

DISTRIBUCION DE LOS CLONES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN VECTORES SECUNDARIOS EN BOLIVIA

Brenière S.F.¹, Bosseno M.F.¹, Morochi W.², Vargas F.³ & Noireau F.⁴

Introducción

Triatoma infestans es el vector principal de la enfermedad de Chagas en Bolivia y, excepto algunos focos silvestres de esta especie descritos en el departamento de Cochabamba, existen hasta ahora pocos estudios de las otras especies silvestres. La descripción de las especies silvestres en Bolivia fue limitada en algunos ejemplares hallados durante recolecciones entomológicas (Bermudez & Balderrama, 1991). Ultimamente, dos focos fueron más estudiados. El primero se ubica en la región subandina (localidad de Apolo, departamento de La Paz) donde dos especies, *Eratyrus mucronatus* y *Triatoma sordida*, fueron capturadas en áreas peridomésticas y domésticas (Noireau *et al.*, 1995). El segundo se sitúa en la provincia Velasco (departamento de Santa Cruz) donde en varias localidades, *T. sordida* fue la única especie capturada en áreas peridomésticas y domésticas (Noireau *et al.*, 1997). Estas especies fueron encontradas naturalmente infectadas por *Trypanosoma cruzi*. Además, en los dos casos, la adaptación a los domicilios sería reciente; ninguna otra especie fue descrita anteriormente y son regiones no incluidas en el Programa Nacional de Control de Vectores.

Gracias a sondas de ADN del cinetoplasto, se identificaron frecuentemente en *T. infestans* dos subgrupos de clones nombrados clonet 20 y 39 pertenecientes cada uno a un linaje de *T. cruzi* (Bosseno *et al.*, 1996; Brenière *et al.*, 1995 & 1998).

Describimos en este trabajo las frecuencias de estos clonet en los dos focos previamente indicados (Noireau *et al.*, 1995 & 1997) y en algunos ejemplares

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

² UMSA, La Paz, Bolivia.

³ IBBA, La Paz, Bolivia.

⁴ IRD, CP 9214, La Paz, Bolivia.

de *Rhodnius stali* capturados en la región subandina en áreas peridomésticas. Los resultados de la hibridación fueron complementados por la tipificación isoenzimática de algunas cepas aisladas.

Material y métodos

Áreas de estudio y triatomíneos - La Tabla 1 resume el origen geográfico y la tasa de infección por *T. cruzi* de las tres especies capturadas. Se encuentra una descripción completa del medio físico y humano de la parte subandina del departamento de La Paz en Le Pont *et al.* (1992).

Tabla 1. Detección de *T. cruzi* en vectores secundarios de Bolivia por la técnica de PCR

Focos*	Especies	No. capturados	No. examinados por	
			mo (% +)	PCR (% +)
Apolo	<i>E. mucronatus</i>	152	68 (0%)	68 (19%)
	<i>T. sordida</i>	57	24 (0%)	24 (12%)
Velasco	<i>T. sordida</i>	482	482 (16.7%)	230 (18.3%)**
Alto Beni	<i>R. stali</i>	36	36 (0%)	36 (52%)

* Consultar Noireau *et al.* 1995 & 1997; Brenière *et al.* 1995 & 1998.

** La PCR fue aplicada sobre todos los ejemplares positivos al microscopio y sobre un muestreo al azar de negativos. Las dos técnicas presentaron una concordancia del 91.7%.
mo = observación al microscopio

