

## Infección por *Trypanosoma cruzi* y polimorfismo del Citocromo B del ADN mitocondrial en *Triatoma maculata* de Anzoátegui y Portuguesa, Venezuela Nilsa González-Brítez<sup>1</sup>, Antonio Morocoima<sup>2</sup>, Clara Martínez<sup>1</sup> & Hernán J. Carrasco<sup>1\*</sup>

Con el fin de entender la dinámica poblacional de *Triatoma maculata*, se analizó el polimorfismo genético y los índices de infección con *Trypanosoma cruzi*, utilizando triatominos provenientes de ecotopos y regiones geográficas diferentes. El índice de infección parasitaria para *T. maculata*, fue de 29.8% a través de la observación directa al microscopio y 40.3% utilizando el método de reacción en cadena de la polimerasa. Los niveles de infección encontrados incrementan la importancia de *T. maculata* como vector involucrado en el ciclo de transmisión de *T. cruzi*. El análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de una región del gen Cyt B, permitió establecer en forma preliminar, diferencias en los patrones de bandas de este gen, según el origen geográfico de cada población. Esto puede asociarse a cambios relacionados con procesos adaptativos involucrados en la colonización de nuevos hábitats. No se observó variación genética para vectores capturados en diferentes ecotopos de una misma localidad. Sin embargo es evidente la participación del vector en el ciclo de transmisión, mostrando que la presencia de *T. maculata* en las casas no puede ser ignorada.

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*, *Triatoma maculata*, RFLP-PCR, citocromo b.

### INTRODUCCIÓN

Los triatominos son insectos hematófagos que pertenecen al orden Hemiptera, familia Reduviidae y subfamilia Triatominae, comprendiendo un grupo de 138 especies (Galvão *et al.*, 2003; Costa & Felix, 2007). Los vectores primarios tienen hábitos intradomiciliarios y son los principales transmisores del *Trypanosoma cruzi*, parásito causante de la Tripanosomosis Americana, una de las más importantes enfermedades metaxénicas, cuya prevención se basa principalmente en el control vectorial, por lo cual es necesario conocer profundamente las características de estos insectos. Existen otros triatominos que demuestran tendencias sinantrópicas relacionadas con su distribución, potencial de colonización y su comprobada

capacidad vectorial, por lo cual han sido considerados como vectores de menor importancia en la transmisión del parásito, tal como *Panstrongylus megistus*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma maculata* y otros.

Una especie originalmente silvestre, adaptada al peridomicilio que habita palmas y árboles secos asociados con aves, roedores y marsupiales, es *Triatoma maculata* (Erichson, 1848), la cual exhibe importancia epidemiológica cuando se encuentra naturalmente infectada con *T. cruzi* y presenta características de colonización de viviendas humanas (Torrealba *et al.*, 1985; Lent & Wygodzinsky, 1979; Luitgards-Moura *et al.*, 2005). Esta especie ha sido descrita en Brasil, Venezuela, Colombia, Surinam, Guyana Francesa y algunas islas del Caribe (Carcavallo *et al.*, 2000). En Venezuela, aunque *Rhodnius prolixus* es el vector responsable de la transmisión doméstica, *T. maculata* es considerada una especie ornitófaga asociada a gallinas y palomas del peridomicilio, y aunque no se conoce mucho de su capacidad vectorial, esta contribuye con la transmisión del parásito (Pifano, 1969; 1973) y la misma ha sido asociada con frecuentes procesos de

<sup>1</sup> Instituto de Medicina Tropical (IMT), "Dr Felix Pifano" Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela.

<sup>2</sup> Centro de Medicina Tropical de Oriente, Universidad de Oriente (UDO) Núcleo de Anzoátegui, Barcelona, estado Anzoátegui, Venezuela.

\*Autor de correspondencia: hernan.carrasco@ucv.ve

domiciliación (Cortes & Suárez, 2005; Feliciangeli *et al.*, 2003; Luitgards-Moura *et al.*, 2005), pero sigue siendo difícil evaluar su papel en la transmisión, debido a que presentan índices de infección inferiores a los registrados para el vector primario. Basados en la escasa información epidemiológica de los vectores secundarios en las áreas endémicas del Venezuela, es importante realizar un estudio de las poblaciones de *T. maculata*, que involucren indicadores de infección y variabilidad poblacional, siendo esto último de gran importancia ya que pudiera estar asociado a cambios en el patrón de comportamiento del vector. Tomando en cuenta estos antecedentes, y con el fin de brindar información epidemiológica en algunas áreas de ocurrencia de *T. maculata*, se utilizó el método de amplificación del ADN del kinetoplasto (k-DNA), para detectar la presencia del parásito en los triatomínos, así como la Reacción en Cadena del ADN Polimerasa seguido del Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) para determinar el polimorfismo intraespecífico del gen citocromo b entre poblaciones provenientes de diferentes regiones geográficas.

