



Determinación del grado de infestación e infección de vectores de la enfermedad de Chagas en la comunidad de Huayhuasi (Mecapaca)

Determination of the degree of infestation and infection of vectors of Chagas disease in the community of Huayhuasi (Mecapaca)

JURADO, M.¹
PAUCARA, M. B.¹
ZAPATA, D.¹

ROCHA, R.¹
CALLAPA, J.¹
REVOLLO, S.¹

CORRESPONDENCIA:

...

FECHA DE RECEPCIÓN: 5 DE ABRIL DE 2017

FECHA DE ACEPTACIÓN: 5 DE MAYO DE 2017

Resumen

Los trabajos realizados de trapeo y captura de triatominos (que son los insectos vectores de la enfermedad de Chagas) en zonas silvestres de los alrededores de la localidad de Huayhuasi, municipio de Mecapaca en el departamento de La Paz. Se colocaron 50 trampas en lugares estratégicos escogidos de acuerdo a las características del área de estudio. De las 50 trampas, en 9 trampas se lograron atrapar a los triatominos, lo que representa el 4.5% de infestación de la zona de estudio. Se capturaron a 13 insectos (7 ninfas de diferentes estadios y 6 adultos). Las características morfológicas de los insectos fueron las típicas del *Triatoma infestans*. En el examen en fresco de las deyecciones de los 6 especímenes adultos capturados, en 4 de ellos se detectó presencia del parásito *Trypanosoma cruzi*, lo cual demuestra un 67% de infección, porcentaje bastante significativo en

Abstract

Trapping and capture of triatomines (which are the insect's vectors of Chagas' disease) were carried out in wild areas around the town of Huayhuasi, municipality of Mecapaca, in the department of La Paz. 50 traps were placed in strategic places chosen according to the characteristics already established. Of the 50 traps, nine traps managed to trap the triatomines, representing 4.5% of infestation in the study area. 13 insects (7 nymphs of different stages and 6 adults) were captured. The morphological characteristics of the insects were typical of *Triatoma infestans*. In the fresh examination of the excrement of the six captured adult specimens, in 4 of them the presence of the parasite *Trypanosoma cruzi* was detected, which shows a 67% infection, a very significant percentage considering the proximity of these infested places to the Urban areas of the municipality of Mecapaca. The parasites that the

¹ Laboratorio de Genética Molecular - Instituto Seladis, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz - Bolivia.

consideración a la cercanía de estos lugares infestados a las zonas urbanas del municipio de Mecapaca. Los parásitos que los especímenes portaban, fueron aislados y cultivados en medio de cultivo LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado con 10% de suero bovino fetal e incubados en estufa a 26°C. El análisis del ADN extraído de los parásitos, ha revelado la DTU (Discrete Typing Unit) correspondiente al linaje TcI.

PALABRAS CLAVE

Triatoma infestans, DTU (Unidad Discreta de Tipificación), Re-infestación, Riesgo epidemiológico.

specimens carried were isolated and cultured in LIT (Liver Infusion Tryptose) medium supplemented with 10% fetal bovine serum and incubated in an oven at 26 °C. Analysis of the DNA extracted from the parasites has revealed the DTU corresponding to the Tc I lineage.

KEY WORDS

Triatoma infestans, DTU (Discrete Typing Unit), Reinfestation, Epidemiological risk.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una antropozoonosis causada por el protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi*, es potencialmente mortal, característica del continente americano y más particularmente de Latinoamérica. Se calcula que en el mundo hay más de 8 millones de personas infectadas, prevalece sobre todo en zonas endémicas de 21 países de América Latina donde se transmite a los seres humanos principalmente por las heces de insectos triatomíneos conocidos como vinchucas, chinches o con muchos otros nombres, según la zona geográfica (OMS, 2016).

