

**POBLACION DE *Triatoma maculata* (Erichson 1848) Y DETECCIÓN DE
Trypanosoma cruzi MEDIANTE AMPLIFICACION DEL ADN DE LOS
MINICIRCULOS DEL CINETOPLASTO, EN EL AREA DE MARTIN ALONSO,
CORDOBA (BOLIVAR)**

JAHIR JADITH MARQUEZ CADRAZCO

JORGE LUIS PALENCIA CONTRERAS

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
SINCELEJO**

2004

**POBLACION DE *Triatoma maculata* (Erichson 1848) Y DETECCIÓN DE
Trypanosoma cruzi MEDIANTE AMPLIFICACION DEL ADN DE LOS
MINICIRCULOS DEL CINETOPLASTO, EN EL AREA DE MARTIN ALONSO,
CORDOBA (BOLIVAR)**

JAHIR JADITH MARQUEZ CADRAZCO

JORGE LUIS PALENCIA CONTRERAS

TRABAJO DE GRADO

Director

ANTONIO MARIA PEREZ HERAZO

Ingeniero Agrónomo

Codirector

PEDRO JOSÉ BLANCO TUIRÁN

MD, Msc. Enfermedades Tropicales

UNIVERSIDAD DE SUCRE

FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

SINCELEJO

2004

“Únicamente los autores son responsables de las ideas expuestas en el presente trabajo” (Art 12, res 02 de 2003)

Nota de aceptación:

Firma del Presidente del Jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Sincelejo, 16 de diciembre de 2004

Ningún hombre ha llegado a ser grande sin un toque de divina inspiración, inspiración que brotó gracias a la ayuda de Dios y a la voz suave y penetrante de mis padres; Rosa Contreras y José Manuel Palencia quienes iluminaron mi camino.

A mis hermanos: el negro, Luz, Rafo, Miladis, Damis, el pocho, Giova y Meda, que creyeron en la posibilidad de una realidad certera.

A mi hija Nikoll por ser aliciente inagotable y motivo para continuar superando caminos difíciles al lado de mi esposa Patricia Cuello.

Jorge Palencia Contreras

El hombre de éxito es valorado por sus logros. Esta es la conclusión de mi segundo logro, el primero es mi hijo Luis Felipe al que va dedicado éste.

Con la ayuda y bendición de mis padres Wilfrido y Bertha pude salir avante en todos los tropiezos por los que pasé.

A mis hermanos Kelly, Javier y Rodrigo por compartir mis alegrías y tristezas

A la mujer de mi vida, Maribel por soportarme y compartir su vida a mi lado.

Jahir Márquez Cadrazco

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD DE SUCRE

AL PERSONAL QUE LABORA EN EL CENTRO DE DIAGNÓSTICO MÉDICO
DE LA UNIVERSIDAD DE SUCRE

A NUESTROS DIRECTORES DE TRABAJO ANTONIO PEREZ Y PEDRO
BLANCO

A TODOS NUESTROS COMPAÑEROS EN LABORATORIO POR
BRINDARNOS SU APOYO Y COLABORACION

A MARTHA WOLFF Y DIEGO SALAZAR POR LA COLABORACIÓN DEL
INSTITUTO DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA A
NUESTRO TRABAJO.

A LA COMUNIDAD DE MARTÍN ALONSO (Córdoba, Bol) POR SU VALIOSA
COLABORACIÓN EN EL TRANCURSO DEL TRABAJO DE CAMPO EN SUS
VIVIENDAS.

A LICETH, ANGELINA, AIDEE, CLAUDIA, GLADIS, MATY, NOELBA,
ALVEIRO, LIBARDO, GIOVANNI, CARLOS, BLAS, EDWAR, XAVIER, EDWIN.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCIÓN	12
1. OBJETIVOS	14
2. MARCO TEORICO	15
2.1 EL VECTOR TRIATOMINO	15
2.2 <i>Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi</i>	16
2.3 GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	20
2.3.1 Formas de transmisión de la enfermedad de Chagas	21
2.3.2 Fases y formas Clínicas	22
2.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	23
2.5 TRABAJOS REALIZADOS RELACIONADOS	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1 BUSQUEDA ENTOMOLÓGICA	27
3.2 METODOLOGÍA DE LABORATORIO	31
4. RESULTADOS	39
5. DISCUSIÓN	49
6. CONCLUSIONES	56
RECOMENDACIONES	58
BIBLIOGRAFÍA	59
ANEXOS	64

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Condiciones aplicadas para la optimización de PCR Con los cebadores S35 y S36	34
Tabla 2. Condiciones aplicadas para la optimización de PCR Con los cebadores S121 y S122	35
Tabla 3. Condiciones aplicadas para la optimización de PCR Con los cebadores TrF y TrR2	36
Tabla 4. Triatomíneos totales capturados mensualmente en Martín Alonso, Córdoba (Bol) nov 2002 – abr 2003 (ninfas y adultos; Intra y peridomicilio)	41
Tabla 5. Triatomíneos capturados en el Intradomicilio en Martín Alonso. nov 2002 – abr 2003	42
Tabla 6. Triatomíneos capturados en el peridomicilio en Martín Alonso. nov 2002 – abr 2003	42

Tabla 7. Ninfas capturadas en el intra y el peridomicilio en Martín Alonso. nov 2002 – abr 2003	43
Tabla 8. Triatominos capturados en el Intradomicilio según el tipo de vivienda, en Martín Alonso, nov 2002 - abr 2003.	43
Tabla 9. Índices de Riesgo de transmisión de <i>Trypanosoma cruzi</i>, Martín Alonso	44
Tabla 10. Relación entre cebadores e insectos positivos	49

LISTA DE FOTOS

	Pág
Foto 1. <i>Triatoma maculata</i> (Erichson 1848)	40
Foto 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Cebadores S35 y S36.	45
Foto 3. Electroforesis en gel de Agarosa al 2%. Cebadores S121 y S122	46
Foto 4. Electroforesis en gel de Agarosa al 2%. Cebadores TrF y TrR2	47
Foto 5. <i>Triatoma maculata</i> (Erichson 1848)	51

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Numero de triatominos totales capturados en Martín Alonso. nov 2002 – abr 2003	41
Figura 2. Ninfas capturadas en Martín Alonso. nov 2002 abr 2003	44
Figura 3. Número de insectos vectores positivos con cada par de cebadores	48

LISTA DE ANEXOS

	Pág
Anexo A. Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas	65
Anexo B. Ciclo de vida del <i>Trypanosoma cruzi</i>	66
Anexo C. Área de estudio	67
Anexo D. Vivienda ubicada en el área de estudio	68

GLOSARIO

Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana: Enfermedad causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido por insectos triatomíneos.

Intradomicilio: Área de búsqueda ubicada en el interior de la vivienda

kADN: ADN del cinetoplasto de los parásitos del orden kinetoplastida.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Peridomicilio: Área de búsqueda ubicada hasta diez metros alrededor de la vivienda.

Pitos: Nombre vulgar de los triatomíneos. Sin: Vinchuca, chinche besador, picúa.

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*, protozoario del orden kinetoplastida.

Triatomíneos: Insectos Hemiptera: Reduviidae

Vector: Insecto capaz de portar y transmitir un parásito al humano.

RESUMEN

En el presente estudio se realizó una búsqueda de insectos vectores de la enfermedad de Chagas, así como también de flagelados (*Trypanosoma cruzi*) en estos vectores.

La búsqueda de los vectores se realizó en Martín Alonso, corregimiento de Córdoba (Bolívar)

Para la detección de la presencia de *T. cruzi* en los vectores se disectaron estos y se extrajeron sus intestinos, a los cuales se les sometió a un proceso de extracción de ADN basado en altas concentraciones de sales. Al ADN extraído se le realizó una amplificación con cebadores específicos para *T. cruzi* (S35 y S36, S121 y S122) y para evitar falsos positivos se utilizaron cebadores específicos para *T. rangeli*, (TrF y TrR2)

En total se capturaron 379 triatominos todos de la especie *Triatoma maculata*, de los cuales se procesaron 255 y se reporta por primera vez la infección natural por *T. cruzi* en este vector a nivel de la Costa Atlántica Colombiana con un índice de 7.45%, haciendo uso de los cebadores S121 Y S122.

También se encontraron 4 individuos infectados con *T. rangeli* usando los cebadores TrF y TrR2.

ABSTRACT

The study was carried out in the village of Martin Alonso, Cordoba (Bolívar), to search for triatomino and to establish their possible infection by *T. cruzi*, causal agent of Chagas disease.

For the detection by *T. cruzi* in the insect vector, they were dissected and the gut was used to extract by the salting out method; PCR was performed with specific primers for *T. cruzi* (S35/S36; S121/S122) and *T. rangeli* (TrF /TrR2)

379 triatomines were captured belonging all of them to *Triatoma maculata* and 255 insects were evaluated by PCR. It is first report of natural infection of *Triatoma maculata* in the Colombian Atlantic coast at a frequency of 7.45% using primers S121/ S122.

We founded four insects vectors infected with *T. rangeli* using primers TrF/TrR2.

INTRODUCCIÓN

La Tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas es endémica en América latina donde afecta principalmente a la población rural con más de 90 millones de personas expuestas a la infección; por lo anterior, se puede decir que la enfermedad de Chagas está ligada fuertemente a la pobreza y al subdesarrollo. La enfermedad de Chagas es causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, un parásito que utiliza como vector a insectos de la subfamilia *Triatominae* (Hemiptera:Reduviidae) de los géneros *Pastrongylus*, *Rhodnius* y *Triatoma* que comúnmente se conocen entre los campesinos como pitos, picuas o chinches besadores; en ellos, el parásito se aloja en los intestinos y cuando este se alimenta de la sangre de una persona sana para alimentarse, deposita la materia fecal con los parásitos sobre la piel del individuo; esta es la vía de entrada del *Trypanosoma* al torrente sanguíneo, una vez en éste, se diferencia hasta la forma infectiva y empieza a desarrollar la enfermedad.(1)

En Colombia, se tienen reportes de la presencia de 23 especies de triatominos y se estima que un 5.0 % de la población humana se encuentra infectada y un 20% se encuentra en riesgo de adquirir la infección. (2)

Para el diagnóstico de esta enfermedad existen pruebas serológicas, xenodiagnósticas, métodos directos e indirectos y últimamente se emplea una prueba de biología molecular conocida como Reacción en Cadena de la

Polimerasa (PCR). Todas estas pruebas se utilizan para diagnosticar si las personas están o no infectadas. La PCR también puede ser utilizada para diagnosticar si un vector está infectado con *Trypanosoma cruzi*.

