

NOTA BREVE

Mejoramiento del procesamiento de muestras para la detección molecular de infecciones por *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* en vectores.

Palmira Guevara⁽¹⁾, Sergio Quispe⁽²⁾, María Teresa Abreu-Blanco⁽¹⁾, Nelly Bladés⁽³⁾, Matías Reyes Lugo⁽⁴⁾.

RESUMEN

El seguimiento de las infecciones en triatomíneos es fundamental en la epidemiología de la enfermedad de Chagas. Demostramos la factibilidad de incorporar el diagnóstico molecular a la rutina del control epidemiológico al incrementar el tiempo de incubación, de 10 minutos a 24 horas, durante el tratamiento con el reactivo de extracción del ADN, y detectar mediante PCR, infecciones sencillas y mixtas por *T. cruzi* y *T. rangeli* en muestras de contenido intestinal y hemolinfa preservadas en papel de filtro.

Palabras clave: PCR, identificación molecular, *T. cruzi*, *T. rangeli*.

ABSTRACT

Improving sample processing for the molecular detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infections in vectors.

The monitoring of triatomino infections is a key step in the epidemiology of Chagas disease. We demonstrate the feasibility of incorporating molecular identification tools in routine epidemiological control measures. Increasing the incubation time from 10 minutes to 24 hours during the treatment with DNA purification reagent, we obtained positive PCR identification of single and mixed infections by *T. cruzi* and *T. rangeli* in haemolymph and digestive track samples preserved in filter paper.

Key words: PCR, molecular identification, *T. cruzi*, *T. rangeli*.

En la biología de la enfermedad de Chagas, la adaptación de los vectores triatomíneos a los ambientes humanos, junto con la circulación de *Trypanosoma cruzi* entre estos y los animales salvajes y domésticos es el factor de mayor importancia para el establecimiento de la infección en humanos (1). Es necesaria la evaluación y el seguimiento de los triatomíneos en cuanto a su infección y a los cambios que conduzcan a su adaptación a ambientes humanos. Los marcadores moleculares permiten un análisis independiente del cultivo y la identificación del parásito directamente de en muestras de hospederos mamíferos y en vectores. Describimos la optimización de la metodología de recuperación de ADN de muestras de contenido intestinal y hemolinfa de triatomíneos, inmovilizadas en papel de filtro FTA (FTA Classic Card, WB120205, Whatman), para el diagnóstico molecular por PCR de *T. cruzi* (2) y *T. rangeli* (3).

Establecimos condiciones óptimas de extracción de ADN, mediante diluciones seriadas de epimastigotes de cultivo de *T. rangeli* en hemolinfa de *Triatoma infestans*, colocadas en papel de filtro FTA de 0,5 cm de diámetro y secadas a temperatura ambiente por 48 horas. Seguimos el protocolo de extracción de ADN de la casa comercial, realizando dos incubaciones consecutivas de cinco minutos con el reactivo de purificación (RP) (200 µL) (FTA Purification Reagent, Whatman, WB120204), seguidas de dos lavados con tampón TE (100 µL), y un paso final de secado del filtro a 50 °C. Determinamos que dos incubaciones consecutivas de 12 horas con el RP, era el tiempo óptimo para obtener amplificaciones reproducibles hasta 0,2 parásitos, con el ensayo PCR P542 (resultados no mostrados).

Procesamos 11 muestras de hemolinfa de chipos de los Departamentos de La Paz y Sucre, Bolivia, y con el PCR P542 determinamos la presencia de *T. rangeli* en 4 muestras (resultados no mostrados). El análisis del contenido intestinal de otros seis triatomíneos con el PCR Clon 6, mostró la infección por *T. cruzi* en cinco muestras (Figura 1A). Dos de estas muestras resultaron positivas en el PCR específico para *T. rangeli*, evidenciando infecciones mixtas (Figura 1B).

