

CAPITULO 4.

4. ***Infección natural por Trypanosoma cruzi.***

- 4.1. Análisis parasitológico de heces de los triatominos, para comprobar la presencia del *Trypanosoma cruzi*.
- 4.2. Identificación del parásito hallado en el contenido intestinal de *Triatoma sordida*.
- 4.3. Aplicación de la técnica de la Reacción en cadena de la polimerasa para confirmar la identificación del parásito hallado en el contenido intestinal de *Triatoma sordida*.
- 4.4. Índice de Concordancia.
- 4.5. Tasa de infección por *Trypanosoma cruzi* en ejemplares de *Triatoma sordida* colectados en palmas.

INFECCION NATURAL POR *TRYPANOSOMA cruzi*.

Objetivos:

- Confirmar la presencia de tripanosomas tipo *cruzi* en los triatominos capturados en los muestreos, mediante la observación directa con microscopio.
- Identificar los tripanosomas hallados como *Trypanosoma cruzi* por la replicación del ADN extraído de la materia fecal seca de *T. sordida* y de *T. infestans* utilizando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Materiales y Métodos:

Análisis parasitológico de heces de los triatominos para comprobar la presencia del Trypanosoma cruzi.

Las heces de los triatominos obtenidas por presión abdominal se diluyeron 1:1 en solución salina de cloruro de sodio al 0,85 % y se colocaron entre porta y cubreobjetos, observándose a 400 x, con un microscopio Standart 25 Carl Zeiss.

Identificación del parásito hallado en el contenido intestinal de Triatoma sordida.

Para la identificación específica del *T. cruzi* se utilizaron criterios morfológicos y la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction).

Los criterios morfológicos que se tuvieron en cuenta son: largo total, ancho máximo a nivel del núcleo, largo del flagelo libre y las distancias al extremo posterior desde el borde proximal del núcleo (Mayer *et al.*, 1976).

Aplicación de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para confirmar la identificación del parásito hallado en el contenido intestinal de Triatoma sordida.

Para la técnica de PCR se utilizaron 13 muestras fecales de *T. sordida* capturadas en palmas de la especie *B. yatay* y 8 de *T. infestans* domiciliadas, procedentes del área circundante al palmar. Estos 21 triatominos habían resultado infectados por triponosomas cruziformes por observación directa al microscopio.

Por otra parte se analizaron heces secas de 20 ejemplares de *T. infestans* (N=5) procedentes de domicilios y *T. sordida* (N= 15) colectadas en palmeras, huecos de árboles y corrales de aves que habían resultado no parasitadas a la observación directa con el microscopio óptico.

Las heces secas de los triatominos se colectaron individualmente en papel Whatman N° 1 y posteriormente se transfirieron a recipientes rotulados para evitar contaminación.

Para la amplificación del ADN se utilizaron un par de cebadores específicos (primers) TCZ. (Russomando *et al.*, 1996).

La técnica de P.C.R. fue efectuada acorde al procedimiento descrito previamente por Russomando *et al.*, (1992).

La P.C.R. involucra síntesis de millones de copias de un segmento de ADN, que consisten en ciclos repetidos de desnaturalización del ADN (separación de las hebras) por el reconocimiento y la unión de los primers a regiones específicas del ADN a amplificar y la síntesis (polimerización) del ADN por acción de la enzima. Los cebadores hibridizan con los extremos opuestos de la secuencia molde (target).

Para evitar la potencial contaminación cruzada, fueron utilizadas 4 muestras fecales de triatomíneos no infectados, como controles durante el aislamiento (extracción) del ADN de las heces.

Se llevaron a cabo los siguientes pasos para la extracción de ADN de las heces impregnadas en papel de filtro.

