

XENODIAGNÓSTICO-PCR UNA HERRAMIENTA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN CON *Trypanosoma cruzi* Y *Trypanosoma rangeli* EN MAMÍFEROS SILVESTRES

AM. Santamaría^{1,2}, C. de Juncá², N. Gottdenker³, M. Perea¹, K. González¹, C. Rigg¹, D. Smith¹, V. Pineda¹, JE. Calzada^{1,2} y A. Saldaña^{1,2}

¹ Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES), ² Universidad de Panamá, Escuela de Biología y el Centro de Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Parasitarias (CIDEP).

³ Department of Veterinary Pathology, University of Georgia, College of Veterinary Medicine, Athens, Georgia.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una infección sistémica causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*. En esta zoonosis participan un gran número de reservorios vertebrados y vectores triatominos. En Panamá, el humano es parasitado por *T. cruzi* y *Trypanosoma rangeli*. Siendo el primero el agente causal de la enfermedad de Chagas y el segundo un hemoflagelado no patógeno de alta prevalencia en nuestro medio. La detección de la infección por *T. cruzi* y *T. rangeli* en reservorios silvestres es importante para conocer y comprender el papel eco-epidemiológico de estos parásitos, la persistencia de la infección en el entorno silvestre y la prevalencia de los parásitos en cada huésped. Actualmente, las pruebas de Xenodiagnóstico y la PCR han sido utilizados independientemente para detectar la infección por estos flagelados en mamíferos silvestres. Sin embargo, los resultados varían debido a las propiedades de la prueba usada y a características particulares de la infección en huéspedes y vectores evaluados.

OBJETIVO

Evaluar el desempeño de la metodología de Xenodiagnóstico acoplada al PCR en el diagnóstico de la infección con *T. cruzi* y *T. rangeli* en mamíferos reservorios silvestres.

METODOLOGÍA

Se evaluaron animales silvestres considerados potenciales reservorios de la enfermedad de Chagas (zarigüeyas, monos perezosos y ratas espinosas) capturados en las comunidades de Las Pavas y Trinidad de Las Minasen la zona Oeste de Panamá. Los animales fueron anestesiados y a cada animal se le colocaron 5 - 10 chinches triatominos procedentes de colonias estériles del CIDEP, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá. Luego de alimentarse por 30 minutos, los chinches fueron colocados en evaneses con papel filtro por un período de 30 días. Las heces de estos chinches fueron revisadas periódicamente por microscopía para determinar la infección con *Trypanosoma* spp. Posteriormente, se procesó el contenido intestinal de los vectores y se extrajo el ADN empleando un Kit comercial (Promega). El ADN se utilizó para realizar una PCR multiplex (Chiurrillo M., 2003), que amplifica simultáneamente una secuencia subtelomérica de las especies *T. cruzi* y *T. rangeli*. Todos los procedimientos que involucran el uso de animales en este estudio fueron aprobados por CIUCAL-ICGES antes de su ejecución.

