



Universidad Central de Venezuela



Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Trabajo Especial de Grado

**Efecto de la infección por *Trypanosoma cruzi* sobre la Microbiota intestinal
de *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae), vector de la
Tripanosomosis americana**

Presentado por: Joshimer K. Rodríguez S.

Tutora: Leidi M. Herrera C

Cotutora: María del Pino Rodríguez

Julio 2011

Efecto de la infección por *Trypanosoma cruzi* sobre la Microbiota intestinal de *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae), vector de la Tripanosomosis americana

Joshimer Rodríguez

Tutores:

Leidi M. Herrera C. ; María del Pino Rodríguez

Los insectos poseen una gran diversidad de simbioses en su tracto digestivo, los cuales son vitales para el desarrollo completo de los mismos. En insectos vectores esta relación puede ser la base para estudios de control biológico en enfermedades de transmisión vectorial. Los triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), hematófagos estrictos, tienen la capacidad de vehicular al *Trypanosoma cruzi*, protozooario causante de la enfermedad de Chagas. Son pocos los estudios que se han realizado sobre la biota microbiana del tracto intestinal de estos vectores y particularmente en *Panstrongylus geniculatus*, vector activo de la transmisión del Chagas en Venezuela, y de amplia distribución, extendiéndose desde el sur de los Estados Unidos hasta el Norte de Argentina. En este triatomíneo hemos caracterizado bioquímicamente en medios axénicos de desarrollo diferencial para enterobacteriaceas, especies de los géneros *Serratia*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Klebsella* y *Salmonella*, además de representantes del género *Pseudomonas*, (Familia [Pseudomonadaceae](#)) entre ellas *Pseudomonas aeruginosa*, mediante el uso de medios y pruebas químicas específicas, así como la identificación de hongos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Chrysosporium* y *Rhizopus*, basados en la observación de sus estructuras reproductivas. También fueron analizados los cambios en la abundancia y diversidad de esta microbiota bacteriana y fúngica en función del tiempo post ingesta con dos fuentes alimenticias y en presencia o ausencia del *T. cruzi*.

Agradecimientos

A mi familia, en especial a mi papá quien siempre creyó que lo conseguiría, y que con su esfuerzo me abrió un mundo de posibilidades.

A Jesús Hernández, por su apoyo, regaños y cariño, por impulsarme a lo que no creía posible.

A el grupo Physis, por ampliar mis horizontes, parte integral de mi vida en la universidad y desde luego, a las personas que le dan vida: Bencho, Ronald, Wilfrido, Wilfredo, y por supuesto cristo (Jesús Hernández, y sí, es el mismo de arriba).

A mis compañeros de laboratorio y amigos de quienes aun sigo aprendiendo Arturito y Milagros.

A María del Pino, gracias a quien conocí el mundo de la microbiología y en especial el de los hongos (que ahora me encantan) ¡Gracias por ser siempre paciente y por todo cuanto aprendí!

A la profe Leidi Herrera, quien me formó tanto académica como personalmente en muchísimos aspecto desde mi 5to semestre, a quien aprecio y tuve el gusto de tener como tutora, un especial agradecimiento.

A todos aquellos que me regalaron su tiempo y amistad: Txomin, Belí, Ingrid, Daniel, Karen, Luis (Mujica eres tú), Vegetal y de nuevo Bencho!!!

Dedicatoria

A quien me guió en mis primeros pasos
y aún me inspira a seguir mi camino
A quien no solo fue madre sino amiga,

1. Introducción

1.1 La tripanosomosis americana o enfermedad de Chagas

La simbiosis es una asociación íntima interespecifica en la cual especies hacen vida en común (De Bary, 1879 citado por Paracer y Ahmadjian, 2000). Existe un amplio número de asociaciones englobadas dentro de este concepto, entre ellas el parasitismo representa una de las asociaciones interespecíficas más estrictas, en la cual un organismo vive a expensas de otro durante toda su vida o parte de ella con capacidad potencial de provocar daño ,aparente o inaparente (Llop y col., 2001).