- Se mantuvieron los papeles de filtro conteniendo muestras de materia fecal a -20°C .
- Se cortó alrededor del área del papel que contenía la muestra de heces.
- Se colocó el fragmento de papel de filtro en un tubo Eppendorf y se agregó $300\ \mu\text{l}$ de buffer de lisis. Ésta contenía $10\ \text{mM}$ Tris para mantener el pH adecuado (7,4) y $1\ \text{mM}$ de EDTA, agente quelante de iones bivalentes, que evita la degradación del ADN.
- Se dejó el papel a temperatura ambiente para que se remojara, durante 10 minutos y luego se hizo vibrar vigorosamente el tubo durante 2 minutos.
- Se centrifugó a 8000 revoluciones por minuto durante 10 minutos, para que el papel de filtro quedara en el fondo del tubo.
- Se transfirió el sobrenadante a otro tubo Eppendorf y se agregó $3\ \mu\text{l}$ de proteinasa K ($20\ \text{ng/ml}$). La acción de la proteinasa es unir el Calcio en determinados sitios.
- Se incubó a 60°C durante 30 minutos, para que la enzima actuara con su máxima actividad.
- Se calentó a 95°C durante 10 minutos, para inactivar la acción de la proteinasa.
- Se agregó $300\ \mu\text{l}$ de fenol y se hizo vibrar el tubo, se usa fenol para separar proteínas y otras impurezas. A continuación se centrifugó a 15.000 revoluciones por minuto, durante 15 minutos. La centrifugación es para separar las 2 fases que se mezclaron.
- Se transfirió la fase acuosa superior del tubo, que es la que contiene el ADN, a otro.

- Se repitieron los pasos 3 y 4.
- Se añadió 300 μl de cloroformo (para eliminar los restos de fenol), se mezcló y se centrifugó a 15.000 revoluciones por minuto durante 1 minuto.
- Se transfirió la fase superior del tubo a un nuevo tubo.
- Se añadió 20 μl de glicógeno, para ayudar la precipitación y 30 μl de acetato de sodio, para lograr la concentración salina ideal.
- Se agregó 3 volúmenes de etanol frío (900 μl), para que realmente precipite todo el ADN.
- Se mantuvo a -70°C durante una hora.
- Se centrifugó a 15.000 revoluciones por minuto a una temperatura de 4°C , durante 30 minutos, para que el ADN se depositara en fondo del tubo Eppendorf.
- Se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento con etanol al 90%, seguidamente se secó el ADN en estufa durante 1 o 2 horas, es decir el tiempo requerido, ya que no deben quedar burbujas.
- Se suspendió nuevamente el sedimento en 50 μl de agua pura autoclavada.
- Se conservó a -20°C hasta su uso.

Se utilizó una solución madre (Master Mix) que contenía 250 μM de Deoxinucleótidos trifosfatos, 100 pmol de cada cebador TCZ 1 y TCZ 2, (Moser *et al.*, 1989) 2 U de la enzima Taq. Polimerasa, $\text{Cl}_2 \text{Mg}$, así como buffer para mantener el pH.

A continuación se adicionaron 10 μl del total de la suspensión de A.D.N. obtenida de las muestras fecales a las muestras alícuotas de Master Mix y se sometieron a 30 ciclos de amplificación en la máquina PTC-100. Programmable Thermal Controller –M J Research, Inc. Watertown, Mass.

Como controles negativos se utilizaron 4 alícuotas de Master Mix, sin el agregado de extractos fecales.

Cada ciclo trabaja a diferentes temperaturas que varían desde 4° C (la más baja) a 95 ° C (la más alta).

El producto de amplificación fue de 195 pares de bases.

La electroforesis se realizó sobre un gel de agarosa al 2%, en buffer TAE 1X. Se mezcló 9 µl de muestra, producto de PCR, más 1 µl de Rojo de Cresol, diluido en glicerol al 50 %.

A continuación se cargaron los pocillos con la citada mezcla mediante una micropipeta automática y se conectó luego a una fuente de poder de 100 V, para iniciar la corrida. La duración de la corrida es de 20 minutos para el cebador TCZ, el tiempo depende de los pares de bases.

Posteriormente el gel se tiñó con Bromuro de Etidio y la formación de bandas específicas se observó sobre una pantalla transiluminada con luz ultravioleta.

Índice de Concordancia.

Se aplicó el Índice de Concordancia para conocer la relación que presentaron las técnicas empleadas. El índice de concordancia es igual al número de resultados concordantes menos los resultados discordantes, sobre el número de resultados concordantes más los resultados discordantes.

En el análisis estadístico de la infección por *T. cruzi* se aplicó el test de X^2 a un nivel de significación del 5% (Sokal & Rohlf, 1995).

Resultados:

Tasa de infección por Trypanosoma cruzi en ejemplares de Triatoma sordida colectados en palmas.

Se analizaron con microscopio óptico las heces de 292 ejemplares de *T. sordida* y 78 mostraron infección por tripanosomas tipo cruzi, por lo que la tasa de infección de *T. sordida* fue de 26,7 %. En la Tabla 4.1- se muestran el

número de ejemplares capturados, analizados y el porcentaje de infectados, discriminados por clase de edad.