Envase para Xenodiagnóstico



Chinches después de alimentarse



Peresozo de 2 dedos- Xenodiagnóstico



Zarigüeya- Xenodiagnóstico



Revisión de vectores

TÉCNICA DE XENODIAGNÓSTICO

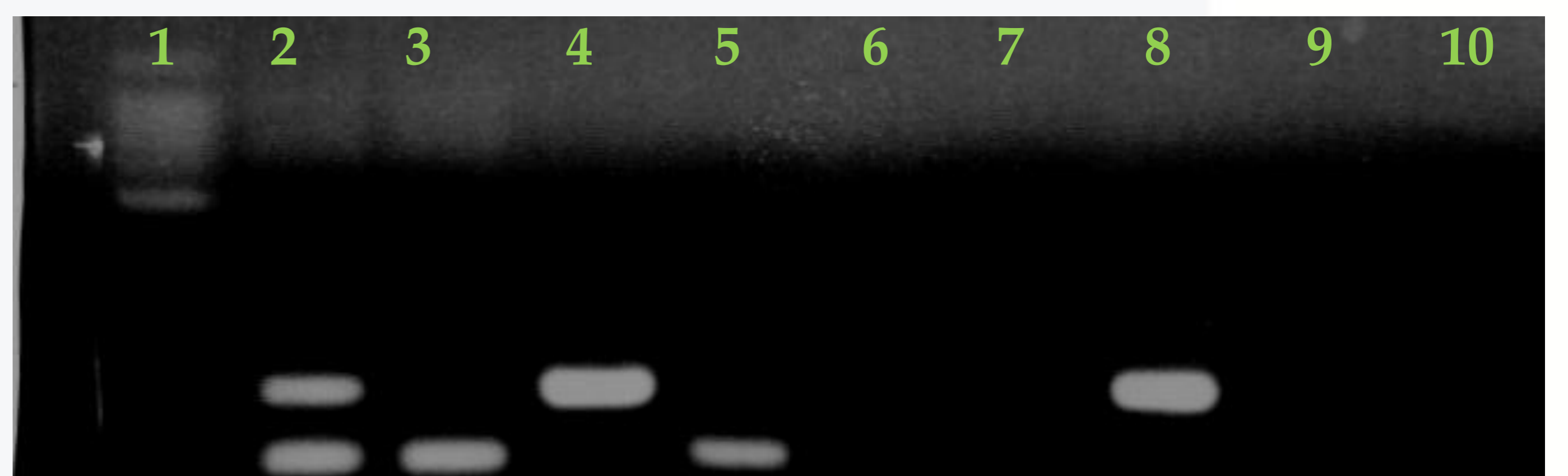
RESULTADOS

Se analizaron muestras de 87 mamíferos. Mediante el análisis por Xenodiagnóstico tradicional por microscopía, se obtuvieron 75 muestras negativas (86%) y 12 muestras (14%) positivas por *Trypanosoma* spp. Al menos un chiche de cada Xenodiagnóstico fue analizado por PCR, obteniendo 63 muestras negativas (72%), 11 muestras positivas por *T. cruzi* (13%) y 13 muestras positivas por *T. rangeli* (15%). De las 24 muestras positivas por *Tripanosomas*:

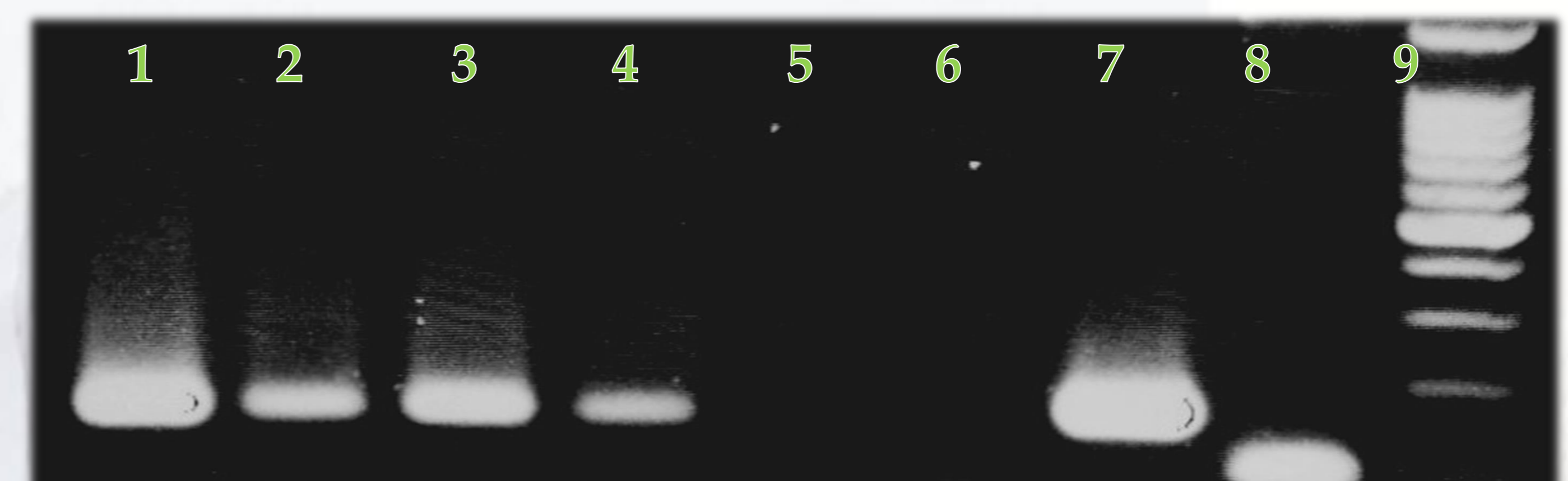
- 6 ratas Espinosas fueron positivas por *T. cruzi* (7%) y 0 por *T. rangeli*.
- 2 zarigüeyas fueron positivas por *T. cruzi* (2.6%) y 0 por *T. rangeli*.
- 3 perezosos fueron positivos por *T. cruzi* (3.4%) y 12 por *T. rangeli* (15%).

