

32. Salud Humana

ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y MOLECULAR DE *Triatoma sordida*: UN VECTOR SECUNDARIO CON CAPACIDAD POTENCIAL PARA TRANSMITIR LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN REGIONES DEL PARAGUAY

Guillén, Laura¹; Nara, Eva¹; Paredes, Berta²; Pineda, Daysi¹; Russomando, Graciela¹;
Sánchez, Zunilda¹

Universidad Nacional de Asunción - Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud -
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología
Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social - SENEPA

RESUMEN

En el presente estudio se evaluaron indicadores entomológicos como: índices de infestación, colonización e infección natural y fuente de alimentación de ejemplares de *Triatoma sordida* capturados en el intra y peridomicilio de viviendas de los departamentos de Paraguarí, San Pedro y Cordillera de la Región Oriental del país en el período 2007 al 2015. El objetivo fue determinar el rol potencial de la especie *T. sordida* (vector secundario) en el ciclo doméstico de transmisión de *T. cruzi*. Se aplicaron técnicas moleculares asociados a indicadores entomológicos y epidemiológicos a un total de 559 ejemplares de *T. sordida*: 335 ejemplares de 253 viviendas de Paraguarí, 144 ejemplares de 91 viviendas de San Pedro y 80 ejemplares de 52 viviendas de Cordillera. La infestación intradomiciliar detectada fue del 28%, 48% y 24% y la colonización fue 36%, 10% y 5% respectivamente. La infección natural se detectó en 19%, 14% y 44% de los ejemplares respectivamente. Del total de 559 ejemplares analizados, en 111 ejemplares se determinó la fuente de alimentación, encontrándose un porcentaje importante de sangre humana como fuente de alimento en los ejemplares de *T. sordida* de los tres departamentos estudiados; 7,5%, 10% y 82% respectivamente. Estos hallazgos evidencian la capacidad de ésta especie de triatomino como transmisor potencial de *T. cruzi* en comunidades de la Región Oriental.

Palabras clave: *T. sordida*, infestación, colonización, infección natural, fuente de alimentación.

ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y MOLECULAR DE *Triatoma sordida*: UN VECTOR SECUNDARIO CON CAPACIDAD POTENCIAL PARA TRANSMITIR LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN REGIONES DEL PARAGUAY

Guillén, Laura¹; Nara, Eva¹; Paredes, Berta²; Pineda, Daysi¹; Russomando, Graciela¹; Sánchez, Zunilda¹

Universidad Nacional de Asunción - Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud -
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología
Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social - SENEPA

RESUMEN

En el presente estudio se evaluaron indicadores entomológicos como: índices de infestación, colonización e infección natural y fuente de alimentación de ejemplares de *Triatoma sordida* capturados en el intra y peridomicilio de viviendas de los departamentos de Paraguarí, San Pedro y Cordillera de la Región Oriental del país en el período 2007 al 2015. El objetivo fue determinar el rol potencial de la especie *T. sordida* (vector secundario) en el ciclo doméstico de transmisión de *T. cruzi*. Se aplicaron técnicas moleculares asociados a indicadores entomológicos y epidemiológicos a un total de 559 ejemplares de *T. sordida*: 335 ejemplares de 253 viviendas de Paraguarí, 144 ejemplares de 91 viviendas de San Pedro y 80 ejemplares de 52 viviendas de Cordillera. La infestación intradomiciliar detectada fue del 28%, 48% y 24% y la colonización fue 36%, 10% y 5% respectivamente. La infección natural se detectó en 19%, 14% y 44% de los ejemplares respectivamente. Del total de 559 ejemplares analizados, en 111 ejemplares se determinó la fuente de alimentación, encontrándose un porcentaje importante de sangre humana como fuente de alimento en los ejemplares de *T. sordida* de los tres departamentos estudiados; 7,5%, 10% y 82% respectivamente. Estos hallazgos evidencian la capacidad de ésta especie de triatomino como transmisor potencial de *T. cruzi* en comunidades de la Región Oriental.

Palabras claves: *T. sordida*, infestación, colonización, infección natural, fuente de alimentación.

Key words: *T. sordida*, infestation, colonization, natural infection, blood meal source.