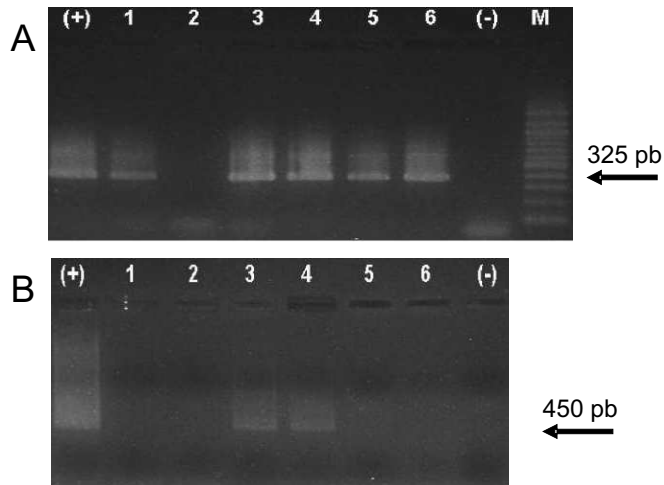


Figura 1: Identificación de infecciones por *T. cruzi* y *T. rangeli* en contenido intestinal de chipos de Bolivia. PCR Clon 6 (*T. cruzi*) (A) y el ensayo P542 (*T. rangeli*) (B). Las muestras 3 y 4 revelan infecciones mixtas. Geles de agarosa 1%, tampón TAE 1X, teñido con Bromuro de Etidio 0,5 g.mL⁻¹. Carriles: +, 10ng ADN *T. cruzi* en A y 10ng ADN *T. rangeli* en B; 1 al 6, contenido intestinal de chipos; carril -, agua. Las flechas indican el tamaño en pb de los amplicones.

La morfología del parásito y el tropismo en el vector, constituyen actualmente el criterio para la identificación de las especies de tripanosomas en infecciones naturales. Las pruebas moleculares son una alternativa, sin embargo, su aplicación en estudios epidemiológicos exige métodos amenos al trabajo de campo y confiables para los ensayos de amplificación.

La modificación reportada incrementando el tiempo de

(1) Laboratorio de Genética Molecular, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. (2) Instituto de Servicios de Laboratorio Diagnóstico en Investigación en Salud, La Paz, Bolivia. (3) Universidad Mayor de San Francisco Xavier, Sucre, Bolivia. (4) Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela.

Correspondencia: Palmira Guevara. E-mail: palmiragt@yahoo.com.mx

Financiamiento: CDCH/UCV UISI 03.00.6145.2005 y PI 03.00.6138.2005. UNU/BioLac.

incubación durante la extracción de ADN a 24 horas, permitió detectar infecciones, sencillas y mixtas, por *T. cruzi* y *T. rangeli* en muestras de contenido intestinal y de hemolinfa, preservadas en filtros FTA.

Las muestras recolectadas en Bolivia y transportadas a Venezuela, fueron procesadas en nuestro laboratorio para el análisis por PCR. Estos resultados demuestran la practicidad y factibilidad de incorporar métodos sencillos y económicos en la toma y procesamiento de muestras, que prescinden de refrigeración y el uso de solventes, permitiendo extender el potencial de especificidad y sensibilidad de las pruebas moleculares a los análisis epidemiológicos en campo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Coura, JR. Chagas disease: what is known and what is needed-A background article. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102(Supp I):113-122.
2. Araya J, Cano MI, Gomes HB, Novack EM, Requena J M, Alonso C, et al. Characterization of an interspersed repetitive DNA element in the genome of *T. cruzi*. Parasitology. 1997; 115: 563-570.
3. Vargas N, Souto R, Carranza J, Vallejo G, y Zingales B. Amplification of a repetitive DNA sequence for *Trypanosoma rangeli* identification and its potencial application in epidemiologicals investigations. *Exptl. Parasitol.* 2000;96:147-159.