TABLA 1. RESULTADOS OBTENIDOS PARA XENODIAGNÓSTICO Y PCR

	Xenodiagnóstico	PCR
Muestras positivas por <i>T. cruzi</i>	—	11
Muestras positivas por <i>T. rangeli</i>	—	13
Muestras positivas por <i>Tripanosomas</i>	12	24
Muestras negativas	75	63
Total de muestras analizadas	87	

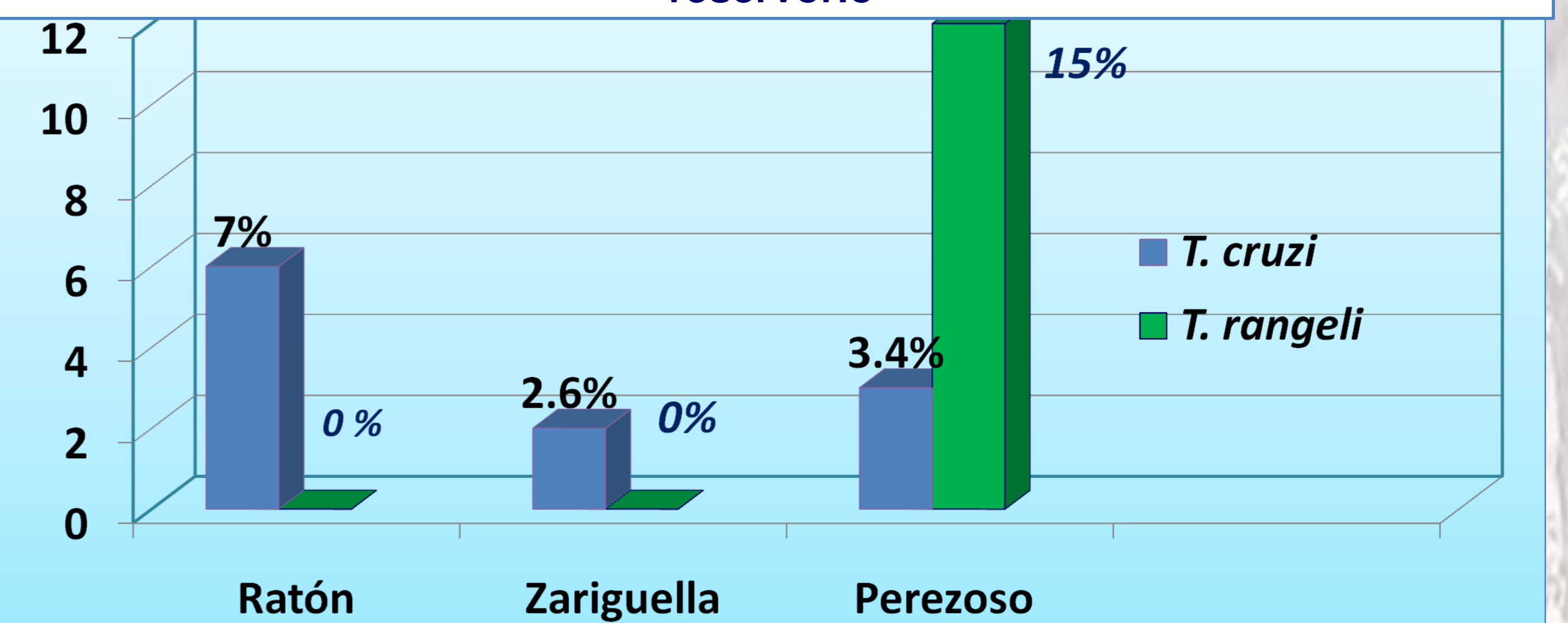


Gel1. PCR- Multiplex (*T. rangeli* / *T. cruzi*) (Electroforesis/ gel de Agarosa al 2%)
1 (Marcador molecular 100 bp DNA Ladder, Promega), 2 (Control positivo por *T. rangeli* y *T. cruzi*), 3 y 5 (Muestras positivas por *T. cruzi* procedente de zarigüeya y rata espinosa), 4 y 8 (muestras positiva por *T. rangeli* procedente de monos perezosos), 6 (control negativo de extracción), 7 (Control negativo de PCR), y 9 y 10 (muestras negativas). El producto amplificado por *T. cruzi* fue de 100 bp y el de *T. rangeli* fue por 170 bp.



Gel 2. PCR- Multiplex (*T. rangeli* / *T. cruzi*) (Electroforesis/ gel de Agarosa al 2%).
Carriles 1, 2, 3 y 4 (Muestras positivas por *T. rangeli*) procedentes de perezosos, carril 5 (control negativo de extracción), carril 6 (Control negativo de PCR), carril 7 (Control positivo de *T. rangeli*), carril 8 (Control positivo de *T. cruzi*) y carril 9 (Marcador molecular 100 bp DNA Ladder, Promega). El tamaño del producto amplificado fue de 100 bp por *T. cruzi* y 170 bp por *T. rangeli*.

Grafica1. Resultados de PCR-Xenodiagnóstico positivos con respecto al reservorio



DISCUSIÓN

