Montero YM, Orozco KE. ELFA IgG anti-*Toxoplasma* y PCR anidada para el diagnóstico de toxoplasmosis en mujeres gestantes de Sincelejo, Colombia. Infectio. 2011;15:253-8. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(11\)70739-1](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70739-1)
21. Benenson MW, Takafuji ET, Lemon SM, Greenup RL, Sulzer AJ. Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. N Engl J Med. 1982;307:666-9. <https://doi.org/10.1056/NEJM198209093071107>
22. Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaac-Renton JL, Bell A, Eng SB, et al. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. Lancet. 1997;350:173-7. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)11105-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)11105-3)
23. Aramini JJ, Stephen C, Dubey JP, Engelstoff C, Schwantje H, Ribble CS. Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. Epidemiol Infect. 1999;122:305-15. <https://doi.org/10.1017/s0950268899002113>
24. De Moura L, García LM, Wada MY, Jones JL, Tuboi SH, Carmo EH, et al. Waterborne, toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. Emerg Infect Dis. 2006;12:326-9. <https://doi.org/10.3201/eid1202.041115>
25. Balasundaram MB, Andavar R, Palaniswamy M, Venkatapathy N. Outbreak of acquired ocular toxoplasmosis involving 248 patients. Arch. Ophthalmol. 2010;128:28-32. <https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2009.354>
26. Adamska M. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in natural surface water bodies in Poland. J Water Health. 2018;16:657-60. <https://doi.org/10.2166/wh.2018.236>
27. Ćirković V, Uzelac A, Miličić D, Klun I, Djurković-Djaković O. First detection of *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) (Eucoccidiorida: Sarcocystidae) in river waters in Serbia. Acta Zool Bulg. 2020;7:79-83. [http://www.acta-zoologica-bulgarica.eu/Suppl\\_15\\_15](http://www.acta-zoologica-bulgarica.eu/Suppl_15_15)
28. Galvani AT, Guarnieri AP, Padula JA, Funada MR, Silva R, Zanolli MI, et al. Real-time PCR detection of *Toxoplasma gondii* in surface water samples in São Paulo, Brazil. Parasitol Res. 2019;118:631-40. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6185-z>
29. Ministerio del Interior de Colombia. Convenio Interadministrativo N° M-923 de 2013 celebrado entre la nación, ministerio del interior y el Cabildo Mayor Regional del Pueblo Zinú: diagnóstico comunitario y líneas de acción para el plan de salvaguarda étnica del pueblo Zinú, capítulo Córdoba-Sucre y dispersos. Fecha de consulta: 25 de marzo de 2020. Disponible en: [https://siic.mininterior.gov.co/sites/default/files/pueblo\\_zenu\\_-\\_diagnostico\\_comunitario\\_tomo\\_1.pdf](https://siic.mininterior.gov.co/sites/default/files/pueblo_zenu_-_diagnostico_comunitario_tomo_1.pdf)
30. Castaño C, González J, Ange C, Zárrate D, Vela M. Ecología y conservación de felinos y presas en el Caribe Colombiano. En: Castaño C, González J, Zárrate D, Ange C, Vela I, editores. Plan de Conservación de Felinos del Caribe colombiano: Los felinos y su papel en la planificación regional integral basada en especies clave. Santa Marta: Fundación Herencia ambiental Caribe, ProCAT Colombia, The Sierra to Sea Institute.; 2013. p. 1-233.

Original article

## Characterization of an outbreak of malaria in a non-endemic zone on the coastal region of Ecuador

Diego Omar Morales<sup>1</sup>, Paul Andrés Quinatoa<sup>1</sup>, Jaen Carlos Cagua<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Referencia Nacional de Vectores, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, Quito, Ecuador

<sup>2</sup> Dirección Nacional de Prevención y Control, Ministerio de Salud Pública, Quito, Ecuador

**Introduction:** Malaria is a vector-borne disease widely distributed in the Amazon region and the coastal area of northern Ecuador. Its epidemiology involves related factors such as human settlements, vector reproduction sites, mobility, productive activity, and the response capacity of health systems, among others.

**Objective:** To describe malaria transmission by *Plasmodium vivax* in a non-endemic area of Ecuador by analyzing the epidemiological and entomological factors involved.

**Materials and methods:** We conducted the epidemiological study of the cases reported in the Salinas canton and the characterization of vector breeding sites through captures of larvae and adult mosquitoes by human capture of resting mosquitoes.

**Results:** We detected 21 cases of malaria with local transmission related to the presence of initial cases in Venezuelan migrant patients and identified *Anopheles albimanus* as the predominant vector in natural breeding sites such as estuaries, wells, and water channels.

**Conclusions:** We detected an outbreak of malaria triggered by imported cases from Venezuela. Climatic, social, environmental, and ecological conditions have favored the development of the vector maintaining the transmission cycle. Strategies to control imported malaria should be multiple including early case detection and control of productive breeding sites to avoid local transmission.

**Keywords:** Malaria/epidemiology; *Plasmodium vivax*; disease outbreak; transients and migrants.

### Caracterización de un brote de malaria en una zona no endémica de la región costera del Ecuador

**Introducción.** La malaria o paludismo es una enfermedad transmitida por vectores, ampliamente distribuida en la región amazónica y en la zona costera del norte del Ecuador. Su epidemiología involucra factores relacionados, como asentamientos humanos, sitios de reproducción del vector, movilidad, actividad productiva y capacidad de respuesta de los sistemas de salud, entre otros.

**Objetivo.** Describir la transmisión de malaria por *Plasmodium vivax* en un área no endémica de Ecuador, mediante el análisis de los factores epidemiológicos y entomológicos involucrados.

**Materiales y métodos.** Se hizo el estudio epidemiológico de los casos reportados en el cantón de Salinas y la caracterización de criaderos del vector con capturas de larvas y adultos mediante la captura de mosquitos en reposo.

**Resultados.** Se detectaron 21 casos de malaria con transmisión local relacionados con la presencia de casos iniciales importados de Venezuela. Se identificó *Anopheles albimanus* como el vector predominante en criaderos naturales como estuarios, pozos y canales de agua.

**Conclusiones.** Se detectó un brote de malaria desencadenado por casos importados de Venezuela. Las condiciones climáticas, sociales, ambientales y ecológicas han favorecido el desarrollo del vector, manteniendo el ciclo de transmisión. Las estrategias para controlar la malaria importada deben ser multifacéticas, e incluir la detección temprana de casos y el control de criaderos productivos para evitar la transmisión local.

**Palabras clave:** malaria/epidemiología; *Plasmodium vivax*; brotes de enfermedades; migrantes; reporte.

Malaria is a vector-borne disease widely distributed in tropical and subtropical areas, which is endemic in 97 countries. It is caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium* transmitted by *Anopheles* mosquitoes. Among the 465 species in the genus, only 70 have been reported as vectors of *Plasmodium malariae*, *P. ovale*, *P. falciparum*, *P. vivax*, and *P. knowlesi* to humans (1,2). According to the World Health Organization (WHO), about 228 million cases of malaria were reported worldwide in 2018 with 405,000 deaths mainly in Africa and in the South-East Asia Region (3).

**Received:** 28/09/2020

**Accepted:** 10/04/2021

**Published:** 12/04/2021

#### Citation:

Morales DO, Quinatoa PA, Cagua JC. Characterization of an outbreak of malaria in a non-endemic zone on the coastal region of Ecuador. Biomédica. 2021;41(Supl.1):100-12. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5816>

#### Corresponding author:

Diego Morales; Centro de Referencia Nacional de Vectores, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, Iquique N14-285 y Yaguachi. Quito, Ecuador  
Telephone: (593) (98) 456 8272  
dmorales@inspi.gob.ec

#### Author contributions:

Diego Morales: Original idea, entomological data collection work, and manuscript review  
Paul Quinatoa: Entomological data collection, study design, data analysis, and manuscript writing  
Jaen Carlos Cagua: Analysis of epidemiological data, preparation of graphics, writing and review of the manuscript

#### Funding:

Pan American Health Organization - PAHO, Ministry of Health of Ecuador

#### Conflicts of interest:

The authors declare no conflicts of interest.

In the American continent, the disease continues to be an important public health problem as there are 102 million people at risk of infection and at least 28 million living in high-risk locations (>10 cases/1.000 inhabitants) (4). The Amazon basin area (Brazil, Perú, Ecuador, Venezuela, and Colombia) hosts 44 % of the malaria cases reported in the Americas (5).

Malaria in Ecuador has been one of the leading public health concerns. In 2001, 106.641 cases were reported while in 2014, a 98% (242 cases) reduction had been achieved with the financial support of the Amazon Network for the Surveillance of Antimalarial Drug Resistance (RAVREDA) project *Control de la malaria en las zonas fronterizas de la región andina: un enfoque comunitario* ("Malaria control in border areas of the Andean region: A community approach") (PAMAFRO). Thanks to this remarkable achievement, Ecuador was included in a group of 21 candidate countries in the world to eliminate this disease by 2020 (6). However, since 2014, there has been a continuous increase of cases: 686 in 2015 and 2,081 in 2019 (with no increase of mortality attributable to malaria), which may be explained by the critical strategic changes introduced in epidemiological surveillance and vector control programs (7).

Malaria transmission zones in the country are mainly concentrated in the Amazonian provinces bordering Perú and the northwestern coastal zone bordering Colombia. During 2019, 790 cases were registered in provinces of the Amazon region: Morona Santiago with 521 cases in Pastaza and 372 in Orellana, i.e., 84% of active transmission in the country (7). In these areas, malaria transmission is related to rainfall increases favoring the availability of habitats for larvae, the development of settlements in forest areas, oil or mining extraction activities, and the migration from neighboring communities in Colombia or Perú, with the subsequent risk of introducing parasites in decreased-transmission areas or maintaining transmission in active areas (8).

In the Ecuadorian coastal region, the province of Esmeraldas is the only historical area with cases of *P. falciparum* malaria with 146 cases in 2019 (7). There, the presence of asymptomatic cases not detectable by microscopic examination and the instability of malaria control activities may have resulted in the underestimation of malaria cases (9). Santa Elena, located in the southern coastal region of Ecuador, recorded only 13 *P. vivax* malaria cases from 2008 to 2013 and since then, it has been considered free of malaria, although its environmental determinants are ideal for mosquito breeding sites and there are socioeconomic risk conditions that intervene in the transmission dynamics. However, during 2019 and the beginning of 2020, 21 new cases were registered, which alerted the epidemiological surveillance and control programs (10,11).

Malaria transmission in a non-endemic area is an unusual event, but it is possible under certain circumstances. These outbreaks are mostly triggered by parasites carried by travelers who return to their country or migrants who come from endemic areas or, less often, by parasites in blood or fluid transfusions unleashing nosocomial infections (12,13).

Malaria epidemiology is very complex because it involves determinants such as the access to health facilities, the type of housing, the proximity of human settlements to vector breeding sites, the abundance of vectors, the socioeconomic status, the mobility, the productive activities, the presence of domestic animals, and the response capacity of health systems. Therefore, it is necessary to understand the link between malaria transmission, climatic variables, and other human-related factors to develop appropriate measures to significantly reduce transmission and achieve elimination in non-endemic areas (14).

In the present study, we described the presence of *P. vivax* infection among the population of a non-endemic area for malaria transmission in the city of Salinas (Santa Elena province). We analyzed transmission drivers such as the current social situation and the possible routes of vector transmission underlining the need to maintain an operative malaria surveillance system to prevent future outbreaks.

## **Materials and methods**

### **Study area**

Salinas (Santa Elena province) is located on Ecuador's coast (02° 13' S, 080° 58' W) at sea level. Its temperature ranges from 26 to 28.5°C at 07:30 to 31 to 36°C at 12:00, and 31.5 to 34°C at 16:00. There is a single rainy season (from January to April) with values below 500 mm per year (15).

Salinas' economy centers on trade, fishing, and oil-related activities and it is one of the most popular tourist destinations in the country, although the majority of its native population is dedicated to fishing. There are clear social differences with predominantly marginal urban sectors with no access to sewage. Instead, there are rainwater channels on the soil where water stagnates when not properly maintained or cleaned turning them into mosquito-breeding sites.

The city has health centers and health care teams, as well as a general hospital and two basic hospitals, one of them with an accredited microscopist for malaria diagnosis. As Salinas is a small city, access to malaria diagnosis from the furthest point of the city does not exceed 60 minutes. However, as there were no malaria case reports for several years, treatment was not available in the city's health centers. Community participation in health activities is carried out in health centers through the local citizen health committees, but malaria had not been on the agenda of their plenary sessions (15).

### **Epidemiological study**

The epidemiological study for reactive case detection was conducted for the first febrile and afebrile cases detected from April, 2019, through to February, 2020. The scope of active case-detection was 3 km around the homes of the initial cases and involved six neighborhoods. Detection teams included health care, promotion, and vector control teams, as well as neighborhood authorities. For passive case detection in health centers, a microscopic examination (thick blood smear) was performed on all patients with fever while rapid diagnostic tests (RDT, SD BIOLINE Malaria Ag) were used for reactive case detection. Positive cases using rapid diagnostic tests were confirmed by a microscopic examination. Both tests fulfilled the requirements of the quality assurance system.

Finally, epidemiologists had exchanges with district authorities and medical personnel to gain a broader understanding of the social determinants of malaria transmission affecting the areas of study and the possible hypothesis of transmission. Case follow-up and control measures were some of the aspects discussed. With this information, a descriptive analysis based on time, place, and population was implemented.

All the activities carried out as part of the outbreak control and strengthening of the surveillance system were based on the World Health Organization's Reference Manual for Malaria Surveillance, Monitoring, and Evaluation (16).

### Entomological study

Entomological samples were collected by the National Vector Reference Center in houses with malaria cases and in the area around them to characterize the breeding sites and determine the abundance of the vector. Immature stages of mosquitoes were collected using plastic pipettes in domestic containers and dippers in natural breeding sites (puddles, wells, channels) (figure 1).

Adult mosquitoes were collected using CDC light traps and a Prokopack motor vacuum aspirator (model 1419). CDC light traps were placed outside four of the homes of confirmed malaria cases from 6:00 p.m. to 7:00 a.m. for three nights, and the Prokopack aspirator was used to capture resting mosquitoes from 18:00 to 21:00 in two houses for two nights. The sampling was done by two persons who took turns every hour to balance possible biases in capture capacity. The samples collected from immature stages were stored in plastic containers. The adult mosquitoes collected with the CDC light traps and the Prokopack aspirator were individually stored in 1.5 ml Eppendorf tubes.

Each sample was identified by date, collection method, and location and then transported to the entomology laboratory of the National Vector Reference Center. For the taxonomic identification of mature mosquito stages, we used the Faran & Linthicum (1981) and González & Carrejo (2009) keys. The samples were identified using a stereoscopic microscope (Carl Zeiss, Germany, model V8 10X / 23 mm).

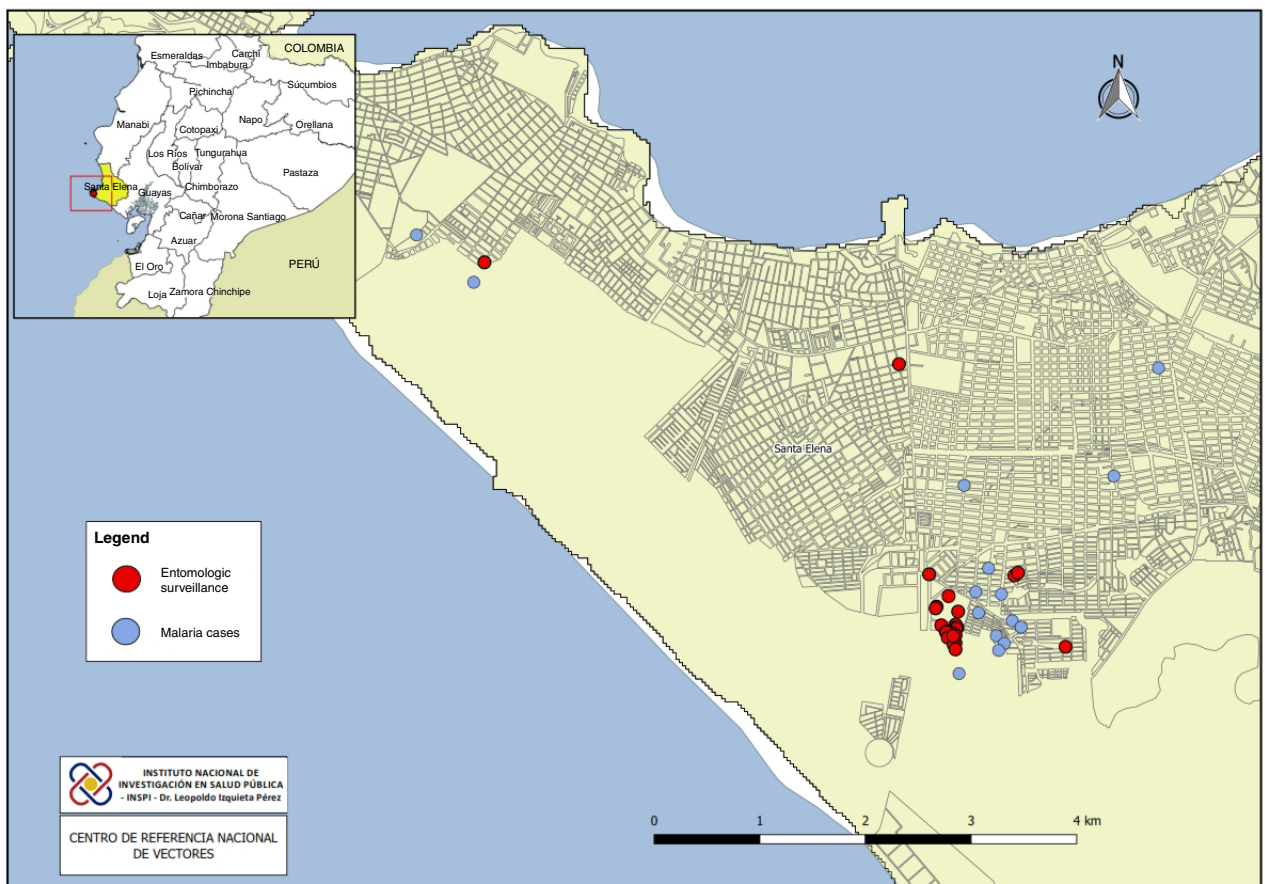


Figure 1. Entomological research locations for malaria, Salinas-Santa Elena province



The epidemiological data and the information on vector control activities came from the early warning system SIVE Alert of the Ministry of Health of Ecuador and the Salinas Health District.