Aislamiento de cepas y caracterización isoenzimática - En el primer foco (Apolo), el tubo digestivo de 20 ejemplares de *E. mucronatus* y 10 de *T. sordida* fue sembrado en medio NNN pero ninguna cepa se desarrolló. En los focos segundo y tercero se aislaron 14 y 6 cepas de *T. sordida* y *R. stali* respectivamente. Después del cultivo masivo, los parásitos fueron concentrados por centrifugación y los sedimentos guardados a - 70°C. El estudio isoenzimático fue procesado sobre placas de acetato de celulosa según las condiciones descritas por Ben Abderrazak *et al.* (1993). Doce sistemas, equivalentes a 13 loci fueron aplicados : glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT, EC 2.6.1.1), glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G6PD, EC 1.1.1.49), glucosa fosfato isomerasa (GPI, EC 5.3.1.9), glutamato dehidrogenasa NAD⁺ (GDH NAD⁺, EC 1.4.1.2), glutamato dehidrogenasa NADP⁺ (GDH NADP⁺, EC 1.4.1.4), isocitrato dehidrogenasa

(IDH, EC 1.1.1.42), malato dehidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.37), enzima málica (ME, EC 1.1.1.40), peptidasas (substratos: L-leucil-leucina-leucina and L-leucil-L-alanina) (PEP, EC 3.4.11 or 13), 6-fosfo-gluconato dehidrogenasa (6PGDH, EC 1.1.1.44), y fosfo-glucomutasa (PGM, EC 2.7.5.1).

Detección de los clonet 20 y 39 por PCR y hibridación - Las etapas de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), la preparación de las muestras, el método de producción de las sondas 20 y 39 y las condiciones de hibridación fueron previamente descritos (Brenière *et al.*, 1992). Las partes hipervariables de los minicírculos del cinetoplasto (HVRm) de las cepas de *T. cruzi* fueron amplificadas por PCR de cada muestra de heces infectada. Luego los productos de amplificación, transferidos sobre membranas después de su electroforesis, fueron hibridados sucesivamente con las sondas 20 y 39. Las sondas 20 y 39 hibridan respectivamente las cepas pertenecientes a los clonet 20 y 39.

Resultados

La Tabla 2 resume los resultados de la hibridación de cada muestra de heces positiva por PCR. Todo los productos PCR + exhibieron una banda mayor de 270 pb previamente identificada como específica del taxón *T. cruzi* (Veas *et al.*, 1991). La mayoría de los productos no fue reconocida por ninguna de las dos sondas (66%). Estas infecciones correspondieron a parásitos genéticamente distintos de los clonet 20 ni 39 y su posición taxonómica fue indeterminada. Los otros productos fueron hibridados por una de las dos sondas y en pocos casos por las dos sondas a la vez (4%). Este resultado es radicalmente diferente del perfil de hibridación obtenido con los productos de amplificación de heces de *T. infestans* (Fig. 1). Los clonet 20 y 39 mayores en *T. infestans* y frecuentemente asociados en un mismo insecto, presentaron una baja frecuencia en las tres especies secundarias estudiadas.

Los perfiles isoenzimáticos (13 loci) de las 20 cepas aisladas fueron comparados a las cepas de referencia SO34 c14 (clonet 20) y MN (clonet 39). De los 13 loci solamente uno fue monomorfo para todas las cepas (*Mdh*) y cinco para el muestreo de las cepas silvestres (*Gdh*, *Nadp*, *Got*, *Mdh*, *Idh* y *Me*). Un total de 13 distintos genotipos multiloci fue detectado (11 en *T. sordida* y 2 en *R. stali*; Fig. 2). El número medio de alelos por locus fue de 0.50 y la heterocigocidad observada 0.10. La diversidad genética media $H = 0.30$, fue calculada por la fórmula siguiente: $H = \sum h / n$, con $n =$ número de loci estudiado y $h = 1 - \sum xi^2$ ($xi =$ frecuencia del alelo de rango 1 para un locus). La diversidad clonal media

calculada por el índice de Whittam (1989) fue muy elevada; la probabilidad de sortear al azar dos genotipos diferentes fue de 0.95.

Las distancias fenéticas de Jaccard (1908) fueron calculadas entre pares de cepas. El número mínimo de bandas comunes entre cepas de los vectores secundarios fue del 27% y todas las cepas estuvieron más relacionadas a la cepa de referencia SO34 cl 4 que a la cepa MN (el promedio de las distancias de las cepas a las de referencia MN y SO34 cl4 fueron de 0.89 y 0.51 respectivamente).

