

EN BOLIVIA, LOS PACIENTES CHAGASICOS SON MAS INFECTADOS POR EL CLONET 39 DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Brenière S.F.¹, Telleria J.² & Bosseno M.F.¹

Introducción

Los clones de *Trypanosoma cruzi* exhiben una gran heterogeneidad biológica (Dvorak, 1984; Gonzalez *et al.*, 1995; Mirkin *et al.*, 1997; Kirchhoff *et al.*, 1984) y se propuso que sus propiedades biológicas puedan estar relacionadas a su constitución genética (Dvorak *et al.*, 1980; Miles *et al.*, 1981; Flint *et al.*, 1984; Laurent *et al.*, 1997; Revollo *et al.*, 1998; Pinto *et al.*, 1998).

En Bolivia, identificamos dos grupos mayores de clones genéticamente distintos con importantes distancias evolutivas, los clonets 20 y 39 (Brenière *et al.*, 1992 & 1995). Estos dos clonets son ampliamente distribuidos, frecuentemente asociados en un mismo insecto (Bosseno *et al.*, 1996) y reconocidos específicamente por dos sondas de ADN del cinetoplasto (Veas *et al.*, 1991; Brenière *et al.*, 1995 & 1998). Como los dos clonets son los más abundantes en Bolivia y genéticamente muy diferentes (grandes distancias evolutivas), sus trascendencias sobre la enfermedad de Chagas podrían ser exclusivas (virulencia, patología, resistencia a las drogas). Para probar esta hipótesis, detectamos estos clonets en los pacientes adultos y niños de una comunidad de alta endemicidad para relacionar las diferentes infecciones con otros factores como la distribución de los clonets en los vectores, la patología y la respuesta inmune.

Material y métodos

Pacientes - Una población de 490 adultos y niños escolares, nativos de la comunidad de Mizque (dpto. de Cochabamba), fue sometida a exámenes para-

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

² IBBA, La Paz, Bolivia

sitológico y serológico para la detección de infecciones por *T. cruzi*. Luego, los clonet 20 y 39 fueron identificados en la sangre por PCR e hibridación. La comunidad de Mizque pertenece a una zona altamente endémica para el Mal de Chagas presentando una transmisión activa de la enfermedad. El estudio fue realizado antes de una acción de control de los vectores. La parasitemia del grupo de niños de edad inferior a 12 años fue controlada en cada individuo por el examen en microscopio de la interfase de 4 capilares de sangre según La Fuente *et al.* (1984). La serología fue establecida a partir de los resultados de 3 o 4 pruebas de detección de los IgG específicos según Wincker *et al.* (1997). El diagnóstico fue basado sobre la positividad o negatividad de por lo menos 3 pruebas. Todos los pacientes fueron sometidos a un exámen clínico pero en ningún paciente se detectaron síntomas clínicos evocadores de la fase aguda de la enfermedad de Chagas.

Vectores - Una muestra de 128 *T. infestans* de 11 viviendas de la comunidad de Mizque, capturados en sitios domésticos (dormitorios) y peridomésticos (gallineros, conejeras, patios), fue estudiada. La presencia de flagelados en las heces fue analizada en cada individuo por observación en microscopio. Para la mayoría de los insectos positivos y una muestra al azar de los negativos se recolectó una gota de heces para el estudio PCR seguido de la hibridación de los productos de amplificación por las sondas 20 y 39. Mil trece insectos capturados en otras comunidades del dpto. de Cochabamba fueron igualmente procesados para la identificación de los clonet.

Caracterización de los clonet 20 y 39 por PCR/hibridación - El procedimiento de la PCR/hibridación a partir de las heces y de la sangre fue descrito por Brenière *et al.* (1998). Se identificaron los clonet en la mayoría de las heces positivas y en la mayoría de los pacientes con una serología positiva. Varias muestras de pacientes con serología negativa fueron también procesadas al mismo tiempo. Los controles, insectos de crianza y sangre de personas no infectadas, fueron introducidos en cada procedimiento de muestras. Para las muestras de sangre la PCR fue procesada en duplicado. La hibridación de los productos PCR + permitió identificar en las muestras los clonet 20 y/o 39, y en ausencia de hibridación por las dos sondas infecciones por otros clones de *T. cruzi*.