### **Statistical analysis**

We used ANOVA and t Student tests to compare case numbers using the SPSS™, software package, version 21.0. The level of significance was established at 5%.

## **Results**

### **Epidemiological study**

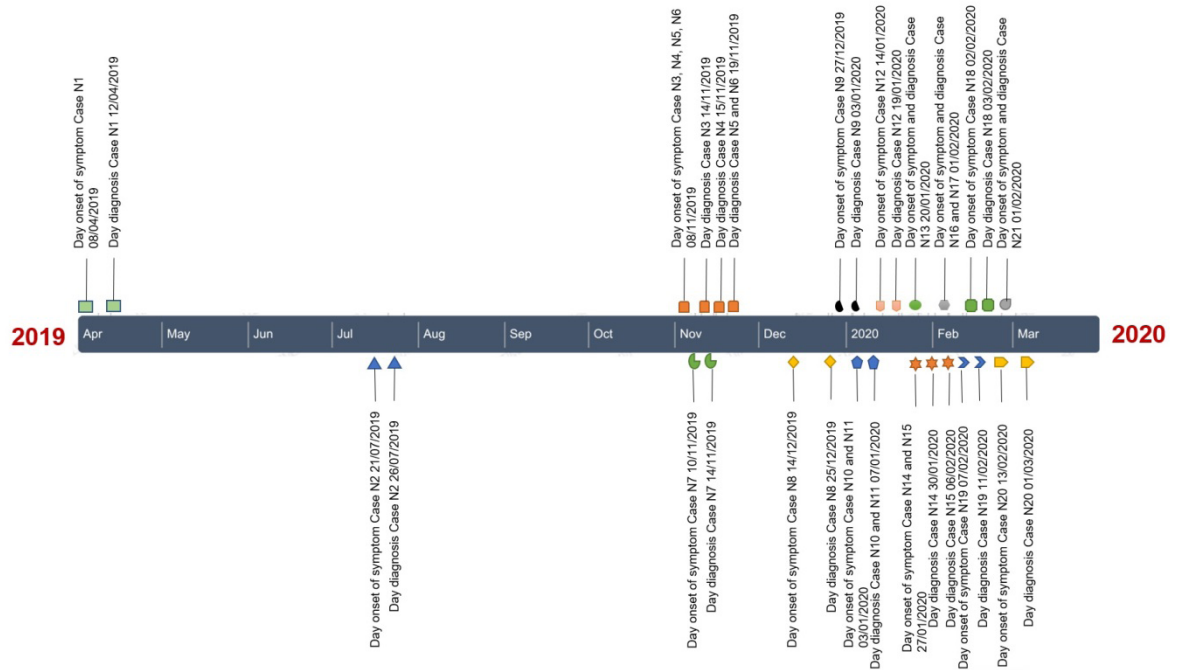
The first malaria case was reported on April 12, 2019, in a Venezuelan citizen whose symptoms first developed on April 8 and was diagnosed with malaria on April 12 at Hospital La Libertad. The patient had had previous episodes of the disease in his native country but did not complete the therapeutic scheme and did not know which it was. The patient had arrived in the city two months before his symptoms began. *P. vivax* malaria was diagnosed, but the hospital did not have the medications, which arrived two days after the diagnosis; however, the treatment could not be given because the patient left the city. The case was classified as imported, probably due to a relapse.

Three months after this initial case, on July 26, 2019, another case was reported again in a Venezuelan citizen whose symptoms started on July 21 and was diagnosed on July 26 by microscopic examination; the parasite was identified as *P. vivax*. That same day, she started treatment with a regimen of chloroquine and primaquine. She said she had no relationship with the initial case, and her address was 10 km away from that first case. The case was classified as imported, although she reported not having been diagnosed with malaria in her country.

After several months of absence of cases, on November 14, 2019, two more cases were reported, this time in Ecuadorians whose homes were a few meters away from the second imported case. *Plasmodium vivax* was identified by microscopy as the parasitic species. These cases were classified as autochthonous and the patients received the same scheme with chloroquine and primaquine.

The notification of these two cases of autochthonous transmission triggered the reactive search within a radius of 3 km involving six neighborhoods. We examined 167 people and detected three cases of *P. vivax* malaria after which, the passive case detection was reinforced in all the city's health establishments and diagnostic tests were carried out on all febrile cases using diagnostic tests, with a total of 189 people examined and one case confirmed by microscopic diagnosis.

A second round of reactive search was scheduled 14 days later, on December 23, 2019, during which we detected a case of malaria among the 15 people examined. In the passive surveillance of cases carried out by the health centers, a case of malaria was reported in a neighborhood far from the initial cases and, thus, the active search for cases in four more neighborhoods was reactivated and nine *P. vivax* malaria cases were detected. In February 2020, another case of malaria was reported in a health center close to the evaluated locations triggering the reactive search for cases. We found two *P. vivax* malaria cases among the 62 people examined. No more cases were detected by passive search and the reactive search was stopped (figure 2).



**Figure 2.** Timeline of malaria transmission in Salinas

All cases were hospitalized to receive treatment with chloroquine (10 mg/kg on day 1, 7.5 mg/kg on day 2, and 7.5 mg/kg on day 3) and primaquine (0.50 mg/kg for 7 days) to ensure therapeutic compliance. After discharge, the closest health center followed up the cases weekly for two months. The majority of the cases in Salinas were men (52.4%) with a statistically significant difference associated with sex ( $p=0.030$ ). The 20 to 49 (47.62%) age group registered the highest number of cases, but there was no significant difference among the age groups ( $p<0.007$ ). The predominant occupations of the patients were studying and unemployment (table 1). The transmission most likely occurred in the households and surroundings, as the population was concentrated. The first cases in this location were registered in migrants from an endemic country (2/21; 9.52% of the total cases), and transmission was re-established in a receptive locality (19/21; 90.48%) that had been an endemic area for malaria transmission in previous years.

### Entomological study

We identified 203 mosquito larvae. *Anopheles albimanus* was predominant (73%;  $n=149$ ) in the breeding sites. Other species such as *Aedes aegypti* and *Culex* spp. were identified sharing breeding sites such as tires and plastic tanks with *An. albimanus*.

We found 12 breeding sites with *An. albimanus* larvae. Vector abundance in estuaries was 30.8% ( $n=46$ ), in wells, 28.8% ( $n=43$ ), in water channels, 20% ( $n=30$ ), in plastic containers, 10% ( $n=15$ ), and in tires, 4.69% ( $n=7$ ), while in the other breeding sites with puddles the abundance was less than 2.68%.

There were many algae and aquatic plants in the breeding sites at estuaries with a continuous flow of residual discharges crossing Salinas canton and emptying into the Pacific Ocean. During the winter season, increased water flows form small puddles that can be potential breeding sites for the vector. Moreover, the water channels contained residual water



from agricultural and domestic activities and they are usually covered with abundant vegetation.

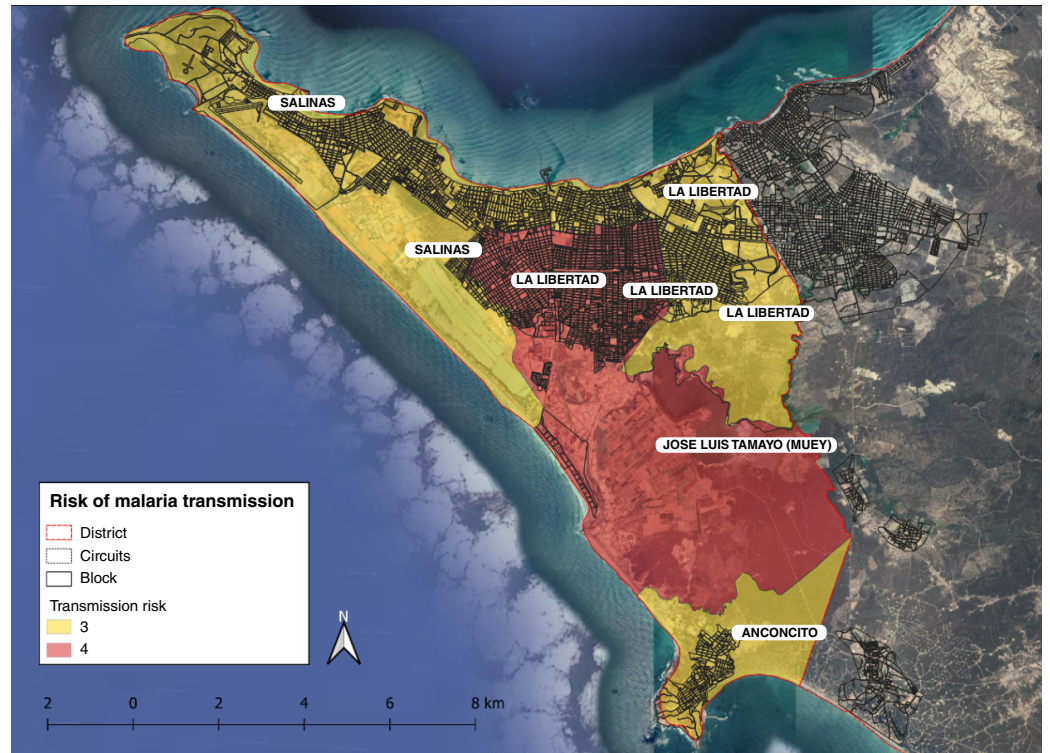
Another main breeding site for mosquitos are wells, usually placed near the houses, used to serve as a source of water before the installation of the potable water service in the locality; now we observe that these wells are abandoned and during winter they collect rainwater and become potential breeding sites for the malaria vectors. We did not analyze the physicochemical properties of the waterbodies, it is assumed that *An. albimanus* was established in the locality given the favorable conditions for its development and their competence in malaria transmission by *P. falciparum* and *P. vivax* along the coastal region.

After the first patient was admitted, *An. albimanus* could have ingested infective gametocytes and started the transmission cycle locally.

We implemented integrated vector management activities for the control of the malaria outbreak in the locality including indoor residual spraying and the delivery of insecticide-treated nets. In a radius of 3 km, a total of 112 homes were sprayed and 132 insecticide-treated nets were delivered, i.e., 84.85% (112/132) coverage for spraying and 64.32% (132/189) for mosquito nets. At the time of the intervention, the lack of insecticide-treated nets prevented a higher coverage. Additionally, with the support of local citizen health committees, we gave talks on education and communication strategies to improve awareness about the disease in the population. Nowadays, there are abundant natural breeding sites for vector development in the locality and vector control measures have not been successful for larval hatcheries, so we focus more on the control of adult mosquitoes. However, there are abundant natural breeding sites for the development of the vector in the locality.

**Table 1.** Sociodemographic and epidemiological characteristics of the cases reported in Salinas, Santa Elena

Variable	Sample (N=21)	
	n	%
Gender		
Man	9	42.86
Woman	12	57.14
Age group (years)		
0 a 4	3	14.29
10 a 14	3	14.29
15 a 19	4	19.05
20 a 49	10	47.62
50 a 64	1	4.76
Nationality		
Ecuadorian	19	90.48
Venezuelan	2	9.52
Place of residence		
La Libertad	20	90.48
Salinas	1	9.52
Occupation		
Housewife	4	19.0
Merchant	1	4.8
Student	7	33.3
Seller	1	4.8
Administrator	1	4.8
Unemployed	7	33.3



**Figure 3.** Stratification of risk level for malaria transmission in Salinas, Santa Elena province

The data collected from the epidemiological study was stratified based on receptivity and vulnerability (risk of parasite importation) to transmission. Receptivity was characterized according to the environmental conditions, altitude, temperature, and permanent residency while the vulnerability was evaluated based on the analysis of case occurrence in the previous 10 years and the mobility from/to endemic localities. At the national level, malaria transmission risk is classified into four strata: Stratum one comprises non-receptive areas; stratum two includes receptive but not vulnerable areas; stratum three, receptive areas with low vulnerability and no presence of indigenous cases, and stratum four, receptive areas, as well as vulnerable places with autochthonous cases. The stratification of Salinas was determined at the third administrative level corresponding to the canton, its risk at levels three and four for malaria transmission (figure 3).

### Discussion

The World Health Organization's guidelines for the elimination of malaria define its reintroduction as the appearance of introduced cases, i.e., the epidemiological connection of cases of local transmission with an imported case in a country or area where the disease had already been eliminated (6). Unfavorable sanitary conditions such as the presence of temporary or permanent breeding sites, migratory population flow from endemic areas or countries, and unprepared health systems are triggering conditions for malaria outbreaks.

According to WHO, the detection of three or more cases of malaria per year for three consecutive years is indicative of the re-establishment of malaria transmission (6). Sustaining elimination of malaria in areas with high receptivity and vulnerability will require effective strategies to prevent the re-establishment of local transmission (17). For this reason, strengthening health

services for early diagnosis and timely treatment were the first immediate activities carried out in this canton. Moreover, rapid diagnostic tests were provided to all health care facilities along with specialized training for health personnel and the strengthening of the microscopy diagnostic network.

Due to this outbreak, the city must keep active and reactive surveillance systems activated and, if there is epidemiological silence, carry out proactive searches with an emphasis on the localities where the outbreak occurred. Surveillance and action systems will allow improving decision-making for disease control and elimination. Local community health committees play an important role, especially in attracting migrants from malaria-endemic countries or areas. In this case, the malaria outbreak records were unusual because there was no follow-up of the initial cases.

The first Venezuelan patients reported on April 12 and July 27, 2019, made the local population vulnerable opening the way to their eventual involvement as silent reservoirs of *Plasmodium* spp. making gametocytes available for malaria vectors, which would lead to a stable and continuous transmission (18,19). According to the timeline presented, it is possible that semi-immune patients, such as migrants from malaria-endemic countries, had asymptomatic parasitemia due to long and continuous exposure to parasites in their countries of origin and this took them to seek medical attention when it was already late (20).

The majority of patients (57.14%) were men but there were no statistical differences between sexes, which may be explained by the occupation profile of patients since the majority were students (33.3%) and unemployed (33.3%). This would also indicate that contagion was autochthonous in those patients that carried out their activities in the locality, did not mobilize outside the province, and were constantly exposed to mosquito breeding sites. Keeping standing water next to homes for 3 to 5 days has been reported to increase the risk of malaria infection, as well as human activities such as digging the soil and building roads, as this creates temporary pools that provide active breeding sites for mosquitoes and facilitates transmission (21,22).

The most representative age group was 20 to 49 years (n=9; 47.62%), however, three cases were recorded in the 0 to 4 years age group (n=3; 14.29%). The presence of infection in infants and children under 5 implies malaria indigenous transmission of malaria (23). The prevalence pattern reflects the state of immunity against malaria as the result of several repeated infections. As no cases had been registered in this town for 6 years, people did not have significant immunity (23).

Malaria transmission is determined mainly by human behavior and the existence of the parasite, as well as social factors, housing conditions, population occupation, treatment-seeking behavior, and health facilities. Importantly, a high proportion of the urban population at any age is at risk of malaria due to the absence of acquired immunity (24).

One of the first cases recorded in Salinas was a Venezuelan patient who entered the canton two months before presenting symptoms of malaria but reported an epidemiological history in his country. A similar situation was reported in 2018 in El Oro province, where five Venezuelan migrants with no acute symptoms were associated with the malaria outbreak in that province (25).

The movement of people, international travel, and migration have been associated with the spread of various arboviruses among local populations

(26,27). Due to the socio-economic and humanitarian conditions in Venezuela, since 2014 migration has increased with an estimated two million people moving to neighboring nations such as Colombia, Ecuador, Chile, Brazil, Argentina, and Perú (28), countries where, in recent years, an increase in malaria cases has been reported. In 2017 and 2018, Colombia registered 2,048 new *P. vivax* malaria cases imported from Venezuela (29).

Malaria in migrant patients has been characterized by mild symptoms with low levels of parasites, less time for *Plasmodium* spp. elimination after treatment, and shorter duration of fever in travelers. Additionally, *P. falciparum* malaria in migrants with symptoms occurred in the first three months after the arrival at endemic countries and the possibility of asymptomatic patients has been contemplated (30,31). In Salinas, the arrival of migrant populations, the suitable climatic factors, and the presence of malaria vectors possibly contributed to the creation of local transmission and the reintroduction of the disease. However, it is not possible to define exactly whether migrants were exposed to malaria in Venezuela or while “in transit”, but they represent a highly vulnerable group (25).

*Anopheles albimanus* has been identified as the main vector involved in malaria transmission in South America, Central America, and the Caribbean (32), especially in places with higher salinity exposed to direct light such as low mangrove areas or near moisture drainage (33). In Ecuador, *An. albimanus* is distributed throughout the coastal region below 500 masl including Santa Elena province (34).

In this study, the main breeding sites were found in estuaries, wells, and water channels with high larval densities of *An. albimanus*. Those in wells were the second with the highest larval density (28%). The entomological research determined that this type of breeding site exposed to climatic conditions had been abandoned. Other reports have described the presence of *An. albimanus* larvae in Esmeraldas, Manabí, Los Ríos, El Oro, and Guayas provinces associated with breeding sites in road ditches, rice paddies, swamps, ponds, river edges, human dwellings, cattle pastures, and plantations (35).

In Colombian towns, wells are a common source of water for domestic use in rural areas and are classified as suitable breeding sites for immature mosquitoes and a refuge for *Anopheles*, *Aedes*, and *Culex* species during the dry season (36). It is important to emphasize that factors as the change in land use and the construction of roads and channels are a direct source of malaria vectors breeding sites and, therefore, the proliferation of infectious diseases (37). The identification of potential breeding sites in outbreak areas is a key factor for risk assessment and the establishment of more effective control measures in immature vector populations (38).

After the interventions, the technical team of the Ministry of Public Health and the National Institute for Public Health Research conducted a situation analysis and concluded that the initial imported cases of malaria in a city with reduced surveillance and low perception of the disease among the local medical personnel, as well as insufficient access to diagnosis in a single health establishment and limited hours, the unavailability of drugs, the lack of knowledge on case-finding and control activities, created the ideal environment for the reestablishment of the disease in an area previously declared as malaria-free.