Cabe destacar que en el 50,0% de las hembras y en el 33,3 % de los machos analizados se verificó infección.

En la Fig.4-1. se presentan los índices de infección de los diferentes estados evolutivos. Desde N1, estadio en el cual no se registró infección, el porcentaje de infección por *Trypanosoma cruzi* creció en forma constante en valores de alrededor del 11.0 % hasta llegar a N4. A partir de éste estadio y hasta el estado adulto, la proporción de triatominos infectados se estabilizó. En la aplicación del X^2 se confirmó que hay diferencia significativa en los porcentajes de infección entre N1 y N3 ($X^2 = 6,97$; $P = 0,03$), a diferencia, entre los estadios ninfales N4, N5 y adultos la diferencia no resultó significativa ($X^2 = 0,12$; $P = 0,94$).

En la Tabla 4-2. se presentan el total de palmas con el correspondiente número de ejemplares de *T. sordida* infectados por *T. cruzi* (según la técnica de O.D.M.) capturados en cada una de ellas.

Al analizar la distribución de los ejemplares de *T. sordida* infectados en las palmas examinadas, se comprobó que el total de 78 vinchucas positivas al *T. cruzi*, provenían de 13 de las 55 palmas disecadas. En especial, la palma N° 3 que albergaba a 60 ejemplares vivos contribuyó con 49 insectos positivos, o sea un 63,0% del total de ejemplares infectados. Las 12 palmas restantes tenían menor número de triatominos (1-29), pero sin embargo los porcentajes de infección eran, en general, superiores al 40,0% y en algunos casos las “vinchucas” capturadas, aunque en bajos números, estaban todas infectadas.

Resultados de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Mediante el empleo de PCR se confirmó infección por *Trypanosoma cruzi* en muestras secas de heces de *T. sordida* y de *T. infestans*, destacándose la rapidez con que se obtuvieron los resultados, comparado al tiempo que requiere el empleo de otras técnicas.

De las muestras de heces infectadas por *Trypanosoma cruzi* (N=20) por búsqueda de parásitos con microscopio óptico, se confirmó la infección por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en el 85 % de los casos. En la Fig. 4-2. se visualizan las amplificaciones del ADN de *Trypanosoma cruzi* en heces secas de *T. sordida* y de *T. infestans*.

En la Tabla 4-3. se presenta la lista de los individuos de *T. sordida* y de *T. infestans* analizados por P.C.R. y O.D.M. y los resultados logrados con ambas técnicas.

Índice de Concordancia.

El valor obtenido de la aplicación índice de concordancia a los resultados logrados por P.C.R. y O.D.M se presenta a continuación.

$$IC= C-D/C+D=28-10/38= 0,473 \text{ (Tabla 4-4.)}$$

Un 35 % de las muestras fecales de *T. sordida* y de *T. infestans* (N=20) negativas en la O.D.M. fueron positivas por la técnica del P.C.R., utilizando el par de primer TCZ.

Todas las muestras negativas que reaccionaron positivamente eran de *T. sordida*, capturadas en palmas (N=6) y en 1 peridomicilio de las viviendas circundantes al palmar (gallinero: N =1).

Por lo antes señalado se constató que el índice de infección hallado por observación directa con microscopio estaba subestimado. Al reaccionar en forma positiva una proporción importante de individuos de las muestras, la tasa de infección global por *Trypanosoma cruzi* ascendió de 26,7 a 29,1 %, dado que el número de ejemplares en los que se había comprobado la presencia de parásitos (78), se incrementó a 85.

Discusión:

Se demostró que la sensibilidad de detección de la reacción en cadena de la polimerasa en heces secas de *T. sordida* es mayor que la lograda con la

observación directa con microscopio óptico, circunstancia lógica ya que la misma no requiere la presencia de parásitos enteros (vivos o muertos).

La utilidad que reviste esta técnica molecular es grande, teniendo en cuenta que con sólo heces secas de triatomíneos alimentados de diferentes hospedadores, es posible confirmar la presencia de infección, en el lapso de aproximadamente 48 horas.

La detección de 5 ejemplares adultos infectados es de gran importancia epidemiológica, teniendo en cuenta que al dispersarse, tanto hembras como machos, tienen la probabilidad de acceder a la vivienda humana en busca de fuentes de sangre y así alimentarse del hombre o sus animales domésticos, transmitiéndoles el parásito.

La interpretación acerca de la forma que adopta la curva de infección indica que, aunque las ninfas mayores y adultos se alimenten en repetidas oportunidades, no aumentan el porcentaje de infección.