Esta información es esencial para el diseño de estrategias de control del vector, ya que, aunque secundario, es pertinente el conocimiento de sus potencialidades como transmisor del parásito, así como para el monitoreo del proceso de colonización domiciliar por *T. maculata*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

Los ejemplares fueron colectados en diferentes ecotopos de los caseríos rurales: “El Eneal” (10° 07’ 00” N, 064° 36’ 00” O) y “Pica de Neverí” (10° 06’ 00” N, 064° 37’ 00” O) del estado Anzoátegui, “Jabillal” (09° 42’ 51” N, 069° 18’ 41” O) y “Las Panelas” (08° 58’ 47” N, 069° 58’ 26” O) del estado Portuguesa (Fig. 1).

El estado Anzoátegui está caracterizado por bosques tropicales de altitud media, temperatura de 28 a 30°C y periodos muy marcados de lluvias (Benítez, 2004). En varios caseríos al norte del estado se ha determinado el incremento en los índices de infección con *T. cruzi* e infestación con *T. maculata* dentro de las viviendas (Gamboa, 1962; Morocoima, 2008 Com pers).

El estado Portuguesa está compuesto por bosques húmedos y relieves montañosos al pie de

los Andes venezolanos y la temperatura media es de 25°C. La infestación peridomiciliar con *T. maculata* se encuentra localizada principalmente en áreas bajas (Benítez, 2006).

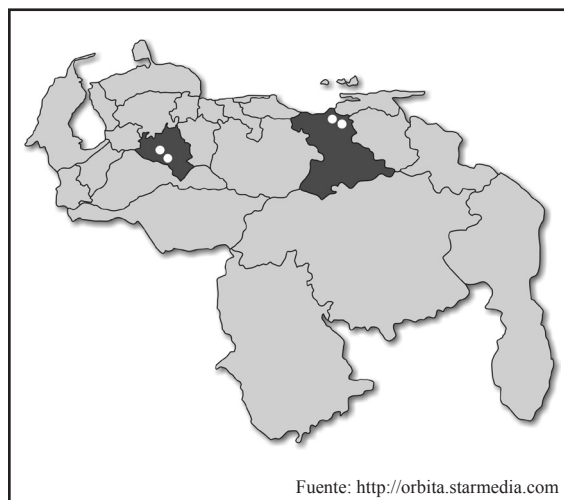
En los caseríos estudiados, la mayoría de las viviendas están construidas con madera, cemento o bahareque y techos de palma o zinc. El peridomicilio está compuesto por refugios de animales domésticos, gallineros y otros anexos, así como por la presencia de palmas alrededor de los ranchos (más abundante en Anzoátegui), que reúnen las condiciones óptimas y constituyen un importante albergue para los insectos.

### Material biológico

La búsqueda activa de insectos se realizó con ayuda del personal de Malariología y el tiempo de búsqueda por vivienda fue de 45 minutos aproximadamente. Se analizaron para ambas regiones un total de 120 biotopos, entre los que se incluyeron 82 viviendas y 38 ambientes extra-domésticos (gallineros, nidos de aves, palmeras y cúmulos de madera), seleccionados al azar por medio del muestreo aleatorio simple (Spiegel & Stephens, 2001).

Los triatomínos silvestres se colectaron luego de la disección de las palmas y a través de la colocación de trampas en árboles y palmeras que se encontraban

**Fig. 1. Área de Estudio: Zona de colecta de triatomínos en los estados de Portuguesa y Anzoátegui. Los puntos blancos indican la ubicación de los caseríos seleccionados en ambos estados.**



en la proximidad de las casas (máximo 300 metros) (Noireau *et al.*, 1999). Se capturaron 124 *T. maculata* (74 adultos y 50 ninfas), clasificados de acuerdo con la clave de Lent & Wygotzinsky (1979). Estos insectos fueron codificados según sexo, ecotopo y estado, de los cuales 72 insectos provenían de Anzoátegui (23 del peridomicilio, 22 del domicilio y 27 silvestres), y 52 de Portuguesa. (36 del peridomicilio y 16 silvestres). Para el análisis parasitológico, las heces frescas se obtuvieron por presión abdominal.