As part of the activities, the strategic lines of diagnosis, treatment, investigation, and response were strengthened and a stock of medicines was provided both for the parasitic species involved in the outbreak and for *P. falciparum* and five laboratory workers were trained for malaria diagnosis microscopic analysis and provided with rapid diagnostic tests. The epidemiology and vector control team was trained in effective research activities and integrated vector management based on risk stratification. On the other hand, all health facilities in the city were instructed to screen febrile cases for malaria, proactive search activities were planned if no cases are detected in health facilities, as well as routine integrated vector management activities and evaluation of mosquito-net acceptance, with the purpose to align the city to the malaria elimination strategy.

In conclusion, after six years of absence of malaria cases, we present the first report of autochthonous cases of *P. vivax* in the locality of Salinas. This malaria outbreak has important implications for the public, economic, therapeutic, and logistical health-related activity in the city and the province in general. In this sense, a more robust surveillance-response system is essential when moving towards the elimination of malaria. Taking into account the economic burden that the active search of malaria cases represents, we consider that a community-based surveillance system for malaria testing among newcomers in neighborhoods might be a more feasible approach for epidemiological control. Furthermore, the surveillance of infectious diseases along migration routes is crucial to prevent the recurrence of malaria, not only in the province of Santa Elena but also in other localities with the same characteristics.

### Acknowledgment

We thank the Pan American Health Organization (PAHO) for the funds we received for the study and their support for the investigation of malaria outbreaks in Ecuador and the National Network of Entomology Laboratories of Ecuador (REDNALENT) for their support in entomology collections, the Salinas Health District for logistical support and the provision of epidemiological data, and the staff of the National Vector Reference Center for the breeding of specimens in the insectary, map making, and the morphological identification of the samples.

### References

1. Kamareddine L. The biological control of the malaria vector. *Rev Toxins*. 2012;4:748-67. <https://doi.org/10.3390/toxins4090748>
2. Manguin S. *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors. France: IntechOpen; 2013. <https://doi.org/10.5772/3392>
3. World Health Organization. World Malaria Report 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. p. 1-232.
4. Recht J, Siqueira AM, Monteiro WM, Herrera SM, Herrera S, Lacerda MV. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: Current challenges in malaria control and elimination. *Malaria J*. 2017;16:1-18. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1925-6>
5. World Health Organization. 55th Directing Council, 68th Session of the Regional Committee of WHO for the Americas. Accessed: April 13, 2020. Available from: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=55-directing-council-8812&alias=37693-cd55-fr-e-693&Itemid=270&lang=en](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=55-directing-council-8812&alias=37693-cd55-fr-e-693&Itemid=270&lang=en)
6. World Health Organization. A framework for malaria elimination Global Malaria Programme. 1st edition. Geneva: World Health Organization; 2017. p. 100.
7. Ministerio de Salud del Ecuador. Gaceta de enfermedades transmitidas por vectores SE01-50/2019. Accessed: June 10, 2020. Available from: <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2020/01/GACETA-VECTORES-SE-50.pdf>

8. Martin JA, Hendershot AL, Saá Portilla IA, English DJ, Woodruff M, Vera-Arias CA, *et al.* Anopheline and human drivers of malaria risk in northern coastal, Ecuador: A pilot study. *Malar J.* 2020;19:1-11. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03426-y>
9. Sáenz FE, Arévalo-Cortés A, Valenzuela G, Vallejo AF, Castellanos A, Poveda-Loayza AC, *et al.* Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the northern coast of Ecuador. *Malaria J.* 2017;16: 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1947-0>
10. Ministerio de Salud del Ecuador. Gaceta de enfermedades transmitidas por vectores SE01-51/2019. Accessed: June 10, 2020. Available from: <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2020/02/GACETA-VECTORES-SE-51.pdf>
11. Ministerio de Salud del Ecuador. Gaceta de enfermedades transmitidas por vectores SE01-11/2020. Accessed: July 10, 2020. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
12. González L, Ochoa J, Franco L, Arroyave M, Restrepo E, Blair S, *et al.* Nosocomial *Plasmodium falciparum* infections confirmed by molecular typing in Medellín. *Malar J.* 2005;4:1-5. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-4-9>
13. Tatem AJ, Jia P, Ordanovich D, Falkner M, Huang Z, Howes R, *et al.* The geography of imported malaria to non-endemic countries: A meta-analysis of nationally reported statistics. *Lancet Infect Dis.* 2017;17:98-107. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30326-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30326-7)
14. Zoller T, Naucke TJ, May J, Hoffmeister B, Flick H, Williams CJ, *et al.* Malaria transmission in non-endemic areas: Case report, review of the literature and implications for public health management. *Malar J.* 2009;8:71. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-71>
15. Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal del Canton Salinas. Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial del Canton Salinas. Accessed: April 8, 2020. Available from: [http://app.sni.gob.ec/snmlink/sni/PORTAL\\_SNI/data\\_sigad\\_plus/sigadplusdocumentofinal/096000138000\\_1\\_DIAGNOSTICO%20PDOT%202015%20marzo\\_13-03-2015\\_20-29-41.pdf](http://app.sni.gob.ec/snmlink/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdocumentofinal/096000138000_1_DIAGNOSTICO%20PDOT%202015%20marzo_13-03-2015_20-29-41.pdf)
16. Organización Panamericana de la Salud. Manual de referencia para la vigilancia, el seguimiento y la evaluación de la malaria. Washington, D.C.: Organización Panamericana de Salud; 2018. p. 1-208.
17. Aboobakar S, Tatarskv A, Cohen JM, Bheecarry A, Boolaky P, Gopee N, *et al.* Eliminating malaria and preventing its reintroduction: The Mauritius case study. *Malar J.* 2012;11(Supl.1):1-2. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-S1-O12>
18. Fradejas I, Rubio JM, Martín-Diáz A, Herrero-Martínez JM, Ruiz-Giardin JM, Rojo-Marcos G, *et al.* Prevalence of submicroscopic malaria infection in immigrants living in Spain. *Malar J.* 2019;18:242. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2870-3>
19. Almeida AC, Kuehn A, Castro AJM, Vitor-Silva S, Figueiredo EFG, Brasil LW, *et al.* High proportions of asymptomatic and submicroscopic *Plasmodium vivax* infections in a peri-urban area of low transmission in the Brazilian Amazon. *Parasit Vectors.* 2018;11:194. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2787-7>
20. Mischlinger J, Rönnerberg C, Álvarez-Martínez MJ, Bühler S, Paul M, Schlagenhaut P, *et al.* Imported malaria in countries where malaria is not endemic: A comparison of semi-immune and nonimmune travelers. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33:1-11. <https://doi.org/10.1128/CMR.00104-19>
21. Nsereko G, Kadobera D, Okethwangu D, Nguna J, Rutazaana D, Kyabayinze DJ, *et al.* Malaria outbreak facilitated by appearance of vector-breeding sites after heavy rainfall and inadequate preventive measures: Nwoya District, Northern Uganda, February-May 2018. *Rev J Environ Public Health.* 2018;2020:1-10. <https://doi.org/10.1155/2020/5802401>
22. Ndiaye A, Niang EH, Diène AN, Nouridine MA, Sarr PC, Konaté L, *et al.* Mapping the breeding sites of *Anopheles gambiae* s. l. in areas of residual malaria transmission in central western Senegal. *PLoS ONE.* 2020;15:1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236607>
23. Tesfahunegn A, Berhe G, Gebregziabher E. Risk factors associated with malaria outbreak in Laelay Adyabo district northern Ethiopia, 2017: Case-control study design. *BMC Public Health.* 2019;19:484-90. <https://doi.org/10.1186/s12889-019-6798-x>
24. Alemu A, Tsegaye W, Golassa L, Abebe G. Urban malaria and associated risk factors in Jimma town, south-west Ethiopia. *Malar J.* 2011;10:173-80. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-173>
25. Jaramillo-Ochoa R, Sippy R, Farrell D, Cueva-Aponte C, Beltrán-Ayala E, Gonzaga JS, *et al.* Effects of political instability in Venezuela on malaria resurgence at Ecuador-Peru border. *Emerg Infect Dis.* 2018;25:834-6. <https://doi.org/10.3201/eid2504.181355>

26. Kraemer MU, Reiner RC, Brady OJ, Messina JP, Gilbert M, Pigott DM, *et al.* Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nat Microbiol.* 2019;5:854-63. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0376-y>
27. Wilson ME. The traveller and emerging infections: Sentinel, courier, transmitter. *J Appl Microbiol.* 2003;94(Supl.):1s-11. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.94.s1.1.x>
28. ACNUR. Venezuela Situation. Accessed: May 3, 2020. Available from: <https://data2.unhcr.org/en/situations/vensit>
29. Rodríguez-Morales AJ, Suárez JA, Risquez A, Villamil-Gómez WE, Paniz-Mondolfi A. Consequences of Venezuela's massive migration crisis on imported malaria in Colombia 2016-2018. *Travel Med Infect Dis.* 2019;28:98-9. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2019.02.004>
30. Muentener P, Schlagenhauf P, Steffen R. Imported malaria (1985-95): Trends and perspectives. *Bull World Health Organ.* 1999;77:560-6.
31. Monge-Maillo B, Jiménez BC, Pérez-Molina JA, Norman F, Navarro M, Pérez-Ayala A, *et al.* Imported infectious diseases in mobile populations, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:1745-52. <https://doi.org/10.3201/eid1511.090718>
32. WRBU. Systematic Catalog of Culicidae - Walter Reed Biosystematics Unit - Home. Accessed: May 4, 2020. Available from: <http://www.mosquitocatalog.org/default.aspx>
33. Naranjo-Díaz N, Altamiranda M, Luckhart S, Conn JE, Correa MM. Malaria vectors in ecologically heterogeneous localities of the Colombian Pacific Region. *PLoS ONE.* 2014;9:1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103769>
34. Pinault LL, Hunter FF. New highland distribution records of multiple *Anopheles* species in the Ecuadorian Andes. *Malar J.* 2011;10:1-11. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-236>
35. Pinault LL, Hunter FF. Characterization of larval habitats of *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Anopheles punctimacula*, and *Anopheles oswaldoi* s.l. populations in lowland and highland Ecuador. *J Vector Ecol.* 2012;37:124-36. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2012.00209.x>
36. Conde M, Pareja PX, Orjuela LI, Ahumada ML, Durán S, Jara JA, *et al.* Larval habitat characteristics of the main malaria vectors in the most endemic regions of Colombia: Potential implications for larval control. *Malar J.* 2015;14:476. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-1002-y>
37. Pinault LL, Hunter FF. Larval habitat associations with human land uses, roads, rivers, and land cover for *Anopheles albimanus*, *A. pseudopunctipennis*, and *A. punctimacula* (Diptera: Culicidae) in Coastal and Highland Ecuador. *Front Physiol.* 2012;3:59-60. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00059>
38. Diallo D, Diagne CT, Hanley KA, Sall AA, Buenemann M, Ba Y, *et al.* Larval ecology of mosquitoes in sylvatic arbovirus foci in southeastern Senegal. *Parasit Vectors.* 2012;7:1-17. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-286>



Artículo original

## Evaluación del UMELISA CHAGAS® con la incorporación de nuevos péptidos monoméricos y quiméricos representativos de diferentes regiones de *Trypanosoma cruzi*

Idialis Hernández, Milenen Hernández, Jeny González, Ivonne Gómez, Orlando Zulueta, Grisell Ramos, Darien Ortega, Dunia Clara Bequer, Giosvany Ernesto Martínez, Aurora Delahanty  
Centro de Inmunoensayo, La Habana, Cuba

**Introducción.** La mayoría de las personas con enfermedad de Chagas desarrolla anticuerpos específicos contra *Trypanosoma cruzi*. En la infección temprana se producen anticuerpos IgM contra *T. cruzi* que son reemplazados por IgG durante el curso de la enfermedad. Los primeros síntomas de la enfermedad suelen ser muy leves y atípicos, por lo que a menudo no se detecta en la fase aguda.

**Objetivos.** Evaluar la sensibilidad y la especificidad clínica y analítica, la precisión y la eficacia del UMELISA CHAGAS® con la incorporación de nuevos péptidos sintéticos en la fase sólida representativos de la proteína SAPA (*Shed Acute Phase Antigen*) y del antígeno TSA (*Trypomastigote Surface Antigen*).

**Materiales y métodos.** Se evaluó un panel de desempeño de título mixto anti-*T. cruzi* y uno de seroconversión de Chagas, así como muestras de suero positivas y negativas provenientes de zonas endémicas de la enfermedad y muestras positivas de otras enfermedades que podían interferir con la prueba. Las pruebas Bioelisa CHAGAS, Chagatest ELISA recombinante v. 4.0, Chagatest HAI y SD BIOLINE CHAGAS Ab Rapid, se emplearon como referencia.

**Resultados.** Los porcentajes de sensibilidad y especificidad clínica fueron de 97,73 % (IC<sub>95%</sub> 96,23-99,24) y 99,33 % (IC<sub>95%</sub> 98,88-99,78), respectivamente. Se obtuvo un 98,96 % de eficacia y una buena precisión.

**Conclusiones.** Los resultados demuestran que la nueva fase sólida del UMELISA CHAGAS® puede utilizarse para el inmunodiagnóstico, la certificación de sangre y la vigilancia epidemiológica en países endémicos y no endémicos con población de alto riesgo.

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*; enfermedad de Chagas/diagnóstico; anticuerpos; péptidos.

### Evaluation of UMELISA CHAGAS™ with the incorporation of new monomeric and chimeric peptides representative of different regions of *Trypanosoma cruzi*

**Introduction:** Most people with Chagas disease develop specific antibodies against *Trypanosoma cruzi*. In early infection, IgM antibodies against *T. cruzi* are produced and later replaced for IgG antibodies during the course of the disease. The first symptoms of the infection may be very mild and atypical, which is why the disease is often not detected in the acute phase.

**Objectives:** To evaluate the clinical and analytical sensitivity, and specificity, accuracy, and efficacy of UMELISA CHAGAS™ with the addition of new synthetic peptides in the solid phase representative of the shed acute phase antigen protein (SAPA) and the trypomastigote surface antigen (TSA).

**Materials and methods:** We evaluated a mixed anti-*T. cruzi* titer performance panel and a Chagas seroconversion one, as well as positive and negative serum samples from endemic areas of the disease and positive samples for other diseases that may interfere with the assay. The Bioelisa CHAGAS assay, Chaga test recombinant ELISA v.4.0, Chagatest HAI, and SD BIOLINE CHAGAS Ab Rapid were used as reference tests.

**Results:** The sensitivity of the assay was 97.73% (95% CI: 96,23-99,24) and the clinical specificity, 99.33% (95% CI: 98,88-99,78) while the efficacy and the accuracy were 98.96%.

**Conclusions:** Our results show that the new solid phase of UMELISA CHAGAS® can be used for immunodiagnostic, blood certification, and epidemiological surveillance in endemic and non-endemic countries with high-risk populations.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease/diagnosis; antibodies; peptides.

**Recibido:** 02/07/2020

**Aceptado:** 20/04/2021

**Publicado:** 21/04/2021

#### Citación:

Hernández I, Hernández M, González J, Gómez I, Zulueta O, Ramos G, et al. Evaluación del UMELISA CHAGAS® con la incorporación de nuevos péptidos monoméricos y quiméricos representativos de diferentes regiones de *Trypanosoma cruzi*. Biomédica. 2021;41(Supl. 1):113-20. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5435>

#### Correspondencia:

Idialis Hernández, Avenida 25 y 134, Reparto Cubanacan, Playa, La Habana, Cuba  
Teléfono: 7208 2929, extensión 320  
idialis.hernandez@cie.cu

#### Contribución de los autores:

Idialis Hernández: responsable del proyecto, evaluación de péptidos, ejecución de la prueba, análisis e interpretación de los resultados y redacción del manuscrito

Milenen Hernández: diseño y síntesis de péptidos sintéticos

Jeny González: evaluación de los péptidos, ejecución de la prueba, análisis de los resultados y revisión bibliográfica

Ivonne Gómez y Orlando Zulueta: síntesis de péptidos sintéticos

Grisell Ramos: evaluación de los péptidos y ejecución de la prueba

Darien Ortega y Aurora Delahanty Fernández: análisis e interpretación de los resultados

Dunia Clara Bequer: ejecución de la prueba  
Giosvany Ernesto Martínez: ejecución de la prueba y redacción del manuscrito

#### Financiación:

Este estudio fue financiado con recursos del Centro de Inmunoensayo, La Habana, Cuba

#### Conflicto de intereses:

La autora principal es desarrolladora del UMELISA CHAGAS® evaluado.



La gran mayoría de las personas afectadas por la enfermedad de Chagas desarrollan anticuerpos específicos contra *Trypanosoma cruzi*. En la etapa inicial de la infección se producen anticuerpos IgM, que son reemplazados por anticuerpos IgG a medida que progresa la enfermedad (1).

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad en su etapa inicial pueden ser muy leves y atípicas, y producir solamente malestar general, motivo por el cual con frecuencia la enfermedad no se detecta en su fase aguda.

La proteína SAPA (*Shed Acute Phase Antigen*) se expresa principalmente en la forma infectiva de *T. cruzi*, lo que produce una temprana y fuerte reacción de la inmunoglobulina G después de la infección, la cual disminuye con el avance de la enfermedad (2). Los anticuerpos contra la SAPA están presentes fundamentalmente en el suero de pacientes en la fase aguda y en aquellos que adquieren la enfermedad de forma congénita (3-5). Además, la actividad trans-sialidasa de la molécula implicada en la invasión del parásito no ha sido detectada en *T. rangeli*, *Leishmania* spp. ni *Plasmodium* spp., parásitos que comparten la distribución geográfica de *T. cruzi* (6,7). Por estas razones, es importante el uso de este antígeno en la fase sólida del UMELISA CHAGAS®, ya que permitiría la detección de anticuerpos en la infección temprana y evitaría reacciones inespecíficas con otros parásitos.

El antígeno TSA (*Trypomastigote Surface Antigen*) es uno de los blancos de los linfocitos T citotóxicos CD8+ en la infección humana y se caracteriza por tener en su secuencia hasta cuatro copias de un motivo de aminoácidos muy conservado en neuraminidasas bacterianas (8,9). En diversos estudios se ha reportado el uso de la proteína TSA para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, con buenos resultados en términos de sensibilidad y especificidad.

El UMELISA CHAGAS® es una prueba inmunoenzimática indirecta en la cual la fase sólida está constituida por placas de tiras recubiertas con tres péptidos sintéticos monoméricos, el P-17, el P-18 y el C-12, correspondientes a regiones inmunodominantes de la membrana del parásito. Con la incorporación de los monómeros SAPA y TSA, así como la sustitución de los monómeros P-17 y C-12 por el quimérico Q-5 formado por estos, se pretende mejorar de forma cuantitativa los indicadores de sensibilidad, especificidad, precisión y eficacia que determinan el buen desempeño o funcionamiento de la prueba con una mayor representación de epítomos inmunodominantes de *T. cruzi*.