Por lo antes señalado se plantea la hipótesis de que *T. sordida* se infecta como estadios ninfales de segundo a cuarto, durante los meses de primavera y verano, cuando la palma es habitada o visitada temporariamente por mamíferos infectados con el *Trypanosoma cruzi* (comadrejas, roedores y murciélagos, entre otros).

De ocurrir lo mencionado, las ninfas de cuarto y quinto estadio mudarían a adulto cuando las únicas fuentes de alimentación disponible en el biotopo son vertebrados de sangre fría (predominantemente anfibios y en ocasiones reptiles), o en última instancia hemolinfa de Dictyoptera-Blattaria.

Dado que las oportunidades de infección están acotadas en el tiempo, es posible que los altos porcentajes de infección detectados en las ninfas mayores y adultos se alcancen en más de una estación cálida. Teniendo en cuenta que, en condiciones experimentales, la ninfa de cuarto estadio necesita alrededor de 60 días para mudar al estadio siguiente y la N5 requiere 136 días, en promedio, para que emerja el adulto, es probable que estos estados de desarrollo tengan mayor número de ocasiones para contraer la infección entre dos años consecutivos.

Tabla 4-1. Índices de infección de *T. sordida* por *Trypanosoma cruzi*, en los diferentes estados evolutivos. Áreas rurales de la provincia de Corrientes, Argentina, 1998- 1999.

Clase de edad	N° ejemplares capturados	N° (%) ejemplares analizados	N° ejemplares infectados	Índice de Infección (%)
N1	46	24 (52,1)	0	0,0
N2	60	34 (56,6)	4	11,7
N3	96	64 (66,6)	14	21,8
N4	100	82 (82,0)	28	34,1
N5	86	75 (87,2)	27	36,0
Adultos	17	13 (76,5)	5	38,5
TOTAL	405*	292 (72,0)	78	26,7

* Total al que debe sumarse: 18 huevos

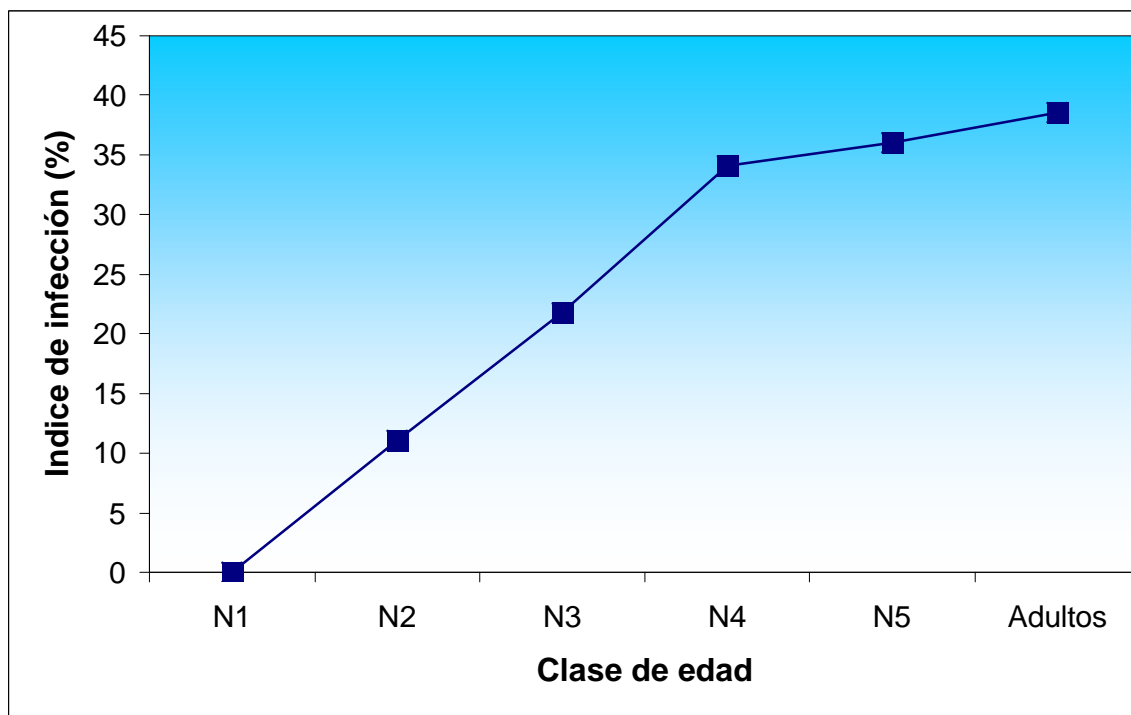


Fig.4.1- Infección de *Triatoma sordida* por *Trypanosoma cruzi* colectada en áreas rurales de la Provincia de Corrientes. 1998-1999.