El *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Kinetoplastida, Tripanosomatidae) es un hemoflagelado, exclusivo de mamíferos que causa la tripanosomosis americana o Enfermedad de Chagas (Ech), parasitosis hasta ahora considerada autóctona del continente americano, extendiéndose desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina (Rey, 2002)

En 1909 el médico brasileño Carlos Chagas describió por primera vez y en forma simultánea al agente causal de la tripanosomiasis humana, sus insectos vectores (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) y los mamíferos reservorios potenciales. Sin embargo este importante descubrimiento no fue de gran impacto en la comunidad científica hasta años más tarde, cuando Salvador Mazza retoma el trabajo de Chagas comenzando las campañas divulgativas de la enfermedad (Zabala, 2009).

En la actualidad, según la Organización Mundial de la Salud, se calcula que en América hay unos 10 millones de personas con enfermedad de Chagas y anualmente mueren más de 10.000. (www.paho.org/Spanish/). Esta parasitosis se presenta como endémica en 21 países de América Latina.

El primer caso de Enfermedad de Chagas fue reportado en Venezuela por Enrique Tejera en el estado Zulia, diez años después que Carlos Chagas en Brasil, descubrió y describió el ciclo epidemiológico de la parasitosis (Feliciangeli, 2009).

El *T. cruzi* se caracteriza morfológicamente por presentar una organela denominada kinetoplasto, que no es más que un segmento de su larga mitocondria, conformado por abundante ADN. La heterogeneidad de *T. cruzi* en cuanto a morfología, fisiología, ecología, subpoblaciones genéticamente definidas y la presencia de algunas variantes antigénicas relacionadas con manifestaciones particulares de infectividad y patogenicidad, han llevado a muchos autores a pensar que no se trata de una especie sino más bien de un “complejo cruzi” (Rey, 2002)

1.2 Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es un parásito heteroxénico, el cual desarrolla su ciclo de vida entre mamíferos (de hasta ocho ordenes) e insectos estrictamente hematófagos, los cuales hacen las veces de vectores biológicos.

En los mamíferos los parásitos asumen la forma tripomastigota (en sangre) o amastigota (en el interior de las células de diversos tejidos). En tanto en los insectos, el parásito se encuentra en el tracto digestivo bajo las formas epimastigota (forma multiplicativa) y tripomastigota (tripomastigotas metacíclicos los cuales son las formas infectivas para el hospedador mamífero, Figura 1). Para que pueda ocurrir la transmisión es necesario que se produzca un encuentro entre el parásito, los triatomíneos vectores y el hospedador mamífero. En el caso del hombre y de algunos mamíferos, dependiendo de sus propias condiciones

físicas e inmunológicas, podrán potencialmente padecer la enfermedad (Hoare, 1972; Rey, 2002; Briceño-León, 2009)

Cuando el triatomo se alimenta sobre un mamífero que posee las formas sanguícolas del parásito, las incorpora junto con la ingesta sanguínea a su tracto digestivo, donde se diferencia rápidamente a su forma multiplicativa, el epimastigote. La multiplicación en el intestino del insecto es por división binaria longitudinal, pudiendo sin embargo ser incompleta y los epimastigotes pueden incluso permanecer agrupados formando grandes rosetas. Luego de varios eventos de multiplicación, algunas formas epimastigotas se conducen hacia la parte posterior del tracto digestivo, específicamente hacia los túbulos de Malpighi, donde al interactuar con el epitelio de esta región, por mecanismos de señalización celular, se promueve un proceso de diferenciación hacia formas tripomastigotes metacíclicos, de alta capacidad infectiva para el próximo eslabón de la cadena de transmisión como son los mamíferos.

La ingesta sanguínea en las especies de triatominos vectores induce en forma inmediata a la defecación, y es en las heces donde los tripomastigotes metacíclicos salen al medio. Muchas veces al rascarse, el mamífero puede arrastrar las heces contaminadas hasta el lugar de picadura, entrando las formas metacíclicas al torrente sanguíneo. Otro modo de infección en mamíferos son los hábitos omnívoros o insectívoros, que pueden llevar a la ingesta del insecto vector, que al ser masticado libera las formas metacíclicas las cuales atraviesan las mucosas llegando al torrente sanguíneo. En algunos casos los triatominos pueden contaminar también alimentos con sus heces y en ambos casos se puede hablar de una transmisión por vía oral (Rey, 2002).