INTRODUCCION

El principal vector transmisor en la Enfermedad de Chagas causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* en la Región del Cono Sur de América Latina, es el *Triatoma infestans* (1). Esta vía de transmisión ha disminuido en la última década, gracias a las decisiones políticas de los países que con actividades sostenidas de control vectorial han logrado el corte de la transmisión intradomiciliar de *T. cruzi* por esta especie. En la actualidad existe un riesgo permanente de re-infestación de las viviendas desde focos residuales de *T. infestans* como también el riesgo de la invasión de viviendas por especies secundarias como el *Triatoma sordida*. Muchas especies nativas adquieren importancia epidemiológica debido a la capacidad de intercambio entre hábitats selváticos y domésticos, así como para reemplazar el nicho ecológico de triatomíneos domiciliarios (2). Por esta razón es importante considerar la presencia de especies nativas de focos selváticos como: *T. sordida*, *T. guasayana*, *Pastrongilus megistus* y otros en el proceso de colonización de las viviendas humanas y que son clasificados como potenciales vectores de la enfermedad. Este estudio se planteó con el objetivo de caracterizar el rol potencial de la especie *T. sordida* procedentes de viviendas rurales de los departamentos de Paraguarí, San Pedro y Cordillera de la Región Oriental del país.

OBJETIVO

Caracterizar el rol potencial en la transmisión de la enfermedad de Chagas en ejemplares de la especie *T. sordida* procedentes de viviendas rurales de los departamentos de Paraguarí, San Pedro y Cordillera de la Región Oriental del país.

MATERIALES y METODOS

Área de estudio y población: Se analizaron un total de 559 ejemplares de *T. sordida*: 335 ejemplares de 253 viviendas de Paraguarí, 144 ejemplares de 91 viviendas de San Pedro y 80 ejemplares de 52 viviendas de Cordillera, capturados en el período 2007 al 2015. Fueron registrados los datos epidemiológicos como sitio de captura y estadio de los triatomíneos capturados en las viviendas. Los triatomíneos fueron clasificados taxonómicamente según Lent y Wygodzinsky (3) por funcionarios del departamento de Entomología del SENEPA (MSP y BS).

Disección de triatomínos: Se realizó la disección de cada uno de los 559 ejemplares de *T. sordida* para la posterior extracción de ADN, cada ejemplar disectado fue colocado en tubos que contenían buffer de lisis compuesto por soluciones de Tris pH 7,4, EDTA, NaCl y SDS.

Extracción de ADN: Se realizó la incubación de cada tubo con 5 ul de proteinasa K (20 ug/ml) a 60°C por 60 minutos. La enzima fue inactivada por calentamiento a 95°C por 10 minutos. El ADN fue purificado por el método: fenol-cloroformo descrito por Sambrook *et al* (4), se realizó la precipitación con Etanol, previa adición de 20 ug de Glucógeno y Acetato de sodio 3M, pH5, 4 en un 10% del volumen recuperado. El ADN se resuspendió en 100ul de agua destilada estéril.

Infección natural con *T. cruzi*: La identificación especie específica de *T. cruzi* fue por el método PCR empleando como blanco las secuencias repetitivas de ADN nuclear (microsatélites) de *T. cruzi*, con los cebadores TCZ1 y TCZ2 descrito por Moser *et al* (5) y ADN kinetoplastídico con cebadores 121 y 122 descrito por Degraeve *et al*.

Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo un transiluminador UV.

Linajes y sublinajes de *T. cruzi*: La identificación de genotipos de *T. cruzi*: se realizó por medio de la amplificación de los genes constitutivos de la región del mini-exón y del gen 24 Sα Ribosomal (6). Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo un transiluminador UV (6).

Detección de fuente de alimentación: Para la identificación de la fuente de alimento se emplearon los métodos: PCR y RFLP. Se realizó primeramente un PCR que consistió en la amplificación del gen de citocromo b (*Cyt b*), ADN mitocondrial, se utilizaron los cebadores *Cyt b 1* y *Cyt b 2* descrito por Osnaghi y col y Mota y col (7-8).

Posteriormente se realizó la digestión de los amplificados de *Cyt b* con 2 enzimas de restricción: *Hae III* y *Mwo I* para la determinación de los patrones de alimentación, se emplearon ADN de 4 especies como controles positivos: humano, ave (gallina), marsupial/roedor y perro según protocolo descrito por Chena *et al* (9). Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo un transiluminador UV.

RESULTADOS

En la **tabla 1** se puede observar la procedencia (intra/peridomiciliar) de los ejemplares de *T. sordida* de los 3 dptos. estudiados, como así también el estadio (ninfas, adultos) de los mismos,

la infestación intradomiciliar fue del 28%, 48% y 24% en Paraguarí, San Pedro y Cordillera respectivamente y el índice de colonización (ninfas en el intradomicilio) fue de 36%, 10% y 5% respectivamente. Se detectó infección natural con *T. cruzi* en 19% (62/335), 14% (20/144) y 44% (35/80) de ejemplares de Paraguarí, San Pedro y Cordillera, respectivamente; y en los mismos se determinaron los linajes y sublinajes de *T. cruzi*. (Ver **Tabla 2**).