Tabla 4-2. Total de palmas con el número de ejemplares de *Triatoma sordida* capturados e infectados por *Trypanosoma cruzi* en cada una de ellas. Áreas rurales de la Provincia de Corrientes, Argentina. 1998-1999.

Nº Palma	Nº ejemplares capturados	Nº de ejemplares infectados (%)
2	2	2
3	60	49 (81,7)
8	17	5 (29,4)
10	6	3 (50)
15	2	2
28	12	1 (8,3)
29	29	6 (20,7)
33	4	1
36	4	1
47	7	3 (42,9)
49	7	3 (42,9)
50	1	1
54	6	1 (16,7)

195 pb
primer

195 pb
primer

Fig.4-2. Amplificación del ADN de *Trypanosoma cruzi* en heces secas de *Triatoma sordida* y *Triatoma infestans* utilizando un par de cebadores específicos TCZ.

Tabla 4-3. Individuos de *Triatoma sordida* y de *T. infestans*, discriminados por estado de desarrollo y ecotopo, analizados por P.C.R. y O.D.M.

Estado-Especie	Ecotopo	Resultado con O.D.M	Resultado con PCR
N5- <i>T. sordida</i>	palma	+	+
N3- <i>T. sordida</i>	palma	+	-
Macho- <i>T. sordida</i>	palma	+	+
N5- <i>T. sordida</i>	palma	+	+
N2- <i>T. sordida</i>	palma	+	+
N5- <i>T. sordida</i>	palma	+	-
Hembra- <i>T.sordida</i>	corral de cerdo	+	-
Macho- <i>T.sordida</i>	palma	+	+
Hembra- <i>T.infestans</i>	vivienda	+	+
Macho- <i>T.sordida</i>	palma	+	+
Macho- <i>T.infestans</i>	vivienda	+	+
Macho- <i>T.infestans</i>	vivienda	-	-
N5- <i>T. infestans</i>	vivienda	-	-
Hembra- <i>T. infestans</i>	vivienda	-	-
N5- <i>T. infestans</i>	vivienda	-	-
Hembra- <i>T.infestans</i>	vivienda	-	Sin Resultado
N4- <i>T.sordida</i>	hueco de árbol	-	-
N4- <i>T.sordida</i>	hueco de árbol	-	-
Macho- <i>T.sordida</i>	gallinero	-	+
N4- <i>T.sordida</i>	peridomicilio(anexo)	-	-
N3- <i>T.sordida</i>	hueco de árbol	-	-
N4- <i>T.sordida</i>	peridomicilio(anexo)	-	-
N4- <i>T. sordida</i>	peridomicilio(anexo)	-	Reacción extraña
Macho- <i>T. sordida</i>	gallinero	-	-
N4- <i>T. sordida</i>	hueco de árbol	-	-
N3- <i>T. sordida</i>	palma	-	+
N5- <i>T. sordida</i>	palma	-	+
N3- <i>T. sordida</i>	palma	-	+
N5- <i>T. sordida</i>	palma	-	+
N5- <i>T. sordida</i>	palma	-	+
N5- <i>T. sordida</i>	palma	-	+
N3- <i>T. infestans</i>	vivienda	+	+
N3- <i>T. infestans</i>	vivienda	+	+
N4- <i>T. infestans</i>	vivienda	+	+
N4- <i>T. infestans</i>	vivienda	+	+
N4- <i>T. infestans</i>	vivienda	+	Sin Resultado
N4- <i>T. infestans</i>	vivienda	+	+
Hembra- <i>T.infestans</i>	vivienda	+	+
N5- <i>T. sordida</i>	palma	+	+
Hembra- <i>T. sordida</i>	palma	+	+
N5- <i>T. sordida</i>	palma	+	+
N5- <i>T. sordida</i>	palma	+	+

Tabla 4-4. Índice de concordancia entre los resultados obtenidos por P.C.R y O.D.M. en ejemplares de *Triatoma sordida* y *T. infestans* colectados en áreas rurales de la Provincia de Corrientes.

		P.C.R.	P.C.R.	
		Positivo	Negativo	Total
O.D.M	Positivo	17	3	20
O.D.M	Negativo	7	11	18
	Total	24	14	38