Siendo una de las enfermedades tropicales con mayor incidencia en nuestro país, se hace necesario realizar trabajos de investigación sobre ella; los trabajos realizados hasta ahora sobre la enfermedad en nuestro medio se han enfocado principalmente en la identificación de *Trypanosoma cruzi* en humanos.

El presente estudio pretende determinar las diferentes especies de Triatomíneos existentes en el corregimiento de Martín Alonso, Córdoba (Bol) y mediante la técnica molecular, Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), determinar si estos están o no infectados con *Trypanosoma cruzi*.

El presente trabajo es de gran importancia para la población y para el manejo de la enfermedad por las autoridades competentes, debido a que se entregaran datos referentes a la población de Triatomíneos que existen en la zona de estudio, los cuales pueden ser vectores potenciales de la transmisión del mal de Chagas. Toda la información obtenida con éste trabajo, será entregada a entidades de salud pública, para que éstas se encarguen de tomar medidas de control de los vectores y para el manejo de la enfermedad en la población humana posiblemente afectada.

01. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

- 1.1.1. Determinar las especies de triatomíneos presentes en el corregimiento de Martín Alonso, Córdoba (Bol). y validar la efectividad de la PCR para la detección de *Trypanosoma cruzi* en los vectores Triatomíneos.

1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.2.1. Identificar las especies de Triatomíneos existentes en el corregimiento de Martín Alonso, Córdoba (Bol).
- 1.2.2. Determinar las especies de Triatomíneos infectadas con *Trypanosoma cruzi* amplificando la región variable del kADN del cinetoplasto.
- 1.2.3. Identificar dentro de los triatomíneos los vectores potenciales de la enfermedad de Chagas.

2. MARCO TEORICO

2.1. El vector Triatomino

Los Triatominos causantes de la enfermedad de Chagas son insectos del orden Hemíptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, perteneciente a los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Pastrongylus*. Existen aproximadamente 130 especies potencialmente vectoras, de las cuales en Colombia hay reportadas alrededor de 23 especies, entre las cuales se encuentra *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *T. sordida*, *T. dimidiata*, *T. maculata*, *Pastrongylus megistus* y *T. braziliensis*. Para nuestro estudio en el departamento de Bolívar están reportadas las siguientes especies, *Eratirus cuspidatus*, *Pastrongylus geniculatus*, *Rhodnius pallescens*, *R. prolixus*, *R. robustus* y *T. maculata*; reportados todos como negativos para la presencia del parásito flagelado. (3)

Estos insectos presentan hábitat selvático y peridomiciliarios; éste último de importante relevancia en la transmisibilidad de la enfermedad de Chagas, debido a que animales domésticos (perro, armadillo y otros) pueden servir como reservorios del parásito *Trypanosoma cruzi*.(4)

Los vectores presentan diferentes tamaños durante las etapas de su desarrollo hasta insecto adulto. En la cabeza tiene una proboscis recta y delgada, ojos ubicados lateralmente de color oscuro, posee antenas largas segmentadas en cuatro partes. En la parte superior del tórax poseen una placa en forma triangular, sus alas son hemielitros donde la pared basal es relativamente dura,

mientras que la parte distal es membranosa con bandas de color amarillo, café, naranja o roja.(5)

El insecto presenta un ciclo de vida que comienza como huevos, los cuales son puestos dentro de las casas en las grietas de las paredes, repisas y techos, también alrededor de la vivienda en corrales, gallineros, troncos, palmeras, y arrumes de piedra o leña. Los huevos una vez son ovipositados presentan una forma elíptica y una coloración blanca, la cual se va modificando hasta tornarse rosada, debido al desarrollo del embrión, cuya evolución tarda entre 20 y 50 días dependiendo de la temperatura. De estos huevos, salen insectos inmaduros llamados ninfas que se alimentan de sangre y van creciendo lentamente pasando por cinco estadios diferentes cuya duración depende de la temperatura, humedad y alimentación; este proceso puede tardar hasta siete meses; las ninfas de primer estadio pueden permanecer sin alimentarse hasta por tres meses. Los insectos adultos pueden llegar a vivir hasta por 15 meses (6)

2.2. *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas 1903)

Taxonomía

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophorea

Orden: Kinetoplastida

Familia: Trypanosomatidae

Género: *Trypanosoma*

Subgénero: *Schizotrypanum*

Especie: *cruzi*

Ciclo de vida

El *Trypanosoma cruzi* es un parásito heteroxeno, es decir, que en una parte de su ciclo de vida vive en la sangre o tejido de un hospedero vertebrado y otra vive en el intestino de un vector hematófago.(7)

Existen cuatro formas morfológicas de *Trypanosoma*: Tripomastigote, Promastigote, Epimastigote, Amastigote. Las diferentes formas se distinguen entre sí por la posición del cinetoplasto en relación al núcleo y por la presencia o ausencia de una membrana ondulante: (8)

El Tripomastigote es el estadio infectivo (no replicativo) del parásito, mide aproximadamente 7 μm a 20 μm se observa en la sangre circulante de los animales y hombres infectados, y en el intestino terminal de los triatomíneos; Con núcleo prominente y citoplasma granuloso, presenta flagelo, una membrana ondulante que corona el soma y el flagelo y en la parte posterior de su citoplasma una masa conocida como cinetoplasto.(7,8)

El Promastigote tiene el cinetoplasto en la parte anterior y un flagelo libre sin membrana ondulante. (8)

El Epimastigote es la forma de vida parasitaria que el *Trypanosoma cruzi* tiene en el intestino del vector, el soma es fusiforme y posee el cinetoplasto por delante del núcleo.(7,8)

El Amastigote es la forma de replicación intracelular, aflagelada y con cinetoplasto poco prominente. Se reproduce por fisión binaria. Se encuentra en los histiocitos de los pacientes que cursan la fase aguda de la infección.(7,8)

Al picar el insecto vector, los tripomastigotes son liberados en las heces y penetran la piel a través de una herida (que puede ser la picadura) o de las mucosas. Posteriormente penetran a las células y ahí se diferencian a amastigotes, estos se dividen por fisión binaria para luego rediferenciarse a tripomastigotes que lisan las células, se liberan y pueden infectar otras células o mantenerse en el torrente sanguíneo.(7)

Los tripomastigotes entran a un insecto vector al ser ingerido durante una picadura. En el intestino vector, los tripomastigotes se diferencian a epimastigotes, que emigran hacia la parte final del intestino; allí se unen a las glándulas rectales del insecto y se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, los cuales son liberados en las heces del insecto durante la picadura.(7)

Los parásitos cuando se encuentran en el vector se pueden observar como tripomastigotes y epimastigotes en el tubo digestivo y en el recto y en las deyecciones aparecen los tripomastigotes metacíclicos que son los infectantes.(7) (ver anexo B)

Cinetoplasto del *Trypanosoma cruzi*.

El cinetoplasto es una estructura en forma tubular o de disco que poseen todas las especies del orden kinetoplastida. Esta estructura se encuentra localizada en la parte posterior del organismo dentro de la mitocondria y está organizado como unas redes de moléculas circulares de ADN grandes y pequeños denominadas kDNA. Las moléculas grandes (maxicirculos) tienen una longitud perimetral de 30,000- 50,000 pb. Se encuentran en mucho menor número que los minicirculos (50 copias por célula) contienen el equivalente típico del ADN mitocondrial, y en ella se han encontrado codificado dos genes de ARN Ribosomal y genes de proteínas tales como citocromos, apocitocromos o subunidades de la NADH deshidrogenasa.(7,8)

Los minicirculos forman la mayor parte de la estructura (5000- 10 000 moléculas por célula). Como su nombre lo indica, son moléculas circulares de ADN con una longitud perimetral de 100 a 2500 pb. Por muchos años se ignoró su función, ya que no contienen información genética evidente. Ahora se sabe que los minicirculos codifican para ARNs pequeños que participan en el procesamiento (por edición) de ARNs mensajeros mitocondriales Por otro lado

en los minicírculos del cinetoplasto se encuentran las regiones constantes y variables de ADN. Estas últimas permiten la hibridación con sondas específicas, las cuales ayudan a identificar humanos y vectores infectados por el parásito con la ayuda de técnicas de biología molecular, entre las cuales la PCR es una de las más eficaces.(7,8)

2.3. GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana fue descubierta por el Doctor Carlos Chagas en Brasil (1910) y al mismo tiempo por Salvador Mazza en Argentina; es causada por *Trypanosoma cruzi*, un parásito protozoario que utiliza como vector de infección a los Triatomíneos.(9)

En el hombre el parásito se encuentra en la sangre y luego pasa a varios órganos, principalmente al corazón, el intestino, el esófago y el sistema nervioso. La enfermedad se manifiesta inicialmente con fiebre, escalofríos, dolor de cabeza y dolor muscular. En el sitio de la picadura se puede ver una lesión. Otra manifestación es la hinchazón de los párpados y el ataque al corazón, el cual puede ser severo. Con el tiempo el corazón puede verse más afectado y causar la muerte. (9)

Es importante notar que en la enfermedad de Chagas son los hábitos de vida, tanto del vector como del huésped, los que tienen mayor importancia en su transmisión.

