

IDENTIFICACION DE LOS CLONET 20 Y 39 EN HECE DE *TRITOMA INFESTANS* POR LA REACCION DE LA POLIMERASA EN CADENA (PCR)

Brenière S.F.¹, Bosseno M.F.¹, Noireau F.¹, Vargas F.², Yacsik N.²,
Alcazar J.L.³ & Telleria J.²

Introducción

Actualmente, la caracterización genética de las cepas de *Trypanosoma cruzi* consiste en el análisis isoenzimático o análisis del ADN del genoma e implica el aislamiento y cultivo masivo de cada cepa. En la naturaleza los vectores y los mamíferos son frecuentemente infectados por poblaciones heterogéneas (varios clones) y, en el curso del aislamiento y cultivo masivo, la diversidad de los clones que infectan un huésped puede reducirse por selección de ciertos clones (Miles y Cibulskis, 1986; Brenière *et al.*, 1989).

Para obviar la etapa del cultivo de las cepas, nosotros y otros investigadores aplicamos una nueva metodología para la detección directa y sensible de *T. cruzi* en las heces de triatominos y en la sangre de mamíferos. Amplificamos por la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) las partes variables de los minicírculos del ADN del cinetoplasto (HVRm) (Veas *et al.*, 1991; Avila *et al.*, 1991). Además, establecimos que las secuencias de las HVRm son específicas de subgrupos de clones filogenéticamente distintos (Brenière *et al.*, 1998). Este resultado determinó el desarrollo de dos sondas (sondas 20 y 39) a partir de las HVRm a fin de detectar por PCR y hibridación los grupos de clones correspondientes (nombrados clonet 20 y clonet 39) en los diferentes huéspedes sin aislar las cepas.

Este trabajo presenta los resultados de la detección directa de los clonet 20 y 39 en heces de *Triatoma infestans* capturados en tres departamentos boliviana-

¹ IRD, calle Cicerón n° 609, Col. Los Morales, AP 11530, México DF.

² IBBA, La Paz, Bolivia.

³ UMSS, Cochabamba, Bolivia.

nos. *T. infestans* es el único vector de importancia epidemiológica y que se encuentra distribuido en todo el país.

Material y métodos

Los especímenes de *T. infestans* provienen de 3 departamentos, Cochabamba, La Paz y Santa Cruz; son ninfas y adultos capturados en las casas y en las áreas peridomésticas (gallineros, conejeras, patios). La Tabla 1 presenta los detalles de la muestra. Las tasas de infecciones de los insectos fueron determinadas por la observación de las heces en el microscopio. La mayoría de los insectos positivos y una muestra de negativos escogida al azar fueron procesados por PCR con los controles adecuados (insectos de crianza no infectados). Las etapas de la PCR, la preparación de las muestras, el método de producción de las dos sondas y las condiciones de hibridación fueron previamente descritos (Brenière *et al.*, 1992). Así, las HVRm de las cepas de *T. cruzi* fueron amplificadas por PCR de cada muestra de heces infectada. Luego los productos de PCR, transferidos sobre membranas después de su electroforesis, fueron hibridados con las sondas 20 y 39.

Resultados

La Tabla 1 presenta las tasas de infección de los triatominos en las regiones estudiadas. En el departamento de La Paz se visitaron poblaciones situadas en Los Yungas Altos, región subandina, que presenta una baja tasa de infección de los vectores. En esta región se detectaron algunos casos de infección humana de transmisión local (2.2% < 18 años; 10.1% > 18 años), que corresponden a una baja tasa de infección (6.8%) comparativamente a otras regiones bolivianas. En cambio, el departamento de Cochabamba está considerado como una zona altamente endémica (Pless *et al.*, 1992). En la provincia de Mizque se examinaron 490 personas, niños y adultos, y la seroprevalencia fue del 42,5%. En la Provincia de Cordillera la tasa de infección de los triatominos es muy elevada, y la tasa de infestación de las casas por triatominos es más o menos del 100%. No se hizo encuestas serológicas pero la transmisión sería muy elevada.

Tabla 1. Origen geográfico de las colectas y tasa de infección de los triatomí- nos.