El propósito del estudio fue evaluar el UMELISA CHAGAS® con la incorporación de nuevos péptidos monoméricos y quiméricos representativos de diferentes regiones de *T. cruzi*.

## **Materiales y métodos**

### ***Obtención de los péptidos sintéticos***

Todos los péptidos se obtuvieron mediante la síntesis química en fase sólida descrita por Merrifield en 1963, siguiendo la estrategia terc-butiloxicarbonilo (Boc) en bolsas de polipropileno (10-12). Se sintetizaron tres péptidos: el péptido quimérico Q5, formado por repeticiones de los péptidos monoméricos P-17 y C-12 representativos de epítomos inmunodominantes de la membrana de *T. cruzi*, que son los utilizados en el UMELISA CHAGAS® actual; el monómero SA-15, correspondiente a la región más antigénica de la proteína SAPA del parásito, y el péptido monomérico TSA-E3, que codifica para una parte del antígeno de superficie del tripomastigote.

### **Muestras utilizadas en la evaluación**

Se emplearon las siguientes: muestras de suero presuntamente negativas procedentes de donantes de sangre cubanos sanos del Banco Provincial de Sangre de La Habana (n=896); muestras de suero positivas (n=441) confirmadas por inmunofluorescencia indirecta (IFI) provenientes de diferentes países endémicos de la enfermedad de Chagas; muestras de suero negativas para la enfermedad de Chagas provenientes de zonas endémicas (n=591) evaluadas por IFI, y muestras de suero negativas para la enfermedad de Chagas y positivas para otras enfermedades que pudieran interferir en la prueba. Todas las muestras se evaluaron con las pruebas diagnósticas SUMA® (UMELISA HCV, UMELOSA HCV UMELISA HBsAg PLUS, HBsAg confirmatory test, UMELISA HCV UMELISA Dengue IgM PLUS) según correspondiera.

Asimismo, se emplearon muestras de pacientes con hepatitis C (n=8), de individuos vacunados contra la hepatitis B (n=16), de pacientes con dengue (IgM) (n=12), de pacientes con hepatitis B (n=16), de suero positivas para el HTLV (n=16), y de pacientes en hemodiálisis atendidos en el Hospital Miguel Enríquez de La Habana (n=18).

Se utilizaron dos paneles comerciales: el de desempeño de título mixto anti-*Trypanosoma cruzi* (Chagas) PMT 204 (n=21) (Laboratorios Lincon, S.A., México), y el de serconversión de Chagas (*T. cruzi*) AccuVert™ (0615-0038) (n=10) (Laboratorios Lincon, S.A., México).

### **Características evaluadas de la prueba**

Se evaluaron la sensibilidad y la especificidad clínica y analítica; se hizo la prueba de concordancia utilizando el índice kappa (K), así como un estudio de precisión mediante la determinación de la reproducibilidad y la eficacia de la prueba. Para el cálculo de estos indicadores, se elaboró una tabla de contingencia.

*Especificidad y sensibilidad clínicas.* La especificidad clínica se expresó como el porcentaje de negatividad en muestras en las que el analito de interés estuviera ausente y se calculó con los valores verdaderos negativos divididos por la suma de los verdaderos negativos más los falsos positivos (13). La sensibilidad clínica se expresó como el porcentaje de positividad en muestras en las que el analito de interés estuviera presente y se calculó como los valores verdaderos positivos divididos por la suma de los verdaderos positivos y los falsos negativos (13).

*Especificidad analítica.* El grado para distinguir entre el analito de interés y otros componentes en la muestra (13) se calculó evaluando muestras positivas para otras enfermedades que pudieran interferir en la prueba.

### **Estudios de concordancia**

La concordancia entre los diferentes métodos de referencia y el UMELISA CHAGAS® frente a un mismo panel de muestras, se determinó mediante el índice de concordancia kappa (K), cuyo valor mayor de 0,6 denota una elevada concordancia (13) (cuadro 1).

### **Eficacia del ensayo**

La capacidad de la prueba para detectar correctamente todos los positivos y negativos, se calculó como la suma de los valores verdaderos positivos más

los verdaderos negativos divididos por la suma de los verdaderos positivos y los falsos positivos más los falsos negativos y los verdaderos negativos (13).

**Cuadro 1.** Clasificaciones de concordancia según el índice kappa

<b>Concordancia</b>	<b>Kappa</b>
Deficiente	<0,20
Regular	0,21-0,40
Moderada	0,41-0,60
Buena	0,61-0,80
Muy buena	0,81-1,00

### **Precisión**

Esta se calculó en términos de reproducibilidad al determinar el grado de concordancia entre los resultados de una serie de réplicas (aproximadamente 20) de una misma muestra en diferentes días. Se analizaron dos muestras positivas en el estudio con grados de positividad alto (PA) y bajo (PB), una muestra falsa positiva (FN) y una negativa (N).

### **Procedimiento**

En la evaluación se utilizó una prueba UMELISA indirecta con reactivos certificados del UMELISA CHAGAS® y el equipamiento de la tecnología SUMA® (14-16). Como referencias se emplearon las pruebas comerciales Bioelisa Chagas® (BIOKIT, España) (17), Chagatest ELISA recombinante®, v. 4.0 (Wiener Lab, Argentina), Chagatest HAI® (Wiener Lab, Argentina) (18) y SD BIOLINE CHAGAS Ab Rapid® (Standard Diagnostics Inc., Korea) (19). Las muestras se consideraron positivas cuando resultaron reactivas en alguna de las pruebas de referencia.

### **Análisis e interpretación de los resultados**

En el análisis e interpretación de los resultados con un nivel de confianza de 95%, se utilizó el sistema Stripe Reader Software™, versión 9.0, para la automatización del trabajo con los lectores de tiras y estuches UMELISA de la tecnología SUMA® (Cuba) (14-16) y el programa para el análisis epidemiológico de datos tabulados Epidat, versión 3.1 (España). Las muestras se clasificaron en verdaderos positivos y falsos negativos tomando como referencia el resultado de las pruebas comerciales.

### **Consideraciones éticas**

El estudio cumplió con los principios establecidos en la Declaración de Helsinki "Recomendaciones que guían a los médicos en la investigación biomédica con seres humanos", adoptada por la XVIII Asamblea Médica Mundial (Helsinki, Finlandia, junio de 1964) y sus sucesivas enmiendas, y fue aprobado por el comité de ética de la institución en la que se llevó a cabo.

### **Resultados**

#### **Sensibilidad y especificidad**

Se evaluaron 1.928 muestras de suero, de las cuales 10 resultaron falsas positivas y 10 falsas negativas con respecto a la prueba de referencia Chagatest HAI®, para 97,73 % (IC<sub>95%</sub> 96,23-99,24) y 99,33 % (IC<sub>95%</sub> 98,88-99,78) de sensibilidad y especificidad clínicas, respectivamente. La especificidad analítica fue de 100 %.

**Cuadro 2.** Tabla de contingencia para determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba

		Referencias		Total
		Positivos	Negativos	
Prueba	Positivos	431	10	441
	Negativos	10	1.477	1.487
Total		441	1.487	1.928

Sensibilidad: 97,73 % (IC<sub>95%</sub> 96,23-99,24)Especificidad: 99,33 % (IC<sub>95%</sub> 98,88-99,78)**Eficacia de la prueba**

La proporción de resultados válidos de la prueba fue de 98,96 %.

**Estudio de concordancia**

La prueba de concordancia con el índice kappa (K) resultó ser de 0,97 (IC<sub>95%</sub> 95-98), es decir, una muy buena concordancia (cuadro 2).

**Estudio de precisión**

Los porcentajes de reproducibilidad fueron del 100 % en todos los casos, lo que indica la buena precisión de la prueba.

**Discusión**

El desarrollo y la producción de antígenos naturales, recombinantes y sintéticos para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas, constituyen el objetivo fundamental de varios trabajos de investigación. Sin embargo, en la actualidad los péptidos sintéticos se utilizan ampliamente por las ventajas que significan en las pruebas diagnósticas en que se utilizan (12).

El uso de péptidos sintéticos como antígenos en el inmunodiagnóstico, los cuales se diseñan para obtener una prueba que garantice resultados con gran sensibilidad y especificidad, constituye una solución al problema del diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas (12,20). Entre los péptidos sintéticos, los quiméricos permiten "simular" estructuras de la proteína nativa en algunas ocasiones. Por ello, en el presente estudio se sintetizaron péptidos quiméricos con estas características no descritos por otros investigadores, con lo cual nuestro grupo de trabajo obtuvo el certificado de autor de invención (21).

En la selección de las secuencias aminoacídicas para el diseño del péptido quimérico, se tuvieron en cuenta los resultados de los estudios de los péptidos monoméricos descritos en la literatura y los obtenidos por nosotros en el laboratorio (22).

El antígeno SAPA se ha propuesto para el diagnóstico temprano de la enfermedad de Chagas debido a que los anticuerpos contra este antígeno están presentes fundamentalmente en el suero de pacientes en la fase aguda y en aquellos que adquirieron la enfermedad de forma congénita (3-5).

En varios estudios se ha reportado el uso de la proteína TSA para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, con buenos resultados en términos de sensibilidad y especificidad. La TSA es uno de los blancos de los linfocitos T citotóxicos CD8+ en la infección humana y se caracteriza por tener en su secuencia hasta cuatro copias de un motivo de aminoácidos muy conservado en neuraminidasas bacterianas (8,9).

### **Sensibilidad y especificidad clínicas**

El porcentaje de sensibilidad (97,73 %) del UMELISA CHAGAS® con la incorporación de estos antígenos en la fase sólida, fue similar al reportado por investigadores colombianos con los estuches comerciales Bioelisa CHAGAS®, Chagatest ELISA recombinante®, versión 3.0, Chagatest HAI® y SD BIOLINE CHAGAS Ab Rapid® en su estudio de comparación de la capacidad diagnóstica de siete métodos de determinación de la infección por *T. cruzi* en pacientes con enfermedad de Chagas crónica, en el cual obtuvieron valores de sensibilidad entre 95 y 98 % (23). En evaluaciones del kit ELISA Chagas IICS®, versión 1 (24,25), se reportaron resultados similares al obtenido por nuestro grupo de trabajo con la nueva modificación de la fase sólida.

Los resultados discordantes del presente estudio pudieran deberse a dos posibles causas: los distintos tipos de antígenos y principios utilizados en las pruebas de referencia (26) y la composición del conjugado que contiene anti-IgM además de anti-IgG humana, que puede generar falsos positivos por su baja especificidad (27).

Uno de los usos más importantes de las pruebas diagnósticas serológicas es en las zonas endémicas, donde estas deben discriminar a los individuos infectados de aquellos que, sin estarlo, pueden tener otras condiciones que generen falsos positivos. Para determinar la especificidad clínica, se evaluaron muestras negativas provenientes de regiones endémicas de la enfermedad y muestras de donantes cubanos de sangre supuestamente sanos, dado que la enfermedad no existe hoy en Cuba. La especificidad del UMELISA CHAGAS® fue de 99,33 % (IC<sub>95%</sub> 98,88-99,78) y en otras pruebas se han reportado resultados similares (24-27).

La especificidad analítica, parámetro que depende del principio de la prueba y del material que se investiga, resultó ser del 100 %, lo que indica que la incorporación de los nuevos péptidos sintéticos en el UMELISA CHAGAS® permite detectar correctamente el analito de interés sin interferencia de ningún otro compuesto semejante.

El estudio de concordancia utilizando el índice kappa presenta diversas ventajas, destacándose su simpleza logística, la sencillez del análisis estadístico y una amplia aplicabilidad en la evaluación de métodos diferentes (28). En la práctica, cualquier valor de kappa mayor de 0,6 denota una buena concordancia. Un problema del uso de este índice es que sus valores dependen de la prevalencia de las muestras de cada categoría, lo que posibilita la comparación entre los diferentes índices utilizados en los estudios (13). En este caso, se obtuvo un valor de kappa de 0,97, lo que refleja muy buena concordancia entre el UMELISA CHAGAS® con los nuevos péptidos sintéticos incorporados y las diferentes pruebas de referencia empleadas. En estudios sobre el desempeño del kit ELISA Chagas IICS®, versión 1, también se obtuvo una muy buena concordancia (24).

La eficacia o probabilidad de que un individuo sea clasificado correctamente por la prueba alcanzará su valor óptimo con aquella técnica que no arroje falsos resultados positivos y negativos (13). En el presente estudio, el UMELISA CHAGAS® con la nueva modificación en su fase sólida obtuvo una eficacia de 98,96 %, con 10 muestras falsas positivas y 10 muestras falsas negativas. Las posibles explicaciones para los resultados falsamente negativos y positivos incluyen la presencia de diferentes antígenos (lisado natural, proteínas recombinantes y péptidos sintéticos) en las fases sólidas y la diversidad de metodologías empleadas en las pruebas de referencia (23).

Las principales limitaciones del estudio fueron la dificultad para adquirir muestras caracterizadas en las tres etapas de la enfermedad y las requeridas para determinar la reactividad cruzada con parásitos en estrecha relación filogenética con *T. cruzi*, así como las pruebas de referencia para una segunda evaluación de las muestras discordantes.

Los resultados de la evaluación del UMELISA CHAGAS® con la incorporación de nuevos péptidos monoméricos y quiméricos representativos de diferentes regiones del parásito, demostraron su adecuado desempeño en la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* en países endémicos y no endémicos para la enfermedad de Chagas. Estos resultados permiten recomendar su uso para el inmunodiagnóstico, la certificación de sangre y la vigilancia epidemiológica en países endémicos y no endémicos con población de alto riesgo, así como para incorporar péptidos representativos de otras regiones inmunodominantes del parásito.

## Referencias

1. Ministerio de Protección Social. Guía de atención clínica de la enfermedad de Chagas. Bogotá: Minprotección; 2010. p. 1-84. Fecha de consulta: 1° de mayo de 2019. Disponible en: <http://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Guia%20de%20atencion%20clinica%20de%20chagas%202010.pdf>
2. Russomando G, Sánchez Z, Meza G, de Guillén Y. Shed acute-phase antigen protein in an ELISA system for unequivocal diagnosis of congenital Chagas disease. *Expert Rev Mol Diagn.* 2010;10:705-7. <https://doi.org/10.1586/erm.10.70>
3. Lovón CJ. Estandarización de la prueba de ELISA de captura para la detección de antígenos de *Trypanosoma cruzi* en muestras de orina y suero de *Cavia porcellus* infectado experimentalmente (tesis). Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa; 2018.
4. Peverengo LM, García V, Rodeles LM, Mendicino D, Vicco M, Lagier C, et al. Development and assessment of an improved recombinant multi-epitope antigen-based immunoassay to diagnose chronic Chagas disease. *Parasitology.* 2018;145:1594-9. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000458>
5. Bustos PL, Milduberger N, Volta BJ, Perrone AE, Laucella SA, Bua J. *Trypanosoma cruzi* infection at the maternal-fetal interface: Implications of parasite load in the congenital transmission and challenges in the diagnosis of infected newborns. *Front Microbiol.* 2019;10:1250. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01250>
6. Brenière SF, Yaksic N, Telleria J, Bosseno MF, Noireau F, Wincker P, et al. Immune response to *Trypanosoma cruzi* shed acute phase antigen in children from an endemic area for Chagas' disease in Bolivia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997;92:503-7. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761997000400011>
7. Buchovsky AS, Campetella O, Russomando G, Franco L, Oddone R, Candia N, et al. Transsialidase inhibition assay, a highly sensitive and specific diagnostic test for Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8:187-9. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.1.187-189.2001>
8. Noazin S, Lee JA, Málaga ES, Valencia-Ayala E, Condori BJ, Roca C, et al. Trypomastigote excretory secretory antigen blot is associated with *Trypanosoma cruzi* load and detects congenital *T. cruzi* infection in neonates, using anti-shed acute phase antigen immunoglobulin M. *J Infect Dis.* 2019;219:609-18. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy562>
9. Lasso P. Determinación de la frecuencia de linfocitos T CD8+ específicos del péptido K1 de la proteína KMP-11 del parásito *Trypanosoma cruzi* en pacientes chagásicos (tesis). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
10. Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc.* 1963;14:2149-54. <https://doi.org/10.1021/ja00897a025>
11. Hernández M, Rodríguez-Tanty CH, Higginson-Clarke D, Márquez Y, Díaz J, González LJ. Síntesis química en fase sólida de dos péptidos de la glicoproteína de la membrana (gp21) del HTLV-I. *Revista CENIC.* 2007;38:331-6.
12. Hernández M, Hernández I, Ramos G, Pozo L. Chimeric synthetic peptides as antigens for detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;339:89-92. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.001>