Dentro del mamífero las formas tripomastigotas no se multiplican en sangre, si no que por un proceso de fagocitosis inducida, se interiorizan en las células de algunos tejidos en los

cuales pasan a la forma amastigote (la forma multiplicativa dentro del mamífero), mediante una división binaria simple que se repite cada doce horas, produciéndose un número creciente de estadios semejantes, los cuales poco a poco van diferenciándose de amastigotes a tripomastigotes. Al romperse la célula hospedadora, por efectos fisicoquímicos y/o mecánicos de la carga parasitaria, estas formas se integran de nuevo al torrente sanguíneo y pueden reinvasar o permanecer un determinado periodo de tiempo en sangre. Este ciclo dentro del mamífero se repite asegurando la continuidad de la infección, así como la propagación del parasitismo a otros órganos o tejidos. Si un triatomino sano se alimenta de este mamífero y toma las formas sanguíneas se cierra el ciclo de transmisión (Rey, 2002).

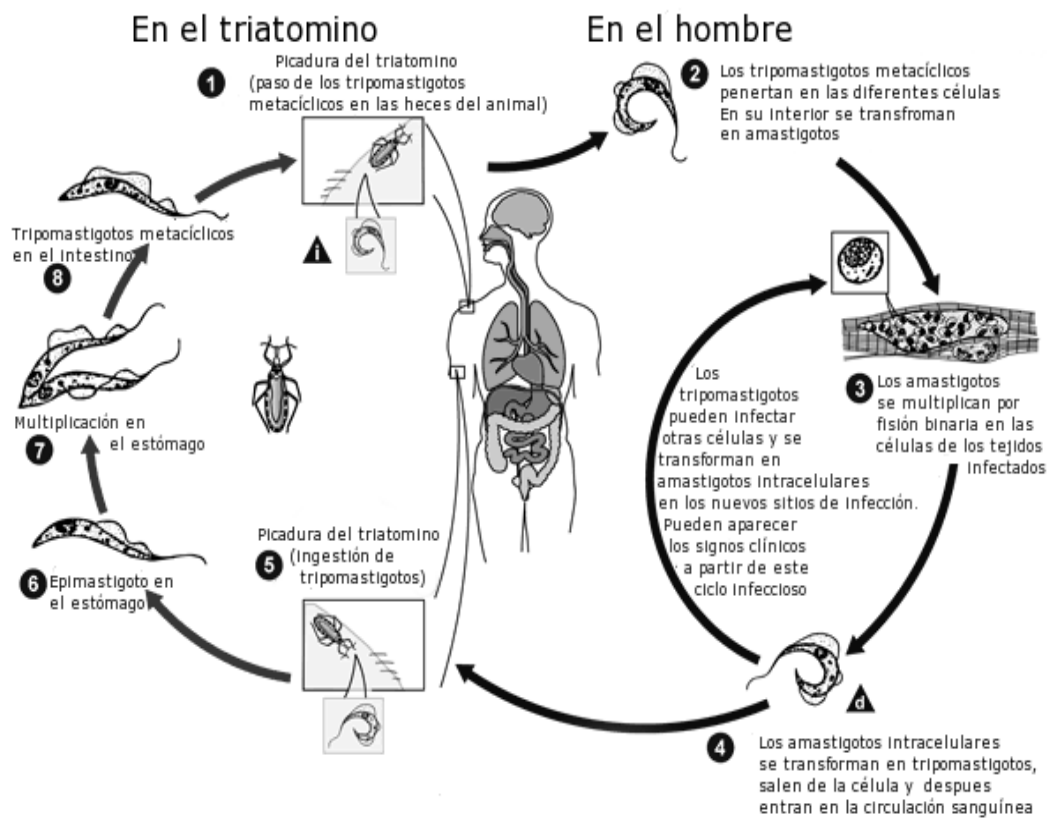


Figura 1. Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*. (Tomado y editado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>)

1.3 Vectores del *Trypanosoma cruzi*

Los vectores del parásito son hemípteros de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, los cuales requieren casi en forma exclusiva, sangre de vertebrados para su desarrollo completo, sin embargo la alimentación sobre hemolinfa y otros fluidos de invertebrados, incluyéndolos a ellos mismos, también ha sido reportada (Schofield, 2000; Sandoval y col., 2004). Los triatominos también son vectores del *Trypanosoma rangeli*, otro tripomastigote autóctono de América, parásito de mamíferos que, aun cuando se discute si causa patología en el hombre, es de importancia médica por cuanto comparte hospedadores, reservorios y vectores con *T. cruzi*. Ambos tripanosomas presentan reacción inmunológica cruzada (Rodríguez y col., 2007).

