

Nota Científica

Supervivencia de formas de cultivo de *Trypanosoma cruzi* en alimentos experimentalmente contaminados

Néstor Añez* & Gladys Crisante

Se registra la supervivencia de formas de cultivo de *Trypanosoma cruzi* en alimentos experimentalmente contaminados. En 8 de 11 (73%) muestras de frutas y hortalizas utilizadas en los experimentos los parásitos permanecieron vivos por períodos entre 6 y 72 horas. Se estima que el mayor número de parásitos vivos está entre las 6 y las 18 horas post-contaminación. Se discute las implicaciones epidemiológicas potenciales de estos hallazgos.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, Contaminación, alimento, Supervivencia.

Además de las muy conocidas formas de transmisión de *Trypanosoma cruzi* al hombre, incluyendo las vías vectorial, transfusional, congénita y por lactancia, otras vías pueden ser responsables por la aparición de nuevos casos de enfermedad de Chagas. Entre éstas, la vía de transmisión oral de *T. cruzi* pareciera un mecanismo que merece atención. La contaminación de alimentos por deyecciones de triatomíneos vectores o por fluidos (sangre, linfa, leche) provenientes de reservorios de *T. cruzi*, pareciera factor importante en la transmisión oral de la infección chagásica (Camandaroba *et al.*, 2002, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **44**: 97-103). Al respecto son varios los episodios epidemiológicos atribuidos a infecciones por *T. cruzi*, registrados en Latinoamérica durante los últimos 40 años (Neves da Silva *et al.*, 1968, *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **10**: 265-276; Crescente *et al.*, 1992, *Rev Soc Bras Med Trop*, **25**(Supl. 1): 29). Recientemente, en Venezuela se registró un brote de

infección chagásica en una localidad del distrito capital (Municipio Chacao, Estado Miranda), incluyendo a niños escolares, probablemente por ingestión de alimentos contaminados por *T. cruzi* (MPPSalud, 2007, Dirección General de Epidemiología, Dirección de Vigilancia Epidemiológica, 1ª Edición). Tomando en consideración lo anterior, nuestro grupo de investigación ha venido llevando a cabo experimentos en esta línea. En la presente experiencia preliminar se indaga sobre el tiempo de supervivencia de formas de cultivo de *T. cruzi* utilizadas para contaminar experimentalmente algunas muestras de frutas y hortalizas, comúnmente consumidas en Venezuela. Los resultados de estas observaciones servirán de base a futuras experiencias utilizando modelos con formas infectivas de *T. cruzi* para precisar su supervivencia en alimentos contaminados y su capacidad infectiva luego de ingeridos por el hospedador mamífero, hechos de potencial importancia epidemiológica para la comprensión de la enfermedad de Chagas en el país.

Los experimentos fueron realizados utilizando cultivos de *T. cruzi* (aislado MHOM/Ve/92/YBM-92) mantenidos en el laboratorio, los cuales fueron centri-

Investigaciones Parasitológicas "J. F. Torrealba", Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, 5101, Venezuela.

*Autor de Correspondencia: nanés@ula.ve

fugados a 3000g por 5 min, concentrados y resuspendidos en PBS hasta un volumen final de 2 ml, dejándose a temperatura ambiente (22°C) hasta su uso. Antes de su utilización la concentración total de parásitos fue estimada en 20x10⁶ flagelados /mL.

Frutas y hortalizas procedentes del mercado principal de Mérida, incluyendo cambur (*Musa sp AAA*), durazno (*Drunus persicae*), piña (*Ananas sativus*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), lechoza (*Carica papaya*), manzana (*Malus sylvestris*), papa (*Solanum tuberosum*), zanahoria (*Daucus carota*), apio (*Arracacia xanthorrhiza*), tomate (*Lycopersicum esculentum*) y plátano (*Musa sp AAB*), fueron incluidas en los experimentos. Las muestras de papa, zanahoria, apio y plátano, fueron previamente cocidas antes de utilizarse, siguiendo la forma normalmente utilizada en nuestros campos. Asimismo, las frutas fueron lavadas, peladas y cortadas en trozos. Además, muestras de tomate, durazno y cambur, fueron trituradas suficientemente en mortero hasta obtener un fluido similar al