El dendrograma computarizado a partir de la matriz de las distancias de Jaccard mostró claramente que las cepas de *T. sordida* y *R. stali* pertenecieron al mismo filum de *T. cruzi* y estuvieron relativamente distantes del clon 20 (Fig. 2). Las cepas de *R. stali* fueron agrupadas aparte de las otras cepas.

Las cepas aisladas fueron también caracterizadas por hibridación. El ADN de cada cepa fue extraído y amplificado por PCR; ninguno de los productos de amplificación fue reconocido por alguna de las sondas.

Tabla 2. Identificación de los clon 20 y 39 en especies secundarias de Bolivia

Focos*	Especies	No.	No. de hibridaciones + con			Ausencia de hibridación con las dos sondas
			sonda 20 sola	sonda 39 sola	sondas 20 + 39	
Apolo	<i>E. mucronatus</i>	13	1	2	2	8
	<i>T. sordida</i>	3	1	0	1	1
Velasco	<i>T. sordida</i>	47	5	6	0	36
Alto Beni	<i>R. stali</i>	19	8	2	0	9
	Total	82	15 (18%)	10 (12%)	3 (4%)	54 (66%)

* Consultar Noireau *et al.* 1995 & 1997; Brenière *et al.* 1995 & 1998

Discusión

En este muestreo, la PCR fue positiva en varios casos de heces negativas al microscopio (Tabla 1). De acuerdo con Shikanai-Yasuda *et al.* (1993), la alta sensibilidad de la PCR puede explicar la discordancia entre las dos técnicas. Este resultado mostró el interés de la PCR en la búsqueda de infecciones inframi-croscópicas.

Los resultados de la hibridación y el análisis isoenzimático de las cepas aisladas muestran que la mayoría de las cepas no pertenecen a los clonot 20 ni 39, mayores en el ciclo doméstico boliviano. Sin embargo, podemos decir que las cepas están incluidas en el filum 1 de *T. cruzi* al igual de la gran mayoría de las cepas silvestres aisladas de la cuenca amazónica, de Colombia y de Chile (Miles *et al.*, 1981; Saravia *et al.*, 1987; Lewicka *et al.*, 1995; Brenière *et al.*, 1991).

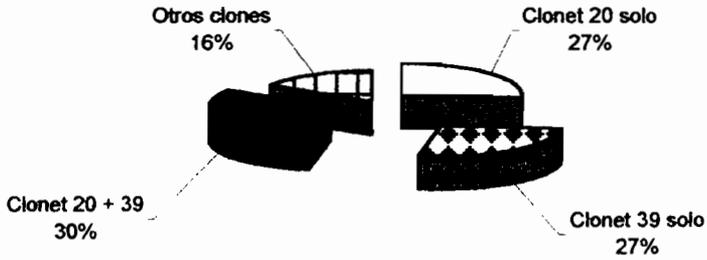
La presencia de los clonot 20 y 39 en *R. stali* podría ser la consecuencia de un estrecho contacto de esta especie con el ciclo doméstico (*T. infestans*). En los dos otros focos, un origen silvestre de los clonot 20 y 39 es más probable, la colonización por *T. sordida* y *E. mucronatus* de los domicilios es reciente, y ninguna población de *T. infestans* fue reportada anteriormente. Además, en estos dos focos, la seroprevalencia es muy baja, de 1% a 3% (Noireau *et al.*, 1995 & 1997). El contacto de estos vectores con pacientes chagásicos no puede justificar las frecuencias de estos clonot en los vectores.

En el foco de Velasco se estudiaron también cepas aisladas de perros, de pequeños mamíferos y marsupiales capturados afuera y adentro de las habitaciones. Cepas pertenecientes a los dos filums fueron identificadas por isoenzimas, algunas fueron estrechamente relacionadas al clonot 39 (dato no presentado). Esto nos confirma la presencia de cepas de los dos linajes en este ciclo, resultado puesto en evidencia por la detección directa de los clonot 20 y 39 en las heces de *T. sordida*.