Los triatominos se identifican por la presencia de un carácter derivado de valor diagnóstico, que no se encuentra en otros Reduviidae, este es una conexión membranosa entre el segundo y tercer segmento del rostro (ver Figura 2); esta estructura permite una amplia flexión del tercer segmento rostral en el acto de picar y los diferencia morfológicamente de los otros miembros de la familia (Lent y Wygodinsky, 1979).

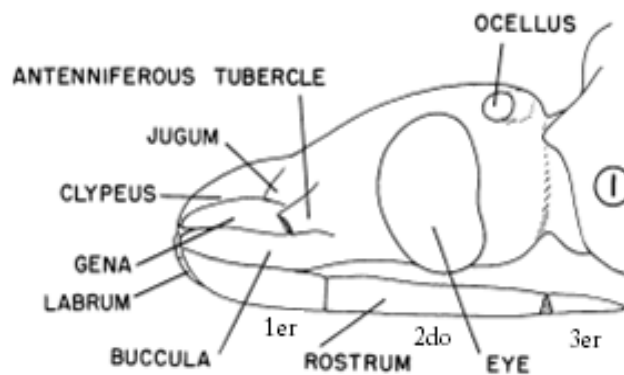


Figura 2. Esquema de la cabeza y aparato bucal de un triatomino, (modificado de Lent y Wygodinsky, 1979)

La mayoría de la especies de triatominos, se alimentan sobre mamíferos terrestres o arbóreos, especialmente didélfidos, desdentados y roedores; algunos otros se encuentran asociados a murciélagos, aves y ocasionalmente reptiles (Reyes-Lugo y col., 2002). Varias especies han colonizado habitaciones humanas, donde transmiten la parasitosis al hombre y a sus animales domésticos, pudiéndose producir en el humano la Ech.

Las especies más importantes epidemiológicamente hablando, por su amplia distribución en América, son *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*, siendo este último considerado como el principal vector del Chagas en los países al Norte de la Cuenca Amazónica (Lent y Wygodinsky, 1979).

En Venezuela se han reportado por lo menos 8 géneros de triatominos, *Triatoma*, *Rhodnius*, *Panstrongylus*, *Microtriatoma*, *Alberprosenia*, *Bolbodera*, *Cavernicola* y *Eratyrus*, siendo los principales vectores en orden de importancia *Rhodnius prolixus*, *Triatoma maculata* y *Panstrongylus geniculatus* (Lent y Wygodinsky, 1979; Abad-Franch y Monteiro, 2007).

P. geniculatus ha sido referido como un vector secundario, asociado principalmente a zonas rurales y silvestres, razón por la cual la mayor parte de los estudios sobre vectores del mal de Chagas en el país, se han enfocado en las dos primeras especies. En la última década tanto en el área de Caracas como en zonas aledañas se han observado numerosos casos de domiciliación por parte de *P. geniculatus*, (Reyes-Lugo y Acosta, 2000; Reyes-Lugo, 2009) así como un incremento en el número de casos de la enfermedad, en áreas donde es este el único vector descrito, lo que lleva a pensar que el rol de este vector ha sido subestimado, haciéndolo interesante como centro de investigaciones.

El *P. geniculatus* se encuentra distribuido en Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guyana, Nicaragua, Surinam, Panamá, Paraguay, Trinidad, Perú, Uruguay y

Venezuela. En este último ha sido reportada su presencia en la mayor parte de los estados, con una mayor abundancia al norte del país. (Lent y Wygodinsky, 1979).

1.4 Simbiontes presentes en tracto intestinal de los triatominos

Los triatominos poseen una dieta en su mayor parte basada en la hematofagia. Se sabe que estos vectores poseen en su intestino numerosas bacterias simbiotes extracelulares, las cuales les aportan vitaminas y otros nutrientes que son esenciales para el desarrollo y normal crecimiento del insecto, un ejemplo de ello es el aporte de vitamina B por parte de algunas bacterias simbiotes de los triatominos, componente escaso en la dieta de los mismos. Estos organismos son transmitidos de generación en generación cuando los triatominos se alimentan de las deyecciones fecales (coprofagia) o de la sangre presente en el abdomen de sus congéneres (cleptofagia). El hecho de que estos insectos se agreguen en colonias facilita el desarrollo de ese comportamiento (Eichler y Schaub, 2002).

