

## Notas Científicas

### ***Panstrongylus rufotuberculatus* (Champion, 1899) naturalmente infectados con *Trypanosoma cruzi* en el estado Miranda, Venezuela**

Zavala-Jaspe R.<sup>1</sup>, Abate T.<sup>2</sup>, Reyes-Lugo M.<sup>3</sup>, Alarcón de Noya B.<sup>1</sup> & Díaz-Bello Z.<sup>1</sup>

Dos ejemplares de *Panstrongylus rufotuberculatus* fueron capturados en una vivienda de El Hatillo, estado Miranda. En ambos se confirma la presencia de *Trypanosoma cruzi*. Se estudian algunos parámetros biológicos para estimar el comportamiento de uno de los aislados (Pr), encontrándose que tanto el cultivo en medios acelulares como la inoculación en ratones fueron exitosos. Así mismo, 73,3% de los *Rhodnius* de laboratorio se infectaron y 30,6% de los parásitos presentaron metaciclogénesis, mientras que *in vitro* se obtuvo 25,5%. La identificación molecular correspondió a *T. cruzi*. Este hallazgo es importante debido a la posible emergencia de esta especie silvestre que por alteración antrópica de sus hábitats naturales puede estar en proceso de dispersión, penetración y domiciliación de las viviendas, implicando la posibilidad de transmisión del parásito al ser humano y animales domésticos.

**Palabras clave:** *Panstrongylus rufotuberculatus*, *Trypanosoma cruzi*, vector.

La Enfermedad de Chagas (ECh) es una parasitosis producida por el flagelado *Trypanosoma cruzi*, un parásito heteroxénico el cual desarrolla su ciclo de vida entre un mamífero y un vector. Existen aproximadamente de 16 a 18 millones de personas infectadas y se estima en unos 100 millones los expuestos a la infección en América Latina (WHO, 2002, Technical Report Series No. 905). *Rhodnius prolixus*, *Triatoma maculata* y *Panstrongylus geniculatus* son las principales especies vectoras en Venezuela. *R. prolixus* constituye el transmisor más importante de la ECh en el país (Pifano, 1960, *Arch Venez Med Trop.* **3**: 73 - 99).

*Panstrongylus rufotuberculatus* es la segunda especie de mayor distribución en centro y

sur América, después de *P. geniculatus* reportándose desde México hasta Argentina (Patterson *et al.*, 2009, *Acta Trop.* **110**: 187-199). En Bolivia, en Colombia y en Perú se demostró su domiciliación y se ha llamado la atención sobre su potencialidad como vector de la ECh (Dujardin *et al.*, 1998, *Ann Trop Med Parasitol.* **92**: 219-228; Wolff & Castillo, 2002, *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **97**: 297-300; Marín *et al.*, 2007, *Cad Saúde Pública.* **23**: 2235-2238). En Colombia, este triatomino ha sido encontrado naturalmente infectado por *T. cruzi* y es el segundo reduvidio más capturado dentro de las viviendas (Wolff & Castillo, 2002, *Op.cit.*).

En Venezuela, *P. rufotuberculatus* no es muy común. Sin embargo, se ha reportado en los estados Aragua, Carabobo, Cojedes, Distrito Federal, Falcón, Guárico, Lara, Miranda, Monagas, Portuguesa, Sucre, Táchira, Trujillo, Yaracuy, Zulia, Delta Amacuro y Amazonas (Reyes-Lugo *et al.*, 2006, *Braz. J. Biol.* **66**: 443-446).

<sup>1</sup>Sección de Inmunología. <sup>2</sup>Sección de Biología Molecular. <sup>3</sup>Sección de Entomología Médica. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Medicina. Instituto de Medicina Tropical. Caracas - Venezuela.

\*Autor de correspondencia: zoraida\_diaz@yahoo.com.