#### *Diagnóstico parasitológico de Infección por Trypanosoma cruzi*

Observación directa al microscopio (ODM): Fue examinado el total de triatominos capturados utilizando la muestra fecal diluida en solución salina al 0,85% para luego realizar la búsqueda de tripanosomas activos según el método de Brener modificado (Brener, 1962). Posteriormente se calcularon los índices de infección natural de *T. maculata* presente en las comunidades.

#### *Aislamiento y amplificación por PCR de la región variable de los minicírculos del ADN del kinetoplasto (k-DNA) de T. cruzi*

La extracción de ADN del parásito se realizó del resto sanguíneo del promesenterón de cada insecto siguiendo el protocolo Wizard® (Genomic DNA Purification, Promega). La amplificación del k-DNA del parásito, se realizó en 20 µL de volumen final de reactivos de PCR y 100 ng ADN blanco, utilizando los iniciadores S35 (5'- AAA TAA TGT ACG GG (T/G) GAG ATG CAT GA-3') y S36 (5'- GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT-3') (Sturm *et al.*, 1989). El control negativo consistió en la amplificación del ADN extraído a partir de heces de triatominos sanos criados en el laboratorio. Los productos del PCR fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %, en buffer TBE 1X (45mM Tris-borato, EDTA 1mM). Los geles fueron visualizados en un transluminador UV a través del programa de captura de imágenes KODAK DC 120.

#### *Aislamiento, amplificación y digestión de un fragmento del gen citocromo b (cyt-b) de T. maculata*

Una muestra representada por el 35 % de la población total (41 insectos de ambas regiones) fue sometida a la extracción de ADN a partir de las patas,

las cuales fueron previamente lavadas con buffer PBS (Phosphated Buffered Saline) para evitar contaminación y posteriormente fueron crio fracturadas en nitrógeno líquido según el método reportado por García *et al.*, (1998). Con el pellet obtenido se realizó el protocolo de extracción del Wizard® (Genomic DNA Purification Kit, Promega) y el producto final fue resuspendido en 40 µL de solución de rehidratación (Miller *et al.*, 1988).

Para la amplificación del fragmento del gen mitocondrial citocromo b y su posterior digestión enzimática fueron utilizados 20 triatominos de Portuguesa (13 de peridomicilio y 7 silvestres) y 21 de Anzoátegui (7 de peridomicilio, 8 silvestres y 6 de domicilio). La mezcla de reacción se realizó en 25 µL de volumen final que contenía 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,6), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 1,0 U. de enzima ADN Taq Polimerasa (BIOTAQ™ DNA Polymerase, Bionline), 10 pmol de los cebadores Cytb-32F y Cytb-82R (Monteiro *et al.*, 2000) y 50 ng de ADN genómico. La amplificación del gen se realizó bajo las siguientes condiciones, desnaturalización a 95°C por 5 minutos, seguida de 95°C por 1 minuto, 60°C por 50 segundos, 72°C por 45 segundos (35 ciclos), con extensión final a 72°C por 5 minutos. El control negativo incluyó todos los componentes con excepción del ADN molde. El producto de PCR fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio y una alícuota del mismo fue digerida durante toda la noche a 37°C, con 5 U de endonucleasa de restricción de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las enzimas utilizadas fueron *AluI*, *BamHI*, *HhaI*, *PstI*, *NotI*, *HindIII* y *SalI* (BioLabs Inc., New England y Promega Corp. USA), seleccionadas acorde al análisis de restricción sobre secuencias del mismo gen en otras especies que fueron tomadas del Gen Bank.

Los perfiles de restricción fueron visualizados en agarosa 2,5 % y digitalizados en el software Quantity One de BIORAD. La interpretación del patrón de bandas se realizó a través de la estimación del tamaño de pares de bases de los fragmentos amplificados comparados con la escalera de 200 pb (Hyperladder™ I de BIOLINE) disponible en el laboratorio.

## RESULTADOS

#### *Diagnóstico parasitológico de Infección por T. cruzi*

En la Tabla I se resume el número de triatominos capturados por caseríos y ecotopos de