El estudio de estas bacterias simbiotes, reviste importancia desde varios puntos de vista. El primero de ellos se relaciona con la manipulación genética de simbiotes de vectores de circulación domiciliar y peridomiciliar, para el control de enfermedades transmitidas por los mismos (Rodríguez y col., 2007). Por otra parte, las interacciones que estas bacterias puedan desarrollar con los parásitos dentro del insecto y el potencial efecto en la transmisión de la enfermedad, son de especial interés dados los estudios sobre la influencia de la microbiota del vector sobre el ciclo de vida de *T. cruzi* y de *T. rangeli*, en procesos de diferenciación y cambios de membrana involucrados en la señalización celular (Azambuja y col., 2005). La literatura no muestra reportes del estudio de la biota microbiana presente en *P.*

geniculatus, vector que está jugando un papel cada vez más importante en la transmisión del *T. cruzi* en Venezuela.

2. Antecedentes

La mayoría de los simbioses de triatominos hasta ahora descritos pertenecen al género *Rhodococcus*, familia Nocardiaceae (Stackebrandt, 1988). La primera bacteria simbiote descrita en triatominos fue *Rhodococcus rhodnii*, originalmente descrita como *Actinomyces rhodnii* en *Rhodnius prolixus* (Erickson, 1935 citado por Eichler y Schaub, 2002). Basados en criterios macroscópicos, investigaciones posteriores clasificaron a *R. rhodnii* como simbiote de otras especies de triatominos: *Triatoma infestans* y *Triatoma protracta* (Wigglesworth, 1936 y Goodchild, 1995 citados por Eichler y Schaub, 2002). Se ha demostrado que *T. infestans*, *T. sordida* y *P. megistus* poseen actinomicetes como simbioses: *Nocardia sp.*, *Gordonia sp.* y *Rhodococcus equi-like* respectivamente. Estas bacterias son adquiridas por coprofagia en el primer estadio ninfal, aunque no ha sido demostrado que no pudiesen estar transmitiéndose además vía transovarial como ocurre con las bacterias presentes en la chinche hematófaga *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae) (Hypsa y Aksoy, 1997; Eichler y Schaub, 2002).

Algunas bacterias endosimbioses de insectos pueden proveerles aminoácidos o vitaminas o ser necesarias para la fertilidad o supervivencia de sus hospedadores y por ende de sus parásitos (Huerta y col., 2007). Otras como las bacterias Gram negativas *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa*, que se encuentran en el tracto intestinal de triatominos, les proveen factores tripanolíticos. (Azambuja y col., 2004)

Existen además de bacterias simbioses, hongos asociados al tracto intestinal de los triatominos. En *Panstrongylus megistus* han sido descritos 13 géneros de hongos, entre los que figuran *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Trichoderma* entre otros,

llegando a un total de 37 especies. La presencia de ciertos grupos de hongos puede influenciar la colonización por parte de *T. cruzi* en el vector, dado que ante la presencia del parásito en ninfas de *P. megistus* hay ausencia de hongos, y cuando estos se hallan presentes, no está presente el *T. cruzi*, aun cuando se haya inducido a los insectos a una infección artificial (Morales y col., 2001). Otro estudio propone la utilización de hongos como *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, conocidos entomopatógenos, como control biológico de los vectores de circulación domiciliar y peridomiciliar (Luz y col., 2004).

Es de importancia resaltar que la aposimbiosis (ausencia de simbiosis) induce efectos deletéreos en el vector, como por ejemplo retraso en el desarrollo e incremento en la mortalidad de los estadios ninfales, pues muchos de estos simbiosis aportan nutrientes como la vitamina B, que escasean en la dieta hematófaga de estos insectos. (Eichler y Schaub, 2002), lo que es de especial interés dado los trabajos realizados por investigadores como Bear y col. (1998, 2001); Rio y col. (2004); Durvasula y col. (1997,2008); en los cuales se sugieren la manipulación genética de los simbiosis, como medida para el control de la enfermedad de Chagas y otras enfermedades transmitidas por artrópodos.