En la **figura 1** se muestran los productos amplificados de ADN de *T. cruzi* en *T. sordida* con un tamaño de 198 pares de bases (pb), y en la **tabla 2** se pueden observar las muestras *T. cruzi* positivas y los linajes y sublinajes detectados en 62, 20 y 35 ejemplares de los tres dptos. respectivamente, donde se detectaron *T. cruzi I* (selvático) y sublinajes de *T. cruzi II* (doméstico).

Del total de 559 ejemplares analizados, 111 ejemplares dieron positivos para el *Cyt b*; en la **figura 2** se pueden observar los productos de la amplificación del gen *Cyt b* con un tamaño de 358pb y en la **tabla 3** se muestran los patrones de alimentación detectados por digestión con enzimas de restricción de las 111 muestras positivas por *Cytb* distribuidos por departamento, se destaca la sangre humana como fuente de alimento en un 7,5%, 10% y 82% respectivamente.

Tabla1. Sitio de captura (Intra/ Peridomiciliar) y colonización de los 559 ejemplares de *T. sordida* analizados y estadíos (Ninfas: N /Adultos: A)

INFESTACION Y COLONIZACIÓN INTRADOMICILIAR					
Ejemplares de <i>T. sordida</i>	INTRADOMICILIO	%	PERIDOMICILIO	%	Total Ejemplares
Paraguarí	94 (34N y 60A)	28	241 (28N/213A)	72	335
San Pedro	69 (7N y 61A)	48	75 (19N/56)	52	144
Cordillera	19 (1N y 18A)	24	61 (13N/48A)	76	80
Total					559

N: Ninfas A: Adultos. Ninfas en el intradomicilio es indicador de **Colonización**.

Figura1. Productos de amplificación por PCR de *T. cruzi*

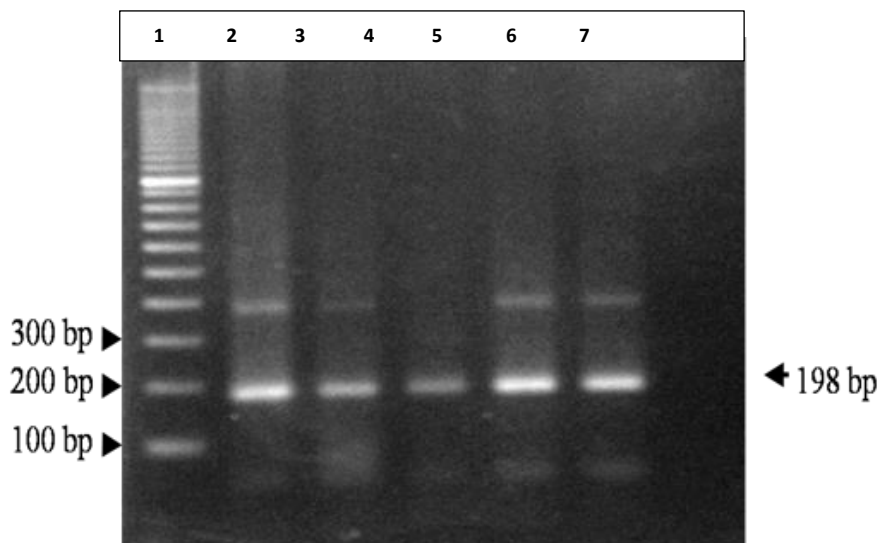


Figura1. Amplificación de ADN de *T. cruzi* en *T. sordida*. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: control positivo de reacción de PCR equivalente a 100 parásitos. Carril 3: control positivo de reacción equivalente a 10 parásitos. Carril 4: muestra de *T. sordida* con *T. cruzi* positivo correspondiente a 10 parásitos. Carril 5: muestra de *T. sordida* con *T. cruzi* positivo correspondiente a 100 parásitos. Carril 6: muestra de *T. sordida* con *T. cruzi* correspondiente a 100 parásitos. Carril 7: Control negativo de reacción (H_2O).

