

Primer registro de triatóminos naturalmente infectados por *Trypanosoma cruzi* en el estado Bolívar, Venezuela

First record of naturally infected triatomines with Trypanosoma cruzi, Bolivar state, Venezuela

Oscar Noya-Alarcón^{1-2*}, Carlos Botto¹⁻², Belkisyolé Alarcón de Noya³⁻⁴, Elizabeth Ferrer⁵, Mercedes Vietri⁵ & Leidi Herrera⁷

RESUMEN

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana está adquiriendo cada vez mayor importancia en la región amazónica de Venezuela, en la cual hasta ahora se carecía de información de la presencia de *Trypanosoma cruzi* en triatóminos, reservorios y humanos, particularmente para el estado Bolívar, el estado de mayor superficie del país, situado al sur del río Orinoco. Cuatro ejemplares de *Triatoma maculata* fueron recolectados en el peridomicilio de la comunidad de Maniapure, en el municipio Cedeño. En dos de los ejemplares se determinó la infección natural por *Trypanosoma cruzi* al examen al fresco de heces con presencia de tripomastigotos metacíclicos infectantes. Los parásitos fueron inoculados en modelos murinos y aislados en cultivos para su caracterización molecular. Se confirmó el diagnóstico de este parásito por pruebas parasitológicas y moleculares, caracterizándose los aislados como TcI. La importancia de estos hallazgos pioneros podría motivar el estudio de la transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas en este estado catalogado como no endémico.

Palabras clave: *Triatoma maculata*, *Trypanosoma cruzi*, Bolívar, Amazonía, Enfermedad de Chagas, Venezuela.

Los insectos del Orden Hemiptera, Familia Reduviidae, subfamilia Triatominae considerados hematófagos estrictos, actúan como vectores de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) agente etiológico de la Tripanosomiasis Americana ó Enfermedad de Chagas (Barreto, 1979. Epidemiología. En: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Eds. Brener *et al.* 2ª Ed:

SUMMARY

American Trypanosomiasis or Chagas disease is becoming increasingly important in the Amazon region of Venezuela, in which up to now information was lacking of the presence of *Trypanosoma cruzi* in triatomines, reservoirs and humans, particularly for Bolivar State, the State with the largest territory of the country, located in the South of the Orinoco River. Four specimens of *Triatoma maculata* were collected in the peri-domiciliar area of the community of Maniapure, in the Cedeño municipality. Two of these individuals were found naturally infected with *Trypanosoma cruzi* upon examination of fresh stool with presence of metacyclic trypomastigotes. Parasites were inoculated in murine models and isolated for molecular characterization. Parasite isolates were molecularly characterized as TcI. The importance of these pioneering findings should motivate the study of the vector or oral transmission of Chagas disease in this non endemic State of Venezuela.

Key words: *Triatoma maculata*, *Trypanosoma cruzi*, Bolivar State, Amazon, Chagas Disease, Venezuela.

89-115. Publicaciones Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro, Brasil). En la actualidad se reportan más de 140 especies reconocidas de triatóminos, siendo las regiones tropicales y subtropicales de Sur América las de mayor diversidad. En Venezuela se han reportado 22 especies de triatóminos, de las cuales se han descrito siete para el estado Bolívar, a saber: *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811), *Triatoma*

¹ Unidad de Ecoepidemiología, Centro Amazónico de Investigación y Control de Enfermedades Tropicales “Simón Bolívar”.

² Sección de Ecología Parasitaria, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela.

³ Sección de Inmunología, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela.

⁴ Cátedra de Parasitología de la Escuela de Medicina “Luis Razetti”, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

⁵ Sección de Parasitología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco J. Triana Alonso” (BIOMED-UC), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo.

⁶ Laboratorio de Biología de *Trypanosoma* de mamíferos, Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Universidad Central de Venezuela.

*Autor de correspondencia: ozonoya6@yahoo.com

dimidiata (Latreille 1811), *Rhodnius robustus* (Larrousse, 1927), *Triatoma maculata* (Ericsson, 1848), *Rhodnius prolixus* (Stål, 1859), *Rhodnius pictipes* (Stål, 1872) y *Triatoma nigromaculata* (Stål 1872). Todos ellos sin registro de infección por *T. cruzi* (Carcavallo *et al.*, 1977. *Bol. Inf. Dir. Mal. San. Amb.* **17**: 53-65; Feliciangeli *et al.*, 2004. *Bol. Mal. Salud Ambient.* **44**: 67-75; Soto-Vivas, 2009. *Bol. Mal. Salud. Amb.* **49**: 259-274).