2.3.1. Formas de Transmisión de la enfermedad.

La enfermedad presenta diferentes formas de transmisión:

Por picadura del triatomino: La picadura del insecto se produce durante las noches cuando el individuo se encuentra durmiendo. Este triatomino infectado succiona sangre de una persona sana para alimentarse y deposita al mismo tiempo su materia fecal sobre la piel, entonces el individuo afectado al rascarse introduce el parásito que se encuentra en la materia fecal al sistema circulatorio a través de la herida producida por el insecto. También se puede presentar en la conjuntiva cuando el individuo picado se rasca la herida y pasa sus dedos contaminados sobre sus ojos introduciendo de esta forma el parásito a la conjuntiva originando el conocido signo de Romaña.(4,9,10,11,28)

Por hemo-transfusión: Se produce por transfusiones de sangre de donantes que ignoran estar enfermos.(9, 10)

Vía transplacentaria: Es posible la infección por esta vía desde la circulación materna, tanto en el periodo agudo o crónico; existen trabajos donde reportan que el grado de parasitemia de la madre no guarda relación con la posibilidad de sufrir contagio fetal sí la placenta no se encuentra totalmente afectada. (9,10,28)

Por leche materna: Si bien esta forma de contagio se considera poco probable o de muy baja frecuencia, es aconsejable que las madres con la enfermedad no amamenten a sus hijos.(9, 10)

Por manejo de hospederos contaminados: Existen casos en que el contagio se produce al desollar animales silvestres o semidomésticos enfermos.(9,10)

2.3.2. Fases y formas Clínicas

Se reconocen tres fases en la enfermedad de Chagas: una fase aguda corta y una fase crónica de larga duración, separadas por una fase clínicamente asintomática llamada fase indeterminada.

Fase Aguda: Los síntomas generales de la enfermedad de Chagas en su fase aguda son fiebre, hepatoesplenomegalia, edema generalizado y adenomegalia. A veces se presenta un exantema generalizado, como también anorexia, diarrea y vómitos. Hasta el 30% de los casos presenta anormalidades electrocardiográficas o radiológicas debidas a miocarditis aguda de diferentes grados. Cuando ocurre una infección a través de la conjuntiva o la piel del párpado se produce una inflamación de los párpados (signo de Romaña-Mazza).(11)

Fase Indeterminada: Esta fase comienza unas 8-10 semanas después de la fase aguda, haya habido o no manifestaciones clínicas y puede durar varios años o indefinidamente. Se caracteriza por la ausencia de síntomas y el

enfermo tiene plena capacidad para realizar actividades físicas, y sus electrocardiogramas son normales. No obstante, las pruebas serológicas de la enfermedad siguen siendo positivas (11)

Fase Crónica: Se estima que hasta el 30% de las personas que sufren la forma indeterminada de la infección sufrirán un daño cardíaco, digestivo o neurológico unos 10-20 años después de haber sido infectados.

2.4. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica "*in vitro*" que permite la amplificación de una región específica de ADN, localizada entre dos regiones de ADN de secuencia conocida.(12)

La amplificación del ADN por PCR es realizada con la ayuda de cebadores conocidos como amplificadores, los cuales son moléculas pequeñas de ADN de cadena sencilla complementaria a los extremos de una secuencia de ADN determinada que sirve como molde. Los cebadores una vez unidos a la secuencia molde son extendidos con la ayuda de una ADN polimerasa termoestable en presencia de deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) bajo determinadas condiciones; este proceso arroja como resultado la síntesis de un ADN complementario a la cadena molde. Este proceso puede ser repetido varias veces siguiendo un ciclo de reacción que comprende desnaturalización del ADN por calor, alineamiento de cebadores y extensión de éstos.(12)

La PCR constituye una herramienta eficaz para el diagnóstico molecular de enfermedades genéticas y producidas por patógenos. Pues permite amplificar el material genético del patógeno, obtenido de muestras de personas, animales o plantas enfermas.

2.5. Trabajos realizados relacionados

En estudios realizados en Colombia la Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR, ha sido utilizada para la detección específica de especie de *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* en vectores y huéspedes mamíferos incluyendo al hombre, amplificando los minicírculos del cinetoplasto. Se hizo con el fin de distinguir infecciones simples y mezcladas producidas por los dos tipos de parásitos.(13)

En el municipio de Amalfi departamento de Antioquia (Col) se hizo un estudio sobre riesgo epidemiológico de la transmisión de la enfermedad de Chagas, por vectores triatomíneos, donde se evaluó simultáneamente los tres componentes básicos de la parasitosis, vector, parásito y reservorio.(14)

En la Argentina esta técnica comenzó a ser utilizada para confirmar infecciones con *T. cruzi* reveladas por pruebas serológicas, pero que pueden ser el resultado de una reacción cruzada con antígenos de *Leishmania*, donde la PCR demuestra tener una mayor sensibilidad que las pruebas serológicas utilizadas en el estudio.(15)

En Bolivia la PCR relacionada al kADN ha sido utilizada para confirmar la presencia de *T. cruzi* en el vector *Triatoma sordida* considerado doméstico en este país, en este estudio además de la PCR también se utilizó una técnica de hibridación con sondas de ADN de *T. cruzi* para identificar su presencia.(16)

RAPD-PCR ha sido utilizado en Brasil para medir las relaciones genéticas de varias estirpes de *Tripanosoma cruzi* aisladas de algunos pacientes que presentaban la enfermedad. En esta ocasión se utilizaron cebadores arbitrarios y un análisis PCR de secuencias repetidas-ancladas simples (SSR-PCR), cuyos resultados sugieren que las estirpes de *T. cruzi* no están agrupadas de acuerdo a su origen geográfico.(17)

3.0. MATERIALES Y METODOS

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en el municipio de Córdoba que se encuentra ubicado en la margen occidental del río grande de la Magdalena en el centro del departamento de Bolívar, en la subregión Montes de María a 195 Km de la capital Cartagena, tiene una altura que oscila entre los 100 y 120 msnm. Tiene por coordenadas $9^{\circ} 34' 54''$ y $74^{\circ} 54' 32''$ W. Presenta los siguientes límites: al Norte con el municipio de Zambrano; al Sur con el municipio de Magangué (Bolívar); al Este con el río grande de la Magdalena y al Oeste con el Carmen de Bolívar y el departamento de Sucre. (18)

La región está catalogada como bosque seco tropical (B.s.t) según clasificación Holdridge. Su temperatura es de 28° centígrados, las épocas de lluvia están dadas entre los meses de abril a noviembre con una precipitación anual que oscila entre los 700 y 1000 mm, registrándose una humedad relativa promedio de 76.8 %, una evaporación promedio de 83.4 mm y un brillo solar promedio de 200 horas mensuales. (18)

El municipio de Córdoba (Bol) tiene una extensión de 584 Km^2 ; el relieve está distribuido según la clasificación CIAF en cinco (5) grandes unidades que son: montaña, colina, pie de monte, llanuras no inundables y llanuras inundables,

sus tierras son dedicadas a la agricultura (ajonjolí, maíz, yuca, tabaco, fríjol, algodón, sorgo, y arroz) y a la ganadería. Actualmente cuenta con ocho (8) corregimientos y 14 veredas.(18)

Se seleccionó el corregimiento de Martín Alonso para éste estudio por tener información anecdótica de los habitantes sobre picaduras y presencia del insecto vector con características similares a aquellas de los triatomíneos.

3.1. Búsqueda entomológica

Muestreo: el muestreo entomológico fue realizado mensualmente durante seis (6) meses entre noviembre de 2002 y abril de 2003 en el corregimiento de Martín Alonso, municipio de Córdoba departamento de Bolívar en 98 viviendas de la localidad, que presentaron las condiciones propicias para una infestación por insectos vectores de la enfermedad de Chagas. Las condiciones tenidas en cuenta fueron: Pared de bahareque, techo de palma, pisos y paredes deterioradas y la presencia de animales domésticos.

Búsqueda activa

a. Intradomicilio: la búsqueda en el intradomicilio se hizo en los sitios donde comúnmente habitan los insectos triatomíneos esto es, debajo de colchones, detrás de cuadros, en grietas de paredes y pisos, en cajas con ropa sucia, y sitios de reposo de animales domésticos en el intradomicilio; la

búsqueda se realizó durante el tiempo necesario para agotar todos los sitios probables con la ayuda de lámparas de mano.

b. Peridomicilio: (hasta 10m alrededor de la vivienda) La búsqueda en esta parte de la vivienda se realizó en los sitios de reposo de los animales domésticos como gallineros, porquerizas y también en arrumes de leña, piedras y cáscaras de maíz. Se realizó durante el tiempo necesario para agotar todo sitio probable con la ayuda de lámparas de mano.

c. Extradomicilio: (más de 10 m alrededor de la vivienda) esta búsqueda no se realizó debido a que las viviendas se encuentran muy próximas entre sí y no hay suficiente espacio como para considerarlo Extradomicilio y en el campo por problemas de orden público.

La búsqueda se realizó paralelamente en el intradomicilio y el peridomicilio utilizando el tiempo necesario para agotar cada sitio probables, en un horario de 8 a.m. a 5 p.m. registrando un promedio de 6 casas diarias durante tres días de cada mes (noviembre de 2002 – abril de 2003).

Las ejemplares capturados fueron depositados vivos y en seco en frascos individuales, teniendo en cuenta su sitio de captura; fueron llevadas a laboratorio donde los adultos se identificaron taxonómicamente a nivel específico mediante las claves para triatomíneos de Lent y Widgodzinski, 1979(19) ; algunas muestras de adultos fueron remitidas al Instituto de

Biología de la Universidad de Antioquia para confirmar la identidad específica de los insectos colectados

Con los datos de captura de los insectos se calcularon los indicadores de riesgo de transmisión que permiten conocer los índices de infestación domiciliaria, densidad, hacinamiento, colonización, infección relativa e infección (OMS 1991). Las formulas para calcularlos son las siguientes:(20)

Vector infectado:

$$\text{Índice de infección} = \frac{\text{Nº de triatominos infectados}}{\text{Nº de triatominos capturados y/o evaluados}} \times 100$$

Insectos en los domicilios:

$$\text{Índice de infestación domiciliaria} = \frac{\text{Nº de domicilios con triatominos}}{\text{Nº de domicilios del área estudiada}} \times 100$$

$$\text{Índice de densidad} = \frac{\text{Nº de triatominos capturados}}{\text{Nº de domicilios del área estudiada}} \times 100$$

$$\text{Índice de hacinamiento} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de triatominos capturados}}{\text{N}^\circ \text{ de domicilios con triatominos}} \times 100$$

$$\text{Índice de colonización} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de domicilios con ninfas}}{\text{N}^\circ \text{ de domicilios con triatominos}} \times 100$$

$$\text{Índice de infección relativa} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de domicilios con triatominos positivos}}{\text{N}^\circ \text{ de domicilios con triatominos}} \times 100$$

3.2. Metodología de laboratorio

Detección de infección natural de *T. cruzi* en triatominos.

Preparación de las muestras para el PCR.