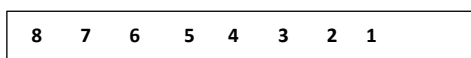
Tabla2. Detección de infección natural con *T. cruzi* y determinación de linajes y sublinajes

***T. sordida* con *T. cruzi* positivos. Linajes y sublinajes detectados**

Procedencia	Ejemplares de <i>T. sordida</i>	<i>T. cruzi</i> Positivos	%	Tcl	Tclla	Tcllb/e	Tcllc	Tclld	ND
Paraguari	62	19		15	4	4	28	3	8
San Pedro	20	14		6	1	1	12	-	-
Cordillera	35	44		7	6	1	9	-	12

ND: No Determinado

Figura2. Detección de fuente de alimentación. Producto de amplificación del gen *Cyt b*



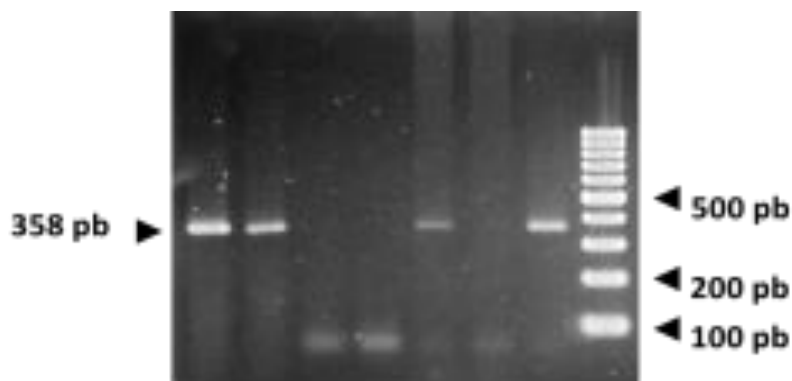


Figura 2. Amplificación del gen *Cyt b* en *T. sordida*. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: muestra de *T. sordida*; *cyt b* positiva. Carril 3: control negativo de reacción. Carril 4: muestra de *T. sordida* positiva. Carril 5: control negativo de extracción de ADN. Carril 6: muestra de *T. sordida* sin producto amplificado (negativa). Carril 7: control positivo de ADN de la especie ave (gallina). Carril 8: control positivo de ADN humano.

Tabla3. Fuente de alimentación detectados.

Procedencia de Ejemplares de <i>T. sordida</i>	Digestión del gen <i>Cyt b</i>				
	<i>Cyt b</i> Positivo	Sangre Humana	Sangre de ave (Gallina)	Sangre de Roedor/ Marsupial	Sangre de Perro
Paraguarí	67	5	11	49	2
San Pedro	10	1	8	1	
Cordillera	34	28	6		
Total	111				

DISCUSION

La infestación intradomiciliar encontrada del 28%, 48% y 24% en Paraguarí, San Pedro y Cordillera respectivamente es un indicador de la domiciliación y adaptación de ésta especie a las viviendas humanas. Por otro lado, la densidad de ejemplares de *T. sordida* detectada en el

peridomicilio es mayor que en el domicilio; 233/335 triatominos en Paraguarí, 75/144 triatominos en San Pedro y 61/80 triatominos en Cordillera, esto evidencia una adaptación aún fuerte de *T. sordida* al peridomicilio (10).

Se detectó infección natural con *T. cruzi* en 19% (62/335), 14% (20/144) y 44% (35/80) de ejemplares de Paraguarí, San Pedro y Cordillera, respectivamente; éstos índices detectados en los tres dptos. fueron superiores a lo detectado por ejemplo en Argentina, donde se había reportado desde el 2% hasta el 12% de infección natural en ejemplares de *T. sordida* capturados en el peridomicilio (11-12-13).

La detección de la fuente de alimentación realizada por el método PCR-RFLP se realizó sobre un total de 111 muestras que dieron *cyt b* positivos (67 de Paraguarí, 10 de San Pedro, 34 de Cordillera), se observó un porcentaje importante de sangre humana como fuente de alimentación en ejemplares de *T. sordida* de los tres departamentos estudiados (Paraguarí, San Pedro, Cordillera); 7,5%, 10% y 82% respectivamente. En Brasil ya se habían reportado datos similares en cuanto a hábitos alimenticios de ésta especie de triatomo en regiones de ese país (14). En Paraguay en 1997, se realizó un estudio sobre las preferencias alimentarias de poblaciones domiciliarias y peridomiciliarias de triatominos procedentes del dpto. de Paraguarí, donde se encontraron tres fuentes de alimentación más frecuentes: sangre de aves de corral (50,2%), sangre humana (14,7%) y de perro (5,3%), con menor frecuencia se encontró sangre de gato y roedores (15).

También nuestro grupo de trabajo ha realizado estudios con *T. sordida* en lo referente a fuente de alimentación por el método PCR-RFLP del gen *cyt b* en ejemplares de otras áreas de la Región Oriental, por ejemplo en un estudio sobre un total de 216 ejemplares capturados en el departamento de Concepción, 11 dieron *cyt b* positivos, de los cuales 8 dieron patrón de sangre humana y 1 ejemplar dio sangre de gallina como patrón alimenticio (16).