13. Ochoa RF. Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas mediante técnicas inmunoenzimáticas. Segunda edición ampliada. La Habana: Finlay Ediciones; 2008. p. 82.
14. Pías NC, Robaina R, Fernández JL. Procesamientos de datos en la Tecnología SUMA. Sistema informático para su implementación. Bioingeniería y Física Médica Cubana. 2009;10:28-32
15. Pías NC, Álvarez RR, Díaz AR, Yero JLF. Sistema informático SRS para el procesamiento de datos en la tecnología Suma. Investigación Operacional. 2014;35:258-67.
16. Tecnosuma Internacional S.A., SUMA (sistema ultramicroanalítico). La Habana: Centro de Inmunoensayo. Fecha de consulta: 1° de mayo 2019. Disponible en: [https://www.ecured.cu/Tecnosuma\\_Internacional\\_S.A](https://www.ecured.cu/Tecnosuma_Internacional_S.A)
17. Biokit. Bioelisa CHAGAS. Fecha de consulta: 1° de mayo de 2019. Disponible en: <https://www.biokit.com/bioelisa-chagas>
18. Wiener Lab. Group. Chagatest ELISA Recombinante v. 4.0 y Chagatest HAI. Fecha de consulta: 1° de mayo de 2019. Disponible en: <http://www.wiener-lab.com/ES/SitePages/Chagas.aspx>
19. Ji MJ, Noh JS, Cho BK, Cho YS, Kim SJ, Yoon BS. Evaluation of SD BIOLINE Chagas Ab Rapid kit. Korean J Lab Med. 2009;29:48-52. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.1.48>
20. Noya O, Patarroyo ME, Guzmán F, Alarcón de Noya B. Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. Curr Protein Pept Sci. 2003;4:299-308. <https://doi.org/10.2174/1389203033487153>
21. Hernández M, Milenen M, Ramos-Martínez G, Hernández-Spengler I, Selles-León ME, Pozo-Peña L. Péptidos sintéticos quiméricos del *Trypanosoma cruzi*. Certificado de autor de invención. Certificado N° 23520. Boletín oficial No. 264. La Habana; Oficina Cubana de la Propiedad Intelectual; 2010. p. 52.
22. Hernández-Marín M, Almenares-Guash P, Martínez-Ortiz C, Gómez-Cordero I, Melchor-Rodríguez A. Péptidos sintéticos del *Trypanosoma cruzi* para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bioquímica. 2003;28:2-7.
23. Duarte LF, Flórez O, Rincón G, González CI. Comparison of seven diagnostic tests to detect *Trypanosoma cruzi* infection in patients in chronic phase of Chagas disease. Colomb Med. 2014;45:61-6.
24. Aria L, Acosta ME, Guillen Y, Rojas A, Meza T, Infanzón B. Desempeño del kit ELISA Chagas IICS V.1 para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Memorias Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. 2016;14:7-13.
25. Fernández L. Diagnóstico inmunológico de las tripanosomosis (tesis). Madrid: Universidad Complutense; 2017.
26. Instituto Nacional de Salud. Recomendación técnica sobre el uso de métodos ELISA para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en Colombia. Nuevo algoritmo de diagnóstico serológico. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2017. Fecha de consulta: 1° de mayo de 2019. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin%20de%20laboratorio/Recomendacio%CC%81n%20te%CC%81cnica%20uso%20ELISA%20Chagas.pdf>
27. Delgado JP, Montoto CD, Dean V, Núñez FA, Mora SR, Fraga J. Diagnóstico de tripanosomiasis americana en estudiantes de la Escuela Latinoamericana de Medicina. Rev Cub Med Mil. 2016;45:119-30.
28. Cerda J, Villarroel L. Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: coeficiente de Kappa. Rev Chil Pediatr. 2008;79:54-8. <https://doi.org/10.4067/S0370-41062008000100008>

Artículo original

## Malaria en poblaciones con ocupación minera, Colombia, 2012-2018

Daniela Salas, Dora Yurany Sánchez, Germán Achury, Fabio Escobar-Díaz  
Maestría en Salud Pública y Desarrollo Social, Fundación Universitaria del Área Andina, Bogotá, D.C., Colombia

**Introducción.** La malaria representa uno de los mayores desafíos de salud pública, principalmente en los países pobres. Ciertas características sociales de Colombia, como la migración, el trabajo informal y la escasez económica, favorecen la minería ilegal. El análisis de la situación de la malaria en estas áreas permite establecer una guía para la prevención, el control y el tratamiento de la enfermedad en los programas de salud pública existentes.

**Objetivo.** Describir la situación de la malaria en las poblaciones mineras colombianas entre el 2012 y el 2018.

**Materiales y métodos.** Se hizo un estudio descriptivo y retrospectivo que incluyó la creación de gráficos y mapas. Para el análisis estadístico se utilizaron la correlación de Pearson y el índice de Moran.

**Resultados.** Entre el 2012 y el 2018, se notificaron 44.032 casos de malaria en la población minera, 43.900 de malaria no complicada y 132 de malaria complicada, así como tres muertes, dos por *Plasmodium vivax* y una por infección mixta. Hubo una disminución del 44,7 % de los casos en el período evaluado. La tasa de riesgo en el 2012 fue de 2,5 casos por 1.000 habitantes; el 87,3 % de los casos se presentó en hombres y el 37,9 % en personas entre los 20 y los 29 años, en tanto que el 46,7 % de la población estudiada estaba conformada por afrocolombianos. Se encontró una posible correlación lineal positiva moderada entre mayor la actividad minera, mayor el número de casos de malaria en mineros. El índice de Moran global evidenció una agrupación espacial significativa de los casos de malaria en zonas con industria minera en los municipios del Pacífico colombiano.

**Conclusiones.** La disminución en la notificación de casos durante el período evaluado podría atribuirse a un subregistro del Sistema de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila), ya que la mayoría de los mineros no tienen trabajos formales, lo que dificulta su acceso a los servicios de salud. Se recomienda un estudio de cohorte en áreas endémicas para establecer una relación directa entre la explotación minera y la presencia de casos de malaria.

**Palabras clave:** malaria; enfermedades transmitidas por vectores; minería; vigilancia en salud pública; Colombia.

### Malaria in populations with mining occupation, Colombia, 2012-2018

**Introduction:** Malaria represents one of the biggest public health challenges, mainly in poor countries. Colombia has social characteristics such as migration, informal work, and economic shortages that favor illegal mining activities. The study of the malaria situation in these areas would allow establishing the bases for its prevention, control, and treatment in the existing public health programs.

**Objective:** To describe the malaria situation in Colombian mining populations between 2012 and 2018.

**Materials and methods.** We conducted a retrospective descriptive study with graphs and maps. For the statistical analysis, we used Pearson's correlation and Moran's index.

**Results.** From 2012 to 2018, 44,032 cases of malaria were reported in the mining population, 43,900 of uncomplicated malaria and 132 of complicated malaria, and three deaths, two due to *Plasmodium vivax* and one due to mixed infection. During this period, there was a decrease of 44.7% in cases. The risk rate in 2012 was 2.5 cases x 1000 inhabitants; 87.3% of cases were in men, and 37.9% corresponded to the 20 to 29-year-old age group while 46.7% were AfroColombians. We found a possible moderate positive linear correlation: The greater the mining activity, the greater the number of malaria cases. The global Moran index indicated a significant spatial grouping of cases in mining activities in Colombian Pacific municipalities.

**Conclusions.** The case notification decrease during this period could be attributed to an underreporting of the public health surveillance system (Sivigila) system, as most miners do not have formal jobs, which prevents them from accessing health services. A cohort study is recommended in endemic areas to establish a direct relationship between mining exploitation and the occurrence of malaria cases.

**Keywords:** Malaria; vector borne diseases; mining; public health surveillance; Colombia.

**Recibido:** 11/11/2020  
**Aceptado:** 09/05/2021  
**Publicado:** 10/05/2021

#### Citación:

Salas D, Sánchez DY, Achury G, Escobar-Díaz F. Malaria en poblaciones con ocupación minera, Colombia, 2012 -2018. Biomédica. 2021;41(Supl.1):121-30.  
<https://doi.org/10.7705/biomedica.5899>

#### Correspondencia:

Daniela Salas, Maestría en Salud Pública y Desarrollo Social, Fundación Universitaria del Área Andina, Calle 67 No 9-72, Bogotá, D.C., Colombia  
Teléfono: (300) 817 3610  
dsalas9@estudiantes.areandina.edu.co

#### Contribución de los autores:

Daniela Salas: recolección y análisis de los datos  
Dora Yurany Sánchez: análisis de los datos  
Todos los autores participaron en la interpretación de los datos y en la escritura del manuscrito.

#### Financiación:

No hubo financiación de parte de ninguna institución o laboratorio.

#### Conflicto de intereses:

Las autoras declaran que no existe conflicto de intereses. Las opiniones expresadas no representan las de las instituciones a las cuales pertenecen.



La malaria o paludismo es una enfermedad infecciosa generada por una variedad de parásitos protozoarios pertenecientes al género *Plasmodium* y transmitida por la hembra del mosquito *Anopheles*. Se han identificado cinco especies distintas de plasmodios que infectan a los seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi* (1). La Organización Mundial de la Salud (OMS) diseñó la Estrategia Técnica Mundial contra la Malaria, 2016-2030, un ambicioso plan que aspira a lograr el control y la eliminación de la enfermedad, y cuyo objetivo global es reducir en más del 40 % la incidencia y la tasa de mortalidad para el 2030 (2).

En Latinoamérica, la malaria constituye uno de los grandes desafíos de salud pública, pues se la considera endémica en la mayor parte de los países y afecta la salud de aproximadamente 102 millones de personas que se creen en riesgo de contraer la enfermedad (3), principalmente en países pobres y marginados. Se afirma que hoy el impacto de la malaria va más allá del número de fallecimientos, pues se ha convertido en un factor limitante para el progreso de las sociedades asociado con situaciones de pobreza y retraso del desarrollo social, escolar y laboral, con la consiguiente imposibilidad de lograr un adecuado crecimiento económico en los diferentes territorios donde es endémica.

Durante las últimas dos décadas, cerca del 40 % del territorio colombiano ha sido objeto de la explotación de minerales e hidrocarburos (4), actividad que se ha consolidado como uno de los sectores estratégicos para la economía nacional, ya que es responsable de financiar cerca del 85,4 % del gasto público y contribuye con el 7 % al producto interno bruto (PIB) (5). Sin embargo, la ubicación de las minas en zonas endémicas para malaria hace que los costos del tratamiento, la incapacidad laboral y los desenlaces fatales contribuyan a la disminución del ingreso familiar y afecten los esfuerzos del Estado para su control, lo que termina por perjudicar la economía nacional (6).

Este panorama ha estado acompañado por la rápida expansión de la minería ilegal, lo que expresa un problema de orden social e informalidad que tiene un importante impacto económico y de salud pública, puesto que solo cerca del 20 % de las minas registradas en Colombia cuentan con título minero (7). Además, la minería ilegal se ha vinculado al patrocinio de actividades igualmente ilícitas, como la financiación del terrorismo y de bandas dedicadas al narcotráfico, entre otros (5).

El vínculo entre la malaria y la población dedicada a las actividades mineras, es uno de los problemas de salud en el que confluyen factores sociales de gran impacto, cuya eliminación requiere de medidas de gran alcance destinadas, no solo al control de la enfermedad, sino también a comprender particularidades de la población, como los fenómenos de migración que favorecen la circulación de personas infectadas con malaria entre los sitios donde se ejerce la minería, además de características ambientales, como la altitud, el clima, o la intensidad de la lluvia, que favorecen la adaptación de los mosquitos anófeles, y características clínicas, como las infecciones asintomáticas o la automedicación que da paso a la resistencia a los medicamentos (8).

La malaria afecta de forma importante a las personas que ejercen la minería de forma ilegal, factor que pone de manifiesto el carácter hiperendémico de las áreas donde se lleva a cabo esta actividad. La automedicación sistemática por parte de los pacientes que utilizan artemisinina y otros fármacos similares sin seguir el ciclo completo de tratamiento, es un riesgo grave que aumenta la resistencia a los medicamentos empleados contra las infecciones por *P. vivax* y *P. falciparum* (9).

Es indispensable un nuevo enfoque para comprender integralmente los cambios en el panorama epidemiológico de la malaria en Colombia, lo que incluye abordar la población dedicada a los diferentes tipos de minería en el país notificada en el Sivigila entre el 2012 y el 2018. Asimismo, deben emprenderse análisis cuyos resultados contribuyan a la formulación o reorientación de las políticas públicas de prevención, control y tratamiento de la malaria en esta población, así como a implementar las recomendaciones de estudios previos en torno al robustecimiento de los programas en salud pública existentes, haciéndolos más funcionales y propiciando una mayor sensibilización de las instituciones estatales y de la población que practica la minería en el territorio colombiano (8,10).

En este contexto, el objetivo del estudio fue describir la situación de la malaria en la población minera en Colombia entre el 2012 y el 2018. Se determinaron las características sociales y demográficas de la población minera afectada por la malaria, y se estimó la relación existente entre la explotación minera y la aparición de casos.

### **Materiales y métodos**

Se hizo un estudio descriptivo y retrospectivo con un universo de 407.795 casos de malaria registrados en las bases de datos del Sivigila en la plataforma del Instituto Nacional de Salud (11) entre la semana epidemiológica 01 de 2012 y la semana epidemiológica 52 de 2018.

Los datos corresponden a casos confirmados de malaria notificados por los servicios de salud del país, de los cuales se seleccionaron solo 44.032 (10,79 %) para el análisis después de excluir aquellos que no correspondían a la población minera, así como los registros duplicados y que no tuvieran la información completa. Los datos de producción de oro del país se tomaron del Sistema de Información Minero Energético Colombiano, publicados como datos abiertos en su sitio Web para los años 2012 a 2018; la información sobre minería ilegal se tomó de los mapas publicados por la Asociación Colombiana de Minería (12).

Se diseñó y validó una base de datos en Microsoft Excel para almacenar la información recopilada. Las variables epidemiológicas y mineras definidas para el estudio fueron: número total de casos de malaria de 214 municipios, especies de parásitos, población en riesgo, y producción anual de oro por municipios y distritos mineros (163 municipios) durante el período de estudio.

El índice parasitario anual se calculó utilizando el número total de casos de malaria entre la población con ocupación minera en cada municipio según el Sivigila y la población total en riesgo por municipio a nivel nacional para cada año del período de estudio según el Ministerio de Salud y Protección Social, la cual se calculó por cada 1.000 habitantes.

Se usó el programa IBM SPSS Statistics Base 22.0™ para hacer el análisis estadístico y de correlación de Pearson. El programa Microsoft Excel™ se empleó para crear gráficos, en tanto que los mapas y el análisis de Moran se hicieron con ArcGis 10.8™.

Los datos de distribución de la población por año y municipios, así como los *shapefiles* de Colombia, se obtuvieron del Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) (13) y se utilizaron como base para el análisis espacial encaminado a determinar la distribución de los casos de malaria y de las minas de oro en Colombia.

La significación estadística se estableció con probabilidades menores del 5 % ( $p < 0,05$ ). Para el análisis de los datos, se recurrió a una correlación lineal de Pearson, con el fin de establecer la relación entre la producción minera de oro y los casos notificados de malaria entre el 2012 y el 2018 en los 214 municipios de explotación minera de oro que presentaron, por lo menos, un caso de malaria.

Las bases de datos se depuraron siguiendo las recomendaciones del sistema de vigilancia (Sivigila) con base en las reglas de validación, código variable, fecha de notificación, unidades generadoras de datos primarios y unidades notificadoras, lo que permitió la evaluación de los casos duplicados. Se estableció un plan de análisis de las variables para calcular las frecuencias absolutas y relativas.

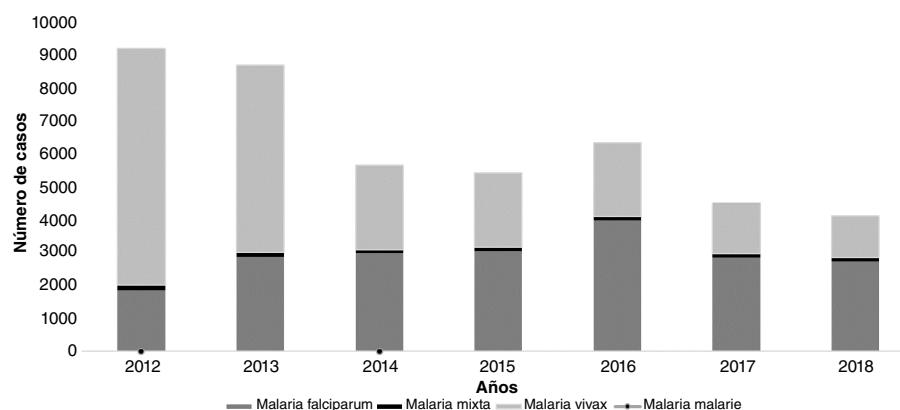
En cuanto al análisis estadístico espacial, se aplicó el índice global de Moran para verificar el patrón espacial de los casos de malaria notificados en la población minera, y se hizo la autocorrelación espacial mediante el análisis de conglomerados y valores atípicos para determinar puntos calientes, puntos fríos y valores atípicos espaciales estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) con el uso del programa ArcGIS 10.8.

Conforme a lo dispuesto en la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia, que define las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, este estudio se clasificó como una investigación sin riesgo debido a su carácter retrospectivo que no contempla intervenciones o modificaciones intencionadas en las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales.

## Resultados

Entre el 2012 y el 2018, se notificaron a nivel nacional 407.795 casos de malaria, de los cuales el 46,6 % se debió a infecciones por *P. falciparum*, el 51,4 % por *P. vivax* y el 2 % por infección mixta, con 5.443 casos de malaria complicada, 402.497 casos de malaria no complicada y 137 muertes.

En el periodo se notificaron 44.032 casos de malaria en la población minera, de los cuales 43.900 fueron de malaria no complicada, 132 de malaria complicada y tres muertes, dos por *P. vivax* y una por infección mixta. Predominó la infección por *P. vivax*, con 51,87 % (22.841 casos), seguida por *P. falciparum*, con 46,2 % (20.344 casos). Los casos de malaria en la población minera disminuyeron progresivamente en un 44,7 % entre el 2012 y el 2018 (figura 1).