Departamento	Provincia	No. de comunidades	Tasa de infección*		
			Examinados	No. positivos	% infección
La Paz	Nor Yungas	12	858	127	14.8
	Sud Yungas	4	292	27	9.2
	Caranavi	17	236	14	5.9
	Total	33	1386	168	12.1
Cochabamba	Campero/Mizque	4	361	162	44.9
	Capinota	15	498	229	46.0
	Cercado	1	235	127	54.0
	Total	20	1094	518	47.3
Santa Cruz	Cordillera	2	387	158	40.8
Total		55	2867	844	29.4

* Examen de las heces de cada insecto en el microscopio

Tabla 2. Comparación de la detección de flagelados en las heces por microscopía y PCR

Departamento	OBM					Comparación de las dos técnicas					
	+		-			% sensibilidad ¹		% concordancia ²		% discrepancias ³	
	PCR					OBM		PCR		A B	
	No.	+	-	+	-						
La Paz	177	73	13	6	85	93.0	86.0	89.3	7.3	3.4	
Cochabamba	319	202	36	12	69	95.0	86.0	85.0	11.3	3.7	
Santa Cruz	179	94	84	1	0	99.0	53.0	52.5	47.0	0.5	
Total	675	369	133	19	154	96.0	74.0	77.5	19.7	2.8	

¹ La sensibilidad de cada técnica esta calculada según la formula siguiente: ni/N, ni=número de positivos por una técnica en particular, N = número de positivos por cualquiera de las dos técnicas, OBM = observación al microscopio.

² % de concordancia = % de muestras positivas o negativas en ambas técnicas.

³ % de discrepancias A = % de muestras positivas por microscopía y negativas por PCR; B = % de muestras positivas por PCR y negativas por microscopía.

Tabla 3. Identificación de los clonets 20 y 39 de *T. cruzi* en heces de *T. infestans* por PCR e hibridación con sondas de ADN específicas.

Departamento	No.	No. y % reconocidos								Valor del χ^2 #
		Por la sonda 20 sola		Por la sonda 39 sola		Por las 2 sondas		Por ninguna de las dos sondas		
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	
La Paz	79	24	30.4	17	21.5	28	35.4	10	12.7	64.4**
Cochabamba	214	62	29.0	44	20.6	87	40.7	21	9.8	
Santa Cruz	95	17	17.9	42	44.2	5	5.3	31	32.6	
Total	388	103	26.5	103	26.5	120	30.9	62	16.0	

: El valor del Chi cuadrado esta calculado entre las poblaciones 2 a 2 (gl = 3); * $P > 0.05$, ** $P < 0.001$

Tabla 4. Prevalencia de las infecciones mixtas: comparación de las tasas observadas y teóricas.

Departamento	No.	Frecuencias*		Infecciones mixtas**			
		clonet 20	clonet 39	No. observado	No. teórico	Chi 2	P
La Paz	79	0.66	0.57	28	29.7	0.1	>0.05
Cochabamba	214	0.70	0.61	87	91.4	0.2	>0.05
Santa Cruz	95	0.23	0.49	5	10.7	2.3	>0.05
Total	388	0.57	0.57	120	126	0.2	>0.05

* Las frecuencias de los clonets son calculadas a partir de los datos de la Tabla 3.

** Infecciones mixtas observadas = no. de muestras de heces hibridadas por las sondas 20 y 39 a la vez (datos en Tabla 3). Infecciones mixtas teóricas = no. de muestras calculado con la fórmula siguiente: $N \times (\text{frecuencia clonet 20}) \times (\text{frecuencia clonet 39})$, con N = número de muestras estudiadas. P estimado de las diferencias entre observados y teóricos por el test del Chi-cuadrado (gl = 1).