1. Muestras entomológicas:

Los insectos capturados fueron disectados en seco por la parte superior del abdomen; se extrajeron todos los intestinos con la ayuda de una aguja N° 26 x 1" y se depositaban en tubos eppendorf de 1.5 mL.(21)

2. Protocolo de extracción con sales de alta molaridad

Lisis:

A los tubos que contenían los intestinos de los triatominos se les adicionaban 500 µL de buffer de lisis (Tris – HCl 10 mM pH 8.0 ; EDTA 0.1 M; SDS 0.5%) mas 10 µL de proteinasa K (20 mg/ mL) y se incubaron a 55° C durante una hora y luego a 94° C durante cinco (5) min. en un baño de María.(21)

Precipitación de proteínas:

Se centrifugaron las muestras a 12000 rpm por 10 min. a 4°C , se desechó el precipitado y se extrajo el sobrenadante, al cual se le adicionó un volumen igual de acetato de potasio 5M y se procedió a mezclar suavemente por inversión del tubo sobre hielo. Se centrifugo a 12000 rpm durante 5 min. a 4°C.(21)

Precipitación de ácidos nucleicos:

Se desechó el precipitado y se extrajo el sobrenadante, al cual se le agregó un volumen de isopropanol, se procedió a mezclar suavemente por inversión del tubo sobre hielo durante 10 min; luego se centrifugó a 12000 rpm por 5 min. a 4°C.(21)

Disolución de Ácidos Nucleicos:

Se eliminó el sobrenadante y al precipitado se le adicionó 1 mL de Etanol al 70% y se dejó por 15 min. en reposo. Luego se centrifugó a 12000 rpm por 5 min. a 4°C, se eliminó el sobrenadante, se dejó secar durante 15 min. y se procedió a agregar 50 µL de buffer TE (Tris – EDTA) para su conservación.(21)

3. Optimización de la reacción en cadena de la polimerasa

Existen cebadores específicos para amplificar los minicírculos del kADN de *T. cruzi* y de *T. rangeli*:(13,22)

Una vez hecha la extracción de ADN de las muestras capturadas se procedió a realizar la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, haciendo uso de los siguientes cebadores que amplifican kADN del cinetoplasto de *T. rangeli* y *T. cruzi*

a. **Cebador S35** (5` GGG TAA TGT ACG GGT GGA GAT GCA TGA 3`)

Cebador S36 (5` GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT 3`)

Este par de cebadores amplifica fragmentos de 450 a 760 bp para *T. rangeli* y fragmentos de 330 bp para *T. cruzi*. (13)

En un tubo eppendorf estéril de 0.5 mL especial para PCR se mezcló: 9.3 µL de agua estéril filtrada; 2.5 µL de buffer para PCR sin MgCl₂ 10X; 2.5 µL de MgCl₂ 25mM; 2.5 µL de mezcla de dNTP`s (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 25 mM; 2.5 µL de cada uno de cebadores S35 y S36 20 pmoles; una (1) U de ADN Taq polimerasa recombinante (0.2 µL); como control positivo se utilizó 3 µL de ADN de *T. cruzi* 20 pmoles (control positivo).

Se adicionaron 2µL de las muestras de ADN obtenidas a partir de los intestinos de los insectos, mantenidas en tampón TE, para todas las reacciones llevadas a cabo.

Tabla 1.CONDICIONES APLICADAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE PCR CON LOS CEBADORES S 35 y S 36 (13)

ETAPA	TEMP °C	TIEMPO MIN Y SEG	Nº DE CICLOS
DESNATURALIZACIÓN INICIAL	95	5 MIN	1
DESNATURALIZACIÓN	95	1 MIN	30
ALINEAMIENTO	54	1 MIN	30
EXTENSIÓN	72	1 MIN	30
EXTENSIÓN FINAL	72	5 MIN	1

b. **Cebador S121** (5`AAA TAA TGT ACG GGT GAG ATG CAT GA 3`)

Cebador S122 (5`GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA 3`)

Estos cebadores son específicos para *T. cruzi* y amplifican un fragmento de ADN de 330 bp. Se utilizaron para confirmar las muestras que resultaron ser positivas con los cebadores S35 y S36.

En un tubo eppendorf estéril de 0.5 µL se mezcló: 12.3 µL de agua estéril filtrada; 2.5 µL de buffer para PCR sin MgCl₂ 10X (KCl 500 mM, Tris HCl 200 mM pH 8.4 Invitrogen Life Technologies); 2.5 µL de MgCl₂ 25mM (Invitrogen Life Technologies); 2.5 µL de mezcla de dNTP`s 20 mM(dATP, dCTP, dGTP, dTTP GIBCO BRL); 2.0 µL de cada uno de cebadores S121 y S122 25 pmoles; 1 U de Taq ADN polimerasa recombinante [0.2 µL (Invitrogen Life Technologies)]; Como control positivo se utilizó1µL de ADN de *T. cruzi* 20 pmoles/ µL.

Se adicionaron 2µL de las muestras de ADN mantenidas en tampón TE, para todas las reacciones llevadas a cabo.

Tabla 2.CONDICIONES APLICADAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE PCR CON LOS CEBADORES S121 Y S122.(23)

ETAPA	TEMP °C	TIEMPO MIN Y SEG	Nº DE CICLOS
DESNATURALIZACIÓN INICIAL	95	5 MIN	1
DESNATURALIZACIÓN	95	45 SEG	30
ALINEAMIENTO	47	45 SEG	30
EXTENSIÓN	65	45 SEG	30
EXTENSIÓN FINAL	65	5 MIN	1

c. **Cebador:** TrF (5`CGC CCC GTC TTG CCC TGT 3`)

Cebador: TrR2 (5`CGC AGC AAG GAC AAG AAG GA 3`)

Estos cebadores son específicos para *T. rangeli* y amplifican un fragmento de ADN de 620 bp. Se utilizaron para confirmar sospechas de infecciones por *T. rangeli* de algunas muestras.

En un tubo eppendorf estéril de 0.5 µL se mezcló 11.25 de agua estéril y filtrada; 2.5 µL de buffer sin MgCl₂; 2.5 µL de MgCl₂ 1.5 mM; 2.5 µL de mezcla de dNTP`s 20 mM; 2.5 µL de cada uno de los cebadores TrF y TrR2 20 pmoles (Invitrogen Life Technologies); 1.25 U de Taq ADN polimerasa recombinante

(Invitrogen Life Technologies); se utilizó 1 μ L de ADN de *T. rangeli* 100 ng/ μ L como control positivo.

Para todas las muestras se utilizaron las mismas condiciones y concentraciones exceptuando la cantidad de ADN muestra 2 μ L y de agua estéril filtrada 10.25 μ L.

Tabla 3.CONDICIONES APLICADAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE PCR CON LOS CEBADORES TrF y TrR2 (24).

ETAPA	TEMP °C	TIEMPO MIN Y SEG	Nº DE CICLOS
DESNATURALIZACIÓN INICIAL	94	5 MIN	1
DESNATURALIZACIÓN	95	30SEG	35
ALINEAMIENTO	63	1 MIN	35
EXTENSIÓN	72	30SEG	35
EXTENSIÓN FINAL	72	5 MIN	1

VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS PCR A TRAVES DE LA ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

Para visualizar los productos obtenidos en las reacciones de PCR realizados se prepararon 750 mL de Buffer TBE 0.5X (Tris borato 40 mM EDTA 1mM pH 8.0) partiendo de una solución madre 5X.

El gel de agarosa al 1% se preparó utilizando 100 mL de TBE 0.5X y un (1) gramo de agarosa, la cual se disolvió calentando la solución con agitación moderada, después de haberse disuelto la agarosa, se dejó enfriar y se vertió en un plato mediano horizontal para geles previamente armado con un peine de 20 dientes, se dejó gelificar hasta estar constante.

A los 650 mL de TBE 0.5X restantes se les adicionó 32.5 μ L de bromuro de etidio para una concentración final de 0.5 μ g/ μ L, luego se vertió en el tanque de electroforesis horizontal (BIORAD)

Para la preparación de las muestras se tomó una alícuota de 12 μ L de cada producto (4/5 del volumen a correr) y se mezcló con 3 μ L de Orange G (1/5 del volumen del tampón de carga) para un volumen final de 15 μ L, el cual se depositó en cada uno de los pozos dejados por el peine en el gel, después del marcador de peso molecular el cual se depositó en el primer pozo y del control positivo (ADN de *T. cruzi*, 20 pgramos) el cual se depositó en el segundo, hasta llegar al último pozo en el cual se depositó el control negativo (agua).

Al tanque de electroforesis con el gel y las muestras servidas se les aplicó un voltaje de 80 vatios con una fuente de poder Model 300 (BIORAD) durante dos horas, tiempo en el cual el ADN migró a través del gel electroforético. El gel se llevó a una fuente de luz ultravioleta de 254/352 nm de longitud de onda donde se observó minuciosamente los resultados arrojados y se fotografió con una cámara digital Sony MCD200.(25)

ANÁLISIS DE LOS GELES DE AGAROSA

El resultado de los PCR en los geles de agarosa al 1% se graficó en una escala semilogarítmica así: el tamaño de los pares de bases de cada fragmento del marcador de peso molecular contra la distancia en cms. recorrida por los fragmentos y comparándolo con el fragmento producido por el control positivo y las muestras positivas..

