

DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN KDR (T929I) EN POBLACIONES DEL PIOJO DE LA CABEZA EN MÉXICO, PERÚ Y CANADÁ

Paulina Díaz-Garrido, Ignacio Martínez-Martínez y Bertha Espinoza Gutiérrez✉

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Departamento de Inmunología. Avenida Universidad 3000, Alcaldía Coyoacán, C. P. 04510, Ciudad de México.

✉Autor de correspondencia: besgu@iibiomedicas.unam.mx

RESUMEN. El piojo de la cabeza *Pediculus humanus capitis* (De Geer, 1767) es un ectoparásito hematófago que habita en el cuero cabelludo humano. Las infestaciones por este insecto se conocen comúnmente como pediculosis, que son más comunes en niños y jóvenes. Estas infestaciones son asintomáticas, la irritación de la piel ocasionada por rascarse, puede ocasionar infecciones bacterianas secundarias. En los últimos años, la prevalencia de pediculosis ha ido en aumento, y entre sus múltiples causas en aumento, atribuyéndose principalmente resistencia a los insecticidas utilizados como medida de control. El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia y frecuencia de la mutación Kdr (resistencia al derribo) T929I en piojos recolectados en México, Perú y Canadá. Existe poca información relacionada con las mutaciones Kdr en el gen “para” (asociadas al canal de sodio dependiente del voltaje) en los piojos de la cabeza en las localidades estudiadas. En las seis localidades de los cuatro estados muestreados en México, se determinó la presencia de la mutación, con frecuencias que fluctuaron entre 0.70 a 1. Con respecto a la población muestreada en Quebec y Lima, ambas presentaron frecuencias de la mutación de 1.0, Estos resultados reflejan que las poblaciones del piojo de la cabeza han estado bajo presión de selección de insecticidas piretroides, principalmente permetrina, debido a que es el insecticida más utilizado, la resistencia por esta mutación podría asociarse con este insecticida en todas las localidades estudiadas.

Palabras clave: *Pediculus humanus capitis*, resistencia al derribo, mutación.

Detection of Gene Mutation Kdr (T929I) in Head Lice population of Mexico, Peru and Canada

ABSTRACT. The head lice *Pediculus humanus capitis* (De Geer) is a hematophagous ectoparasite inhabiting human scalp. Infestations by this insect are commonly known as pediculosis, which are more common in younger groups. These infestations are asymptomatic however, skin irritation where scratching cause occasionally secondary bacterial infections. Over the last years, the pediculosis prevalence has increased in children which have been attributed to resistance to insecticides used as control measure for this infestation. The aim of the present study was to determine the presence and frequency of the knockdown resistance mutation (kdr) T929I in 73 head lice collected from eight population in metropolitan area of Nuevo León, México, Quebec City (Canada) and Lima (Peru). This is the first report of a mutation in knockdown resistance (kdr) gen in the head lice in Mexico. Mutation was present in all of the sampled schools, the lowest frequency was 0.32 and the highest was 0.96. This indicates the lice resistance to pyrethroid insecticides commonly used its control.

Key words: *Pediculus humanus capitis*, knockdown resistance, mutation.

INTRODUCCIÓN

La pediculosis es una infestación de piojos en cualquier parte del cuerpo humano (Hodgdon et al., 2010; Lee et al., 2000; Sidoti, 2009). Los piojos infestan las partes pilosas del cuerpo en cada etapa de su ciclo de vida. La alimentación de sangre por los piojos provoca un prurito intenso. La pediculosis se considera un problema de salud pública y afecta principalmente a niños de 3 a 12 años, independientemente de su situación económica (Durand et al., 2007; Izri et al., 2010; Marcoux et al., 2010; Vahabi, 2012). En los últimos años, las tasas de infestación han aumentado en América del Norte y del Sur y en varios países europeos y asiáticos. Las principales causas de

infestación de piojos son la falta de atención de los padres, uso de fomites y el problema se ha agravado por la resistencia a los insecticidas piretroides.