En el estado Bolívar, entidad catalogada como no endémica para la Tripanosomiasis Americana (Aché, 1993. *Bol. Dir. Malarial. San. Amb.* **33**: 11-22), se han reportado sin precisión del lugar de captura, la presencia de cuatro *R. robustus* colectados en “palmera indeterminada” y examinados para búsqueda de tripanosomatideos, encontrándose uno de los ejemplares positivo a *T. rangeli* y dos con flagelados no identificados. En la bibliografía no se registra la existencia de triatóminos infectados con *T. cruzi* para el estado Bolívar (Tonn *et al.*, 1976. *Bol. Dir. Mal. San. Amb.* **16**: 158-162; Feliciangeli *et al.*, 2004. *Op. cit.*), por lo que el trabajo se centró en la búsqueda de triatóminos en tres comunidades de este estado. Se discuten las características e implicaciones del hallazgo.

La región de estudio en el estado Bolívar reúne a caseríos que se encuentran en la subcuenca baja del río de aguas claras Maniapure, tributario del río Chaviripa el cual es afluente del Orinoco medio. El paisaje está compuesto por sabanas de galerías, con filas montañosas de unos 500 msnm que representan las estribaciones de las serranías aledañas. Esta región está caracterizada por sabanas abiertas, bosques de galería, bosques caducifolios y matorrales. Su clima es macrotérmico tropófilo por presentar una temperatura media anual de 27°C y una precipitación media anual de 1000-2000 mm. Geológicamente Maniapure, Colorado y La Emilia (6° 55'40" N, 66°33'40,72" W, Altitud 65 msnm; 6° 49'35,82" N, 66°33'36,98" W, Altitud 73 msnm y 7° 1' 2,36" N, 66° 31' 43,81 W, Altitud: 59 msnm, respectivamente), son comunidades asentadas sobre rocas graníticas tipo Parguaza.

Se realizó búsqueda de triatóminos en tres comunidades del municipio Cedeño, Parroquia La Urbana, estado Bolívar, a saber: La Emilia, Maniapure y la comunidad indígena Panare de Colorado (Fig. 1). En cada punto de muestreo se describió el paisaje y

se tomaron datos de temperatura (°C), altitud (msnm) y coordenadas UTM (Sistema de Coordenadas Universal Transversal de Mercator) con un dispositivo receptor portátil de sistema de posicionamiento global o Global Positional System (GPS), marca Garmin®.

1.- Búsqueda activa de triatóminos

1.1- Por procura directa: se llevó a cabo la búsqueda de ninfas y adultos en domicilios y peridomicilios (a 100 m de la vivienda) siguiendo protocolos de procedimiento seguro, tales como uso de guantes, pinzas y cajas de recolección de insectos, para evitar el contacto manual. Estas búsquedas se realizaron con un esfuerzo de 2 horas/hombre/vivienda sobre 2 casas de las comunidades criollas (La Emilia y Maniapure) y en 4 viviendas (*pereka*) uni o multifamiliares de los Panare, todas confeccionadas con techos de palma y paredes de barro.

1.2.- Disección de palmeras: se realizó la disección parcial de áreas foliares e interfoliares y cogollos según protocolos de procedimiento seguro de 3 ejemplares vegetales en el peridomicilio. En Maniapure y Colorado: *Maximiliana* sp, y en la comunidad de La Emilia: *Mauritia* sp., con un esfuerzo de 6 horas/hombre/palma (Añez *et al.*, 2003. *Bol. Malarial. Salud Amb.* **43**: 45-57; Carcavallo *et al.*, 1999. Geographical distribution and alti-latitudinal dispersion. En: *Atlas of Chagas' Disease Vectors in the Americas*. Eds. Carcavallo *et al.* Vol. III: 747-792. Fiocruz Editorial, Rio de Janeiro, Brasil; Morocoima *et al.*, 2010. *J. Vector Borne Dis.* **47**: 76-84).

1.3.- Trampa de luz: se buscaron triatóminos mediante el uso de una trampa de luz de fabricación casera, con lienzo blanco de 2 m² sujeto a superficies fijas, y fuente de luz blanca incandescente como atractivo a insectos fotofílicos por un periodo de 12 horas nocturnas en cada comunidad para seguir la posada sobre la sábana de ejemplares morfológicamente compatibles con triatóminos (Barreto, 1979. *Op. cit.*).