4.0. RESULTADOS

a. TRABAJO DE CAMPO

Durante los seis meses en los que se llevó a cabo la investigación de campo se muestreó mensualmente desde noviembre de 2002 hasta abril de 2003, entre los días 13 y 17 de cada mes en horas diurnas (8 a.m. – 5 p.m.); se revisaron 98 viviendas de la localidad que corresponden a un 62.02% del total, las cuales presentaban las condiciones propicias para el establecimiento del insecto vector triatomino: pared de bahareque, techo de palma, pisos y paredes deterioradas y con presencia de animales domésticos [pavos (*Meleagris gallopavo*), perros (*Cannis familiaris*), gallinas (*Gallus gallus*), palomas (*Columba sp*), cerdos (*Sus scropha*), gatos (*Felix domesticus*) y burros (*Equus asinus*) entre otros] de estas viviendas solo una carecía de energía eléctrica (0.98%) y dos no tenían presencia de animales domésticos (1.96%)

Durante el tiempo de la investigación de campo se realizó la captura de 379 triatominos pertenecientes todos (100%) a la especie *Triatoma maculata* (Tabla 4) ; de los cuales 176 triatominos fueron capturados en el intradomicilio (46.44%) correspondientes a la revisión de 92 casas de bahareque de las cuales se encontraron 27 infestadas, y 6 casas de material de las cuales 3 estaban infestadas (ver tabla 8); y 203 triatominos se capturaron en el peridomicilio (53.56 %); los triatominos capturados en el intradomicilio se encontraron

principalmente debajo de colchones, en las grietas de las paredes y en sitios de reposo de los animales domésticos en las habitaciones de estar; de estos triatominos 42 fueron adultos correspondiendo al 23.86% triatominos capturados en el intradomicilio y 134 triatominos en estado inmaduros que corresponden al 76.14%. Los triatominos capturados en el peridomicilio se encontraron principalmente en nidos de gallinas, arrumes de leña y cáscaras de maíz (*Zea mays*) de los cuales se capturaron 50 adultos que corresponden al 24.63% y 153 triatominos en estado inmaduro que corresponden al 75.37%. Algunos triatominos adultos después de capturados ovipositaron en los frascos de almacenamiento, el número de huevos no se tomó en cuenta para el desarrollo del presente estudio. (Foto 1)



Foto 1. *Triatoma maculata* (Erichson 1848)
y huevos ovipositados después de la captura

Tabla 4: Triatominos totales capturados mensualmente en Martín Alonso, Córdoba (Bol) Nov 2002 – Abr 2003 (Ninfas más adultos; Intra y peridomicilio)

MESES	Nº DE TRIATOMINOS CAPTURADOS				TOTALES	%
	NINFAS	%	ADULTOS	%		
NOV 2002	105	59.32	72	40.68	177	46.70
DIC 2002	59	88.06	8	11.94	67	17.68
ENE 2003	00	00	00	00	00	00
FEB 2003	24	85.71	4	14.29	28	7.39
MAR 2003	23	79.31	6	20.69	29	7.65
ABR 2003	76	97.43	2	2.57	78	20.58
TOTALES	287	75.73	92	24.27	379	100

Figura 1. Número de Triatominos totales capturados en Martín Alonso, Córdoba (Bol) mensualmente desde nov de 2002 hasta abr de 2003

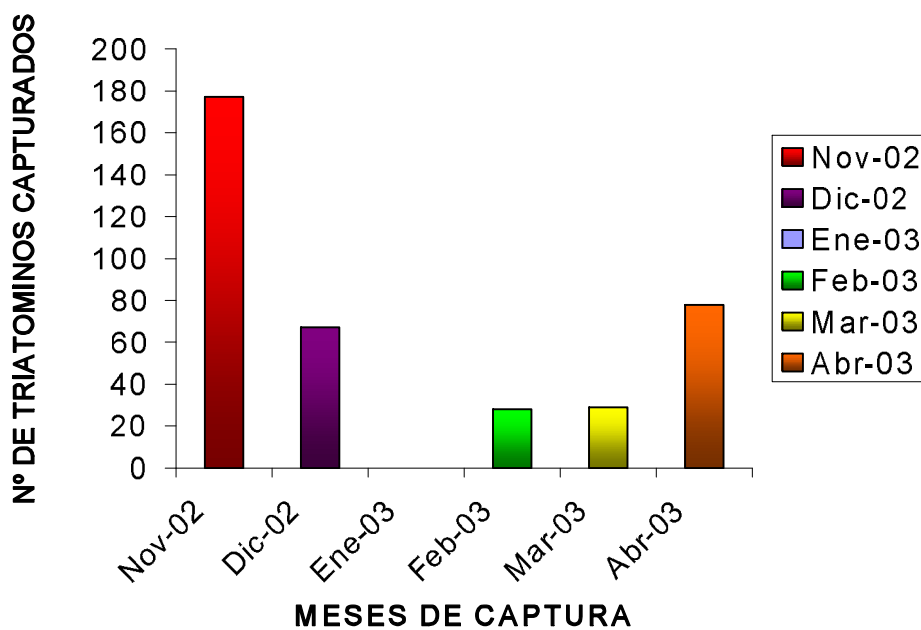


Tabla 5. Triatominos capturados en el intradomicilio en MARTÍN ALONSO Córdoba(Bol) entre los meses de Nov de 2002 y Abr de 2003.

MES	ADULTOS	%	NINFAS	%	TOTALES
NOV 2002	22	56.41	17	43.59	39
DIC 2002	8	11.94	59	88.06	67
ENE 2003	0	0	0	0	0
FEB 2003	4	15.38	22	84.62	26
MAR 2003	6	22.22	21	77.78	27
ABR 2003	2	11.76	15	88.24	17
TOTALES	42	23.86	134	76.14	176

Tabla 6. Triatominos capturados en el peridomicilio en MARTÍN ALONSO Córdoba (Bol) entre los meses de Nov de 2002 y Abr de 2003.

MES	ADULTOS	%	NINFAS	%	TOTALES
NOV 2002	50	36.23	88	63.77	138
DIC 2002	00	00	00	00	00
ENE 2003	00	00	00	00	00
FEB 2003	00	00	2	100	2
MAR 2003	00	00	2	100	2
ABR 2003	00	00	61	100	61
TOTALES	50	24.63	153	75.37	203

Tabla 7. Ninfas capturadas en el intradomicilio y en el peridomicilio en MARTÍN ALONSO, Córdoba (Bol) entre los meses de nov de 2002 y abr de 2003.

MESES	NINFAS INTRADOMICILIO					TOTALES	NINFAS PERIDOMICILIO					TOTALES
	I	II	III	IV	V		I	II	III	IV	V	
NOV2002	12	3	2	00	00	17	0	9	21	26	32	88
DIC 2002	23	32	3	1	00	59	00	00	00	00	00	00
ENE2003	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
FEB2003	11	3	7	00	1	22	00	00	2	00	00	2
MAR2003	4	7	8	1	1	21	00	1	1	00	00	2
ABR2003	9	5	00	1	00	15	12	13	20	13	3	61
TOTALES	59	50	20	3	2	134	12	23	44	39	35	153

Tabla 8. Triatominos capturados en el Intradomicilio según el tipo de vivienda, en Martín Alonso, Córdoba (Bol) entre noviembre de 2002 y abril de 2003.

TIPO DE VIVIENDA	Nº DE VIVIENDAS	Nº DE TRIATOMINOS	PORCENTAJE
BAHAREQUE	92	160	90,90
MATERIAL	6	16	9,10
TOTAL	98	176	100,00

Figura 2. Número de ninfas capturadas en Martín Alonso, Córdoba (Bol) entre los meses de noviembre de 2002 y abril de 2003.

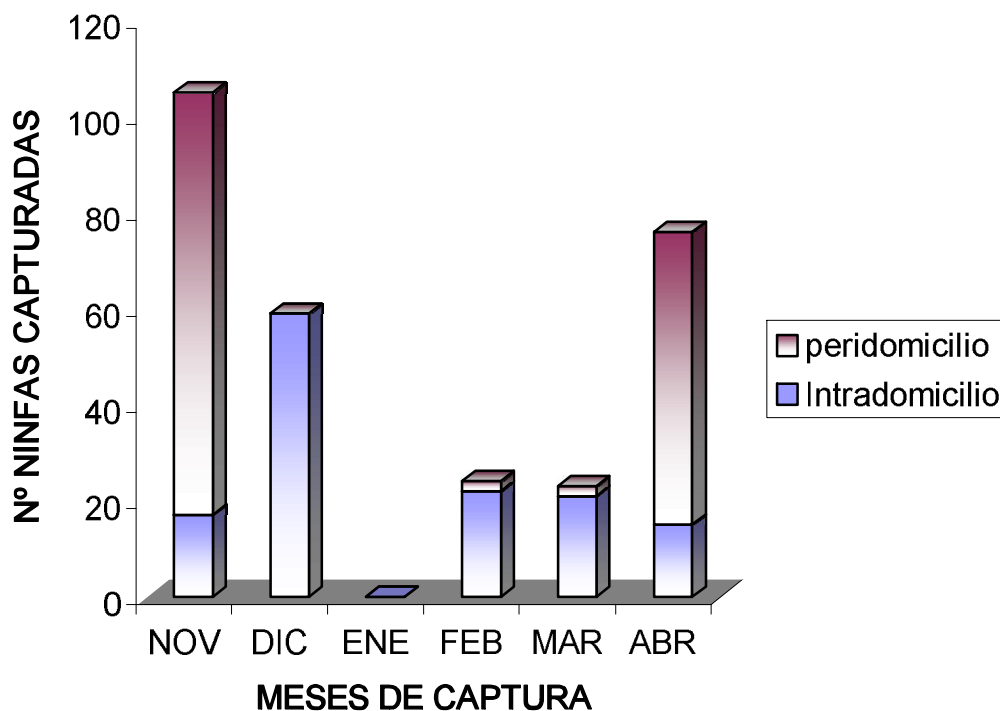


Tabla 9. Índices de riesgo de transmisión de *tripanosoma cruzi* Martín Alonso, Córdoba (Bol)

INDICES INDICADORES DE RIESGO	PORCENTAJE
INDICE DE INFESTACION	17.72
INDICE DE DENSIDAD	239.87
INDICE DE HACINAMIENTO	1353.00
INDICE DE COLONIZACIÓN	85.71
INDICE DE INFECCIÓN	7.45
INDICE DE INFECCIÓN RELATIVA	35.71

b. TRABAJO DE LABORATORIO

DETECCIÓN DE INFECCIÓN NATURAL POR *T. cruzi* EN TRIATOMINOS

De 255 triatominos evaluados con los cebadores S35 y S36 se obtuvo un total de 43 insectos infectados (16.86%) y 212 (83.14%) fueron negativos para la infección con *T. cruzi*.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