Las cepas aisladas de *R. stali* fueron agrupadas aparte de las de *T. sordida* (Fig. 2) pero los focos correspondientes son muy distantes y se piensa más en una estructuración geográfica que en una adaptación preferencial de las cepas a las especies de vectores.

Finalmente, en los vectores secundarios de Bolivia se propagan en abundancia cepas pertenecientes al filum 1 pero también cepas del filum 2 al contrario de lo observado en otras áreas del Cono Sur.

Triatoma infestans



Vectores silvestres

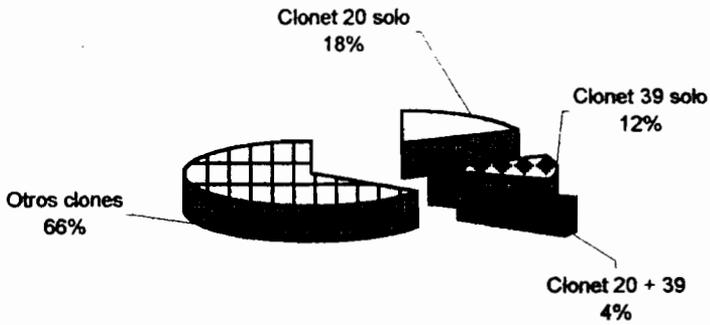


Figura 1. Distribución de los clonet 20 y 39 en *T. infestans* y vectores silvestres.

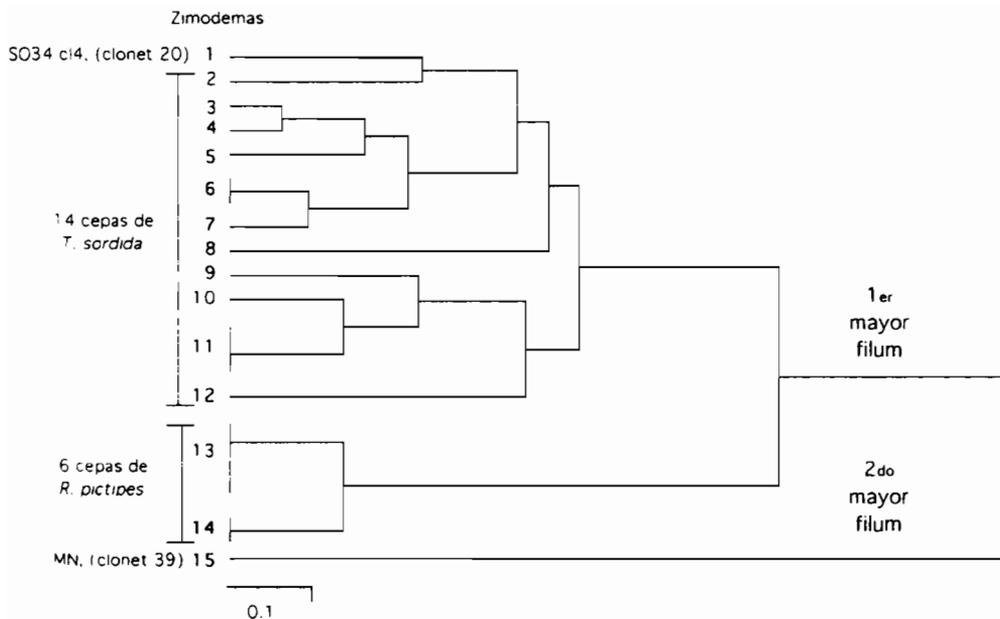


Figura 2. Dendrograma (UPGMA, “Unweighted Pair-Group Method”) construido a partir de las distancias de Jaccard calculadas entre pares de 22 cepas de *T. cruzi* aisladas de vectores secundarios (datos isoenzimáticos). Los zimodemas 1 y 15 corresponden a las cepas de referencia.