Fuente: Sivigila, Instituto Nacional de Salud, Colombia

**Figura 1.** Distribución de casos de malaria en población minera, Colombia, 2012-2018

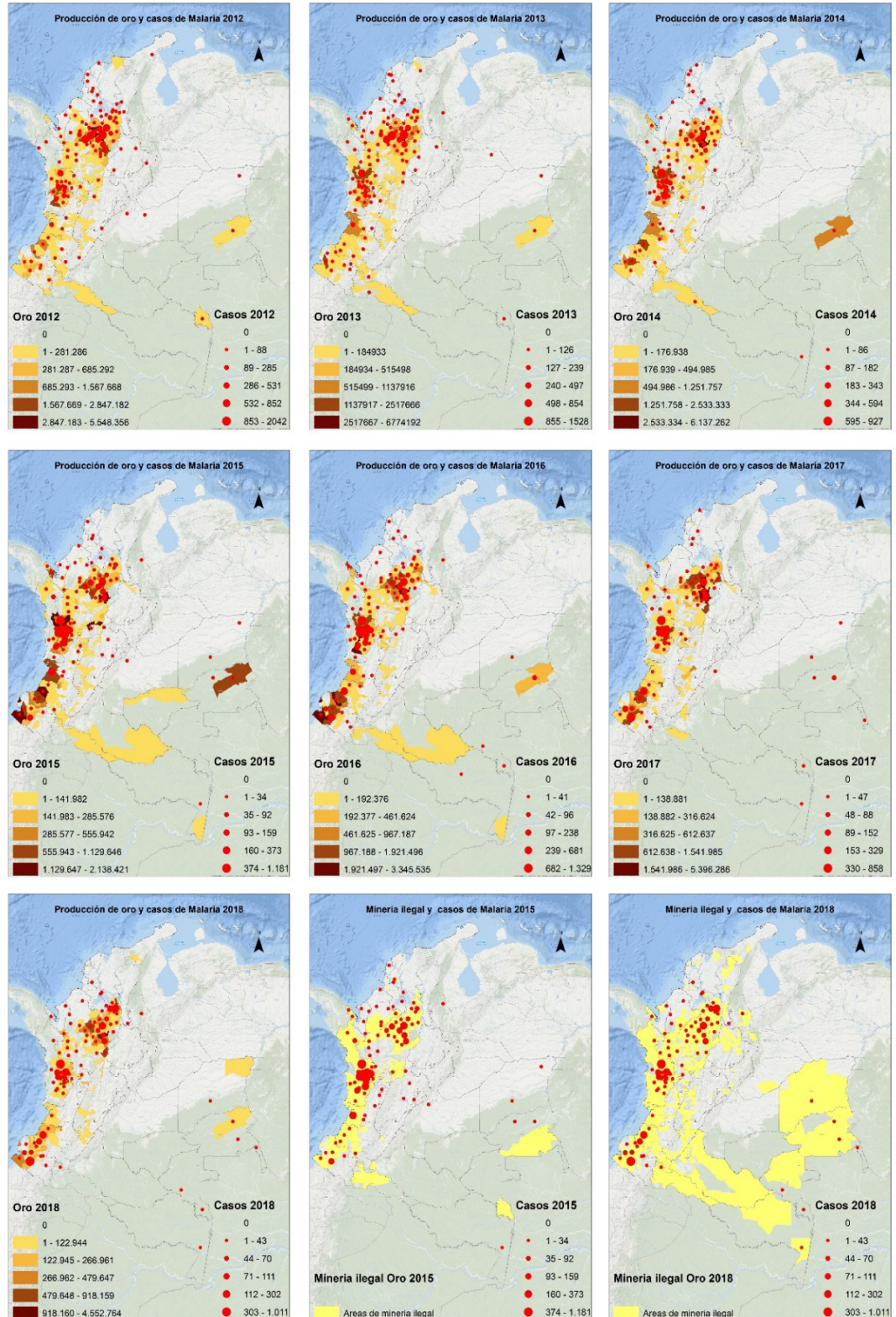
Los departamentos de Chocó, Antioquia, Bolívar y Nariño registraron el 90,5 % de los casos de malaria no complicada en población minera. El riesgo epidemiológico de malaria para los 214 municipios con este tipo de casos en el 2012, fue de 2,5 casos por cada 1.000 habitantes en riesgo (población del área rural) y, en el 2018, fue de un caso por cada 1.000 habitantes en riesgo. Los casos se concentraron en la población masculina, con 38.479 casos (87,3 %). La distribución por edad mostró que el grupo de 20 a 24 años fue el más afectado con 8.506 casos (19,3 %); seguido del grupo de 25 a 29 años con 8.231 casos (18,6 %). En cuanto a la pertenencia étnica, 20.574 casos (el 46,7 %) se notificaron como población afrocolombiana; en la población indígena, por su parte, la notificación fue solo de 1.322 casos (el 0,03 %) y 22.046 (51,1 %) casos no correspondían a ninguna población étnica específica.

Según lo reportado por la Agencia Nacional de Minería, los municipios de El Bagre, Segovia y Remedios en Antioquia, y Quibdó en Chocó, son los de mayor extracción legal de oro del país. Sin embargo, en las mismas zonas donde se realiza esta actividad de forma legal, con el pasar de los años se ha percibido un aumento de la minería ilegal, especialmente en el Pacífico y la Amazonia. En estos mismos municipios se registraron casos de malaria, siendo los de mayor número de casos acumulados Quibdó (Chocó) con 5.958 casos, El Bagre (Antioquia) con 4.979 casos y Barbacoas (Nariño) con 2.937 casos (figura 2).

En el análisis de correlación lineal de Pearson, se encontró una posible correlación lineal positiva moderada, con un coeficiente  $R^2$  de 0,5, lo que nos indicaría que se espera que, a mayor producción minera de oro, mayor sea el número de casos de malaria en la población minera; los datos presentaron una alta dispersión, siendo los municipios de El Bagre, Segovia, Remedios y Quibdó los de mayor producción de oro durante los años del estudio, por encima del millón de gramos por año (figura 3).

En cuanto al análisis estadístico espacial, se aplicó el índice global de Moran para verificar el patrón espacial de los casos de malaria que mide la autocorrelación espacial basada en las ubicaciones y los valores de las entidades simultáneamente, y evalúa si el patrón expresado está agrupado, disperso o es aleatorio. El índice global de Moran indicó una agrupación espacial significativa de los casos de malaria en población minera; la autocorrelación espacial evidenció un grupo bajo-bajo en la región del Caribe y centro del país, y es importante aclarar que en estas zonas se presentó el 0,05 % de los casos de malaria en población minera; además, otro grupo alto-alto y otro alto-bajo, con el 81,9 % del total de los casos analizados (36.065/44.032 casos) ubicado en el 19,2 % de los municipios con casos de malaria (42/214 municipios).

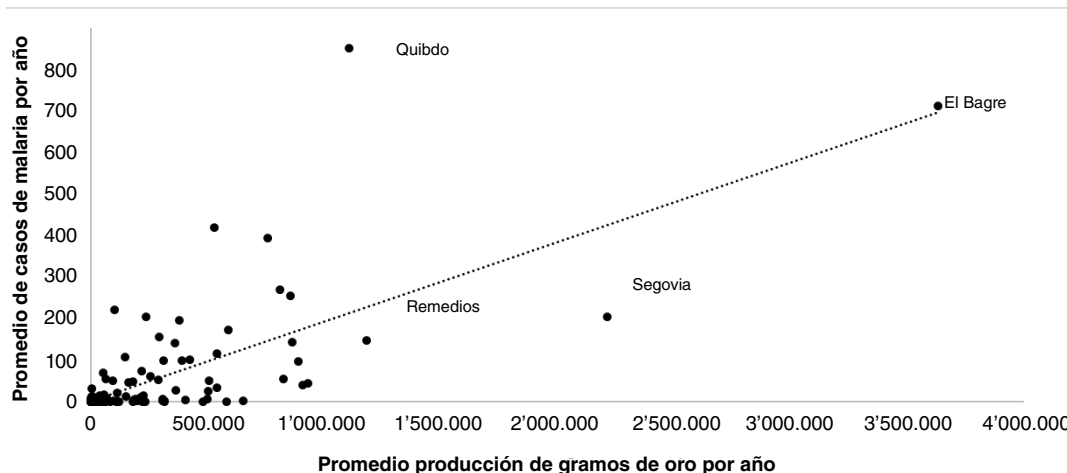
Dada la puntuación Z de 11,69, este resultado evidenció que existe una probabilidad menor del 1 % de que el patrón de agrupación pueda ser producto de una verosimilitud aleatoria, por lo tanto, los datos estadísticos permiten afirmar que los casos de malaria siguieron un patrón de distribución agregado (figura 4).



Fuente: Sivigila, Instituto Nacional de Salud y SIMEC, Unidad de Planeación Minero-Energética, Colombia

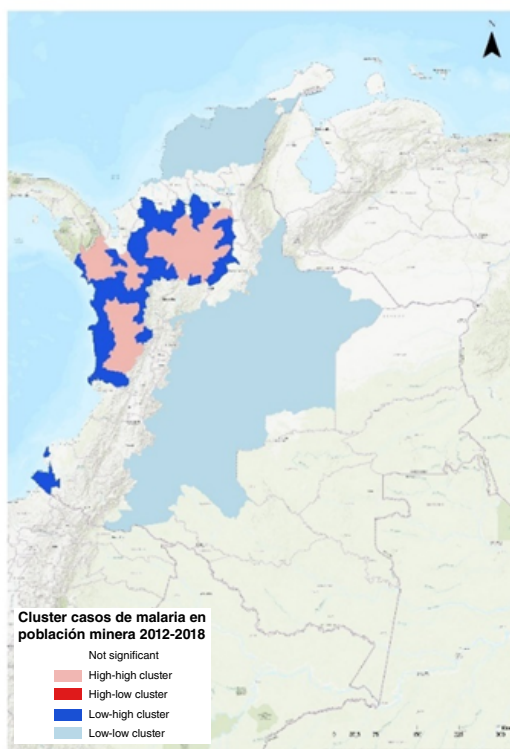
**Figura 2.** Distribución de casos de malaria, producción de gramos de oro por municipio y municipios con reporte de minería ilegal, Colombia, 2012-2018





Fuente: Sivigila, Instituto Nacional de Salud y SIMEC, Unidad de Planeación Minero-Energética, Colombia

**Figura 3.** Dispersión de producción minera de oro y casos de malaria en población minera, Colombia, 2012-2018



Fuente: Sivigila, Instituto Nacional de Salud, Colombia

**Figura 4.** Distribución del análisis de conglomerados y valores atípicos (Anselin Local Moran I) para casos de malaria en población minera en Colombia, 2012-2018

### Discusión

El objetivo del estudio era describir la situación de la malaria en la población con ocupación minera en Colombia entre el 2012 y el 2018. Según los resultados obtenidos, se pudo establecer una posible correlación entre la explotación minera de oro y los casos de malaria, lo que permite inferir los datos a los individuos que habitan en los municipios con casos de malaria y con explotación de oro. En algunos estudios en países donde se practica la minería, como Brasil, se ha encontrado una asociación entre la extracción de oro y el incremento en la incidencia parasitaria anual (14).

En el mapeo de las zonas mineras del país, se estableció una mayor frecuencia de población con malaria en el Pacífico colombiano, con una posible correlación lineal positiva moderada en algunos municipios de esta región. En un estudio del Observatorio Nacional de Salud en el Chocó, el departamento con mayor producción aurífera del país, se encontró una importante asociación entre los casos de malaria y la producción de oro (15). En otro estudio similar, se ubicaron las minas de oro ilegales mediante datos satelitales del país y estos coincidieron con informes oficiales sobre casos de malaria, lo que sugiere que cuando un área contiene minas de oro ilegales en una hectárea, aumenta el índice parasitario anual (16).

En el presente estudio, se estableció que el 87 % de los casos se dio en hombres, y el 38 % eran personas en la etapa productiva, con edades entre los 20 y los 29 años; esta característica es frecuente en las actividades mineras que requieren de gran esfuerzo físico. Algunos estudios sugieren que los hombres tienen un riesgo mayor de presentar malaria, lo que probablemente se relaciona con factores que afectan la exposición al mosquito, como la extracción minera de oro a cielo abierto (15).

Además, el 12,8 % de la población es mayor de 50 años, un grupo de edad que se encuentra al final de su etapa productiva; también, se estableció la presencia de mujeres, niños y adolescentes que registraron la minería como su principal ocupación y, a veces, como su única fuente de sustento, debido a la baja escolaridad y la ausencia de afiliación a la seguridad social, perpetuando esta forma de vida para las siguientes generaciones (17). Además, la falta de medidas eficaces de control, su desconocimiento cuando las hay, la proximidad de su alojamiento y la migración propia de estos trabajadores, contribuyen a la propagación de enfermedades como la malaria (8).

Según el censo nacional minero de 2010-2011, de 4.133 minas de oro censadas, solo 549 (13,3 %) poseían título minero, por lo que esta actividad en el país la desarrollan mayoritariamente mineros artesanales sin formalización laboral (17), factor que dificulta el acceso a los servicios de salud porque no están afiliados al sistema general de seguridad social en salud y tiene implicaciones a la hora de acceder al tratamiento oportuno; además, se ha establecido que las personas con mayor número de necesidades básicas insatisfechas tienen mayor riesgo de presentar malaria (15).

El descenso en la notificación de los casos al Sivigila en el periodo evaluado podría atribuirse a un subregistro y a la ausencia del reporte porque la vigilancia epidemiológica es pasiva (18). En un estudio de captura y recaptura, se evidenció un subregistro del 80 % en la notificación de este evento (19), lo que subraya la necesidad de mejorar los procesos de capacitación del personal encargado de la recopilación de datos, mediante la implementación de cursos regulares, el fortalecimiento de los procedimientos de sensibilización y la presentación oportuna de informes (20).

El presente estudio entrega un panorama de la situación actual de la malaria en la población minera y se puede inferir que los casos siguen un patrón de distribución agregado. Se recomienda hacer un estudio de cohortes en las zonas afectadas que permita establecer una relación directa entre la explotación minera y la presentación de casos de malaria. Los resultados que aquí se reportan podrían emplearse como punto de partida para la construcción de una política pública coherente y estructurada, que involucre de forma integral aspectos ambientales, sociales, económicos, laborales, de salud pública y ocupacional con énfasis en poblaciones vulnerables ante la evidente

desarticulación institucional que se presenta en torno al fenómeno de la minería ilegal en el país (10). Se debe tener en cuenta el contexto actual de las personas ocupadas en la minería con énfasis en la sensibilización frente al riesgo, y el fortalecimiento de las actividades de promoción, prevención, detección precoz y oportunidad del tratamiento en esta población a partir de su contexto particular.

### Agradecimientos

A la Fundación Universitaria del Área Andina, por el acompañamiento en este proceso.

### Referencias

1. Instituto Nacional de Salud. Guía Protocolo para la Vigilancia en Salud Pública de Malaria. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2010. Fecha de consulta: 30 de julio de 2020. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/Documents/Salud%20P%C3%BAblica/Ola%20invernal/Protocolo%20Vigilancia%20MALARIA.pdf>
2. Organización Mundial de la Salud. Estrategia técnica mundial contra la malaria. Informe técnico. Ginebra: OMS, Programa mundial sobre el paludismo; 2016. Fecha de consulta: 30 de julio de 2020. Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/186671/9789243564999\\_spa.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/186671/9789243564999_spa.pdf?sequence=1)
3. Conn JE, Sallum M, Correa MM, Grillet ME. Malaria transmission in South America—Present status and prospects for elimination. En: Manguin S, Dev V, editors. Towards malaria elimination—A leap forward. Intech Open; 2018. Fecha de consulta: 30 de julio de 2020. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/towards-malaria-elimination-a-leap-forward/malaria-transmission-in-south-america-present-status-and-prospects-for-elimination>
4. Peace Brigades International Colombia. Minería en Colombia: ¿A qué precio? PBI Colombia. Boletín informativo N° 18. noviembre de 2011. Fecha de consulta: 30 de julio de 2020. Disponible en: [https://www.peacebrigades.org/fileadmin/user\\_files/projects/colombia/files/colomPBIa/111122\\_boletin\\_final\\_web.pdf](https://www.peacebrigades.org/fileadmin/user_files/projects/colombia/files/colomPBIa/111122_boletin_final_web.pdf)
5. Defensoría del Pueblo de Colombia. Informe especial: economías ilegales, actores armados y nuevos escenarios de riesgo en el posacuerdo. Bogotá, D.C.: Defensoría del Pueblo de Colombia; 2018. Fecha de consulta: 23 de julio de 2020. Disponible en: <https://www.defensoria.gov.co/public/pdf/economiasilegales.pdf>
6. Ministerio de Salud de Perú, USAID. Impacto económico de la malaria en el Perú. Fecha de consulta: 10 de agosto de 2020. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1763.pdf>
7. El País. 80% de la minería en Colombia es ilegal, alerta la Contraloría. Publicado el 19 de octubre, 2017. Fecha de consulta: 3 de agosto de 2020. Disponible en: <https://www.elpais.com.co/medio-ambiente/contraloria-revela-que-80-de-la-mineria-en-colombia-es-ilegal-y-esta-arrasando-el-pais.html>
8. Castellanos A, Chaparro-Narváez P, Morales-Plaza CD, Alzate A, Padilla J, Arévalo M, *et al.* Malaria in gold-mining areas in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016;111:59-66. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150382>
9. Pommier de Santi V, Djossou FC, Barthes N, Bogreau HC, Hyvert G, Nguyen C, *et al.* Malaria hyperendemicity and risk for artemisinin resistance among illegal gold miners, French Guiana. Emerg Infect Dis. 2016;22:903-6. <https://doi.org/10.3201/eid2205.151957>
10. Procuraduría General de la Nación de Colombia. Minería ilegal en Colombia. Informe preventivo. Informe técnico. Bogotá; 2011. Fecha de consulta: 3 de agosto de 2020. Disponible en: <https://www.procuraduria.gov.co/portal/media/file/mineria/ilegal/en/colombia/20/20documento.pdf>
11. Instituto Nacional de Salud. Portal Sivigila, microdatos. Fecha de consulta: 5 de agosto de 2020. Disponible en: <http://portalsivigila.ins.gov.co/>
12. SIMEC. Unidad de Planeación Minero-Energética UPME mapas geológicos, minería de metales. Fecha de consulta: 5 de agosto de 2020. Disponible en: <http://www.simec.gov.co/Mapas/MapasdeMineria/tabid/68/Default.aspx>
13. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Datos Abiertos Cartografía y Geografía - GEOPORTAL. Colombia, 2018. Fecha de consulta: 9 de agosto de 2020. Disponible en: <https://geoportal.igac.gov.co/es/contenido/dahttps://geoportal.igac.gov.co/es/contenido/datos-abiertos-cartografia-y-geografias-abiertos-cartografia-y-geografia>



14. Duarte EC, Fontes CJ. Asociación entre la extracción anual de extracción de oro reportada y la incidencia de malaria en Mato Grosso-Brasil, 1985-1996. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35:665-8.
15. Chocontá LA, Díaz DP. Minería de oro y aumento de la malaria: ¿qué ocurre en Chocó? 2007-2014. Policy Brief. Observatorio Nacional de Salud. Fecha de consulta: 16 de septiembre de 2020. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/Direcciones/ONS/Guas%20Mediadoras%20de%20Conocimiento/Policy%20brief%20miner%C3%ADa%20y%20malaria%20en%20choc%C3%B3.pdf>
16. Rozo SV. Unintended effects of illegal economic activities: Illegal gold mining and malaria. *World Development.* 2020;136. <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2020.105119>.
17. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Sinopsis nacional de la minería aurífera artesanal y de pequeña escala. Bogotá: MADS, PNUMA, 2012. Fecha de consulta: 16 de septiembre de 2020. Disponible en: [https://www.minambiente.gov.co/images/AsuntosAmbientalesySectorialyUrbana/pdf/mercurio/Sinopsis\\_Nacional\\_de\\_la\\_ASGM.pdf](https://www.minambiente.gov.co/images/AsuntosAmbientalesySectorialyUrbana/pdf/mercurio/Sinopsis_Nacional_de_la_ASGM.pdf)
18. Chaparro-Narváez PE, López-Pérez M, Rengifo LM, Padilla J, Herrera S, Arévalo-Herrera M. Aspectos clínicos y epidemiológicos de la malaria complicada en Colombia, 2007-2013. *Malar J.* 2016;15:269. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1323-5>
19. Orjuela LI, Herrera M, Erazo H, Quiñones ML. Especies de *Anopheles* presentes en el departamento del Putumayo y su infección natural con *Plasmodium*. *Biomédica.* 2013;33:42-52. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i1.619>
20. Quintero L, López MB, Ramírez H, Castaño JC. Descripción de un brote epidémico de malaria en una comunidad indígena asentada en la zona urbana de Armenia, Colombia, 2012. *Biomédica* 2015;35:24-33. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i1.2195>

Brief communication

## Natural infection with *Trypanosoma cruzi* in bats captured in Campeche and Yucatán, México

Marco Torres-Castro<sup>1</sup>, Naomi Cuevas-Koh<sup>1</sup>, Silvia Hernández-Betancourt<sup>2</sup>, Henry Noh-Pech<sup>1</sup>, Erendira Estrella<sup>2</sup>, Belén Herrera-Flores<sup>2</sup>, Jesús A. Panti-May<sup>1</sup>, Etienne Waleckx<sup>1,5</sup>, Javier Sosa-Escalante<sup>3</sup>, Ronald Peláez-Sánchez<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, Campus de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México

<sup>2</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México

<sup>3</sup> Laboratorio DYMIGEN, Mérida, México

<sup>4</sup> Grupo de Investigación en Ciencias Básicas, Escuela de Graduados, Universidad CES, Medellín, Colombia

<sup>5</sup> Institut de Recherche pour le Développement, UMR INTERTRYP IRD, CIRAD, Université de Montpellier, Montpellier, France

**Introduction:** Bats have been reported as hosts of the *Trypanosoma cruzi* protozoan, the etiologic agent of American trypanosomiasis, an endemic zoonotic disease in México.