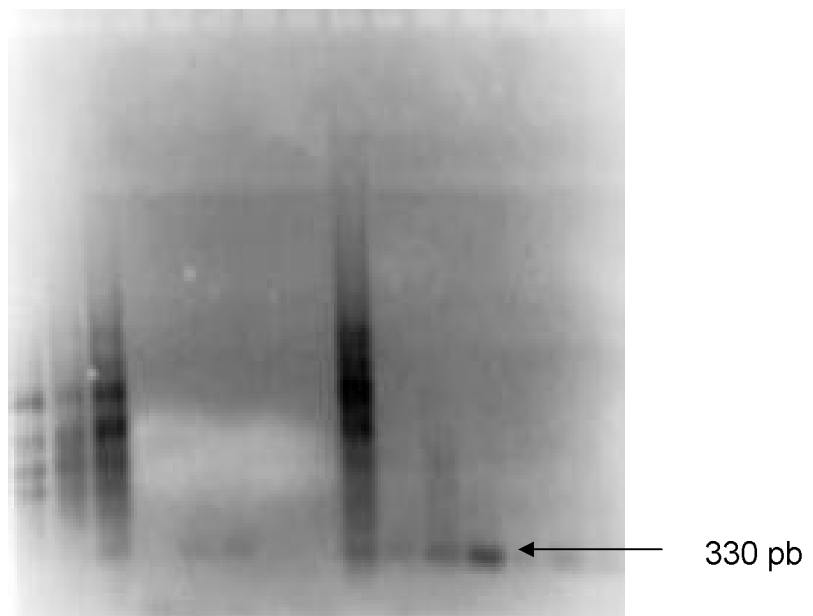


Foto 2. Electroforesis en gel de Agarosa al 1%, con tinción de Bromuro de Etidio; usando cebadores S35 y S36 con una U de Taq polimerasa; Pozo 1: Marcador molecular Φ X 174; pozo 2: control positivo (50 pmoles de ADN de *T. cruzi*); pozos 3 – 16 productos de PCR problema 15 μ L por pozo; pozo 17 Control negativo (agua estéril filtrada); se observa en el pozo 2 correspondiente al control positivo un exceso de ADN lo que ocasiona el barrido, lo mismo ocurre en los pozos 3 y 11.

Debido a que los cebadores S35 y S36 no son específicos para *T. cruzi* a causa de que producen reacciones cruzadas con el kADN de *T. rangeli*; como las que se muestran en la foto 2 donde se ven fragmentos de 330 pb correspondientes a *T. cruzi* y fragmentos inespecíficos que pueden corresponder a *T. rangeli*, se decidió hacer uso de otros juegos de cebadores, uno específico de *T. cruzi* (S121 y S122) y otro para confirmar sospechas de infecciones por *T. rangeli* (TrF y TrR2 específicos para *T. rangeli*).

Con los cebadores S121 y S122 se analizaron los 43 insectos hallados positivos con S35 y S36 resultando ser positivos para *T. cruzi* solo 19 de ellos amplificando un fragmento de 330 pb que se observa claramente en la foto (3); todos sobre *Triatoma maculata* esto indica un nivel de infección natural del 7.45%

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

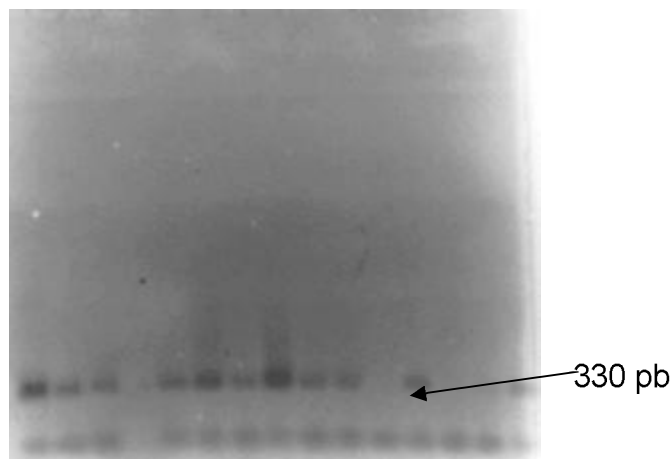


Foto 3. Electroforesis en gel de Agarosa al 2%, con tinción de bromuro de etidio; con los cebadores S121 y S122 y una U de Taq polimerasa; en el pozo uno se encuentra el control positivo (20 pmoles ADN de *T. cruzi*); del pozo 2 al 15 muestras de ADN problema. No se observa el control negativo. Se observa en los pozos 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 12 y 15 la banda correspondiente a 330pb lo cual confirma estas muestras como positivas.

Con los cebadores TrF y TrR2 se analizaron 15 insectos de los cuales se tenían sospechas de estar infectados por *T. rangeli* debido a la presencia de bandas inespecíficas presentes en los corridos electroforéticos de las muestras amplificadas con los cebadores S35 y S36, de estos sólo cuatro resultaron estar infectados con *T. rangeli*, como se observa en la foto (4), donde se presenta un fragmento de 620 pb

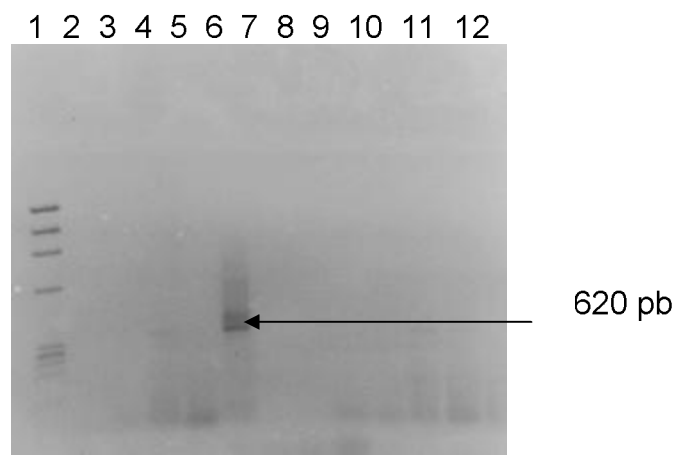
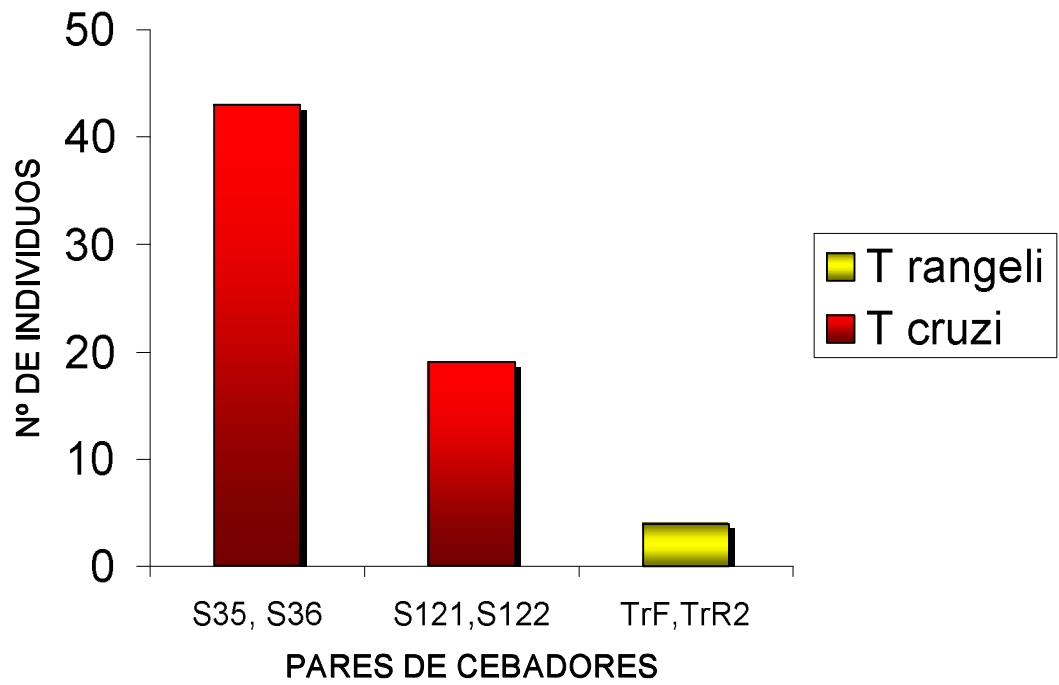


Foto 4. Electroforesis en gel de Agarosa al 2% y tinción con Bromuro de Etidio; usando los cebadores TrF y TrR2 con 1.25 unidades de Taq polimerasa; en el pozo 1 se encuentra el marcador molecular Φ X 174; de los pozos 2 al 12 muestras de ADN problema. En el pozo n°6 se presenta la banda de 620 pb correspondiente a *T. rangeli*

Tabla 10. Relación entre cebadores e insectos positivos

INDIVIDUOS ANALIZADOS	CEBADOR	INSECTOS POSITIVOS			
		T Cruzi	%	<i>T. rangeli</i>	%
255	S35, S36	43	16.86	0	0
43	S121,S122	19	7.45	0	0
15	TrF,TrR2	0	0	4	1.5

Figura 3. Insectos vectores encontrados positivos para *T. cruzi* o *T. rangeli* con cada uno de los cebadores específicos para cada especie de parásito



5.0 DISCUSIÓN

Las condiciones estructurales de las viviendas es un factor bastante influyente en la domiciliación de los vectores triatominos, debido a que le proporcionan sitios donde anidarse y fuentes de alimentación cercanas.

Pero no se encontró una relación directa entre la invasión con insectos vectores y el tipo de material en que está construida la casa (Paredes en bahareque o bloques; pisos en tierra o cemento; y techos en zinc o palma), debido a que en los distintos tipos de vivienda analizados se encontraron vectores como lo muestra la tabla 8, sino con el grado de aseo que esta tuviera, resultado similar al obtenido en el trabajo Detección de triatominos en ambientes domésticos. Corrientes, Argentina donde a pesar que las condiciones de las viviendas rurales en los departamentos de esta provincia eran muy parecidas entre si no se encontró una relación entre el grado de infestación y el tipo de viviendas.(27)

La presencia de animales domésticos en las viviendas tanto en el intradomicilio como en el peridomicilio, da mayores posibilidades al establecimiento de los vectores; en este caso el animal doméstico que se encuentra asociado con la presencia de vectores triatominos en las viviendas es la gallina (*Gallus gallus*), debido a que los habitantes las dejan anidar en el interior de sus casas y no tienen la precaución de limpiar estos sitios de reposo, esto se pone de

manifiesto al analizar que de los 379 triatomíneos capturados el 90% de ellos lo fueron en sitios de reposo de las gallinas, esto se asemeja a lo reportado en el trabajo de Corrientes, Argentina donde se encontró al vector *T. platensis* asociado a nidos de aves y más específicamente a nidos donde se oculta *D. albiventris*.(27).