2.- Recolección pasiva

2.1 Participación comunitaria: Los triatóminos fueron recolectados y colocados en cajas de fósforos por habitantes de las comunidades en estudio, previamente instruidos en la técnica de colecta segura, según protocolo modificado (Reyes-

Fig. 1. Mapa geopolítico del estado Bolívar, Venezuela, con la ubicación geográfica de las comunidades del estudio. Se destaca la comunidad de Maniapure donde se recolectaron dos ejemplares de *T. maculata* infectados con *T. cruzi*.

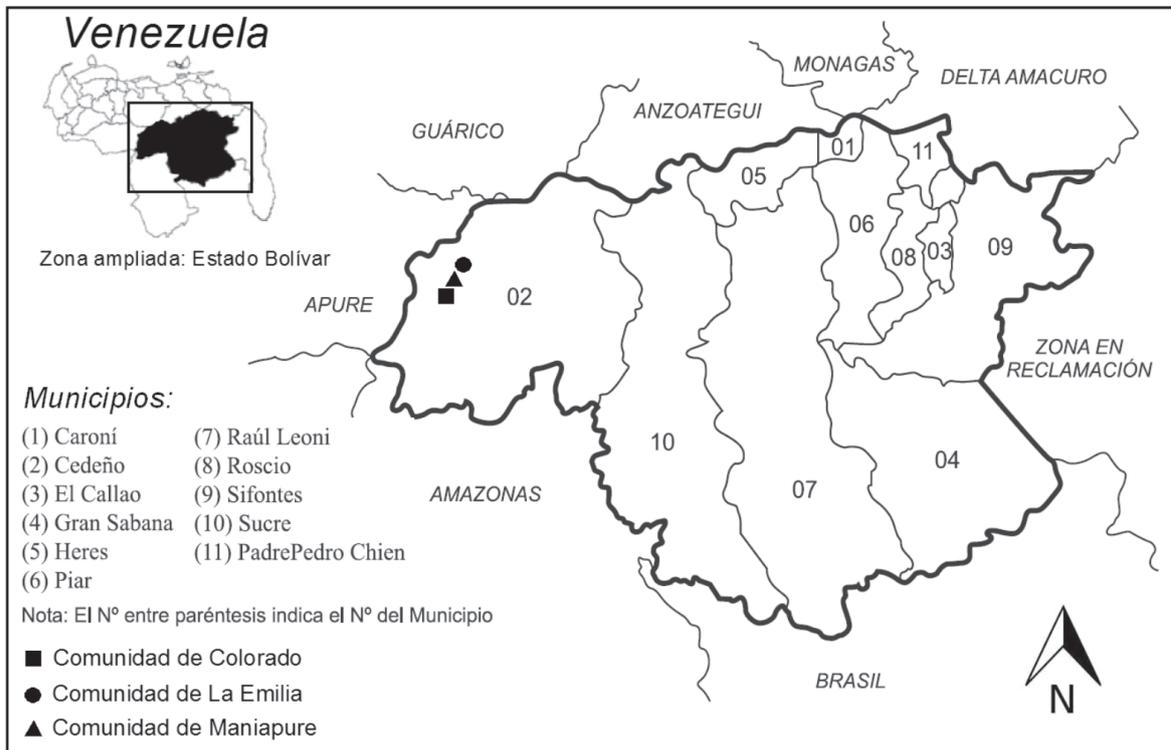
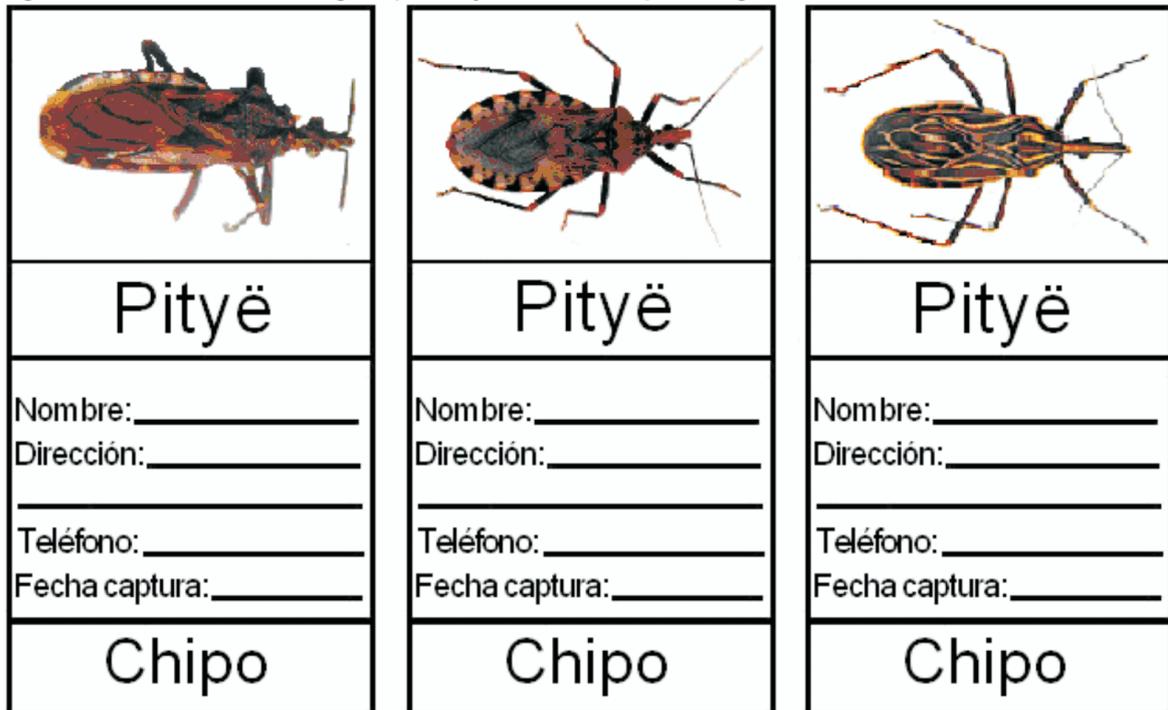