El Xenodiagnóstico ha sido utilizado por años para el diagnóstico y aislamiento de *Tripanosomas* en reservorios silvestres. Se basa en la capacidad biológica de los triatominos de permitir la multiplicación de los parásitos. Sin embargo, es una técnica laboriosa y potencialmente poco sensible cuando la infección con los tripanosomas no se establece totalmente y su presencia en las heces es baja o nula. Por otro lado, la PCR ha sido reportada como una técnica altamente sensible, pero aun así de poca ayuda cuando la parasitemia en el vertebrado infectado es muy baja. Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran que la combinación de estas dos metodologías aumenta la sensibilidad para el diagnóstico de la infección con tripanosomas en mamíferos reservorios. Además, permite diferenciar claramente infecciones por *T. cruzi* y/o *T. rangeli* y detectar infecciones mixtas.

CONCLUSIÓN

La técnica de xenodiagnóstico-PCR es una herramienta útil para el diagnóstico y caracterización de las infecciones con *T. cruzi* y *T. rangeli* en mamíferos-reservorios silvestres. Este tipo de análisis permitirá una mejor evaluación del papel de los reservorios en la epidemiología de la enfermedad de Chagas y la infección con *T. rangeli* en nuestras áreas endémicas.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos el financiamiento de la SENACYT (Proyecto COL11-043). También, se agradece a los funcionarios: Roberto Rojas, José Montenegro (ICGES) y Enrique Martínez (MINSa) por su importante colaboración brindada en el trabajo de campo.