Son también de interés las investigaciones centradas en la interacción tripanosoma-triatominos y en los procesos de co-evolución, que pueden ayudar a identificar los mecanismos que facilitan o impiden la transmisión de los parásitos en diferentes especies de vectores. Estos mecanismos parecen implicar a las bacterias del tracto intestinal de los triatominos, necesarias para completar el desarrollo de ninfas y para la producción de huevos. El desarrollo de los simbiosis parece estar regulado por el vector y la presencia de parásitos como *T. cruzi* y *T. rangeli*, que pueden interferir con este sistema e incluso inducir la producción de sustancias antibacterianas. Si bien hasta ahora se ha considerado al *T. cruzi* no patógeno para el vector, se ha observado que *T. rangeli* afecta fuertemente las especies del

género *Rhodnius* y que esta patogenicidad parece influir en una reducción del número de simbioses, por lo que puede deducirse que existen interacciones entre la microbiota intestinal del triatomino y el parásito. Por tales razones, sirven para motivar trabajos acerca de la microbiota de estos insectos que puedan abrir nuevos horizontes y líneas de investigación en la lucha contra la tripanosomosis americana (Vallejo y col., 2009).

3. Objetivos

3.1.- Objetivo General

Determinar el efecto de la infección por *Trypanosoma cruzi* sobre la microbiota intestinal de *Panstrongylus geniculatus*, vector de la Tripanosomosis americana o Enfermedad de Chagas

3.2.- Objetivos Específicos

-Mantener colonias de triatominos en diferentes condiciones de ayuno y alimentación constante.

- Estandarizar las condiciones de infección experimental para *P. geniculatus*.

- Estandarizar la siembra del contenido intestinal de triatominos y el cultivo de elementos de su microbiota.

-Reconocer los diferentes morfotipos de *T. cruzi* en la cinética de infección experimental en *P. geniculatus*.

-Identificar por métodos morfológicos y por caracterización bioquímica, la biota microbiana del tracto digestivo de triatominos sanos y experimentalmente infectados con *T. cruzi*

-Analizar diferencias en las poblaciones de simbioses en presencia o ausencia de *T. cruzi*

4. Materiales y Método

4.1 Población de vectores

Para la realización del estudio se tomó una población de 100 individuos vivos de *P. geniculatus* criados en laboratorio, todos en el tercer estadio ninfal, según protocolo de

Gómez-Núñez y Fernández, (1963), mantenidos en frascos boca ancha tapados con una tela de tul y alimentados cada 21 días. Los frascos en su interior se complementaron con escalerillas de papel para aumentar la superficie donde los triatominos pueden moverse y proporcionar espacios semi ocultos, donde estos en estado libre se refugian.

Los ejemplares de *P. geniculatus* provinieron de la colonia perteneciente al insectario de la Sección de Entomología Médica “Dr. Pablo Anduze” (SEMPA) del Instituto de Medicina Tropical de la UCV, dirigido por el Dr. Matías Reyes Lugo, las cuales están bajo el registro de colecciones de fauna N° DF-001 MARNR-año 2000.

4.2 Infección artificial de los vectores

La población de vectores se dividió en tres grupos, el primero de ellos, el grupo A (40 individuos), fue el modelo experimental expuesto a la infección por *T. cruzi* el agente parasitario y alimentado con sangre de conejo, el segundo es el grupo control del anterior, Grupo B (40 individuos) estuvo conformado por el mismo modelo experimental, sin infección por *T. cruzi* alimentado también con sangre de conejo; el último es otro grupo control, grupo C (20 individuos) , sin infección y alimentado con sangre de gallina.

Los 3 grupos recibieron una ingesta única, que en el caso de los grupos A y B fue mediante un alimentador artificial usando sangre de conejo desfibrinada. A partir de esta ingesta se mantuvieron en ayuno hasta finalizar el experimento (Tabla I)

El grupo A de 40 individuos fue infectado artificialmente durante la ingesta única donde se incluyó en la sangre desfibrinada de conejo, extraída bajo esterilidad, un inóculo de 10^6 tripomastigotes sanguícolas/ml (aislado Bebe Paraguay, tipificado como Tc II), cultivados en medio axénico, RPMI (Roswell Park Memorial Institute) en el laboratorio de Biología de *Trypanosoma* de Mamíferos, IZET.