Fig. 2. Diseños de rótulos bilingües para cajas de fósforos para resguardo de los triatóminos recolectados.



Lugo, 2009. *Rev. Biomed.* **20**: 180-205). Cada caja fue identificada en la cara posterior con los datos del recolector, fecha y lugar del hallazgo y en la cara anterior se colocó una imagen de *P. geniculatus*, *T. maculata* o de *R. prolixus*, adulto, a color, de dimensiones reales, acompañada de la palabra “chipo” en castellano y en lengua Panare “pityë” -pityë kai'në según diccionario Panare-Español: especie nocturna cuya picadura produce hinchazón en la piel; chupa la sangre, a lo mejor un tipo de chinche”- (Mattei, 1994. Diccionario Ilustrado Panare-Español. Caracas, Venezuela) (Fig. 2).

Los triatóminos recolectados fueron sexados e identificados morfológicamente usando claves taxonómicas y pictográficas (Lent & Wygodzinsky, 1979. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* **163**: 123-520; Soto-Vivas, 2009. *Op. cit.*). A cada ejemplar se le hizo la disección del tubo digestivo en solución salina isotónica (0,85%) a fin de obtener el contenido intestinal el cual fue examinado al microscopio de luz (400X), para búsqueda de flagelados.

El contenido intestinal positivo fue dividido en dos partes, una de ellas destinada a la inoculación intra-peritoneal de 200 metacíclicos/gr (peso animal) en lotes de ratones NMRI machos, mantenidos ad libitum en el Laboratorio de Biología de Trypanosoma de Mamíferos del Instituto de Zoología y Ecología Tropical de la UCV. La otra alícuota se dispuso para la búsqueda de ADN de *T. cruzi*. El contenido intestinal negativo fue destinado exclusivamente a la búsqueda de ADN (Herrera *et al.*, 2004. *Exp. Parasitol.* **107**: 78-88).

Para la extracción de ADN se siguió el protocolo de purificación con resina Chelex®100 (Bio-Rad) y posteriormente, se realizó la detección de ADN de cinetoplasto (ADNk) y de ADN satélite (ADNsat) de *T. cruzi* por la técnica de amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Moser *et al.*, 1989. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 1477; Wincker *et al.*, 1994. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**: 771-777; Ferrer *et al.*, 2008, Memorias del VI Congreso de Investigación en la Universidad de Carabobo Valencia, Edo. Carabobo Venezuela. 2008, I: 532-536).