El piojo de la cabeza, no es considerado como vector de enfermedades para el hombre, sin embargo existen reportes de que *Pediculus humanus capitis*, es vector de enfermedades como la bertonelosis (Roux y Rault, 1999, Burgess, 1995), además estas infestaciones afectan el bienestar de las personas infestadas (principalmente niños). Existe evidencia de la sobrevivencia de *P. h. capitis* después de la exposición a permetrina (Durand et al, 2007, Clark, 2010), esto indica la presencia de resistencia al tratamiento primario utilizados en América del Norte (Lebwohl, et al 2007).

Se han utilizado marcadores moleculares para detectar la presencia de mutaciones de resistencia al derribo (Kdr) en los canales de sodio (Bialet et al, 2011, Clark, 2005; Hogdon et al, 2010, Lee et al, 2000, Kasai et al, 2009, Marcoux et al., 2010), que están asociados a genes de resistencia a los piretroides. La detección de la fase temprana de resistencia es crucial para el manejo eficiente a largo plazo que puede retrasar y/o revertir el desarrollo de la resistencia (Ponce et al, 2009). Sin embargo, la resistencia temprana es muy difícil de detectar utilizando solo métodos de monitoreo basados en ensayos biológicos convencionales, particularmente cuando la resistencia es recesiva (Clark, 2010). Poca información existe relacionado con mutaciones Kdr en México y otros países de América relacionadas al piojo de cabeza *P. h. capitis*.

MATERIALES Y MÉTODO

Colecciones de piojos y extracción de ADN. Las recolecciones de piojos se realizaron manualmente utilizando un peine (peine anti piojos itchybitsi® metálico) en sucursales de Itchy Bitsi spa, de México, Perú y Canadá. Las muestras recolectadas se almacenaron inmediatamente en alcohol etílico absoluto (99.8%) para prevenir la degradación de los ácidos nucleicos y se transportaron al Laboratorio de Entomología Médica, en la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Extrajimos el ADN total de cada piojo individual utilizando la técnica de extracción de sal (Black y DuTeam, 1997). La cantidad y la integridad del ADN se determinaron con un nanodrop (Thermo Scientific®, NanoDrop 2000).

Determinaciones de genotipo. La amplificación mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) de la región polimórfica de la subunidad α del gen del canal de sodio sensible al voltaje se llevó a cabo en un volumen total de 25 μ l. La reacción de la mezcla contenía 200 ng de ADN genómico, 0,1 μ M de cada cebador, 2,5 μ l de tampón de polimerasa Taq 10X (50 mM de Tris-HCl 10 mM KCl, pH 8,0 y 1 mM de MgCl₂), 0,2 mM de dNTP y 0,15 U de ADN polimerasa Taq (Bioline, Taunton, MA). La secuencia del cebador para la subunidad α del gen del canal de sodio sensible al voltaje fue 5'-AAATCGTGGCCAACGTTAAA-3' e inversa 5'-TGAATCCATTCACCGCATAA-3' (6). La mezcla de reacción se incubó durante 5 min a 94 ° C para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de 94 ° C / 45s, 55 ° C / 45s y 72 ° C / 1 min, una etapa de extensión final de 3 min / 72 ° DO. Los 20 μ l de producto de PCR se mezclaron con 2 U de SspI (Invitrogen, San Diego, California, EE. UU.) y el tampón de reacción, según las instrucciones del fabricante. Los polimorfismos se categorizaron como homocigotos "SS" susceptibles, visualizados como una banda de 332bp; 'RR' homocigoto resistente, visible al ver dos bandas de 261 y 71 pb; o heterocigoto "RS", visible como tres bandas de 332, 261 y 71 pb. El producto de la digestión se cargó en un gel de agarosa al 1.5% que contenía bromuro de etidio para visualización con luz UV. La genotipificación se confirmó mediante la secuenciación utilizando el kit de secuenciación del ciclo del terminador Big Dye v3.1 y los mismos cebadores de PCR utilizados para la amplificación. Las reacciones se analizaron en el analizador genético ABI PRISM

3100 utilizando el software de análisis de secuenciación v5.3 (Applied Biosystems) y GeneStudio™ Molecular Biology Suite (versión: 2.2.0.0).