Dos machos adultos de *P. rufotuberculatus* fueron capturados posados en las paredes de los dormitorios de dos casas entre las 10 y 12 p.m., entre los meses de mayo 2001 y abril 2002 en las tierras altas del Estado Miranda, en el pueblo de El Hatillo a 25 Km al sureste de Caracas, en la misma región donde se reportó por primera vez la colonización de ambientes domésticos por *P. geniculatus* (Latreille, 1811) (Reyes-Lugo & Rodríguez-Acosta, 2000, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **94**: 508). Esta región se ubica en lo que era hasta hace poco la transición de un bosque nublado a una altura de 1.000 a 1.300 m (Ewel *et al.*, 1976, Zonas de Vida de Venezuela. Min. Agric. Cría. Caracas), pero que ha sido modificado por áreas de construcción de urbanizaciones y carreteras (Reyes-Lugo *et al.*, 2006, *Op.cit.*). En Venezuela *P. rufotuberculatus* se encontró por primera vez naturalmente infectado con *T. cruzi* en el estado Yaracuy (Torrealba *et al.*, 1985, En: *Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas, Venezuela*. Eds: Carcavallo RU, Rabinovich JE, Tonn RJ. OPS-ECO/MSAS-SNCh, Buenos Aires) y en 2008 se reporta el hallazgo de huevos y la presencia de adultos infectados dentro de viviendas en el municipio Andrés Eloy Blanco del estado Lara (Traviezo-Valles *et al.* 2008, *Bol. Mal. Salud Amb.* **48**: 99-101).

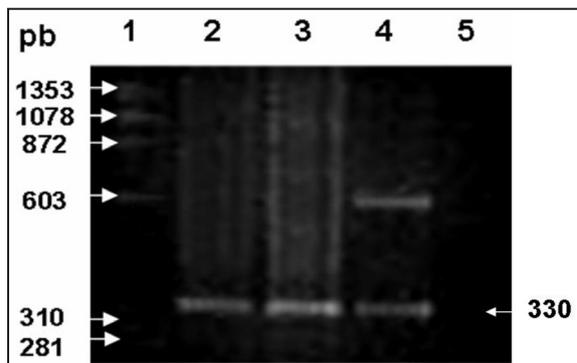
La identificación de los especímenes capturados se realizó utilizando la clave de la familia Triatominae (Ramírez-Pérez, 1985, *Chips de Venezuela*. Min. San. Asist. Soc. Caracas, Venezuela). Estos ejemplares midieron en promedio 26 mm y pesaron 0,25 gr. Morfológicamente se evidenció el proceso escutelar redondeado, corto y truncado apicalmente y no alargado, la juga roma, los tubérculos del lóbulo anterior del pronoto rojizos, presentando en los segmentos del conxivo puntos oscuros centrales (Bérenger & Blanchet, 2007. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **102**: 733-736).

En el contenido intestinal de los ejemplares examinados, se evidenciaron formas tripomastigotas compatibles con *T. cruzi*. El aislado proveniente de *P. rufotuberculatus* (Pr) se confirma biológicamente como *T. cruzi* por sus características tales como la capacidad de infección en modelos animales a partir de sangre y heces de triatominos, con producción de parasitemia y recuperación a través de xenodiagnóstico secundario siguiendo los parámetros de Barretto (Barretto, 1979, Epidemiología. En:

*Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Eds: Brener Z. & Andrade Z., Guanabara- Koogan, Brasil). El crecimiento del aislado en medio LIT mostró un pico máximo de crecimiento a los 14 días de cultivo con  $1,74 \times 10^8$  epimastigotes/mL. En el modelo murino la infección con este aislado estuvo caracterizado por un periodo prepatente de 14 días, un periodo patente de 38 días y un pico de parasitemia a los 33 días con 158.613 parásitos/mL y 0% de mortalidad al día 60 post-infección.

Otro parámetro biológico estudiado fue la infección en triatominos. Para ello, un grupo de 18 ninfas de 3er y 4to estadio de *R. prolixus* fue alimentado artificialmente con sangre de conejo desfribinada a la cual se le adicionaron  $10^6$  epimastigotes/ mL del aislado. Los insectos fueron pesados antes y después de alimentarlos. Después de 30 días fueron alimentados nuevamente con sangre de conejo sano desfribinada. Se realizó conteo diferencial de epimastigotes y tripomastigotes en cámara de Neubauer. Los resultados muestran que el aislado Pr colonizó eficientemente el tracto digestivo de los triatominos infectados, obteniéndose un número más alto de parásitos en el intestino en comparación con el número de flagelados ingeridos. El 73,3 % de *R. prolixus* en estudio fueron infectados por este aislado obteniéndose una baja mortalidad de estos insectos (3/18). Así mismo, se evidenció en los triatominos infectados el fenómeno de diferenciación con 30,6 % de metacicloogénesis, mientras que el mismo fenómeno realizado *in vitro* con medio TAU-3AAG (Contreras *et al.*, 1985. *Mol. Biochem. Parasitol.* **16**: 315-327) ocurrió en una proporción de 25,5%, lo que podría tener importantes implicaciones biológicas tanto en la virulencia como en la patogenicidad de este aislado. Adicionalmente, la presencia de ADN de micróculo de kinetoplasto de *T. cruzi* en las heces de los dos ejemplares se demostró mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Fig. 1). Para extraer el ADN se lisaron las células mezclando 100  $\mu$ L de heces de los *P. rufotuberculatus* con 100  $\mu$ L de DNAzol (Invitrogen, U.S.A.) y se guardaron a -20°C. La extracción se realizó según instrucciones del fabricante. Las reacciones fueron dirigidas a amplificar el fragmento de 330 pb del ADN del cinetoplasto. Se tomaron 5  $\mu$ L del ADN obtenido de las heces y se colocaron en la mezcla de reacción que contenía 0,2 mM de cada dNTP, 5 uM de cebadores S35 (5'-AAATAATGTACGAGGGGTGAGATGCATG)