La cinética de infección en el modelo murino fue seguida en forma interdiaria durante 45

días (Brenner, 1979. *O parasito. Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Eds. Brenner *et al.* 2ª Ed: 89-115. Publicaciones Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro, Brasil). A los ratones con alta parasitemia en la fase aguda de infección, se les hizo xenodiagnóstico con 8 a 12 ninfas emaciadas de III-IV estadios de *R. prolixus* sanos, aislado “Tres Matas” con cinco años de cría y mantenidas a temperatura constante de 28°C en el insectario del Laboratorio de Biología de Trypanosoma de mamíferos del IZET, según protocolos (Perlowagora-Szumlewicz & Moreira, 1994. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **89**: 603-18; Gómez-Núñez & Fernández, 1963. *Bol. Infor. Dir. Malariaiol. San. Amb.* **3**: 134-7). Todo ello fue conducido para la recuperación de los parásitos circulantes y posterior búsqueda de metacíclicos en heces de estos triatóminos, como prueba parasitológica de la existencia de *T. cruzi* (Barreto, 1979. *Op. cit.*). Los aislados fueron obtenidos por extracción de sangre por cardiopuntura sobre el animal de más alta parasitemia y mantenidos en cultivos axénicos agar-sangre con solución fisiológica estéril al 0,9% y gentamicina (100µg/mL) y repicados en medio RPMI (2:1, Gibco Life Technologies) por un máximo de 5 repiques para su posterior caracterización molecular.

La caracterización molecular de los aislados de *T. cruzi* obtenidos de los triatóminos infectados, fue realizada por PCR según protocolos ya descritos para la amplificación de la región intergénica del espaciador no transcrito del gen miniexón, detección de la fracción 24S α del ADN ribosomal y para la amplificación de la fracción 18S del gen ribosomal (Souto, 1996. *Mol. Biochem. Parasitol.* **83**: 141-52; Brisse, 2000. *Int. J. Parasitol.* **30**: 35-44; Ferrer *et al.*, 2008. *Op. cit.*).

A continuación se describen y discuten los resultados obtenidos:

La disección parcial de las palmeras, así como la colocación de trampas de luz y la búsqueda de triatóminos en los techos de palma de *pereka* Panare y de viviendas de criollos, no revelaron la presencia de triatóminos.

Con participación comunitaria, se recolectaron en cajas de fósforos cuatro triatóminos adultos (codificados desde el B-01 a B-04), y fueron identificados como *T. maculata*. Dos de estos ejemplares resultaron infectados con *T. cruzi* y en

ambos casos se pudo aislar la cepa y caracterizarla molecularmente.

Los triatóminos adultos codificados como B-01 (hembra), B-02 (hembra) y B-03 (macho), fueron recolectados sobre una pared cercana a una luz blanca en horas de la noche (entre 7pm y 10pm) en el peridomicilio de una vivienda de Maniapure. El triatómino codificado B-04 (hembra), fue recolectado a las 9:30 p.m. en presencia de luz artificial, sobre las paredes de un baño que está separado a 20 m de una vivienda en el sector Las Piedras en Maniapure.

La disección y extracción del contenido intestinal evidenció la presencia de tripomastigotos metacíclicos (triatóminos B-01 y B-03), compatibles con *T. cruzi* (Hoare, 1972. *The Trypanosomes of Mammals*. A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publication, Oxford, Reino Unido). Los triatóminos B-02 y B-04 se mostraron negativos tanto al examen al fresco como en las pruebas moleculares.

Los metacíclicos fecales obtenidos inoculados en el modelo murino lograron la infección sistémica con la presencia de tripomastigotos sanguícolas. Los parásitos fueron recuperados en xenodiagnóstico y observados en las heces de los triatóminos con potencial infectivo, confirmándose parasitológicamente la especie.

La caracterización molecular de estos aislados permitió identificar los aislados B-01 y B-03 como TcI, evidenciándose la presencia de las bandas diagnósticas de 350, 110 y 175 nucleótidos respectivamente.

A pesar de que ya ha sido descrito *T. maculata* en el municipio Cedeño, estado Bolívar (Felicangeli et al., 2004. *Op. cit.*), los hallazgos de este estudio demostraron infección natural por *T. cruzi* para este triatómino en la entidad, determinándose también la circulación del linaje TcI en dos de las muestras en estudio, lo cual constituye un aporte al mapa de circulación de los genotipos de *T. cruzi* para la región amazónica y para Venezuela.