jugo expendido comercialmente. Todas las muestras fueron cortadas en trozos pequeños de 0.5 cm x 0.5 cm y colocadas individualmente en pozos de cubetas plásticas esterilizadas (multiwell) como las utilizadas para la realización del formato ELISA. Las mismas fueron colocadas con un pozo de separación con dos replicaciones por muestra. Otro grupo de muestras fue cortado en trozos de 3-4 cm x 3-5 cm y colocados en placa de Petri de vidrio, previamente esterilizadas. Las muestras de jugos fueron colocadas en viales plásticos esterilizados antes de su uso. La contaminación de cada una de las muestras indicadas con formas flageladas de *T. cruzi* fue llevada a cabo, bajo condiciones de esterilidad en campana de seguridad, depositando en cada una de ellas 30 µL de cultivo, el cual contenía aproximadamente 6 x10⁵ parásitos. Las placas multiwell y las de Petri fueron colocadas en estufa a 26°C y los viales conteniendo los jugos contaminados fueron dejados a temperatura ambiente (22°C). Detalles sobre las muestras contaminadas y su forma de mantenimiento se muestran en la Fig. 1.

Fig. 1. Muestras de alimentos experimentalmente contaminados con formas de cultivo de *Trypanosoma cruzi*.



Observaciones sobre las muestras fueron registradas a las 6, 18, 24, 48, 72, 96 y 120 horas post contaminación. Las mismas consistieron en tomar una alícuota colocándola sobre una lámina portaobjetos para ser observada en microscopio Axioscop (Zeiss) con contraste de fase a 400x. La presencia de parásitos en cada muestra fue registrada de acuerdo a su abundancia como escasa (+:1-5 flagelados/campo), moderada (++:6-12 flagelados/campo) o abundante (+++:>15 flagelados/campo). Los mismos fueron registrados en video-cámara digital (Noticam 480) adaptada al axioscop y conectada a computador personal (HP) con programa Motic Images 2000 version 1.3. Similarmente, fue registrada la contaminación por bacterias o levaduras en cada caso. Los resultados obtenidos en observaciones realizadas entre las 6 y 120 horas después de la contaminación experimental con formas de cultivo de *T. cruzi* en diferentes alimentos, se detallan en la Tabla I.

El análisis de los resultados reveló que 8 (73%) de las 11 muestras de alimentos contaminados

utilizados en estos experimentos, mantuvieron parásitos en abundancia variable durante el período de observación. En 1(9%) de ellos, la piña, no se observó supervivencia de parásitos a ningún tiempo de observación. Por el contrario, se detectó una alta concentración de levaduras, lo cual coincidió con un pH cercano a 3 en todo momento. Asimismo, en la muestra de durazno (1/11; 9%) sólo se detectaron parásitos muertos durante todo el período de observación. Como puede apreciarse en la tabla, el rango de supervivencia de *T. cruzi* en los alimentos contaminados varió entre 6 y 72 horas, siendo la muestra de cambur la que ofreció mayor tiempo de supervivencia, la cual se extendió hasta las 72 horas manteniendo una moderada cantidad de parásitos vivos. La comparación de la supervivencia reflejada en el tiempo reveló que el mayor número de parásitos vivos contaminando los alimentos se apreció entre las 6 y las 18 horas de ocurrida la contaminación. Luego de este tiempo, los alimentos fueron colonizados por bacterias y/o levaduras, induciéndose un proceso de fermentación que fue diezmando la población parasitaria hasta su agotamiento total.

Tabla I. Supervivencia de formas de cultivo *Trypanosoma cruzi* en alimentos experimentalmente contaminados.