**Objective:** To describe *T. cruzi* infection in bats from the states of Campeche and Yucatán, México.

**Materials and methods:** Captures were made from March to November, 2017, at three sites in Yucatán and one in Campeche. Up to four mist nets on two consecutive nights were used for the capture. The bats' species were identified and euthanasia was performed to collect kidney and heart samples for total DNA extraction. *Trypanosoma cruzi* infection was detected by conventional PCR with the amplification of a fragment belonging to the *T. cruzi* DNA nuclear.

**Results:** Eighty-six bats belonging to five families (Vespertilionidae, Noctilionidae, Mormoopidae, Phyllostomidae, and Molossidae) and 13 species (*Rhogeessa aeneus*, *Noctilio leporinus*, *Pteronotus davyi*, *P. parnellii*, *Artibeus jamaicensis*, *A. lituratus*, *A. phaeotis*, *Glossophaga soricina*, *Carollia sowelli*, *Chiroderma villosum*, *Uroderma bilobatum*, *Sturnira parvidens*, and *Molossus rufus*) were captured. Infection frequency by PCR was 30,2% (26/86) detected only in the renal tissue. The infected species were *P. parnellii*, *G. soricina*, *A. lituratus*, *A. jamaicensis*, *S. parvidens*, *C. villosum*, and *R. aeneus*.

**Conclusions:** Our results confirmed the participation of several bat species as hosts in the *T. cruzi* transmission cycle in the region. Further studies are necessary to establish the importance of these animals in the zoonotic transmission of *T. cruzi*.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*; Chiroptera; infections; polymerase chain reaction; México.

### Infección natural con *Trypanosoma cruzi* en murciélagos capturados en Campeche y Yucatán, México

**Introducción.** Los murciélagos se han reportado como huéspedes del protozoario *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la tripanosomiasis americana, enfermedad zoonótica endémica en México.

**Objetivo.** Describir la infección con *T. cruzi* en murciélagos capturados en los estados de Campeche y Yucatán, México.

**Materiales y métodos.** Se realizaron capturas de marzo a noviembre de 2017 en tres sitios de Yucatán y uno de Campeche. Para la captura se emplearon hasta cuatro redes de niebla por dos noches consecutivas. Se identificó la especie de los murciélagos capturados y se les practicó la eutanasia para recolectar muestras de riñón y corazón, utilizadas posteriormente en la extracción de ADN total. La infección con *T. cruzi* se detectó por la amplificación con PCR convencional de un fragmento perteneciente al ADN nuclear de *T. cruzi*.

**Resultados.** Se capturaron 86 murciélagos pertenecientes a cinco familias (Vespertilionidae, Noctilionidae, Mormoopidae, Phyllostomidae, Molossidae) y 13 especies (*Rhogeessa aeneus*, *Noctilio leporinus*, *Pteronotus davyi*, *P. parnellii*, *Artibeus jamaicensis*, *A. lituratus*, *A. phaeotis*, *Glossophaga soricina*, *Carollia sowelli*, *Chiroderma villosum*, *Uroderma bilobatum*, *Sturnira parvidens* y *Molossus rufus*). La PCR mostró una frecuencia de infección de 30,2 % (26/86), detectada únicamente en tejido renal. Las especies infectadas fueron *P. parnellii*, *G. soricina*, *A. lituratus*, *A. jamaicensis*, *S. parvidens*, *C. villosum* y *R. aeneus*.

**Conclusiones.** Los resultados confirmaron la participación de varias especies de murciélagos como huéspedes en el ciclo de transmisión de *T. cruzi* en la región. Es necesario realizar más estudios para determinar la importancia de estos animales en la transmisión zoonótica de *T. cruzi*.

**Received:** 07/04/2020

**Accepted:** 12/11/2020

**Published:** 25/11/2020

#### Citation:

Torres-Castro M, Cuevas-Koh N, Hernández-Betancourt S, Noh-Pech H, Estrella E, Herrera-Flores B, et al. Natural infection with *Trypanosoma cruzi* in bats captured in Campeche and Yucatán, México. Biomédica. 2021;41(Supl. 1):131-40. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5450>

#### Corresponding author:

Marco Antonio Torres-Castro, Av. Itzáes No. 490 x 59, 97000, Mérida, Yucatán, México  
Teléfono: (999) 924 5809; fax: (999) 923 6120  
antonio.torres@correo.uady.mx

#### Author contributions:

Marco Torres-Castro: Study design, fieldwork, interpretation of results, and manuscript writing  
Naomi Cuevas-Koh: Fieldwork, laboratory work, laboratory interpretation, and manuscript writing  
Silvia Hernández-Betancourt: Study design and fieldwork

Henry Noh-Pech: Laboratory work, bioinformatic analysis, and interpretation of results  
Erendira Estrella, Belén Herrera-Flores, Jesús A. Panti-May and Etienne Waleckx: Study design and fieldwork

Javier Sosa-Escalante: Bioinformatic analysis  
Ronald Peláez-Sánchez: Bioinformatic analysis and interpretation of results

All authors participated in manuscript revision.

#### Funding:

The capture of bats and the biological sampling were financed by the project *Análisis y evaluación de los probables vectores y reservorios del virus del Ébola en México* (CONACYT-251053).

#### Conflicts of interest:

The authors declare that no conflicts of interest exist.

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*; quirópteros; infecciones; reacción en cadena de la polimerasa; México.

*Trypanosoma cruzi* (of the order Kinetoplastida) is a protozoan parasite recognized as the causative agent of Chagas disease or American trypanosomiasis, zoonotic disease with relevance in areas with poverty conditions and social inequality mainly in Central American countries (1).

In México, approximately 1,100,000 people may be infected with *T. cruzi* and 29,500,000 are at risk of infection (2). The Yucatán Peninsula (in the southeast of México), which includes the states of Campeche, Yucatán, and Quintana Roo, is an area with numerous cases, mostly due to the high abundance of *Triatoma dimidiata* in the peridomestic environment and eventually inside houses (3). According to the Mexican *Dirección General de Epidemiología* of the *Secretaría de Salud*, in 2017 seven cases of chronic American trypanosomiasis were registered in Campeche while 86 cases of chronic American trypanosomiasis and one of the acute form were registered in Yucatán (4).

*Trypanosoma cruzi* infects more than 400 species of mammals (5). The most important natural reservoirs are armadillos, wild rodents, and opossums that help to support the wild transmission cycle (1,6). Other animals such as dogs (7), pigs, sheep, horses (8), and synanthropic rodents (9,10) have also been described as *T. cruzi* accidental hosts.

Bats are the second most diverse group (after rodents) of mammals worldwide and they are distributed in all natural areas in México (11). These animals have ecological and commercial relevance because they are consumers of insects known as pests and they pollinate plants used in products for human consumption (12). However, bats are also recognized as natural reservoirs of different viruses (13) and accidental hosts of bacteria (14) and parasites (15) of relevance for public and animal health.

Several studies have reported the involvement of bats in the *T. cruzi* transmission cycle, which has led to the formulation of the hypothesis that they are parasite ancestral hosts. Later, the parasite was genetically diversified and adapted to other vertebrate hosts (16). On the American continent, investigations with bats from Ecuador (17), Colombia (18), Argentina (19), México (20), and the United States of America (21) have been conducted where the importance of these mammals in the transmission risk of *T. cruzi* to other animals and human populations has been documented (17-21). In this context, our study aimed to describe *T. cruzi* infection in bats from Campeche and Yucatán, México, to contribute to the understanding of the intervention of bats in the *T. cruzi* transmission cycle.

## Materials and methods

### Study sites

Captures were carried out in three sites in Yucatán state and one in Campeche, México. The sites were selected for their easy access on roads close to highways and the necessary infrastructure (electricity, clean running water, and ventilated rooms) to set up a field station.

Site I (Hobonil Ranch) was located in Tzucacab municipality, Yucatán (20° 01' 00.9 " N and 89° 01' 11.8" W) and has a warm sub-humid climate with rainfall during summer and little thermal oscillation. Its average annual

temperature is 26,1° C, average annual rainfall, 1,097 mm, and average elevation, 40 m above mean sea level (mamsl) (22). The ranch's vegetation is composed of medium sub-deciduous forest areas with different uses and areas with introduced species for pasture and forage (23).

Site II (*Ich Ha Lol Xaan* Recreational and Ecotourism Center) was located in the town of Hampolol, Campeche (19° 56' 16" N and 90° 22' 21" W). Its climate is tropical with rains in summer, an average annual temperature of 26,6° C, and an average annual rainfall of 1,088 mm. The average elevation is 10 mamsl and the vegetation is composed of several types of tropical forests (medium sub-deciduous, medium sub-evergreen, and low flood sub-evergreen), aquatic, and secondary vegetation (24).

Site III (San Francisco Ranch) was located in Panabá municipality, Yucatán (21° 21' 48.2" N and 88° 19' 23.6" W). It has a warm sub-humid climate with rains in summer, an average annual temperature of 25,6° C, and an average annual rainfall of 1,049 mm. The average elevation is 17 mamsl (25) and the vegetation is predominantly deciduous rainforest; however, due to agricultural and livestock activities, it has been profoundly transformed (26).

Site IV (Campus of Biological and Agricultural Sciences) was located in the Cuxtal Ecological Reserve, Mérida, Yucatán (20° 52' 02" N and 89° 37' 29" W). The climate is warm sub-humid with rains in summer, an average annual temperature of 26° C, and an average annual rainfall of 984,4 mm. The average elevation is 10 mamsl (27). The surface is mainly covered with secondary vegetation in different stages of regeneration (85 % of the total area) while the rest (15 %) is land with agricultural (cornfields, grasslands, henequenals, or other crops) or livestock uses, family gardens, streets, and houses (28).

### **Bat captures**

The captures were carried out in March (site I), May (site II), August (site III), and November (site IV) 2017. Up to four mist nets (12 m wide x 2,5 m high) were installed on each study site in two consecutive nights, situated around bodies of water, fruit trees, cave entrances, or abandoned buildings. The nets were open from 6:00 p.m. to 11:00 p.m. and checked every 20-30 min (depending on the bats activity). All the captured bats were removed from the nets and were placed in a cloth bag. Subsequently, they were transported to the field station.

### **Individual variables register and biological samples conservation**

At the field station, euthanasia was performed in all the studied bats following the guidelines described by the American Veterinary Medical Association (29). Subsequently, we identified the species of each captured individual as described by Medellín, *et al.* (30), and Reid (31) and we registered their sex (male or female), reproductive status (mature or immature; in males, mature bats were individuals with descended testicles; in females, mature bats were pregnant or with alopecia areas around the nipples), and age (juvenile or adult, according to Torres-Castro, *et al.* (15)).

Heart (atria and ventricles) and kidney (cortex and pelvis) fragments from each bat were collected and deposited in a 1.5 ml microcentrifuge vial (Eppendorf™, Germany) with 99% ethanol. All the samples were stored at 4° C and transferred to the *Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes* at the *Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi"* of *Universidad Autónoma de Yucatán* where they were stored at -80° C until their use for total genomic DNA extraction.

### **Total DNA extraction and quantification**

Before the total DNA extraction, all tissues were washed to remove excess alcohol. Then, 25 mg of heart or kidney cut into small fragments were embedded in 25  $\mu$ l of proteinase K (Omega Bio-tek Inc., USA) and lysis buffer; the mixture was incubated at 56° C overnight. Using a commercial kit (DNeasy Blood & Tissue Kit™, QIAGEN, Germany) and following the manufacturer's specifications. DNA extraction was performed on 86 hearts and 70 kidneys (it was not possible to collect the kidney samples from the bats from site I, Hobonil Ranch). The extracted DNA was evaluated on a spectrophotometer (NanoDrop2000™, Thermo Scientific, USA) and then stored at -79° C.

### **Detection of *Trypanosoma cruzi* infection**

The *T. cruzi* detection was performed on all collected tissues by conventional PCR using the oligonucleotides TCZ1 and TCZ2, which amplify a tandem repeated fragment of 188 base pairs (bp) belonging to a region of the nuclear DNA of *T. cruzi* (32).

The molecular reaction included the following reagents (final concentrations): 1X PCR buffer, 2,5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0,2  $\mu$ M of each oligonucleotide, 1 U Taq polymerase (Thermo Scientific, USA), 0,2 mM of dNTP's, 3  $\mu$ l of template DNA (heart or kidney), and molecular biology grade water sufficient for 25  $\mu$ l (final volume). The conditions in the thermal cycler were a five-minute stage at 94° C followed by 35 cycles of ten seconds at 94° C, 30 seconds at 55° C, and 30 seconds at 72° C. The final extension was for five minutes at 72° C.

All reactions included positive (genomic DNA extracted from rodent organs experimentally infected with a *T. cruzi* lineage I) and negative controls (all reaction reagents but with no template DNA). Electrophoresis was performed on 1% agarose gels stained with ethidium bromide. The gels were then visualized in a photo-documentation system (Bio-Rad, USA) to record the results.

### **Statistical analysis**

We used descriptive statistics to determine the *T. cruzi* infection frequency and the frequency of each variable (age, sex, and reproductive condition) collected in the studied bats. Additionally, we explored the association strength of each variable with the infection frequency using a chi-square test ( $\chi^2$ ). Data were analyzed on the Epiinfo™ program (version 7.2.3.0) (CDC, USA);  $p < 0,05$  was considered the value of statistical significance.

### **Bioethical guidelines**

The Mexican *Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales* approved the extraction of the captured animals (minutes SGPA/DGVS/03705/17 and SGPA/DGVS/01186/17). The Bioethics Committee of the *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia* (minutes CB-CCBA-I-2018-001) approved the capture, sacrifice, and biological sampling of the studied bats.

### **Results**

Eighty-six bats of 13 different species belonging to five families were captured. Table 1 shows the family with the greatest richness: Phyllostomidae with eight distinct species and the species with the highest number of individuals captured: *A. jamaicensis*, present in all study sites.

PCR results showed an overall infection rate of 30.2% (26/86). All positive reactions corresponded to renal tissue extractions. The species with infected individuals were: *A. jamaicensis*, *G. soricina*, *C. villosum*, *P. parnellii*, *A. lituratus*, *R. aeneus*, and *S. parvidens*, each one with different infection frequencies according to the number of captured individuals for each species (table 1). Of the infected bats, 16 were captured at site III (61.5%) and 10 at site II (38.5%).

Table 2 shows the values and frequencies of the individual variables considered in the bat population under study, as well as those from bats infected with *T. cruzi*. The  $\chi^2$  test showed no significance for any of the evaluated cases ( $p>0.05$ ).

**Table 1.** Family, species, total number of captured and infected bats per study site in Yucatán and Campeche, Mexico

Family	Species	Site I	Site II	Site III	Site IV	N	Infected by species (n) (%)
		n	n	n	n		
Vespertilionidae	<i>Rhogeessa aeneus</i>	0	0	1	0	1	1 (100)
Noctilionidae	<i>Noctilio leporinus</i>	0	6	0	0	6	0 (0)
Mormoopidae	<i>Pteronotus davyi</i>	2	0	0	0	2	0 (0)
	<i>Pteronotus parnellii</i>	0	6	0	0	6	4 (66.7)
Phyllostomidae	<i>Artibeus jamaicensis</i>	6	7	12	20	45	10 (22.2)
	<i>Artibeus lituratus</i>	0	1	1	0	2	2 (100)
	<i>Artibeus phaeotis</i>	3	0	0	0	3	0 (0)
	<i>Glossophaga soricina</i>	0	1	3	1	5	4 (80)
	<i>Carollia sowelli</i>	0	2	0	0	2	0 (0)
	<i>Chiroderma villosum</i>	0	1	6	0	7	4 (57.1)
	<i>Uroderma bilobatum</i>	0	1	0	0	1	0 (0)
	<i>Sturnira parvidens</i>	0	1	0	0	1	1 (100)
Molossidae	<i>Molossus rufus</i>	5	0	0	0	5	0 (0)
Total		16	26	23	21	86	26

**Table 2.** Values and frequencies of the bats captured and infected with *Trypanosoma cruzi* in sites of Yucatán and Campeche, México

	Captured bats*		Bats infected with <i>Trypanosoma cruzi</i> **	
	n	%	n	%
Study sites				
I	16	(18.6)	0	(0)
II	26	(30.2)	10	(38.5)
III	23	(26.8)	16	(61.5)
IV	21	(24.4)	0	(0)
Sex				
Male	48	(55.8)	10	(38.5)
Female	38	(44.2)	16	(61.5)
Age				
Juvenile	28	(32.6)	8	(30.8)
Adults	58	(67.4)	18	(69.2)
Reproductive condition				
Active	50		12	(46.2)
Inactive	36		14	(53.8)

\* n=86

\*\* n=26

## Discussion

We captured individuals from five families and 13 species of bats, i.e., 20.3% of the total number of species found in the Yucatán Peninsula (33). The most abundant species by capture was *A. jamaicensis*, which is widely distributed in the Yucatán Peninsula as it is tolerant to ecosystem fragmentation and can colonize a wide variety of natural or artificial shelters (34).