**Tabla I. Número de *T. maculata* adultos (A) y ninfas (N) capturados según ecotopos y caseríos del estado Anzoátegui y Portuguesa.**

| Estados                  | Caseríos       | Ecotopos       |           |                   |             |                |            |
|--------------------------|----------------|----------------|-----------|-------------------|-------------|----------------|------------|
|                          |                | Domicilio (D)  |           | Peridomicilio(PD) |             | Silvestre (S)  |            |
|                          |                | A              | N (%)     | A                 | N (%)       | A              | N (%)      |
| Anzoátegui               | Pica de Neveri | 8              | 6 (43,7%) | 5                 | 5 (31,2 %)  | 5              | 3 (25 %)   |
|                          | El Eneal       | 8              | 0 (20 %)  | 8                 | 5 (32,5 %)  | 13             | 6 (47,5 %) |
| Portuguesa               | Las Panelas    | 0              | 0 (0 %)   | 12                | 8 (71,4 %)  | 7              | 1 (28,5 %) |
|                          | Jabillal       | 0              | 0 (0%)    | 6                 | 10 (66,6 %) | 2              | 6 (33,3 %) |
| *Sub total Infestación   |                | 22/124 (17,7%) |           | 59/124 (47,5%)    |             | 43/124 (34,6%) |            |
| **Sub total Colonización |                | 6/50 (12%)     |           | 28/50 (56%)       |             | 16/50 (32%)    |            |

\* Sub total de infestación: número y porcentaje de *T. maculata* adultos y ninfas capturados en cada ecotopo.\*\* Sub total de colonización: número y porcentaje de ninfas de *T. maculata* capturadas en cada ecotopo.**Tabla II. Detección de *T. cruzi* en *T. maculata* utilizando los métodos de Observación Directa al Microscopio (ODM) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

| Caseríos                    | Tamaño de Muestra | ODM        | PCR        | Infección/Estado |       |
|-----------------------------|-------------------|------------|------------|------------------|-------|
|                             |                   |            |            | ODM              | PCR   |
| Las Panelas (Portuguesa)    | 28                | 6 (21,4%)  | 11 (39,2%) | 15,3 %           | 30,7% |
| Jabillal (Portuguesa)       | 24                | 2 (8,33%)  | 5 (20,8%)  |                  |       |
| Pica de Neveri (Anzoátegui) | 32                | 14 (43,7%) | 15 (46,8%) | 40,2%            | 47,2% |
| El Eneal (Anzoátegui)       | 40                | 15 (37,5%) | 19 (47,5%) |                  |       |
| Total                       | 124               | 37 (29,8%) | 50 (40,3%) |                  |       |

acuerdo a la región de la cual provienen, así como los índices de infestación y colonización por cada ecotopo. Para el análisis por ODM y PCR, se utilizó el 100 % de los ejemplares y se observó la mayor sensibilidad del PCR, obteniéndose para Anzoátegui 29/72 individuos positivos por microscopia y 34/72 positivos por PCR. Para el estado Portuguesa se obtuvieron 8/52 positivos por observación directa y 16/52 positivos por PCR (Tabla II). El método de amplificación por PCR evidenció la presencia del fragmento de 330pb, correspondiente a la región variable de los minicírculos del kinetoplasto de *T. cruzi*, según Sturm *et al.* (1989) (Fig. 2).

#### *Reacción en Cadena del ADN Polimerasa -Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP)*

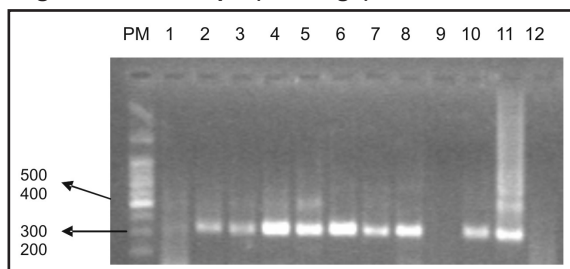
Con la amplificación del gen Cyt-b se obtuvo un producto de aproximadamente 580 bp (Fig. 3), el cual fue digerido con las enzimas de restricción ya mencionadas: Las enzimas *HhaI* y *PstI* no mostraron

diferencias en los fragmentos generados para los individuos provenientes de los dos estados, mostrando un único sitio de restricción. La Fig. 4 corresponde a la digestión con la enzima *AhaI*, que generó fragmentos diferentes según el origen geográfico de los triatomos. Para los individuos de Portuguesa, se generaron dos fragmentos de restricción; de 430 y 150 bp aproximadamente, mientras que para las poblaciones de Anzoátegui se observaron varios fragmentos de digestión parcial y al menos tres fragmentos de restricción bien definidos de aproximadamente 350bp, 150bp y 80bp. Las enzimas restantes no exhibieron sitios de restricción en ninguna de las poblaciones estudiadas (foto no mostrada).