Muestra de alimento	Presentación y Mantenimiento de la muestra	Temperatura de mantenimiento (°C)	Presencia de parásitos a diferente tiempo de observación (horas)						
			6	18	24	48	72	96	120
Cambur	P.P * (trozo)	26	+++	+++	++	++	++	PMC	-
	M.W**(trozo)	26	+++	+++	NO	PMC	ELI	ELI	ELI
	Vial (jugo)	22	+++	+++	NO	PMC	ELI	ELI	ELI
Tomate	P.P * (trozo)	26	+++	+++	NO	PMC	ELI	ELI	ELI
	M.W**(trozo)	26	+++	+++	NO	PMC	ELI	ELI	ELI
	Vial (jugo)	22	+	PMC	NO	PMC	ELI	ELI	ELI
Durazno	P.P * (trozo)	26	NO	PM	NO	PM	ELI	ELI	ELI
	M.W**(trozo)	26	NO	PM	NO	PM	ELI	ELI	ELI
	Vial (jugo)	22	NO	PM	NO	PMC	ELI	ELI	ELI
Papa	P.P (trozo)	26	+++	+++	++	+++	PM	-	-
Manzana	P.P (trozo)	26	+++	++	++	-	-	-	-
Lechoza	P.P (trozo)	26	+++	+++	NO	PMC	PMC	-	-
Apio	P.P (trozo)	26	+++	+++	++	++	PM	PMC	-
Piña	P.P (trozo)	26	-	-	NO	ELI	ELI	ELI	ELI
Zanahoria	P.P (trozo)	26	+++	+++	++	+++	PMC	-	-
Plátano	P.P (trozo)	26	+	+	NO	PMC	ELI	ELI	ELI
Caña de azúcar	P.P (trozo)	26	+++	+++	NO	PMC	ELI	ELI	ELI

*P.P: Placa de Petri; M.W**: Multi well; PM: parásitos muertos; PMC: Parásitos muertos-contaminación; NO: No observado; - negativo; + escasa cantidad de parásitos; ++ moderada cantidad de parásitos; +++ abundantes parásitos. ELI: Eliminado

A nuestro modo de ver los siguientes aspectos justifican la presente comunicación:

1. A nuestro entender, por primera vez, se alerta sobre la capacidad de *T. cruzi* para sobrevivir en alimentos normalmente consumidos por pobladores de localidades venezolanas donde la enfermedad de Chagas es endémica.
2. Se detecta mediante metodología muy sencilla el rango de supervivencia de flagelados de *T. cruzi* sobre alimentos contaminados, indicándose el periodo de mantenimiento de mayor número de parásitos.
3. El presente podría ser un hallazgo de potencial importancia epidemiológica, asumiendo un comportamiento similar en las formas infectivas de *T. cruzi*. De resultar cierta la presunción, podría arrojar luces sobre la comprensión de las infecciones ocurridas en Venezuela por presunto consumo de alimentos contaminados por *T. cruzi*.

Finalmente, para ampliar los presentes resultados preliminares, mayores detalles sobre supervivencia de formas infectivas y transmisión oral por contaminación de alimentos por *T. cruzi* provenientes de sus hospedadores naturales serán publicados en otra entrega.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Lic. Néstor Añez-Rojas, su asistencia en la preparación del material gráfico del manuscrito. Trabajo financiado por los proyectos CDCHT-ULA-C-1209-03-A (NA); FONACIT-G-20050000370 (NA).

Survival of culture forms of *Trypanosoma cruzi* in experimentally contaminated food

SUMMARY

The survival of *Trypanosoma cruzi* culture forms in contaminated food is reported. In 8 out of 11 (73%) samples of fruits and other vegetables experimentally contaminated with *T. cruzi*, the parasite was able to survive from 6 to 72 hours. The major number of survivor flagellates was detected from 6 h to 18 h post contamination. The potential epidemiological implication of this finding is discussed.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Contamination, Food, Survival.

Recibido el 01/03/2007
Aceptado el 10/06/2008