Bolivia, es un país con una alta tasa endémica para la enfermedad de Chagas, siendo el vector principal el *Triatoma infestans* (Triatominae), se trata de una especie principalmente doméstica que también se encuentra en el medio ambiente salvaje (Depickere, S. y col., 2012). Entre los departamentos con presencia de la enfermedad de Chagas se encuentra el departamento de La Paz con 24 municipios endémicos. Si bien, en el año 2011, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) certificó al departamento de La Paz como el primer departamento que alcanzó la interrupción de la transmisión vectorial del *T. cruzi* por *T. infestans* intradomiciliario (<https://boliviasol.wordpress.com>); en el año 2012, investigadores franceses y bolivianos publicaron los resultados de un estudio pionero sobre la distribución geográfica y el papel epidemiológico de las poblaciones silvestres de *Triatoma infestans* en Bolivia, describieron la amplia distribución de *T. infestans* silvestre en ecoregiones de Bosques Secos Interandinos y en el Gran Chaco, la alta tasa de infección de *T. infestans* silvestre andino, la re-infestación en los Andes y el peligro de transmisión de *T. cruzi* en el medio silvestre andino, alertando que las poblaciones silvestres están altamente infectadas con el parásito y que pueden moverse hacia las casas (Breniere, S. y col., 2012). Estos resultados han llamado la atención y despertado el interés en realizar el estudio para determinar el grado de infestación por los insectos triatomíneos vectores de la enfermedad de Chagas

en el área silvestre de la comunidad de Huayhuasi del municipio de Mecapaca del departamento de La Paz; el grado de infección por *T. cruzi* de estos insectos y la determinación de la DTU de *T. cruzi* que infecta a los insectos triatominos ya que la diversidad genética de *T. cruzi* en las zonas endémicas del territorio boliviano es bastante grande (Buitrago, R. y col., 2016).

MATERIAL Y MÉTODOS

Terreno

Huayhuasi, es una comunidad del municipio de Mecapaca en el departamento de La Paz, se halla ubicada a una altura de 2,757 m.s.n.m., a los 16°42'25.47" de latitud este y 67°59'37.64" de longitud sud (Vidaurre, P., 2016). Luego de un análisis de preinspección del área, se decidió iniciar con los trabajos de trapeo y captura de los insectos en lugares escogidos de manera aleatoria.

Captura y trapeo de triatominos

Para el trapeo y captura de las vinchucas se siguió el método Noireau (Noireau, F. y col., 2002). Las trampas, fueron armadas de forma artesanal y consistieron en recipientes de plástico dentro de los cuales se colocaron a un ratón como cebo con el fin de atraer a los insectos triatominos, luego los frascos fueron cerrados con una tapa de malla de alambre, bordeada con una cinta pegajosa doble cara para atrapar al insecto.

En total se colocaron 50 trampas en el área silvestre de la comunidad de Huayhuasi, las cuales se instalaron en lugares donde se presume que las vinchucas viven y donde se supone que se esconden durante el día. Los lugares escogidos fueron: La entrada de madrigueras; debajo de los bloques de piedras, al pie de plantas como los cactus y otros. La operación se desarrolló en dos días, en la tarde del día 1 se colocaron las trampas numeradas en lugares designados correspondientes al área silvestre, estos lugares fueron señalados con cintas de colores fosforescentes para una buena visualización de estos lugares, al día siguiente (día 2), por la mañana, se procedió a recuperar las trampas, a recoger a los insectos y a efectuar el registro de las capturas. Los especímenes fueron clasificados según su edad y colocados dentro de tubos de plástico para transportarlos al laboratorio.

Análisis morfológico de los triatominos

Para el estudio de caracterización morfológica mediante la observación directa de los especímenes, se ha utilizado un estéreo microscopio (Euromex). En la identificación y la clasificación se tomaron en cuenta las siguientes características morfológicas: En los adultos, se observaron el color, el tamaño, la forma de la banda conexiva, el tamaño de la región cefálica y la posición de las antenas entre otras características (Lent y Wygodzinsky, 1979; Botero, D., Restrepo, M., 2003); en los estadios de ninfa se observaron y se identificaron

a los mismos por la ausencia o por la presencia de los segmentos del tórax y los vestigios de las alas a partir del cuarto estadio de ninfa (Carcavallo, R. y col., 1999; Rojas, M., 2007).

Cultivo de *Trypanosoma cruzi*

Para conocer la presunta infección con *T. cruzi* en las vinchucas, se procedió a realizar el examen en fresco de las deyecciones, las cuales fueron disueltas en solución fisiológica sobre un portaobjetos para luego proceder a la observación en el microscopio óptico en busca de la presencia del parásito mediante observación directa. De acuerdo a los resultados, a partir de los triatomíneos adultos positivos portadores del parásito, se procedió a retirar el tubo digestivo con ayuda de una pinza, el cual fue colocado inmediatamente en medio de cultivo LIT (Liver Infusión Tryptose) suplementado con 10% de suero bovino fetal e incubado en estufa a 26°C.