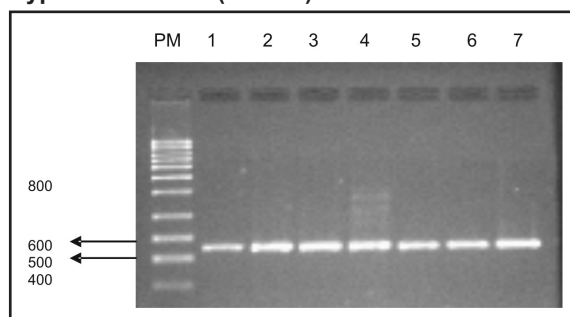
#### DISCUSIÓN

La frecuencia de infección encontrada por el método parasitológico directo, sugiere que el riesgo que *T. maculata* podría representar en la transmisión de la

**Fig. 2.** Amplificación del fragmento de 330 pb de kDNA de *T. cruzi* mediante PCR en deyecciones de *T. maculata* provenientes del estado Anzoátegui y Portuguesa. Carriles: 3, 4, 5 y 6 Anzoátegui. Carriles 1, 2, 7, 8, 9, 10 Portuguesa. Carril 11: Control positivo (cepa TcI). Carril 12: Control negativo. PM: 100 pb (Promega).

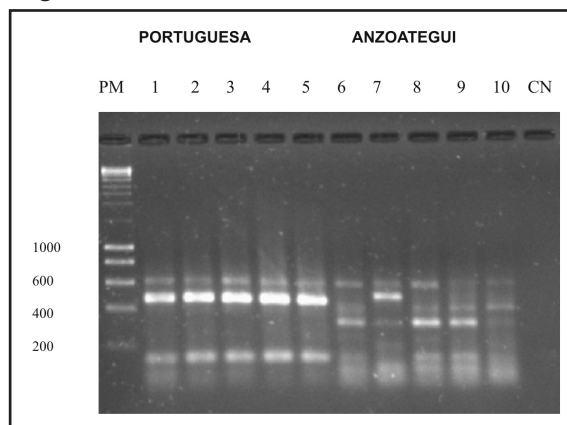


**Fig. 3.** Producto de amplificación de aproximadamente 580 bp del gen Cyt-b, obtenido con *T. maculata*. Carriles 1, 2: Triatomo de peridomicilio de El Eneal y Pica de Neveri. Carriles 3, 4: Triatomo de domicilio de El Eneal y Pica de Neveri. Carriles 5, 6: Triatomo de peridomicilio de Jabillal y Las Panelas. Carril 7: Triatomo silvestre de Las Panelas. PM: escalera de 100 pb, HyperLadder™ IV (Bioline).



Tripanosomosis puede estar subestimado, sin embargo con la amplificación del k-DNA del parásito, utilizando ADN de las deyecciones de triatomos, se logró mejor aproximación de los índices reales de infección con *T. cruzi* (Brito *et al.*, 2001; Guevara *et al.*, 2005; Zalloum *et al.*, 2005). Los niveles de infección subestimados muestran limitado potencial de transmisión para *T. maculata*, hecho que podría no ser real en estos caseríos, principalmente cuando se les compara con los índices de infección obtenidos (5,8 a 20%) para *R. prolixus* (Benítez, 2006). A pesar de esto, el papel del *T. maculata* en la transmisión de la Tripanosomosis en Venezuela, es difícil de evaluar, debido a la escasa información sobre la especie, habiéndose reportado en la década del 70, índices de infestación entre 0,8% y 4,5% (Gamboa &

**Fig. 4.** Perfil de PCR-RFLP del gen Cyt-b de adultos de *T. maculata*, generado con la enzima AluI. PM: escalera de 200 pb, HyperLadder™ I (Bioline). Carriles: 1-5 triatomos de Portuguesa (1, 2 y 3.PD, 4 y 5 S). Carril 6-10: triatomos de Anzoátegui (6 y 7 S, 8 y 9.PD y 10 D). CN: Control negativo.



Pérez-Ríos, 1965; Tonn *et al.*, 1978). Posteriormente en el 2003, Alvarez *et al.*, (2003) reportaron que la infección de *T. maculata* con *T. cruzi* varió entre 0,78 % y 13,2 %, y datos más recientes dieron índices de infección de 0.36% para tres especies de vectores, incluido *T. maculata* (Rojas *et al.*, 2008). Ambos estudios fueron para los estados Lara y Yaracuy. Por otra parte, en algunas áreas rurales colombianas asociadas a la presencia de *T. maculata*, se registraron índices de infestación del 20% e infección de 58,3%, así como casos seropositivos en niños menores de 9 años (Cortes & Suárez, 2005). En nuestro trabajo, los triatomos presentaron índices de infección por ODM, de 15,3% y 40,2% y por PCR de 30,7 % y 47,2% para Portuguesa y Anzoátegui respectivamente, lo que podría involucrar a esta especie como un vector eficiente en la transmisión del parásito.