CONCLUSION

La frecuencia elevada de infección natural con *T. cruzi* en los ejemplares de *T. sordida* e infestación intradomiciliar detectados, la presencia de *T. cruzi* selvático en ejemplares de los tres departamentos y los porcentajes importantes de sangre humana como fuente de alimentación en ejemplares de *T. sordida* de los tres departamentos estudiados (Paraguarí, San Pedro, Cordillera); 7,5%, 10% y 82% respectivamente, evidencian la capacidad de ésta especie de triatomo como transmisor potencial de *T. cruzi* en comunidades de la Región Oriental.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Silveira A C, Rojas de Arias A, Segura E, Guillén G, Russomando G, Schenone H, et al. El control de la Enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur de América. Historia de una Iniciativa Internacional. 1991/2001. OPAS, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba; 2002. 316.
- 2- Sánchez Z, Russomando G, Pineda D, Guillén L, Paredes B, Villalba de Feltes C. *Triatoma sordida*: indicadores de adaptación y transmisión de *Trypanosoma cruzi* en intradomicilio del Chaco Paraguayo. Mem Inst Investig Cienc Salud 2016; 14(3):96-101.
- 3- Lent H, Wygodzinsky P. Revision of *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae), and the other significanse as vectors of Chagas disease. Bull Am Mus Nat Hist 1979; 163: 123-27.
- 4- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York E.U.A 1994.
- 5- Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1989; (7): 1477-82.
- 6- Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exón genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. Int. J Parasitol. 2000; (31): 1218-26.
- 7- Osnaghi MA, Chavshin AR, Vatandoost H. Analysis of mosquito bloodmeals sing RFLP markers. Exp. Parasitol. 2006; 114(4): 259.64
- 8- Mota J, Chacon JC, Gutierrez AF, Sánchez V, Wirtz A, Ordoñez R et al. Identification of blood meal source and Infection with *Trypanosoma cruzi* of Chagas Disease Vectors using a Multiplex Cytocrhrome b Polimerase Chain Reaction, Vector Borne and Zoonotic Diseases. 2007; 7(4): 617-27
- 9- Chena L, Nara E, Sánchez Z, Espinola E, Russomando G. Estandarización de la técnica PCR-RFLP del gen mitocondrial *cyt b* como herramienta para la identificación de fuentes de alimentación de insectos hematófagos. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud, Vol 12 (2). 2014; 33.42
- 10- Sánchez Z, Russomando G, Pineda D, Guillén L, Paredes B, Villalba de Feltes C. *Triatoma sordida*: indicadores de adaptación y transmisión de *Trypanosoma cruzi* en intradomicilio del Chaco Paraguayo. Mem Inst Investig Cienc Salud 2016; 14(3):96-101.
- 11- Oscherov EB, Bar ME, Damborsky MP, Milano A, Avalos G, Borda M. Epidemiología de la

- enfermedad de Chagas, Departamento General Paz Argentina. Rev Saúde Pública 2003; 37(1):59-64.
- 12- Bar ME, Wisnivesky-Colli C. *Triatoma sordida* Stal 1859 (Hemiptera, Reduviidae: Triatominae) in palms of northeastern Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001;(96): 895-9.
- 13- Macchiaverna NP, Gaspe MS, Enriquez GF, Tomassone L, Gurtler RE, Cardinal MV. *Trypanosoma cruzi* infection in *Triatoma sordida* before and after community-wide residual insecticide spraying in the Argentina an Chaco. Acta Tropica 2015; 143, 97-102.
- 14- Forattini OP, Barata JMS, Santos JLF, Silvera AC. Hábitos alimentares: infeccao natural e distribuicao de *triatomíneos* domiciliados na regioa central do Brasil. Rev Saúde Públ 1982; 16, 171-204.
- 15- González-Brítez N, Gurtler R, Rojas de Arias A, De Marco R, Cuosiño B. Fuentes de alimentación de triatominos peri domésticos (Hemiptera- Reduviidae) en localidades endémicas para la enfermedad de Chagas. Annual Reports 1997. Asunción: EFACIM- EDUNA; 1999. p 71 Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud.
- 16- Sánchez León Z, Russomando G, Guillén R. Enfermedad de Chagas: estudio de un vector secundario. Editorial académica española. 2012.

FINANCIAMIENTO

Este proyecto fue financiado por el CONACYT a través del Programa PROCENCIA con recursos del Fondo para la Excelencia e investigación – FEEI del FONACIDE.