Para investigar el beneficio y la sensibilidad de la PCR para la detección de *T. cruzi* en heces se analizó un total de 675 muestras de estos tres departamentos, de las cuales 502 presentaron flagelados al microscopio (Tabla 2). Las muestras PCR + exhibieron una banda mayor de 270 pb, anteriormente deter-

minada como específica de *T. cruzi* (Veas *et al.*, 1991). Los controles (heces no infectadas procedentes de los insectos de laboratorio y las muestras de agua) fueron todos PCR - como se esperaba. Las dos técnicas presentaron una tasa de concordancia del 77,14% (Tabla 2). Los casos de discrepancias fueron en su mayoría aquellos con la falta de amplificación por PCR de muestras positivas al microscopio (87%). Sin la muestra de la provincia Cordillera (179 insectos de los cuales 178 fueron positivos al microscopio), la concordancia entre ambas técnicas fue más elevada, 86,2%. Los falsos negativos por PCR representaron en este caso el 15% de las muestras positivas al microscopio. Además el 10% de las muestras negativas al microscopio presentaron una PCR +. Para evaluar la sensibilidad de la técnica de PCR, varias concentraciones de ADN purificado de una cepa de *T. cruzi* fueron añadidas a varios extractos de las heces de triatominos de crías. Para una concentración de 0,2 pg de ADN equivalente aproximadamente a un parásito, la PCR fue siempre positiva. En concentraciones más bajas (10 a 100 fg) solamente 30% de las muestras fueron positivas. Si se considera que un parásito contiene alrededor de 150-200 fg de ADN, la PCR permite detectar un sólo parásito en una muestra de heces.

Se observaron diferencias entre la sensibilidad de la técnica aplicada a muestras del campo y muestras artificialmente infectadas. Además, el análisis detallado por localidades mostró que la sensibilidad fue variable y que podía en ciertos lugares ser sorpresivamente baja (data no presentado).

Se procedió luego a la detección de los clonets 20 y 39 por hibridación de los productos de amplificación PCR + con las sondas específicas correspondientes. Tres perfiles de hibridación se observaron (Fig. 1) :

- Muestras reconocidas por una de las dos sondas correspondientes a infecciones por cepas del clonet 20 o 39.
- Muestras reconocidas por las dos sondas correspondientes a infecciones mixtas por los dos clonet a la vez.
- Muestras no reconocidas por ninguna de las dos sondas correspondientes a infecciones por otros clones de *T. cruzi* que no pertenecen ni al clonet 20 ni al 39.

De un total de 388 muestras PCR + hibridadas, la mayoría (84%) fue reconocida por una o, en el caso de infección mixta, las dos sondas (Tabla 3). En el muestreo total, los clonet 20 y 39 estuvieron presentes cada uno en 57.4% de los triatominos. Un total de 62 muestras no fueron reconocidas por ninguna de las sondas (16%), correspondiendo a insectos infectados (PCR +) por otros clo-

nes que no pertenecieron al clonet 20 ni 39 y su estatuto taxonómico quedó indeterminado. El porcentaje de los otros clones fue más elevado en el muestreo del departamento de Santa Cruz comparado a los dos otros departamentos. Por otra parte, la distribución de los clones en Santa Cruz se distinguió a la de La Paz y Cochabamba; en La Paz y Cochabamba no fueron diferentes ($P > 0.05$; ver Tabla 3). El porcentaje de asociación del clonet 20 con el 39 en un mismo insecto fue muy elevado, 30.9% para el muestreo total, llegando a 40.7% en Cochabamba. Bajo la hipótesis nula de transmisión independiente de los clonet identificados por las sondas 20 y 39 se pudo calcular el número teórico de infecciones mixtas en los triatomíneos a partir de las estimaciones de las frecuencias de los clonets en la población. Los resultados de la Tabla 4 se dedujeron de los datos de la Tabla 3 e indicaron que no hay diferencia significativa entre los números observado y teórico de infecciones mixtas para cada departamento.