Los 379 triatomíneos colectados pertenecen en su totalidad (100%) a la especie *Triatoma maculata*, además se da el hecho de que este insecto se encuentra infectado naturalmente con *T. cruzi* constituyéndose como un nuevo reporte para el departamento de Bolívar, dado que antes se había encontrado la presencia del vector pero sin infección natural. (29) Esto representa una nueva amenaza para la población humana rural del departamento de Bolívar, puesto que, se suma a los vectores antes mencionados y aumenta la posibilidad de una posible infección con *T. cruzi* debido a los evidentes hábitos domiciliarios del vector, lo que deberá ser tenido en cuenta por parte de las entidades de salud pública correspondientes, para el manejo y control adecuado de los vectores y de posibles casos de la enfermedad dentro de la población humana en el área de estudio.

Triatoma maculata representa la tercera especie de importancia médica en Colombia, después de *Rhodnius prolixus* y *T. dimidiata* en cuanto a transmisión de la enfermedad de Chagas.(28)



Foto 5. *Triatoma maculata* (Erichson 1848)
capturado en Martín Alonso, Córdoba (Bol)

Los indicadores de riesgo de transmisión de *T. cruzi* por triatomíneos, como Infestación Domiciliaria (17.72%), Densidad (239,87%), Hacinamiento (1353,00%), Colonización (85,71%), Infección (7.45%) e Infección relativa (35.71%), (tabla 9) muestran un desplazamiento activo de los triatomíneos hacia las viviendas, quizá atraídos por la fuente de alimentación que constituyen los animales domésticos.(27)

Los índices de hacinamiento y densidad fueron los de más altos porcentaje, quizá debido a los malos hábitos de aseo en algunas viviendas y a la costumbre de tener animales domésticos en el interior de las casas que como ya se mencionó brindan alimento a los vectores y sirven como reservorio para el parásito, y como dichas habitaciones son usadas por la población humana como dormitorios, confirmando lo dicho por los autores del trabajo realizado en Amalfi, Antioquia donde estos índices también fueron los más altos y según

ellos este hecho es debido al estado nutricional de los vectores los cuales buscaran la manera de satisfacer sus necesidades alimenticias. (27)

El índice de Infestación domiciliaria puede considerarse bajo (17.72%) con respecto a los índices de Hacinamiento y Densidad, (1353,00% y 239,87% respectivamente) debido a que en las viviendas en las que no se encontraron signos de la presencia de triatomíneos, se reportó el uso de agentes químicos como Lorsban 4E, (480 g/L) y Metil Parathion EC (480 g/L) y también el uso de Creolina y agua caliente como agentes para la desinfección de las viviendas, sin embargo, comparado a lo encontrado en el trabajo realizado en Amalfi, Antioquia (14.5%) se puede afirmar que el índice de infestación domiciliaria es similar, lo cual significa que existe una alta población de triatomíneos para esta población rural y si se tiene en cuenta que el vector se encuentra infectado naturalmente con *T. cruzi* se puede pensar en un alto riesgo epidemiológico para la población de Martín Alonso.

Con respecto al hecho de la limpieza de las casas con los químicos, en el trabajo de Corrientes, Argentina se reporta el hallazgo de 73 ejemplares de *T. sordida* en casas que habían sido asperjadas unas dos semanas previas a la realización de la búsqueda entomológica, sin embargo esto podría significar que las campañas encaminadas a erradicar *T. infestans* de la Argentina hayan abierto un espacio que otras especies de triatomíneos pueden llegar a colonizar rápidamente, lo cual no se presentaría en nuestra área de estudio debido a que sólo se encontró una especie de insecto vector.(27)

En cuanto al índice de Colonización, se puede asegurar que es alto (85.71%),, este es mucho más elevado que el reportado en Corrientes, Argentina que alcanzó un porcentaje del 54.3% en algunas regiones lo cual es indicativo de que los habitantes del corregimiento de Martín Alonso están en un gran riesgo de adquirir la enfermedad de Chagas, lo cual aunado a los altos índices de hacinamiento y densidad de los vectores contribuyen a poner en alerta a los organismos de control y prevención de las enfermedades tropicales del departamento de Bolívar .(27)

De otro lado, para la detección de la infección natural por *T. cruzi* se usó la técnica PCR por tener esta una mayor sensibilidad a la hora de distinguir entre este parásito y *T. rangeli* puesto que otras técnicas como la microscopía solo captan el aspecto morfológico del parásito y al ser estos muy similares es posible llegar a confundirlos.(28)

En cuanto al hallazgo de insectos infectados naturalmente con *T. cruzi* (19 insectos) presenta un porcentaje de 7.45% que corresponde al índice de infección. Este resultado es obtenido tras la confirmación con los cebadores S121 y S122 los cuales resultaron ser más eficaces que los cebadores S35 y S36 con los cuales se analizaron 255 insectos y arrojaron un resultado de 43 insectos infectados que corresponden a un 16.68%.

Este valor de 7.45% puede considerarse bajo, si tenemos en cuenta que Acosta (2003) reportó un índice de infección de 5.35% en triatominos en una muestra de 112 insectos capturados en Chihuahua de los cuales solo se analizaron 59 a través de un examen de materia fecal, este valor fue considerado por Acosta como bajo. (30) Y además teniendo en cuenta que Wood encontró en California E.E.U.U una infección natural en *T. protracta* del 25% tras analizar 816 insectos.(28) y que Bar (1998) encontró en Corrientes que de 174 insectos (*T. sordida*) analizados 67 estaban infectados naturalmente por *T. cruzi*, para una tasa de infección de 38.5%(31); también Acuña (2002) reportó un índice de infección natural en *Mepraia spinolai* del 26% en tres localidades Chilenas.(32) en Colombia también se tienen reportes de índices de infección altos como los obtenidos por Wolf (2001) en varios municipios antioqueños, Montebello 21.2%, Salazar 40% y La Picardía 50%.(14)

Aunque el índice de infección del 7.45% es considerado bajo, debe ser tenido en cuenta por las autoridades de salud, debido a que es la primera vez que el triatomo *T. maculata* es reportado infectado naturalmente por *T. cruzi* en la costa Atlántica Colombiana.(29) Este bajo índice de infección también podría demostrar que los reservorios animales poseen un bajo índice de infección, tomando como punto de partida el hecho de que la mayoría de los triatominos (90%) fueron capturados en nidos de aves que se encuentran tanto en el intra como en el peridomicilio. (30)

Los cebadores S35 y S36 reportados por Vallejo y Guhl (13) como específicos para *T. cruzi* presentaron reacción cruzada con *T. rangeli*, debido a que en la secuencia que amplifican estos cebadores hay ciertas zonas del kADN de los minicírculos de *T. cruzi* y de *T. rangeli* que se parecen hasta en un 60% lo cual pudo haber ocasionado falsos positivos, confirmando lo dicho por los autores antes mencionados. En cuanto al hecho de trabajar las electroforesis con agarosa, donde ellos afirman que se pueden presentar este tipo de inconvenientes, a causa de que los perfiles de las distintas bandas de las regiones amplificadas para ambos parásitos no se muestran bien definidos en este tipo de geles, sin descartar los posibles errores cometidos durante el transcurso de la presente investigación, tales como, contaminación durante el proceso de PCR o en la propia electroforesis al pasarse muestras de un pozo del gel a otro. (13) Al hacer uso de los cebadores S121 y S122 las regiones parecidas de las secuencias del kADN de ambos parásitos son eliminadas y por tal razón pueden ser eliminados los falsos positivos.(23)

De acuerdo a las coinfecciones reportadas para *T. rangeli* y *T. cruzi* (13) no se encontró ningún insecto con ambos parásitos en el transcurso de la investigación. Pero utilizando los cebadores TrF y TrR2 se encontraron cuatro insectos infectados con *T. rangeli*. Los cebadores utilizados en este caso son reportados como específicos para *T. rangeli*. (24)

6.0 CONCLUSIONES

1. La única especie encontrada en el área de estudio fue *Triatoma maculata* (Erichson 1848), lo cual se constituye en un nuevo registro para el departamento de Bolívar y la costa Atlántica debido a que se encuentra por primera vez con infección natural de *T. cruzi*.
2. El insecto vector *Triatoma maculata* presentó hábitos peridomiciliarios e intradomiciliarios, constituyéndose en una amenaza potencial para la salud de los habitantes de Martín Alonso.
3. Los índices de riesgo encontrados fueron lo suficientemente elevados para considerar que la población humana en el área de estudio (Martín Alonso) presenta una alta posibilidad de adquirir la infección con *T. cruzi* y por tanto padecer la enfermedad de Chagas.
4. En el presente estudio no se encontró un mismo espécimen del vector coinfectado por *T. cruzi* y por *T. rangeli*, pero se encontró tanto *T. cruzi* como *T. rangeli* en diferentes especímenes, indicando que los dos parásitos se encuentran dentro de la misma población vectora.

5. Las condiciones de pobreza, los malos hábitos de aseo y la presencia de animales domésticos en el intradomicilio brindan las condiciones propicias para el asentamiento del insecto vector en el área de estudio.

6. La PCR demostró ser una herramienta eficaz para el diagnóstico de infección natural con *T. cruzi* en vectores triatominos.

7. Los cebadores S121 y S122 resultaron ser más específicos, bajo nuestras condiciones de trabajo, para *T. cruzi* que los cebadores S35 y S36, debido a que estos presentan reacción cruzada con *T. argeli*, al ser utilizados en electroforesis en agarosa.