El linaje TcI es uno de los linajes que se presentan en mayor frecuencia en áreas endémicas de Venezuela en humanos y en insectos vectores, por lo que está siendo imputado como el principal causante de la Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de

Chagas en el país (Añez & Crisante, 2004. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **99**: 781-7; Carrasco et al., 2005. *Int. J. Parasitol.* **35**: 1379-84).

En el área de estudio la participación comunitaria demostró ser la estrategia más efectiva para detectar la presencia de triatóminos frente a la disección de palmeras, trampas de luz o búsqueda activa, sin embargo el bajo número de ejemplares colectados podría indicar poca domiciliación. Algunos autores han planteado que en las viviendas indígenas de la región, el humo al momento de cocinar dentro de la vivienda tiene un efecto repelente sobre los triatóminos (Gamboa, 1965. *Arch. Venez. Med. Trop. Parasitol Med.* **5**: 299-304; Osuna, 1984. *Bol. Mal. Salud Amb.* **24**: 1-4), disminuyendo así la posibilidad del encuentro triatómino-humano, y en consecuencia la probabilidad de transmisión vectorial sobre las poblaciones indígenas.

La gran mayoría de los casos descritos de humanos infectados con *T. cruzi* en regiones como la Amazonía brasilera han sido en población no indígena, especialmente, en población rural criolla del estado de Pará, Brasil (Souza & Valente, 1992. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **25**: 29-30). Algunas investigaciones en las tierras bajas amazónicas colombianas fronterizas con Venezuela, confirman la existencia de población indígena infectada (Guhl & Schofield, 2004. *International Workshop on Chagas Disease surveillance in the Amazon Region*. Bogotá, Colombia). La escasa referencia que hace la población en estudio a ser picados por triatóminos, podría ser una de las razones a investigar en relación a los escasos registros de casos en indígenas infectados con *T. cruzi* en la Amazonía venezolana (Briceño-León, 2005. *Una perspectiva sociológica de la enfermedad de Chagas en la Amazonia*. II Reunión de la Iniciativa Intergubernamental de Vigilancia y Prevención de la Enfermedad de Chagas en la Amazonia. Cayena. Guayana Francesa). Sin embargo, el uso de vocablos relacionados a insectos hematófagos, el reconocimiento de los triatóminos en los muestrarios y los relatos de los pobladores de distintas regiones y de la etnia Panare en el estado Bolívar-Venezuela, son indicadores antropológicos del conocimiento ancestral de presencia de triatóminos y del encuentro de estos con el hombre.

En Amazonas y Bolívar hasta ahora, no existen registros de población humana infectada

con *T. cruzi*. Sin embargo, la presencia de ADN del parásito en un triatómino de Parima B municipio Alto Orinoco, y la presencia de varias especies de triatóminos descritas en estos estados de la región amazónica con comprobación parasitológica, hacen pensar en la circulación del parásito entre insectos vectores, reservorios y posiblemente población humana (Noya-Alarcón *et al.*, 2011. *Bol. Dir. Mal. San. Amb.* **51**: 81-85; Feliciangeli *et al.*, 2004. *Op. cit.*), por lo que es necesario una mayor investigación en esta región en la cual la parasitosis pudiera pasar de una enzootia a una zoonosis eventual.

Consideraciones Éticas

Este trabajo obtuvo el aval del Comité Ético Científico del Instituto de Medicina Tropical (Oficio 015/2010) y se rigió por los lineamientos del Comité de Bioética del FONACIT quienes aprobaron los aspectos éticos del Proyecto Misión Ciencia en red No 2008000911.

CONFLICTO DE INTERESES

Los Autores declaramos que no han habido entre nosotros conflictos de intereses durante el desarrollo del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Al personal de la Fundación Proyecto Maniapure y del Ambulatorio de la Milagrosa de Maniapure, a los médicos Gerso Chacón, Daniel Peña y Luís Hernández por su participación en la recolección de triatóminos, a las técnicas Isabel Medina y Marlene Rodríguez, a la Dirección del Distrito Sanitario N° V del estado Bolívar y a los pobladores de las comunidades de La Emilia, Maniapure y Colorado.

Este trabajo recibió financiamiento de FONACIT/MPPS para el Proyecto Misión Ciencia 2008000911, a través de sus componentes Sub-proyecto 2008000911-6, Enfermedad de Chagas y Sub-proyecto 2008000911-5, Oncocercosis.

Recibido el 19/09/2011
Aceptado el 05/02/2012