Aunque son escasos los estudios realizados en el estado Anzoátegui, se han registrado casos seropositivos para la enfermedad de Chagas con riesgo de transmisión activa (Añez *et al.*, 2003). Sin embargo la mayor infección vectorial observada podría atribuirse a la simpatría con *R. prolixus* y a la presencia de *Didelphis marsupialis* (principal reservorio de *T. cruzi*) en los ecotopos silvestres, los cuales, en algunos casos se encuentran a menos de 300 metros del peridomicilio, que aunado a la tala y quema de bosques de la zona, ha facilitado la migración y colonización de viviendas por



*T. maculata* (Morocoima *et al.*, 2005). Esta característica coincide con el caserío Pica de Neveri, debido a que en el mismo fueron encontradas ninfas intradomiciliares (6/50), aunque el hallazgo se observó en solo tres viviendas, esto se explicaría por la colonización peridomiciliar (principalmente gallineros) favorecida por la presencia de animales que actúan como fuente de alimento; e incluso por el desorden peridomiciliar que incrementaría su infestación en detrimento del domicilio, como ya lo afirmaron otros autores (de Andrade *et al.*, 1995). La menor infección hallada en los caseríos de Portuguesa, podría ser explicada por la mayor densidad de *R. prolixus*, que por ser vector primario tiene la capacidad de desplazar a los de menor importancia epidemiológica y mantenerlos en su biotopo original, donde su fuente principal de alimento son las aves, las cuales son refractarias al parásito.

Por otra parte, el PCR-RFLP es una prueba alternativa para la diferenciación entre poblaciones de vectores, la cual es importante para orientar el control y contribuir al señalamiento de tendencias de la transmisión natural. Los haplotipos diferentes en las dos poblaciones de *T. maculata* obtenido con la enzima *Alu* I, muestra la utilidad del gen citocromo b como marcador de polimorfismo intraespecífico y el perfil de restricción obtenido sugiere que las poblaciones naturales retienen algunos índices de variabilidad genética, probablemente como indicador de estructura poblacional en la distribución de haplotipos del gen amplificado. Es decir, que la variación observada en la longitud de los fragmentos de restricción con *Alu* I infiere en forma preliminar, la existencia de alelos diferentes para ambas poblaciones, afirmación basada también en otros resultados hallados en el análisis de secuencias del mismo gen (datos no publicados). Aun así, los autores consideran que se requiere profundizar el estudio con genes menos conservados. Por otro lado, cuando se consideran las poblaciones de una misma localidad, es difícil establecer afirmaciones concluyentes sobre el polimorfismo genético, debido al hallazgo de variaciones propias del individuo, afectado por factores ambientales o fuentes alimenticias, como parece observarse en un ejemplar adulto (Fig. 4, carril 7) proveniente de una palma silvestre que ha mostrado perfil distinto a otros insectos del mismo biotopo. Por otra parte, debido al reducido número de ejemplares utilizado por ecotopo ( $\pm 8$  ejemplares/ecotopo) en este tipo de análisis, no es posible concluir acerca de características genéticas específicas. Sin embargo, apoyados en otros resultados obtenidos con morfometría

geométrica, se sugiere la similaridad morfológica entre individuos de diferentes ecotopos correspondientes a una misma localidad (datos no mostrados).

De esta manera, aunque el polimorfismo se observó con una única enzima, el elevado índice de infección natural nos lleva a pensar en la ocurrencia de cambios en el comportamiento y la dinámica adaptativa de *T. maculata*, principalmente en Anzoátegui, lo que incrementaría su relación con la transmisión del parásito. Estos cambios son ayudados por las acciones antropogénicas (deforestación, caza) que impactan el hábitat natural y por ende su fuente de alimento, por lo cual los insectos son presionados a migrar y buscar microambientes similares a su hábitat natural, hecho que podría conducir a la domiciliación de los vectores (Wolff & Castillo, 2002). En el estado Anzoátegui, la proximidad de los biotopos silvestres a las viviendas favorecen el desplazamiento de los vectores y esto les permite establecerse exitosamente como nuevo eslabón de los focos domiciliarios (Noireau *et al.*, 1999). La movilidad de los insectos entre hábitats adyacentes nos lleva a pensar en la mayor facilidad de colonización vectorial, acorde a un estudio obtenido por Sánchez-Martin *et al.*, (2006), donde reportaron que las palmeras infestadas dentro de los 100 metros de la vivienda representa un factor de riesgo importante para la colonización domiciliar, aunado al elevado índice de infección natural que mantiene la infección humana en las comunidades.