Extracción y cuantificación de DNA de los parásitos

Una alícuota de cultivo puro de los parásitos fue sedimentado para concentrarlos por centrifugación y lavado con PBS y proceder a la extracción del DNA en un extractor automatizado de ADN y ARN Kingfisher DuoPrime a través del kit Thermo Scientific Kingfisher™ Pure DNA Blood Kit. El ADN extraído fue cuantificado en el cuantificador Qubit® 2.0

Tipificación genética del *Trypanosoma cruzi*

El ADN fue amplificado en 25µL de volumen de reacción conteniendo 1X de buffer de reacción, 1.5 mM de MgCl₂, 50 µM de cada nucleótido, 0.2 µM de cada cebador, 0.5 UI de Ampli Taq® Gold DNA Polymerase (Applied biosystems). La amplificación fue realizada en un termociclador (Veriti de Applied Biosystem) en condiciones previamente descritas (Fernandes y col., 2001) con algunas modificaciones. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1.5% usando marcadores de peso molecular (100bp DNA Ladder Plus Eurogentec, Angers, France) y visualizado bajo luz ultravioleta con SYBR Green (Applied biosystems). La discriminación entre DTUs (Discrete Typing Unit) fue realizada de acuerdo a (Aliaga, C. y col., 2011) mediante el uso de tres cebadores de la región intergénica del *T. cruzi* miniexon, Tc1: 5' ACACTTTCTGTGGCGCTGATCG; Tc2: 5'-TTGCTCGCACACTCGGCTGCAT y Tc3: 5'CCGCGWACAACCCCTMATAAAAATG, un cebador de *T. rangeli* Tr: 5' CCTATTGTGATCCCCATCTTCG y un oligonucleótido común corriente abajo fue seleccionado en la parte más conservada del gen miniexon Me: 5' TACCAATATAGTACAGAAACTG.

Los cebadores utilizados en el presente trabajo fueron diseñados para amplificar específicamente regiones del Miniexon de *Trypanosoma cruzi* los cuales fueron desarrollados inicialmente por Fernandes y col., 2001 y posteriormente han sido ampliamente utilizados en otros trabajos como el de Aliaga y col.; 2011, Brenière & Barnabe, 2011; Barnabe y col., 2011.; Bosseno y col.,

2006; Brenière y col., 2012; Pérez y col., 2013, por esta razón no ha sido necesario la diferenciación con otros parásitos de la familia Trypanosomatidae, además las secuencias de los cebadores utilizados fueron comprobadas en el banco de genes (NCBI: GenBank) utilizando el programa BLAST con un grado de correspondencia del 100%.

RESULTADOS

De las 50 trampas colocadas en las zonas silvestres, en 9 trampas se lograron capturar a trece insectos (Foto 1), la clasificación de acuerdo a la edad de los mismos se detalla en la Tabla 1.

Foto 1.
Trampa Noireau con los insectos capturados.



Tabla 1.
Clasificación por edad de los especímenes de Triatomos capturados en la localidad de Huayhuasi.

N°	Código	Estadio
1	H50	4to. Estadio (N4)
2	H46	Adulto (macho)
3	H71	Adulto (hembra)
4	H72	Adulto (hembra)
5	H73	5to. Estadio (N5)
6	H11	Adulto (hembra)
7	H462	3er. Estadio (N3)
8	H463	2do. Estadio (N2)
9	H74	1er. Estadio (N1)
10	H8	1er. Estadio (N1)
11	H30	2do. Estadio (N2)
12	H33	1er. Estadio (N1)
13	H28	1er. Estadio (N1)

El estudio de caracterización morfológica ha permitido reconocer que los especímenes muestran las características físicas propias del *Triatoma infestans*, fotos (2, 3, 4 y 5), se ha constatado además que el tamaño de los adultos

varía entre 1,5 y 3 cm de longitud, el perfil de las trompas es el característico, la cabeza es alargada, y termina en una proboscis recta que en el reposo se dobla centralmente sobre el cuerpo y se extiende en el momento de la picadura. El tórax es quitinoso y su segmento anterior tiene forma de escudo. Las alas son dobles y permanecen dobladas sobre el dorso y el abdomen tiene pigmentación de colores vistosos característicos del *T. infestans*.