Resultados

Identificación de los clonet 20 y 39 en los vectores - El gran número de insectos capturados en todas las comunidades visitadas confirmó que las pobla-

ciones de *T. infestans* están totalmente establecidas en las áreas domésticas y peridomésticas (Tabla 1). La tasa de infección en la población total fue de 42,6% y fue todavía muy elevada en el barrio de la ciudad de Cochabamba (30,2%). En la comunidad de Mizque, las frecuencias de los clonet 20 y 39 fueron respectivamente de 0,69 y 0,67, con 43,1% de infecciones mixtas (Tabla 1); solamente 7,8% de las muestras no fueron hibridadas por ninguna de las sondas, indicando la presencia de otros clones de *T. cruzi* en estos insectos. En las otras localidades se observaron frecuencias similares de los clonet excepto en la Provincia de Capinota donde el clonet 20 fue por supuesto más frecuente que el clonet 39. Las infecciones mixtas fueron también abundantes, de 31,1% a 85,7% en la localidad de Quiroga.

Tabla 1. Origen geográfico de las colectas y tasa de infección de los triatominos

Provincia	Comunidad	Tasa de infección*		No.	Identificación de los clonet. No. (%)			
		No.	% de positivos		Clonet 20 solo	Clonet 39 solo	Clonet 20 + 39	Otros clones
Mizque	Mizque	128	57.8	51	13 (25.5)	12 (23.6)	22 (43.1)	4 (7.8)
Campero	Aiquile	205	35.1	38	10 (26.3)	6 (15.8)	21 (55.3)	1 (2.6)
	Quiroga	57	54.4	14	0 (0.0)	2 (14.3)	12 (85.7)	0 (0.0)
Capinota	Capinota y 13 localidades cercanas	506	46.4	22	10 (45.5)	2 (9.1)	8 (36.3)	2 (9.1)
Cochabamba	Cochabamba (barrio de Huayra K'asa)	245	30.2	74	23 (31.1)	20 (27.0)	23 (31.1)	8 (10.8)
Total		1141	42.6	199	56 (28.1)	42 (21.1)	86 (43.2)	15 (7.6)

* Exámen de las heces de cada insecto en el microscopio

Identificación de los clonet 20 y 39 en la sangre de los pacientes - De los 490 pacientes, 42,5% presentaron una serología positiva; 3 dieron un resultado dudoso. La Tabla 2 indica los porcentajes de las seroprevalencias de acuerdo con las clases de edades : 1 niño de 4 años y 3 niños de 5 años presentaron una serología positiva; la seroprevalencia de los niños menores de 11 años fue del 38,7%. Este resultado acreditó la importancia de la transmisión activa de la enfermedad de Chagas en esta población. Además, la seroprevalencia aumentó notablemente en función de la edad de los pacientes. De los 270 niños examinados por la presencia de parásitos en la sangre periférica (examen al microscopio), 12 (4,4%) fueron positivos y considerados como casos de reciente infección

(casos agudos). Trescientas setenta y una muestras fueron procesadas por PCR, y la concordancia entre ambas técnicas (PCR y serología) fue del 90%. De los 3 pacientes con una serología dudosa, 1 fue PCR + y presentaba un examen parasitológico positivo. Los dos otros fueron PCR -.

Tabla 2. Seroprevalencia de la infección por *T. cruzi* en la población de Mizque

	Mujeres			Hombres			Total
	No.	Seropositivos		No.	Seropositivos		Seropositivos
	examinados	No.	%	examinados	No.	%	%
< 5 años	9	0	0	11	1		5
5 a 10 años	78	36	46.2	145*	57	39.3	41.7
11 a 15 años	62	27	43.5	67*	19	28.3	35.6
16 a 20 años	21	7	33.3	17*	9	52.9	42.1
21 a 30 años	8	4	50.0	13	8	61.5	57.1
31 a 45 años	21	17	80.1	9	2	22.2	63.3
> a 45 años	11	10	90.1	8	8	100	94.7