Debido a ésto es importante la vigilancia epidemiológica para los vectores secundarios que buscan ocupar el espacio dejado por el vector domiciliario; con el fin de asegurar que estas especies no se conviertan en un severo problema de salud pública. Para ello es necesario, incrementar las medidas de control a través de la capacitación activa de la comunidad, así como disminuir la colonización triatomínica en áreas suburbanas, de manera que este control sea sostenible en el tiempo.

Por último, señalamos que el análisis del k-DNA puede representar un método sencillo y práctico para el diagnóstico durante el monitoreo epidemiológico de la enfermedad de Chagas.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado por los autores con el apoyo financiero del FONACIT a través del proyecto de

grupo G-2005000827. Agradecemos también la ayuda brindada por los técnicos David Chique y Marlene Rodríguez, a la dirección de Malariología, Acarigua, estado Portuguesa y finalmente a los habitantes de las localidades estudiadas por su cordial receptividad y colaboración.

***Trypanosoma cruzi* infection and cytochrome b polymorphism of mitochondrial dna in *Triatoma maculata* of Anzoátegui and Portuguesa states, Venezuela.**

**SUMMARY**

In order to understand more about the populational dynamics of *Triatoma maculata*, the genetic polymorphism and the infection indexes of *Trypanosoma cruzi* were analysed, using triatomine obtained from different ecotopes and geographical regions. The parasitic infection index of *T. maculata* was 29.8% using the microscope direct observation, and 40.3% by the polymerase chain reaction method. Both methods were important for epidemiological screening of the vectors with low potential of infection. The amplification of one region the Cyt B gene of these organisms, followed by a restriction fragments length polymorphism analysis, allowed us to establish different patterns of bands according to the geographic origin of each population, which indicates the lack of migration between individuals of Portuguesa and Anzoátegui states. These genetic differences may be associated with changes in adaptative events involved in the colonization of new habitats. The lack of polymorphism among vectors collected in different habitats of the same region showed an important genetic flow which has epidemiological implications in the risk of transmission of the disease, showing that the presence of *T. maculata* in houses cannot be ignored.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*, *Triatoma maculata*, RFLP-PCR, cytochrome b.

**REFERENCIAS**

- Alvarez C., Gil A., Bonfante R., Superlano Y., Aldana E. & Rodríguez-Bonfante C. (2003). *Movimiento de los Vectores de la Enfermedad de Chagas en municipios de Lara y Yaracuy*. Documento en Línea: <http://www.ucla.edu.ve/dmedicin/postgrado/CCT-UCLA.htm> (Consultado: 2009, Mayo 21).
- Añez N., Crisante G., Rojas A., Díaz N., Añez-Rojas N., Carrasco H., *et al.* (2003). La cara oculta de la enfermedad de Chagas en Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **43**: 45-57.
- Benítez J. (2004). *Aspectos Básicos de la Enfermedad de Chagas*. Manual del Educador. Dirección de Salud Ambiental. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Maracay, Venezuela.
- Benítez J. (2006). *Programa Nacional de Control de Chagas*. Informe Situación 2006. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Caracas, Venezuela.
- Brener Z. (1962). Therapeutic activity and criterion of cure of mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* **4**: 389-396.
- Brito C., Silveira C., Cardoso M., Marques P., Luqueti A., Macedo V., *et al.* (2001). Parasite Persistence in treated Chagasic patients revealed by Xenodiagnosis and Polimerase Chain Reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **96**: 823-6
- Carcavallo R., Jurberg J., Lent H., Noireau F. & Galvao C. (2000). Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomol. Vect.* **7**: 1-99.
- Cortés L. & Suárez H. (2005). Triatominos (Reduviidae: Triatominae) en un foco de enfermedad de Chagas en Talaigua Nuevo (Bolívar, Colombia). *Biomédica.* **25**: 568-74
- Costa J. & Felix M. (2007). *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **102**: 87-90.
- de Andrade A., Zicker F., de Oliveira R., Da Silva I., Silva S., Sgambatti S., *et al.* (1995). Evaluation of risk factors for house infestation by *Triatoma infestans* in Brazil. *A. J. Trop. Med. Hyg.* **53**: 443-447.
- Feliciangeli M. D., Campbell-Lendrum D., Martinez C., Gonzalez D., Coleman P. & Davies C. (2003). Chagas disease control in Venezuela: Lessons for