Fotos 2 y 3.
Cabeza y tórax de Triatominos adulto.



Fotos 4 y 5.
Dorso del abdomen de Triatominos adulto.



Nota: Los resultados de la infección positiva (presencia del *T. cruzi*) o negativa (ausencia del *T. cruzi*) en los 6 especímenes de los Triatominos adultos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.
Resultado de la infección de los Triatominos adultos con *Trypanosoma cruzi*

N°	Código	Resultado de infección
1	H50	Negativo
2	H46	Positivo
3	H71	Positivo
4	H72	Positivo
5	H73	Negativo
6	H11	Positivo

Como se puede ver en la Tabla 2, en las deyecciones de los 6 especímenes adultos revisados, en 4 de ellos se observó presencia del *T. cruzi*, lo cual significa un 67% de infección de los Triatominos.

De los parásitos aislados del espécimen H72 y cultivados en medio LIT, se logró extraer DNA para el análisis por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR convencional), la genotipificación a partir de los productos de la PCR ha confirmado que el *Triatoma infestans* del área silvestre de la comunidad de Huayhuasi presenta infección con el linaje de *T. cruzi* (Tcl).

DISCUSIÓN

En este trabajo de investigación se constata una infestación del 16% con Triatominos de la zona silvestre de la comunidad de Huayhuasi, porcentaje bastante significativo en consideración a la proximidad a las zonas urbanas del municipio de Mecapaca, y lo que llama más la atención es el alto porcentaje de infección de estos insectos con el parásito *T. cruzi* (67%) y la confirmación mediante la genotipificación de esta infección por la DTU Tcl, el cual era considerado principalmente de origen selvático con circulación entre animales y triatominos silvestres; pero posteriormente detectaron *T. infestans* capturados desde casas positivas y también pacientes infectados con Tcl, el cual está asociado a una presentación más aguda y virulenta en humanos (Coronado, X. y col., 2006). Además, los datos encontrados estiman una probabilidad de re-infestación en el ciclo doméstico ya que si se observa los resultados que obtuvieron Brenière y col., en el año 2012 sobre el contenido estomacal de los triatominos capturados en áreas silvestres, en el 19% detectaron sangre humana, suponiendo un posible desplazamiento de insectos del hábitad humano hacia el medio silvestre después de alimentarse de sangre o la exposición humana a las picaduras de estos insectos en medio silvestre donde las personas realizan sus actividades, lo cual representa un riesgo importante de reemergencia de la enfermedad (Breniere, S. y col., 2012).

Los resultados de este estudio deben ser tomados en cuenta por las autoridades de salud correspondiente, definir las medidas que pueden tomarse para proteger a los habitantes de la localidad de Huayhuasi del municipio de Mecapaca de todo contacto con los vectores de la enfermedad de Chagas.

Debemos mencionar como investigadores, que hace falta una vigilancia constante respecto al control del vector y su presencia en áreas silvestres para detener la transmisión de la enfermedad de Chagas en poblados con presencia importante de personas que realizan trabajos externos propios de agricultura, ganadería y otros.

Los estudios posteriores que se van a realizar referentes a la prevalencia de la enfermedad de Chagas en el municipio de Mecapaca serán relevantes y reveladores para tomar las medidas correctas de vigilancia y control de la enfermedad de Chagas en este municipio.