* un paciente presentó una serología dudosa

La Tabla 3 presenta los resultados de las hibridaciones de 236 productos de PCR incluyendo la mayoría de los PCR + y 75 PCR - escogidos al azar como controles. Los controles positivos y negativos (paciente chagásico y paciente no infectado) fueron introducidos cada 5 muestras procesadas en duplicado. Los perfiles de hibridación, como para los vectores, correspondieron a la identificación en la sangre de los clonet 20 y/o 39, u otros clones de *T. cruzi*. De los 75 productos de PCR -, 68 no fueron hibridados como se lo esperaba; de los 7 que presentaron una hibridación 6 correspondieron a pacientes con una serología positiva (pacientes chagásicos) y una PCR -. La etapa de hibridación puede ser adecuadamente sensible para detectar productos de amplificación no visibles por la coloración con el bromuro de etidio. El otro paciente presentó una serología negativa y un problema de contaminación fue presumido. De los 161 productos PCR +, la gran mayoría fue hibridada por la sonda 39 (84.5%). Solamente en 4 pacientes el clonet 20 solo fue identificado y 16.1% de los pacientes presentaron una mezcla de los dos clonet. La repartición de los clonet no fue diferente según las clases de edades ($P > 0.05$; Fig. 1). De la población total, los clonet 20 y 39 fueron identificados en 9 pacientes con una parasitemia positiva (casos

agudos): 6 de ellos presentaron una infección mixta (66.7%) y 3 por el clonot 39 solo.

Tabla 3. Identificación de los clonot 20 y 39 en la sangre de los pacientes

PCR	Serología	Hibridación positiva			Hibridación negativa
		Sonda 20 sola	Sonda 39 sola	Sondas 20 + 39	
PCR + n = 161	+	4	109	25	20
	Dudosa	0	0	1	0
	-	0	1	0	1
PCR - n = 75	+	0	5	1	23
	Dudosa	0	0	0	2
	-	0	1	0	43
Total		4	116	27	89

Comparación de la distribución de los clonot en los vectores y los pacientes - La distribución de los clonot fue radicalmente diferente entre los vectores y la población total de los pacientes ($P < 0.001$). El clonot 20 que fue abundante en los vectores (frecuencia = 0.69) fue poco representado en la sangre de los pacientes (frecuencia = 0.19; $P < 0.001$). El número de infecciones mixtas (clonot 20 + 39) cayó proporcionalmente en los pacientes ($P < 0.001$). El incremento del clonot 39 en los pacientes fue significativo ($P < 0.01$). En cambio, no se encontraron diferencias de la distribución de los clonot entre la población de los pacientes en fase aguda (9 pacientes) y de los vectores.

Discusión

Comparación de las frecuencias de los clonot 20 y 39 en los vectores y los pacientes - Los clonot 20 y 39 fueron siempre muy abundantes en *T. infestans* capturados en Bolivia pero se detectó en la gran mayoría de los pacientes de la comunidad de Mizque el clonot 39. En esta comunidad la transmisión es mayormente vectorial y en caso de transmisión al azar de los clonot las frecuencias en el hombre deberían ser análogas que en los vectores. Varias hipótesis pueden explicar esta diferencia :

- i) Fluctuaciones temporales de los clonot en los vectores : Los clonot fueron detectados al mismo tiempo en los vectores y en los pacientes. La enfermedad

de Chagas es una infección crónica, la mayoría de los pacientes fueron probablemente infectados varios años antes del estudio. Variaciones de la distribución de los clones en los vectores en el pasado podrían explicar la diferencia observada. Hace 12 años, Tibayrenc *et al.* (1986) reportaron en el departamento de Cochabamba frecuencias de los clones en los vectores similares a las actuales. Este resultado y la amplia dispersión de los dos clones en otras regiones de Bolivia apoya la ausencia de fluctuaciones temporales de los clones en los vectores.