Análisis estadístico de haplotipos y frecuencias alélicas. Las frecuencias genotípicas (f) se calcularon dividiendo el número de piojos con cada genotipo específico entre el número total de piojos analizados. Las frecuencias alélicas se calcularon sumando la frecuencia genotípica heterocigótica dividida por dos, más la frecuencia homocigótica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En seis localidades localizadas en cuatro estados, se determinó la presencia de la mutación, con frecuencias que fluctuaron entre 0.70 a 1. Con respecto a la población muestreada en Quebec y Lima, ambas presentaron frecuencias de la mutación de 1.0, lo cual refleja que las poblaciones del piojo de la cabeza han estado bajo presión de selección de insecticidas piretroides, principalmente permetrina, en todas las localidades estudiadas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Ubicaciones, año de recolección, tamaño de muestra y número de piojos por cada genotipo.

País	Estado	Ciudad	Año	n	AA	AG	GG	Frecuencia Mutación T929I
México	Nuevo León	Monterrey	2018	10	8	0	2	0.80
		Quintana Roo	2018	10	6	2	2	0.70
	Puebla	P. Carmen	2018	12	8	1	3	0.79
		Puebla Zona Dorada	2018	10	8	2	0	0.90
		Puebla Zavaleta	2018	7	7	0	0	1.00
	Morelos	Cuernavaca	2018	24	23	1	0	0.97
Canadá	Quebec		2018	15	15	0	0	1.0
Perú	Lima		2018	7	7	0	0	1.0
Total				95	82	6	7	0.89

Nuestros resultados indicaron que, de los 95 piojos de la cabeza analizados, 82 presentaron la mutación de manera homocigota, 6 fueron heterocigotos y 7 susceptibles. Existen diversos estudios similares al nuestro como lo es del de Durand et al. (2007), quienes examinaron una submuestra de 90 piojos obtenidos de seis niños infestados de una escuela seleccionada al azar, en Bobigny, Francia. Veinte de estos piojos (22,2%) fueron homocigotos susceptibles en la posición 929 del alelo similar a *kdr*, 33 (36,7%) fueron homocigotos resistentes y 37 (41,1%) piojos fueron heterocigotos. Así, 70 (77.8%) de los piojos estudiados por Durand et al., albergaba uno o dos alelos mutantes T929I. A nivel mundial, la frecuencia de la mutación T929I fue de 0,57. Estos resultados fueron cerca de 23.07% para homocigotos susceptibles, 25% para heterocigotos y 51.93% para homocigotos resistentes. En otro estudio, Kristensen (2005) evaluó la presencia de haplotipos T929I en piojos recolectados de varias escuelas diferentes en Dinamarca. Kristensen analizó 38 muestras de piojos y determinó que 22 eran homocigotas resistentes, 6 heterocigotas y 10 homocigotas susceptibles.

Nuestros resultados muestran que 39 muestras de piojos de la cabeza fueron homocigotas susceptibles, 39 muestras heterocigóticas y 81 muestras de homocigotos resistentes, tanto en Durand como en nuestros hallazgos, la presencia de la mutación *kdr* (T929I) fue dominante. Los resultados de Durand (2007) coinciden con los resultados de frecuencia de alelos de Clark (2010) y Hodgdon et al. (2010) que determinaron las frecuencias alélicas *kdr* (mutación T917I) de piojos de 14 países mediante la reacción de amplificación de señal invasiva en serie. En los piojos

recolectados de Uruguay, el Reino Unido y Australia tuvieron frecuencias alélicas *kdr* del 100%, mientras que los piojos de Ecuador, Papua Nueva Guinea, Corea del Sur y Tailandia, la frecuencia alélica *kdr* fue del 0%. En los 7 países restantes investigados, incluidas siete poblaciones de EE. UU., Dos Argentina, Brasil, Dinamarca, República Checa, Egipto e Israel, mostraron frecuencias de alelos *kdr* variables, que oscilaron entre el 11% y el 97%.

Por su parte Marcoux *et al.* (2010) recolectaron piojos en Ontario, Quebec y Columbia Británica y analizaron las muestras mediante una reacción de amplificación de señal invasiva en serie para genotipar la mutación T917I. Reportaron que 133/137 (97.1%) de las muestras de piojos tenían un genotipo de alelo resistente y el 2.9% tenían una frecuencia de alelos susceptible, estos resultados son similares a los reportados en nuestro estudio, donde determinamos una frecuencia de 1.