Discusión

En este trabajo se demostró la utilidad de la PCR como diagnóstico y método de tipificación de cepas de *T. cruzi* para estudios epidemiológicos. La sensibilidad de la PCR para el muestreo total llegó al 74%, un porcentaje más bajo de lo teóricamente esperado. Esto se explica por la falta de purificación del ADN a partir de las muestras fecales. Para procesar grandes cantidades de muestras y evitar la contaminación de una muestra a la otra, se escogió una preparación sencilla, con dilución de la muestra en agua, hervido y centrifugado. Este extracto pudo contener varios factores inhibidores de la polimerasa, entre otros productos de la sangre ingerida por el insecto. Evidenciamos previamente que la tasa de heces positivas en el microscopio con PCR - varió mucho de una localidad a la otra (Brenière *et al.*, 1995). Los insectos procedentes de la provincia Cordillera (2 localidades próximas) dieron un resultado similar que no se pudo explicar por condiciones experimentales. La presencia de inhibidores de PCR en las muestras fecales sería responsable de la falta de detección de un solo parásito en ciertas muestras. En cambio, en ciertas muestras negativas en el microscopio se tuvo una PCR +. La probabilidad que esta positividad se debió a contaminaciones es baja: los controles introducidos en cada ensayo de preparación de muestras fueron negativos como se esperaba, la intensidad de la amplificación fue variable entre muestras, además fue intensa en algunas de ellas (las contaminaciones dan generalmente bandas débiles), las hibridaciones sobre estos productos exhibieron los diferentes perfiles posibles, resultados poco compatibles con una contaminación que proviene generalmente de una misma fuente.

La segunda parte de este trabajo fue la caracterización de los clones circulantes en los vectores. Se utilizaron dos sondas que reconocen dos grupos de clones, llamados clonete 20 y 39. Cada clonete está compuesto de clones presentando una diversidad genética reducida pero los dos clonetes están separados entre sí por distancias evolutivas grandes. Encontramos que estos 2 clonetes son mayoritarios en *T. infestans* y se encuentran ampliamente distribuidos en Bolivia. La caracterización isoenzimática de 419 cepas bolivianas por Tibayrenc *et al.* (1986) identificó también clones extremadamente representados, los cuales corresponden a los clonetes 20 y 39. La caracterización directa, que evita la etapa del cultivo, confirmó el resultado. La diferencia entre los dos tipos de estudios fue el mayor número de infecciones mixtas identificado por la PCR/hibridación. El análisis isoenzimático detectó solamente 10% de infecciones mixtas y la caracterización directa más del 50% en varias localidades. Esta estimación es probablemente una subestimación porque se detectaron solamente infecciones mixtas de clonete 20 y 39. Se obtuvo una correlación significativa entre las tasas de infección de los triatominos de las diferentes comunidades estudiadas y los números de infecciones mixtas (dato no presentado).

Dos puntos adicionales pudieron ser analizados gracias a la detección directa de los clonetes :

- La distribución de los clonetes 20 y 39 fue diferente entre comunidades e independiente de las distancias geográficas, y se notó diferencias notables entre localidades cercanas. Este resultado sugiere que los contactos entre poblaciones son relativamente limitados, lo que coincide con la baja capacidad de dispersión de los triatominos (fuerte estructuración entre poblaciones de comunidades cercanas).
- La hipótesis de una ausencia de interacciones entre los dos clonetes no pudo ser rechazada. Esto nos sugiere que durante el ciclo del parásito a través del vector y de sus huéspedes mamíferos no existe selección de un clonete particular. Esto no impide la selección de clones por ciertos huéspedes pero la diversidad del parásito parece conservada a través del ciclo completo.

El punto original de este trabajo fue la puesta en evidencia de infecciones mixtas muy abundantes en *T. infestans*. El hombre puede adquirir infecciones mixtas por picaduras de vectores con infecciones mixtas o por reinfección a partir de un vector portador de otro clon. En Bolivia, la alta incidencia de las infecciones mixtas y la alta prevalencia de los dos clonetes 20 y 39 implican que el número teórico de infecciones humanas por los dos clonetes al mismo tiempo