AGRADECIMIENTOS

El estudio fue parte del programa de la cátedra de Epidemiología Molecular de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la UMSA gestión 2016 y contó con la participación de los estudiantes quienes colaboraron con el trampeo y captura de los insectos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliaga, C., Brenière, S.F., Barnabé, C., (2011), Further interest of miniexon multiplex PCR for a rapid typing of *Trypanosoma cruzi* DTU groups. *Infect. Genet. Evol.* 11: 1155–1158.
- Barnabe, C., Buitrago, R., Bremond, P., Aliaga, C., Salas, R., Vidaurre, P.,... Breniere, S. F. (2013). Putative panmixia in restricted populations of *Trypanosoma cruzi* isolated from wild *Triatoma infestans* in Bolivia. *PLoS One*, 8(11), e82269. doi: 10.1371/journal.pone.0082269
- Bosseno, M. F., Garcia, L. S., Baunaure, F., Gastelum, E. M., Gutierrez, M. S., Kasten, F. L., Breniere, S. F. (2006). Identification in triatominae vectors of feeding sources and *Trypanosoma cruzi* variants by heteroduplex assay and multiplex miniexon polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, 74(2), 303-305.
- Brenière, S., Barnabé, C., Brémond, P., Buitrago, R. (2012a), Sistema vectorial emergente debido a las poblaciones salvajes de *Triatoma infestans*: la enfermedad de Chagas en Bolivia, proyecto TIBO, *BIOFARBO*, 20 (1): 1-7
- Breniere, S. F., Aliaga, C., Waleckx, E., Buitrago, R., Salas, R., Barnabe, C., Noireau, F. (2012b). Genetic Characterization of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Wild *Triatoma infestans* from Bolivia: Predominance of TcI. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(5), e1650.
- Buitrago, R., Breniere, S., Taborga, X., Quispe, R., Revollo, S. (2016). Identificación genética del agente causal y el insecto vector de la enfermedad de Chagas circulante en la Amazonía Boliviana: Provincia Iturrealde, *Revista Con-Ciencia*, N°1/Vol. 4: 93-103.
- Carcavallo, R., Galíndez-Girón, I., Juerberg, J., Glavao, C., Lent, H., (1999), Pictorial keys for tribes, genera and species of the subfamily Triatominae. In: Carcavallo, R., Galíndez-Girón, I., Juerberg, J., Glavao, C., Lent, H., editors. *Atlas of Chagas disease vectors in the Americas*. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 107-244.
- Coronado, X., Zulantay, I., Albrecht, H., Rozas, M., Apt, W., Ortiz, Z., Rodriguez, J., Sanchez, G., Solari, A., (2006). Variation in *Trypanosoma cruzi* clonal composition detected in blood patients and xenodiagnosis triatomines: implications in the molecular epidemiology of Chile, *Amij. Trop. Med. Hyg.* 74(6):1008-1012.
- Depickere S., Buitrago R., Siñani E., Baune M., Monje M., López M., Waleckx E., Chavez T., Brenière F., (2012), Susceptibility and resistance to deltamethrin of wild and domestic populations of *Triatominae* (Reduviidae: Triatominae) in Bolivia: new discoveries, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 107 (8): 1042-1047.
- Fernandes, O., Santos S.S., Cupolillo, E., Mendonga, B., Derre, R., Junqueira, A. C. V., Santos, L. C., Sturm, N. R., Naiff, R.D., Barret, T.V., Il. A. Campbell, A., and Coura, J.R. (2001). A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon, 95: 97-99.
<https://boliviasol.wordpress.com>, revisado el 14 de febrero de 2017
- Lent, H., Wygodzinsky, P., (1979), Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease, *Bull AmerMus Nat Hist.*, 163: 125-520
- Botero, D., Restrepo, M. (2003) *Tripanosomiasis. Parasitosis Humanas. Corporación para la investigación biológica, Medellín – Colombia*, p. 239-260.
- Noireau F., Abad-Franch F., Valente S., Dias-Lima A., Lopes C., Cunha V., Valente V., Palomeque F., de Carvalho-Pinto C., Sherlock I., Aguilar M., Steindel M., Grisard E., Juerberg J., (2002), Trapping Triatominae in silvatic habitats, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97: 61-63.
- Organización Mundial de la Salud, 2016, *La enfermedad de Chagas, tripanosomiasis americana*, centro de prensa, 340.
- PREz, E., Monje, m, Chang, B., Buitrago, R., Parrado, R., Barnabe, C.,...Breniere, S.F. (2013). Predominance of hybrid discrete Typing Units of *Trypanosoma cruzi* in domestic *Triatoma infestans* from the Bolivian Gran Chaco region. *Infect Genet Evol*, 13, 116-123. Doi: S1567-1348(12)00307-3 (pii) 10.1016/j.meegid.2012.09.014
- Rojas M., 2007, *Triatomines de Bolivia y la enfermedad de Chagas*, Ministerio de Salud y Deportes – Programa Nacional de Chagas, Imp. Genesis, 352 p.
- Vidaurre, P., (2016), “Jornadas de actualización en enfermedad de Chagas”, Vigilancia Entomológica en Áreas libres de riesgo de transmisión de Chagas en el Departamento de La Paz, Octubre de 2016, Sucre – Bolivia.