**Fig. 1.** Electroforesis en gel de agarosa donde se muestra el producto de amplificación de 330 pb de la secuencia de minicirculos de kinetoplasto de *T. cruzi* de contenido intestinal de dos *P. rufotuberculatus* capturados en El Hatillo-Miranda. Las muestras 2 y 3 revelan infección por *T. cruzi*. Gel de agarosa al 3%, tampón TAE teñido con bromuro de etidio 0,5g/ml. Carriles: 1: Marcador  $\phi$ 174-HaeIII, 2: Heces de *P. rufotuberculatus* (Pr), 3: Heces de *P. rufotuberculatus* (Pr2), 4: DNA *T. cruzi* (Control Positivo), 5: Control Negativo



y S36 (5'-GGGTTTCGATTGGGGTTGGTG), 1,25 U de Taq Polimerasa, 5 uL de tampón 10 X de la Taq polimerasa y 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>. La amplificación se llevó a cabo de la siguiente manera: un ciclo de desnaturalización de 5 min a 95°C; 28 ciclos a 95°C, 1 min, 60°C, 1 min, 72°C, 1 min; con una extensión final a 72°C por 5 min (Avila *et al.*, 1993, *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2421-2426).

Es posible que los dos ejemplares de *P. rufotuberculatus* capturados en el intradomicilio, hayan sido atraídos por la luz de las viviendas porque, a pesar de la búsqueda extensiva que se practicó en la misma, no se encontraron huevos ni ninfas que evidenciaron colonización. Sin embargo, su incursión en las casas señala que esta especie silvestre podría estar en esta área en proceso de dispersión, penetración y domiciliación. Así mismo, la infección con *T. cruzi* en ambos ejemplares destaca la posibilidad de transmisión del parásito al ser humano y animales domésticos evidenciando la posibilidad de este triatomino como vector de la Enfermedad de Chagas. Se recomienda una cuidadosa actividad de vigilancia entomo-epidemiológica ya que en Venezuela muchos aspectos de la biología y ecología de este triatomino no se conocen.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Sra. Ana Avilan por su colaboración en la captura de los ejemplares. Este trabajo recibió financiamiento de la Sección de Inmunología, Instituto de Medicina Tropical, de FONACIT, Proyecto Misión Ciencia G-2007001442-2, de la Sección de Entomología Médica, Instituto de Medicina Tropical, UCV y del Proyecto Control de Vectores, Fundación UCV.

## *Panstrongylus rufotuberculatus* (Champion, 1899) naturally infected with *Trypanosoma cruzi* in Miranda state, Venezuela

### SUMMARY

Two specimens of *Panstrongylus rufotuberculatus* were captured in a house in El Hatillo, Estado Miranda. In both specimens the presence of *Trypanosoma cruzi* was confirmed. We studied some biological parameters for estimating the behavior of the isolates, finding in both that cell-free culture media as inoculation in mice were successful. Also, 73.3% of *Rhodnius prolixus* fed on infected mice became infected and 30.6% of the parasites developed to metacyclic forms whereas *in vitro* only 25.5% was obtained. Furthermore, the molecular identification corresponded to *T. cruzi*. This finding is important due to the possible emergence of wild species by anthropogenic alteration of their natural habitats, and this may become a process of dispersion, penetration and clearance of houses, implying the possibility of transmitting the parasite to humans and pets.

**Key words:** *Panstrongylus rufotuberculatus*, *Trypanosoma cruzi*, vector.

Recibido el 28/04/2009  
Aceptado el 06/11/2009