In México, there are reports of *T. cruzi* natural infection in several bat species (20,35,36). In our study, five species were found to be infected in each state (Campeche and Yucatán) amounting to a total of seven distinct infected species in all the study sites. This diversity of infected species captured at specific sites underlines the need to evaluate *T. cruzi* distribution in the different epidemiological environments that could be influencing the transmission dynamics in bat populations, such as the abundance of other vertebrate hosts and the circulating species of insect vectors, as well as bat behavior and ecology (20,37,38).

In a first study conducted with bats from Molas, Yucatán, infection with *T. cruzi* was described in *A. jamaicensis*, *A. lituratus*, and *S. parvidens* (35). In this sense, our reports for *C. villosum*, *G. soricina*, and *R. aeneus* are the first in Yucatán. Additionally, in another study in bats from Calakmul, Campeche, *A. jamaicensis*, *A. lituratus*, *S. parvidens*, *S. ludovici*, *C. brevicauda*, and *Myotis keaysi* were found to be infected (20) while here we present unprecedented reports of *T. cruzi* infection in *P. parnellii* and *G. soricina* individuals captured in Campeche.

In a study on bats from Morelos (central México), *T. cruzi* infection was described in *A. jamaicensis*, *G. soricina*, *S. parvidens*, and *Choeronycteris Mexicana* (36). In the context of these findings and the results from studies on bats in Yucatán (35) and Campeche (20), we present here the first evidence of *T. cruzi* infection in *C. villosum* individuals captured in Mexico. Previously, *Pteronotus parnellii* had been reported as parasitized by *T. cruzi* in the state of Morelos (36).

At the international level, there are also reports of *T. cruzi* infection in bats of different genera. For example, in Colombia, infected individuals of *Carollia*, *Desmodus*, *Glossophaga*, *Noctilio*, *Peropteryx*, *Phyllostomus*, and *Artibeus* genera have been reported and *A. lituratus* and *C. villosum* species were suggested as *T. cruzi* accidental hosts (18), which coincides with our results. Likewise, in Ecuador, infections in individuals of *Artibeus* and *Myotis* genera and *G. soricina* species have been reported (17); this last species was also detected as infected in our study. In Brazil, *A. lituratus* and *G. soricina* were registered as accidental hosts for *T. cruzi* (39). In South America as well, specifically in Perú, infections in *Phyllostomus*, *Diaemus*, *Trachops*, and *Desmodus* specimens have been reported (37). However, none of these infected species coincide with those found in the bat population studied in Campeche and Yucatán, although it is important to note that not all species circulate in both study regions (Perú and México).

There are several hypotheses about *T. cruzi* transmission routes to bat populations. These mammals are usually established in caves, trees, or artificial constructions (buildings and houses), places where *T. dimidiata* and other triatomines, as those reported in Ecuador, such as *Cavernicola pilosa* (associated with *Myotis* sp.) and *Triatoma dispar* (associated with *Molossus molossus*) have been detected (17). *Cavernicola pilosa* has also been found in roost sites of at least nine bat species within five families (40,41).

These findings are relevant for human health because triatomines associated with bats species might opportunistically feed on and transmit trypanosomes to humans (17,38) and they also demonstrate that bats and triatomines share the same area and shelters considered to be restricted to sylvatic environments (17); therefore, there is a probability of *T. cruzi* vectorial transmission to bat populations (42,43).

In this context, in a study in which massive sequencing (12S RNA gene) was used to analyze the abdominal contents of 14 triatomines (*T. dimidiata*) collected in Yucatán, at least 14 species of vertebrate animals were described as food sources for these insects, among them, *Artibeus* bats; consequently, the authors concluded there is the probability that this bat genus participates in the stability of the *T. cruzi* transmission cycle contributing to the parasite enzootic expansion in the wild environments of the study region (5,16,44) since some *Artibeus* species (including *A. jamaicensis*) have been captured around and inside rural houses in the Yucatán Peninsula (35).

Infections in bat species belonging to the insectivorous trophic level may have been caused by the intake of triatomines hosting the parasite. Thomas, *et al.* (45), confirmed this in *Artibeus*, *Carollia*, *Glossophaga*, and *Molossus* individuals when triatomines experimentally infected with *T. cruzi* were given to them for consumption. Finally, *T. cruzi* transmission during the gestation period (vertical or congenital), or the lactation stage, has also been described in bats (46).

The presence of *T. cruzi* DNA was only detected in the renal tissue of the studied bats. Although unexpected, as *T. cruzi* usually invades the cardiac cells (1), this may be explained by many factors, among them, the virulence of infectious strain (19). In this context, in experimental conditions it has been shown that a limited distribution in the affected vertebrate hosts' organism can be generated depending on this characteristic (19,47,48). Likewise, *T. cruzi* did not persist in the cardiac tissue of experimentally infected mice (49,50).

Further studies are necessary to determine the infective strains in the bat populations of the region, as well as the distribution and the damage that the parasite may cause in organs and tissues (16). Infected bats with *T. cruzi* may have implications for public health (5,16,21,37) considering that *T. dimidiata* lodges in cracks or dark spaces in rural homes to feed on its inhabitants (42,43). In this respect, Ramírez, *et al.* (38) have shown through cloning and blood culture the infection with *T. cruzi* strains transmitted from bats to humans. Additionally, Villena, *et al.* (37), suggest that bats with chronic infections in their salivary glands can contaminate fruits and vegetables with viable parasites deposited in their saliva, which allows *T. cruzi* transmission to human populations and other susceptible animals through the intake of contaminated food.

## References

1. Carrada-Bravo T. *Trypanosoma cruzi*: historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Rev Mex Patol Clin. 2004;51:205-19.
2. Salazar-Schettino PM, Cabrera-Bravo M, Vázquez-Antona C, Zenteno E, De Alba-Alvarado M, Torres-Gutiérrez E, *et al.* Chagas disease in Mexico: Report of 14 cases of chagasic cardiomyopathy in children. Tohoku J Exp Med. 2016;240:243-9. <https://doi.org/10.1620/tjem.240.243>
3. Waleckx E, Camara-Mejia J, Ramírez-Sierra MJ, Cruz-Chan V, Rosado-Vallado M, Vázquez-Narváez S, *et al.* An innovative ecohealth intervention for Chagas disease vector control in Yucatán, México. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2015;109:143-9. <https://doi.org/10.1093/trstmh/tru200>
4. Dirección General de Epidemiología (DGE). Secretaría de Salud (SSA). Anuarios de morbilidad. Fecha de consulta: 12 de mayo del 2020. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/documentos/datos-abiertos-152127?idiom=es>
5. Nichols MD, Lord WD, Haynie ML, Brennan RE, Jackson VL, Monterroso WS. *Trypanosoma cruzi* in a Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*) in Oklahoma, USA. J Wildl Dis. 2019;55:444-8. <https://doi.org/10.7589/2018-04-095>



6. Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24:655-81. <https://doi.org/10.1128/CMR.00005-11>
7. Mejía A, Portugal-García C, Chávez-López V, García-Vázquez Z, Ramos C. Evidencia serológica de infección por *Trypanosoma cruzi* en perros atendidos en clínicas veterinarias del área conurbada de Cuernavaca, Morelos. *Salud Pública Mex*. 2017;59:205-6. <https://doi.org/10.21149/7945>
8. Ruiz-Piña H, Gutiérrez-Ruiz E, Escobedo-Ortegón F, Rodríguez-Vivas R, Bolio-González M, Ucan-Leal D. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* in backyard mammals from a rural community of Yucatán, México. *Trop Subtrop Agroecosystems*. 2018;21:367-71.
9. Panti-May JA, DE Andrade RRC, Gurubel-González Y, Palomo-Arjona E, Sodá-Tamayo L, Meza-Sulú J, et al. A survey of zoonotic pathogens carried by house mouse and black rat populations in Yucatán, México. *Epidemiol Infect*. 2017;145:2287-95. <https://doi.org/10.1017/S0950268817001352>
10. Ucan-Euan F, Hernández-Betancourt S, Arjona-Torres M, Panti-May A, Torres-Castro M. Estudio histopatológico de tejido cardíaco de roedores infectados con *Trypanosoma cruzi* capturados en barrios suburbanos de Mérida, México. *Biomédica*. 2019;39(Supl.2):32-43. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4192>
11. Sánchez O. Murciélagos de México. CONABIO. *Biodiversitas*. 1998;20:1-11.
12. Jones G, Jacobs DS, Kunz TH, Willig MR, Racey PA. *Carpe noctem*: The importance of bats as bioindicators. *Endanger Species Res*. 2009;8:93-115. <https://doi.org/10.3354/esr00182>
13. Hui-Ju H, Hong-Ling W, Chuan-Min Z, Fang-Fang C, Li-Mei L, Jian-Wei L, et al. Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases. *Virus Res*. 2015;205:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.05.006>
14. Torres-Castro M, Febles-Solís V, Hernández-Betancourt S, Noh-Pech H, Estrella E, Peláez-Sánchez R, et al. *Leptospira* patógenas en murciélagos de Campeche y Yucatán, México. *Rev MVZ Cordoba*. 2020;25:e1815. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1815>
15. Torres-Castro M, Muñoz-Dueñas D, Hernández-Betancourt S, Bolio-González M, Noh-Pech H, Peláez-Sánchez R, et al. Infección con *Toxoplasma gondii* (Eucoccidiorida: Sarcocystidae) en murciélagos de Campeche y Yucatán, México. *Rev Biol Trop*. 2019;67:633-42. <https://doi.org/10.15517/rbt.v67i2.35147>
16. Pinto CM, Kalko EKV, Cottontail I, Wellinghausen N, Cottontail VM. TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. *Infect Genet Evol*. 2012;12:1328-32. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.013>
17. Pinto CM, Ocaña-Mayorga S, Tapia EE, Lobos SE, Zurita AP, Aguirre-Villacís F, et al. Bats, Trypanosomes, and Triatomines in Ecuador: New insights into the diversity, transmission, and origins of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease. *PLoS ONE*. 2015;10:e0139999. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139999>
18. Marinkelle CJ. Prevalence of *Trypanosoma cruzi*-like infection of Colombian bats. *Ann Trop Med Parasitol*. 1982;76:125-34. <https://doi.org/10.1080/00034983.1982.11687517>
19. Argibay HD, Orozco MM, Cardinal MV, Rinas MA, Arnaiz M, Mena-Segura C, et al. First finding of *Trypanosoma cruzi* II in vampire bats from a district free of domestic vector-borne transmission in northeastern Argentina. *Parasitology*. 2016;143:1358-68. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000925>
20. López-Cancino SA, Tun-Ku E, De la Cruz-Felix HK, Ibarra-Cerdeña CN, Izeta-Alberdi A, Pech-May A, et al. Landscape ecology of *Trypanosoma cruzi* in the southern Yucatan Peninsula. *Acta Trop*. 2015;151:58-72. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.021>
21. Hodo CL, Goodwin CC, Mayes BC, Mariscal JA, Waldrup KA, Hamer SA. Trypanosome species, including *Trypanosoma cruzi*, in sylvatic and peridomestic bats of Texas, USA. *Acta Trop*. 2016;164:259-66. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.013>
22. Secretaría de Fomento Económico (SEFOE). Tzucacab. Fecha de consulta: 10 de agosto del 2019. Disponible en: <http://www.sefoe.yucatan.gob.mx/secciones/ver/tzucacab>
23. Martínez-Noble JI, Meléndez-Ramírez V, Delfín-González H, Pozo C. Mariposas de la selva mediana subcaducifolia de Tzucacab, con nuevos registros para Yucatán, México. *Rev Mex Biodivers*. 2015;86:348-57. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.04.010>
24. Gutiérrez-Báez C, Zamora-Crescencio P, Puc-Garrido E. Estructura y composición florística de la selva mediana subperennifolia de Hampolol, Campeche, México. *For Ver*. 2013;15:1-8.

25. Secretaría de Fomento Económico (SEFOE). Panabá. Fecha de consulta: 10 de agosto del 2019. Disponible en: <http://www.sefoe.yucatan.gob.mx/secciones/ver/panaba>
26. Magaña-Rueda S, Santos-Flores J, Castillo-Caamal J. Identificación y uso de la vegetación nativa en ranchos de doble propósito en el Oriente de Yucatán. *Bioagrociencias*. 2015;8:17-22.
27. Simei M, Campos B, Jiménez-Osornio J, Barrientos MR. Fenología y producción de frutos de plantaciones de siricote (*Cordia dodecandra* A. DC.) bajo tres tipos de manejo en X'matkuil, Yucatán, México. *Polibotánica*. 2016;41:115-31. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.41.8>
28. Panti-May JA, Hernández-Betancourt S, Ruiz-Piña H, Medina-Peralta S. Abundance and population parameters of commensal rodents present in rural households in Yucatan, Mexico. *Int Biodeter Biodegr*. 2012;66:77-81. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.10.006>
29. Leary S, Underwood W, Cartner S, Corey D, Grandin T, Greenacre C, *et al*. AVMA Guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition. Illinois (USA): American Veterinary Medical Association; 2013. p. 102.
30. Medellín RA, Arita WHT, Sánchez O. Identificación de los murciélagos de México: clave de campo. México: Asociación Mexicana de Mastozoología, A.C.; 1997. p. 83.
31. Reid F. A field guide to the mammals of America Central and Southeast México. Second edition. New York: Oxford University Press; 2009. p. 384.
32. Moser DR, Kirchoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1989;27:1477-82.
33. Sosa-Escalante JE, Hernández-Betancourt S, Pech-Canché JM, MacSwiney GCM, Díaz-Gamboa R. Los mamíferos del estado de Yucatán. *Rev Mexicana Mastozoo (Nueva Época)*. 2014;4:40-59. <https://doi.org/10.22201/ie.20074484e.2014.4.1.190>
34. Ortega J, Castro-Arellano I. *Artibeus jamaicensis*. *Mamm species*. 2001;662:1-9.
35. Córdova-Aldana D, Escobedo-Ortegón JE, Hernández-Betancourt S, Ruiz-Piña HA. Los murciélagos en el ciclo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* en el peridomicilio rural. En: Pacheco-Castro J, Lugo-Pérez JA, Tzuc-Canché L, Ruiz-Piña HA editores. *Estudios multidisciplinarios de las enfermedades zoonóticas y ETVs en Yucatán*. Mérida (México): Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán; 2013. p. 233-46.
36. Villegas-García JC, Santillán-Alarcón S. Sylvatic focus of American Trypanosomiasis in the State of Morelos, México. *Rev Biol Trop*. 2001;49:685-8.
37. Villena FE, Gómez-Puerta LA, Jhonston EJ, Del Alcázar OM, Maguiña JL, Albuja C, *et al*. First report of *Trypanosoma cruzi* infection in salivary gland of bats from the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2018;99:723-8. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0816>
38. Ramírez JD, Hernández C, Montilla M, Zambrano P, Flórez AC, Parra E, *et al*. First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. *Zoonoses Public Health*. 2014;61:477-9. <https://doi.org/10.1111/zph.12094>
39. Dos Santos FCB, Lisboa CV, Xavier SCC, Dario MA, Verde RS, Calouro AM, *et al*. *Trypanosoma* sp. diversity in Amazonian bats (Chiroptera; Mammalia) from Acre State, Brazil. *Parasitology*. 2018;145:828-37. <https://doi.org/10.1017/S0031182017001834>
40. Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Mus Nat Hist*. 1979;163:123-520.
41. Oliveira MA, Lopes-Ferreira R, Carneiro MA, Diotaiuti L. Ecology of *Cavernicola pilosa* Barber, 1937 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in the Boa Esperança cave, Tocantins, Brazil. *Ecotropica*. 2008;14:63-8.
42. Reyes-Novelo E, Ruiz-Piña H, Escobedo-Ortegón J, Barrera-Pérez M, Manrique-Saide P, Rodríguez-Vivas RI. *Triatoma dimidiata* (Latreille) abundance and infection with *Trypanosoma cruzi* in a rural community of Yucatan, Mexico. *Neotrop Entomol*. 2013;42:317-24. <https://doi.org/10.1007/s13744-013-0120-x>
43. Dumonteil E, Gourbière S, Barrera-Pérez M, Rodríguez-Félix E, Ruiz-Piña H, Baños-López O, *et al*. Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatán, peninsula of México. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;67:176-83. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.67.176>
44. Dumonteil E, Ramírez-Sierra MJ, Pérez-Carrillo S, Teh-Poot C, Herrera C, Gourbière S, *et al*. Detailed ecological associations of triatomines revealed by metabarcoding and next-generation sequencing: Implications for triatomine behavior and *Trypanosoma cruzi* transmission cycles. *Sci Rep*. 2018;8:4140. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22455-x>

45. Thomas ME, Rasweiler IV JJ, D'Alessandro A. Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive neotropical bats. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102:559-65. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007005000068>
46. Añez N, Crisante G, Soriano PJ. *Trypanosoma cruzi* congenital transmission in wild bats. Acta Trop. 2009;109:78-80. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.08.009>
47. Martínez-Díaz RA, Escario JA, Nogal-Ruiz JJ, Gómez-Barrio A. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;96:53-9. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762001000100006>
48. Roellig DM, Yabsley MJ. Infectivity, pathogenicity, and virulence of *Trypanosoma cruzi* isolates from sylvatic animals and vectors, and domestic dogs from the United States in ICR strain mice and SD strain rats. Am J Trop Med Hyg. 2010; 83:519-22. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0663>
49. Andrade LO, Machado CRS, Chiari E, Pena SDJ, Macedo AM. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. Mol Biochem Parasitol. 1999;100:163-72. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(99\)90035-x](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(99)90035-x)
50. Zúñiga C, Vargas R, Vergara U. Evolución de la infección con *Trypanosoma cruzi* en cepas susceptibles y resistentes de ratones. Arch Med Vet. 2002;34:183-8. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2002000200004>