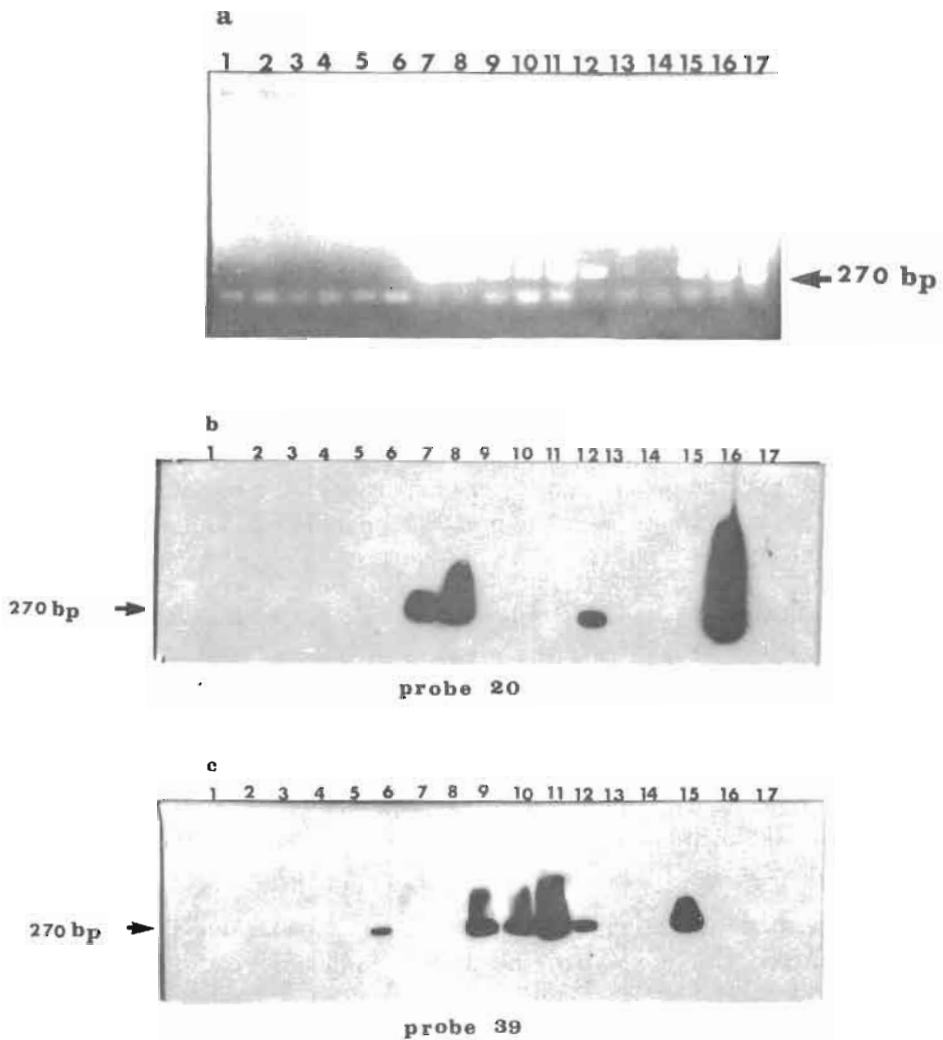


Figura 1. (a) Gel de agarosa al 0.8% con productos de PCR de heces de *T. infestans* teñido con bromuro de etidio. (b & c) Perfiles de hibridación de estos productos con las sondas específicas de los clonet 20 y 39 respectivamente; fila 1 a 3, controles (utilizando heces de *T. infestans* de crianza); filas 4 y 5, controles negativos (utilizando como blanco agua destilada); filas 6 a 13, muestras positivas de *T. infestans*; fila 14, muestra negativa de *T. infestans*; filas 15 y 16, controles positivos (usando 10 ng de ADN de cepas de referencias de *T. cruzi* pertenecientes a los clonet 20 y 39 respectivamente); fila 17, marcador de peso molecular, pUC 19 dirigido por *Rsa*I. Las flechas indican la banda mayor amplificada (270 bp).

debería ser sumamente elevado. Varios trabajos experimentales sobre cepas pertenecientes a estos dos clones mostraron grandes diferencias de virulencia y de comportamiento biológico (Laurent *et al.*, 1997; Revollo *et al.*, 1998; Pinto da Silva *et al.*, 1998), pero los análisis de coinfecciones son escasos y los efectos desconocidos. La situación de coinfecciones humanas por clones de *T. cruzi* que presentan diferencias genéticas importantes sería la regla general en Bolivia. Las consecuencias de tal asociación sobre la patología de la enfermedad queda por determinar.