RECOMENDACIONES

1. Extender la búsqueda del insecto vector al resto de los corregimientos y a la cabecera municipal de Córdoba (Bolívar).
2. Hacer un estudio epidemiológico en el cual se tenga en cuenta tanto a la población humana como a los animales que sirven de reservorio al parásito.
3. Se recomienda la utilización de cebadores específicos para *T. cruzi* tales como S121 y S122, si se desea obtener un buen resultado en posteriores investigaciones de la misma línea de trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. BOTERO, David; RESTREPO, Marcos; Parasitosis humana. ; tercera edición; corporación para Investigaciones Biológicas; Medellín, Colombia 1998.
2. BARRETO Mauricio, BURBANO Maria, BARRETO Pablo; nuevos registros de flebotominos (díptera: Psychodidae) y triatominos (Hemíptera: Reduviidae) para Risaralda, Cauca y Valle del Cauca, Colombia. Revista Colombiana de medicina, vol 28 , 116-122. 1997
3. La enfermedad de Chagas. Disponible en Internet en :
<http://therion.dna.uba.ar/labchagas/espaniol.htm>
4. SALAZAR Clara Lina y otros; conoce usted la enfermedad de Chagas; programa Nacional de Prevención y control de la enfermedad de Chagas y la cardiopatía infantil. ICMT: Antonio Roldan Betancourt; Medellín Colombia.
5. Service M.W. lectures notes on medical entomology. Blacwell scientific publication; Oxford; 1986.
6. GÓMEZ Omar; enfermedad de chagas (Tripanosomiasis Americana).
<http://www.bibliomed.com/lib/showdoc.cfm?libdocid=4886&returncatid=641>

7. PALACIOS, Búsqueda de secuencias complementarias a los monitores en el genoma de *Trypanosoma cruzi* .1999. Disponible en Internet en: <http://www.bact.wisc.edu/gradstudents/palacios/Tesis/introducción.htm>
8. CEVALLOS, Ana M; HERNÁNDEZ Roberto. *Trypanosoma cruzi* y La enfermedad de Chagas; Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana). Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Autónoma de México.
9. Etiología del mal de Chagas; La página azul del Chagas. Disponible en Internet en: <http://www.4gratisweb.com/página azul /etiología.htm>
10. GUHL, Felipe, Programas en la Eliminación de la Enfermedad de Chagas en Colombia. Academia Nacional de Medicina de Colombia. Vol 22 N°2 Agosto de 2000.
11. MORALES . W. Informes Básicos sobre la Enfermedad de chagas. Curso de parasitología médica. Departamento de Parasitología y microbiología de la universidad de León. México. Febrero 9 de 1999
12. NEWTON C.R. and A. Graham; PCR; introduction Biotechniques; Bios-Scientific publishers; 1994.

13. VALLEJO Gustavo Et al. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian host by Polimerase Chain Reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. Acta tropica 72 (1999) 203-212.
14. WOLFF, Marta, CASTILLO, Diana y otros. Tripanosomiasis Americana: determinación de Riesgo epidemiológico de transmisión en el municipio de Amalfi, Antioquia.
15. CHIARAMONTE M.G. Polimerase Chain Reaction reveals *Trypanosoma cruzi* infection suspected by serology in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis patients. Acta tropica 72 (1999) 295- 308.
16. BRENIERE Simone et al . *Trypanosoma cruzi* genotypes asociated with domestic *Triatoma sordida* in Bolivia. Acta tropica 71 (1998) 269 – 283.
17. Gomes Monica et al . Genetics relationships between *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients in southern Brazil as revealed by RAPD and SSR – PCR. Acta tropica 69 (1998) 99 – 109.
18. Planeación Municipal de Córdoba Bolívar. Comunicación oral. 2000.
19. LENT, H y P WYGODZINSKI, Revision of the triatominae (Hemiptera: Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas Disease. Bulletin Museum Natural History. 1979.

20. LANE, R; CUPP, E; SALOMON, B; y GONZALEZ, R. Manual de entomología medica para investigadores de América Latina. Fundación Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Medicas CIDEIM. Cali, Colombia. Pag 217-275.
21. KATZ D, CLADWYNE P. A. DNA isolation. Flinn scientific, INC. Web site: [www. Flinnsci.com](http://www.Flinnsci.com). En linea.
22. Protocolo de PCR para la detección de patógenos en muestras entomológicas. Manual de PCET.
23. BARBOZA Vivian. Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Trabajo de grado. Universidad de Sucre. 2003
24. MORALES Liliana, ROMERO Ibeth, DIEZ Hugo y otros. Characterization of a candidate *Trypanosoma rangeli* small nucleolar RNA gen and its application in PCR-based parasite detection. *Experimental Parasitology*. 2002
25. SAMBROOK-FRITSCH-MANIATIS; Molecular cloning, A Laboratory manual; second edition, tomo 1; cold Spring Harbor Laboratory press; 1989.
26. CASTILLO Diana, WOLFF Marta. Aspecto del Comportamiento de los triatominos (Hemiptera: Reduviidae), vectores de la enfermedad de Chagas. *Biomédica* 2000 .

27. BAR M.E, OSCHEROV E.B. DAMBORSKY y otros. Detección de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) en ambientes domésticos y Extradomésticos. Corrientes Argentina.

28. HARWOOD, J Roberts y JAMES, Maurice T. ENTOMOLOGÍA MEDICA Y VETERINARIA . Noriega editores. 1978. Pag 141

29. MOLINA Jorge, GUALDRON Luis, BROCHERO Helena y otros. Distribución actual e importancia epidemiológica de las especies de triatomíneos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. Biomédica Vol 20 N° 4 de 2000.

30. ACOSTA, Legarda Manuela Índice de infección natural de *T. cruzi* en triatomíneos (hemiptera: reduviidae) presentes en la barranca de Batopilas, Chihuahua.. Facultad de Medicina, UACH. Chihuahua, Chihuahua, México. 2003

31. BAR, María Esther Triatomíneos de la Comunidad de Palmeras en la Provincia de Corrientes. Ecología e Importancia Epidemiológica. Cátedra de Artrópodos. FACENA -UNNE. 1449 - (3400) Corrientes - Argentina. 9 de Julio 1998

32 ACUÑA, Mariana. La vinchuca silvestre: ¿una amenaza latente?. TECNO VET: Año 8 N°2, agosto 2002 [file:///A:/Revista%20 TecnoVet.htm](file:///A:/Revista%20TecnoVet.htm)

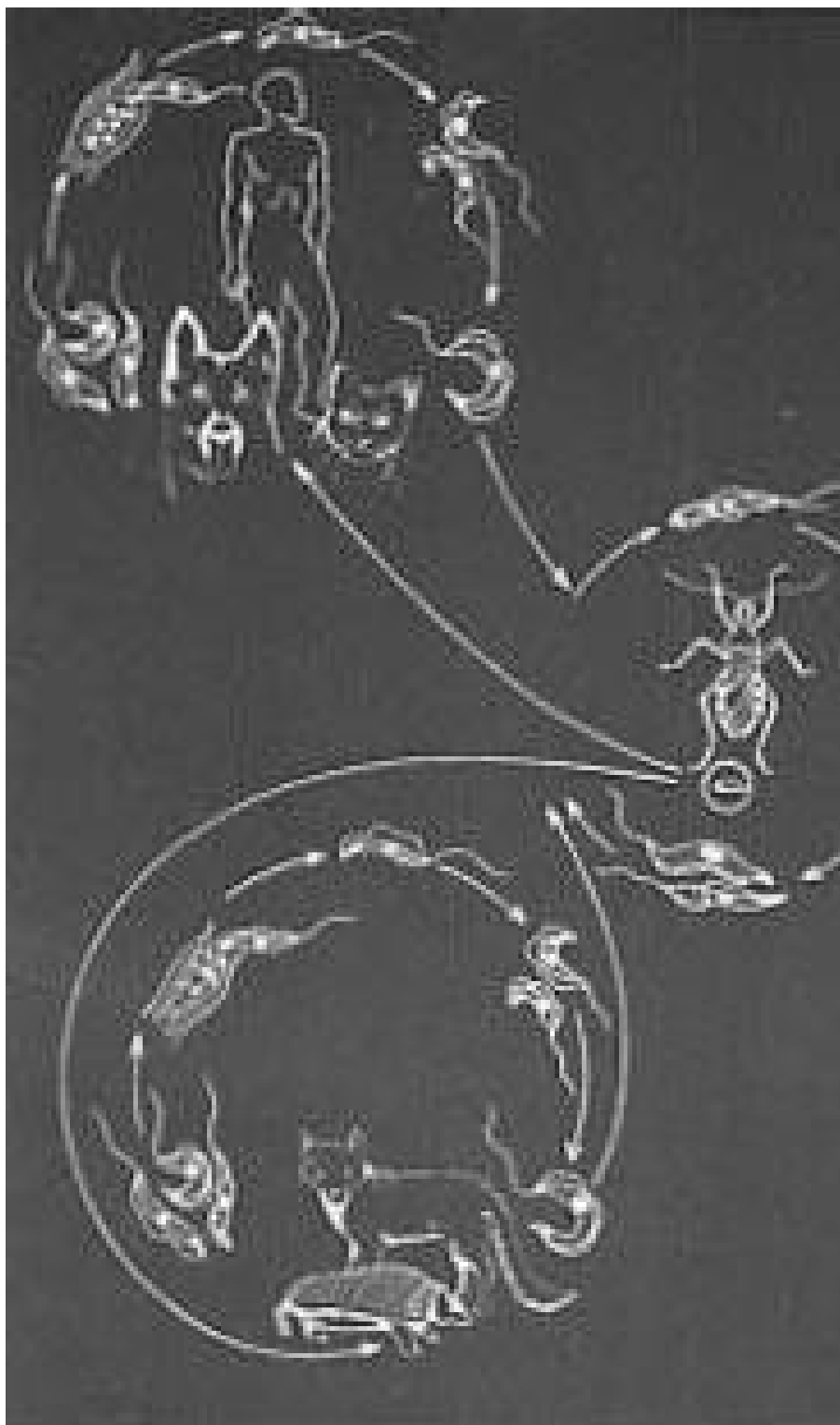
ANEXOS

Anexo A



Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas e América Latina
Tomado de Acuña, Mariana. La vinchuca silvestre: ¿una amenaza latente?.
TECNO VET: Año 8 N°2, agosto 2002 <file:///A:/Revista%20TecnoVet.htm>

Anexo B



Interacción entre ciclo silvestre y doméstico de la enfermedad de Chagas, tomado de Acuña, Mariana. La vinchuca silvestre: ¿una amenaza latente?. TECNO VET: Año 8 N°2, agosto 2002 <file:///A:/Revista%20TecnoVet.htm>

Anexo c

AREA DE ESTUDIO



Tomado de biblioteca virtual Encarta 2004

Anexo D.



Vivienda típica ubicada en el área de estudio