ii) Selección de un clone particular en el hombre : La selección de un clone en los pacientes puede explicarse por diferencias de infectividad o tasas diferentes de parasitemia según el clone. Para comparar la infectividad de los clones es necesario estudiar a los pacientes en la fase inicial de la infección. Al principio de la infección la parasitemia es más elevada (casos agudos), la respuesta inmune es todavía mal establecida y la probabilidad de ser reinfectado es mínima. Así, en esta población, la distribución de los clones debería estar similar a la de los vectores. En 9 pacientes con parasitemia indetectada en microscopio (casos agudos), la distribución de los clones no es diferente a la de los vectores. Obtuvimos un resultado similar para pacientes menores de 2 años de la ciudad de Cochabamba que presentaron una parasitemia directa positiva: de 15 pacientes, 3 fueron infectados solamente por el clone 20, 9 solamente por el clone 39, 4 por los dos clones a la vez y 1 por ninguno de los clones. La distribución de los clones en este segundo grupo no fue diferente de los vectores del barrio de la ciudad de Cochabamba. Los resultados de los dos estudios de pacientes en la fase inicial de la infección apoyaron la hipótesis de una transmisión al azar de los clones. La selección llegaría más tarde en la infección. Después de la fase inicial de la infección, la parasitemia baja para establecerse a un nivel infra microscópico debido probablemente a la intervención de la respuesta inmune del huésped. Sin embargo, el control de la parasitemia parece más eficiente contra los parásitos pertenecientes al clone 20 para después prolongarse durante toda la infección (resultados idénticos en las diferentes clases de edades). De igual manera, algunos trabajos experimentales en el ratón, indicaron que la virulencia y la parasitemia fueron dependientes de la variabilidad genética de los clones de *T. cruzi* (Sánchez *et al.*, 1990, Laurent *et al.*, 1997).

¿Como persiste el clone 20 en los vectores? La existencia de un ciclo de transmisión limitado al hombre/vector debería provocar la eliminación del clone 20 en el ciclo doméstico. Consecuentemente, los animales domésticos como

perros, gatos, conejos y pequeños roedores jugarían un papel importante en la persistencia de los dos clonet. Es muy probable que la virulencia y la parasitemia de los clones varíen entre especies diferentes de mamíferos. Así, la intervención de numerosos huéspedes en el ciclo doméstico puede explicar la persistencia de la diversidad clonal en los vectores.

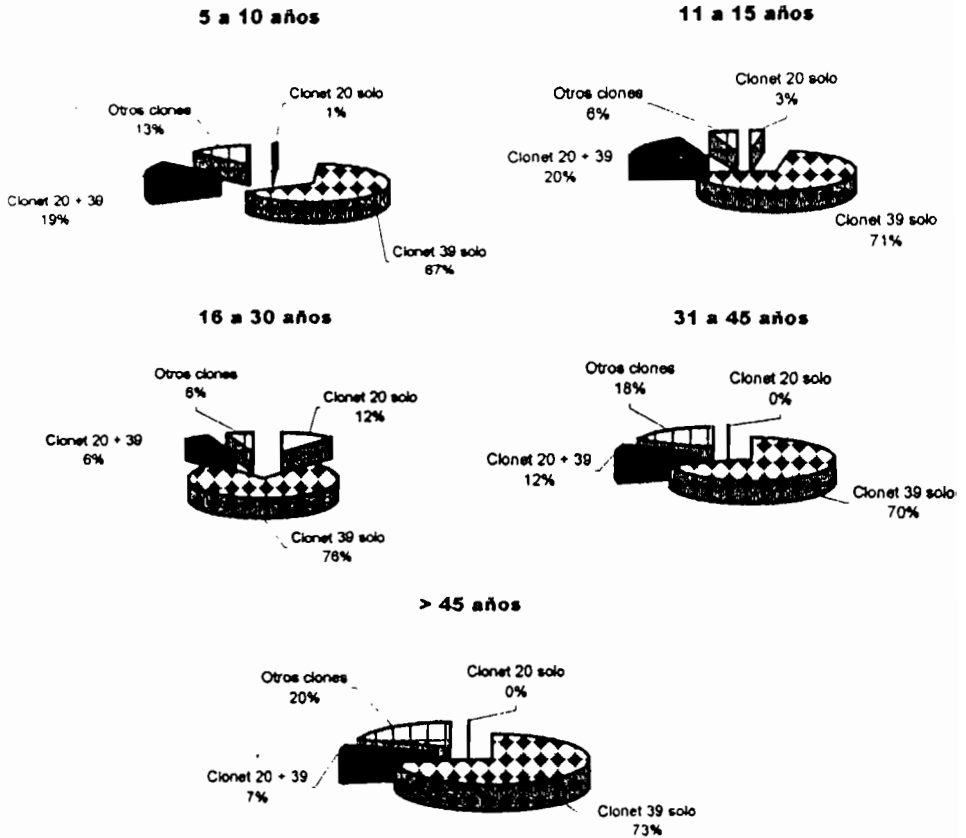


Figura 1. Distribución de los clonet en los pacientes chagasicos según las clases de edades