- the Andean region and beyond. *Trends Parasitol.* **19**: 44-49.
- Galvão C., Carcavallo R., Rocha D. & Jurberg J. (2003). A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa.* **202**: 1-36.
- Gamboa J. (1962). Dispersión de *Rhodnius prolixus* en Venezuela. *Bol. Inf. Dir. Malariol. San. Amb.* **3**: 262-272.
- Gamboa J. & Pérez Ríos L. (1965). El "rancho" venezolano: Su Influencia en la Prevalencia Triatomina Doméstica. *Bol. Inf. Dir. Mal. San. Amb.* **5**: 129-140.
- García A., Carrasco H., Schofield C., Stothard J., Frame I., Valente S., *et al.* (1998). Random Amplification of Polymorphic DNA as a Tool for Taxonomic Studies of Triatomine Bugs (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* **35**: 38-45.
- Guevara A., Garzon E., Bowen C., Cordova X., Gomez E. & Ouassi E. (2005). High infection rates of *Triatoma dimidiata* are associated with low level of *T. cruzi* seroprevalence in Pedro Carvo, Ecuador. Use of a tc24 gene- based PCR approach. *Parasite.* **12**: 65-68.
- Lent H. & Wygodzinsky P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull. Am. Mus Nat. Hist.* **163**: 123-520.
- Luitgards-Moura J., Borges-Pereira J., Costa J., Zauza P. & Rosa-Freitas M. (2005). On the possibility of autochthonous Chagas disease in Roraima, Amazon region, Brazil, 2000-2001. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **4**: 45-54.
- Miller S., Dykes D. & Polesky H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids. Res.* **16**: 1215-1217.
- Monteiro F., Wesson D., Dotson E., Schofield C. & Beard B. (2000). Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **62**: 460-465.
- Morocoima A., Sotillo E., Salaverría C., Maniscalchi M., Pacheco F. & Chique D. (2005). Domiciliación del vector peridomiciliario de la enfermedad de Chagas, *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) en caserío rural del norte del estado Anzoátegui. *Acta Cient. Venezolana.* **55** (Suppl. 1): 215.
- Noireau F., Zegarra M., Ordoñez Y., Gutierrez T. & Dujardin J. P. (1999). Genetic Structure of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) Domestic Populations from Bolivia: Application on Control Interventions. *Mem. Inst. Osw. Cruz.* **94**: 347-351.
- Pifano F. (1969). *Algunos aspectos en la ecología y epidemiología de las enfermedades endémicas con focos naturales en el área tropical, especialmente en Venezuela.* Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. Ed. Caracas. Venezuela.
- Pifano F. (1973). La epidemiología de la enfermedad de Chagas en Venezuela. *Arch. Venez. Med. Trop. Parasitol. Med.* **5**: 171-84.
- Rojas M., Várquez P., Villarreal M., Velandia C., Vergara L., Moran Borges L., *et al.* (2008). An entomological and seroepidemiological study of Chagas disease in an area in central-western Venezuela infested with *Triatoma maculata* (Erichson, 1848). *Cad. Saúde Pública.* **24**: 2323-2333.
- Sánchez- Martin M., Feliciangeli M. D. & Campbell D., Davis C. (2006) Could the Chagas disease elimination program in Venezuela be compromised by reinvasion of houses of houses by sylvatic *Rhodnius prolixus* bug populations?. *Trop. Med. Int. Health.* **11**: 1585-1593.
- Spiegel M. & Stephens L. (2001). *Estadística.* 2da. Edición. Ed. McGraw Hill Interamericana. Ciudad de México. México.
- Sturm N., Degraeve W. & Morel C. & Simpson L. (1989). Sensitive Detection and Schizodeme



- classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* **3**: 205-214.
- Tonn R., Otero M., Mora E., Espinola H. & Carcavallo R. (1978). Aspectos biológicos, ecológicos y distribución geográfica de *Triatoma maculata* (Erichson 1848), (Hemiptera, Reduviidae), en Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **18**: 16-24.
- Torrealba J., Tonn R. & Carcavallo R. (1985). Parásitos, Reservorios, Control, Situación Regional. p 465-72. En: *Factores Biológicos y Ecológicos en la Enfermedad de Chagas*, Carcavallo R., Rabinovich J., Tonn R. (eds), Tomo II. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. OMS, Ministerio de Salud y Acción Social. Buenos Aires, Argentina.
- Wolff M. & Castillo D. (2002). Domiciliation trend of *Panstrongylus rufotuberculatus* in Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **97**: 297-300.
- Zalloum L., Gomez M., Kinoshita A., Toledo M., Priori A. & De Araujo S. (2005). *Trypanosoma cruzi*. Two genetic group in Parana state, Southern Brazil. *Exp Parasitology.* **111**: 55-58.

Recibido el 01/09/2009  
Aceptado el 21/02/2010