CONCLUSIONES

Este estudio revela la presencia de las mutaciones *kdr* T929I en todas las poblaciones de piojos recolectadas en México, Perú y Canadá. Los resultados presentados aquí sugieren que principalmente el uso de productos formulados con permetrina puede estar causando el aumento en la frecuencia de la mutación T929I en *P. h. capitis* en el área de estudio. Esto plantea la cuestión de si los insecticidas a base de permetrina deben reemplazarse por alternativas para mantener y restaurar la susceptibilidad a los piretroides.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la participación de los técnicos que colectaron las muestras.

LITERATURA CITADA

- Burgess, I. F. 1995. Human lice and their management. *Adv. Parasitol.* 36:271–342.
- Clark J. M. (ed.). 1995. Molecular Action of Insecticides on Ion Channels. ACS Symposium Series 591, ACS Books, Washington, D.C., pp. 1-356.
- Clark, J. M. 2010. Permethrin Resistance Due to Knockdown Gene Mutations is Prevalent in Human Head Louse Populations. *The Open Dermatology Journal*, 4, 63-68.
- Durand, R., B. Millard, C. Bouges-Michel, C. Bruel, S. Bouvresse y A. Izri, 2007. Detection of Pyrethroid Resistance Gene in Head Lice in Schoolchildren from Bobigny, France. *J. Med. Entomol.* 44(5):796-798.
- Hodgdon, H. E., K.S. Yoon, D. J. Previte, H. J. Kim, G.E. Aboelghar, S. H. Lee, y J. M. Clark. 2010. Determination of knockdown resistance allele frequencies in global human head louse populations using the serial invasive signal amplification reaction. *Pest Manag Sci.* September; 66(9): 1031–1040.
- Izri A., B. Uzzan, M. Maigret, M.S. Gordon. y C. Bouges. 2010. clinical efficacy and safety in head lice infections by *Pediculus humanus capitis* (Anoplura:Pedicidae) of a capillary spray containing a silicon-oil complex. *Parasite*, 17, 329.-335.
- Kristensen M. 2005. Identification of sodium channel mutations in human head louse (Anoplura: Pediculidae) from Denmark. *J. Med. Entomol.* 42(5): 826-829.
- Lebwohl M., L. Clark y J. Levitt. 2007. Therapy for head lice base on life cycle, resistance and safety considerations. *Pediatrics.* 119 (5). 965-975.
- Lee, S. H, K.S. Yoon, M. S. Williamson, S. J. Goodson, M. Takano-Lee, J. D. Edman, A. L. Devonshire y J. M. Clark. 2000. Molecular Analysis of *kdr*-like Resistance in Permethrin-Resistant Strains of Head Lice, *Pediculus capitis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 66, 130–143.

- Marcoux D., Palma K. G.M, Kaul Nalini., Hodgon H., Van Geest A., Previte D. J., Abou-Elghar G. E., Yoon K. S y Clark J. M. 2010. Pyrethroid Pediculicidae Resistance of Head Lice in Canada Evaluated by Serial Invasive Signal Amplification Reaction. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*. Vol 14:3. 115-118.
- Ponce G., Flores A., Fernandez I., Saavedra K., Lozano S., Bond G., Casas M., Ramsey J, Garcia J., Domínguez M., Ranson H., Hemingway, Einsen L., y Black IV W. 2009. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. *PLOS Neglected Tropical Disease*. October 3(10) 1-10pp.
- Roux Veronique and Didier Raoult. 1999. Body Lice as Tools for Diagnosis and Surveillance of Reemerging Diseases. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(3):596–599.
- Sidoti E., F. Bonura, G. Paolini y G. Tringali. 2009. A survey on knowledge and perceptions regarding head lice on a sample of teachers and students in primary schools of north and south of Italy. *J. Prev. Med. Hyg*; 50: 141-151.
- Vahabi, A., Shemshad, K., Sayyadi, M., Biglarian, A., Vahabi, B., Sayyad, S., Shemshad, M. y Rafinejad, J. 2012. Prevalence and risk factors of *Pediculus (humanus) capitis* (Anoplura: Pediculidae), in primary schools in Sanandaj City, Kurdistan Province, Iran. *Tropical Biomedicine* 29(2): 207–211.