TABLA I. Resumen de los grupos de estudio y sus variables (fuente alimenticia e infección experimental)

Grupo de estudio	Fuente alimenticia	Presencia o ausencia de infección por <i>T. cruzi</i>
Grupo A <i>P. geniculatus</i> , 3er estadio ninfal , 40 individuos	Sangre de Conejo	Infectado experimentalmente(1.10 ⁶ tripomastigotes sanguícolas/ml) <i>T. cruzi</i> II
Grupo B <i>P. geniculatus</i> , 3er estadio ninfal , 40 individuos	Sangre de Conejo	Sin infección
Grupo C <i>P. geniculatus</i> , 3er estadio ninfal , 20 individuos	Sangre de gallina	Sin infección

Los alimentadores artificiales fueron construidos como dispositivos Pyrex de doble cámara, una externa con circulación de agua a temperatura constante a través de un baño de Maria y un motor sumergible, simulando la condición fisiológica del mamífero (37 °C) y la otra para soportar la sangre desfibrinada de conejo suplementada o no con parásitos según el caso. El espacio diseñado para contener la sangre fue cubierto en la parte inferior con látex, a modo de que los insectos pudiesen atravesar con su probosis y lograr la ingesta sanguínea. (González y col., 2009) Figura 3

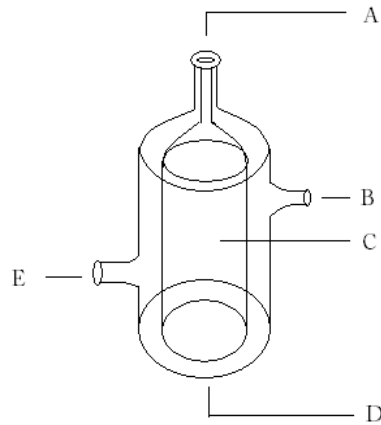


Figura 3. Esquema de uno de los viales del alimentador artificial

A.- Abertura para la colocación de la sangre dentro del vial. **B.-** Orificio para la entrada del agua al espacio entre las paredes del vial. **C.-** Espacio interno para la mantención de la sangre. **D.-** Abertura en el compartimiento adecuado para la sangre donde se colocara el látex. **E.-** Orificio para salida del agua que se halla entre las paredes del vial.

Los insectos se colocaron en recipientes de vidrio, tapados con tela de tul, con soportes de papel para facilitar su ascenso a la parte superior del envase, que estuvo en contacto con el vial del alimentador, permitiéndose la repleción total de los insectos (Figura 4).

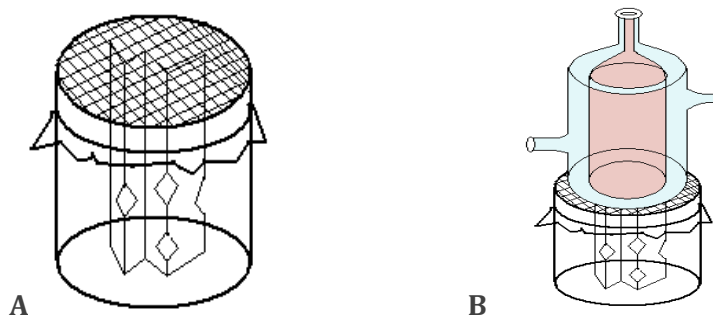


Figura 4. **A.** Recipiente que contiene las ninfas de *P. geniculatus*. **B.** Recipiente con las ninfas y el vial del alimentador durante la alimentación

4.3 Seguimiento de las poblaciones de estudio

La población expuesta al parásito (alimentados con sangre de conejo), y la de los grupos control (B: alimentados con sangre de conejo y C: con sangre de gallina y sin parásitos) y fueron evaluadas regularmente (a los 0, 15, 45, 75 y 125 días post-ingesta) escogiendo aleatoriamente 3 individuos para toma de muestras, a los cuales se les lavó exteriormente con una solución antifúngica y antibiótica, (hipoclorito al 10%) para asegurar que los simbiontes encontrados correspondan exclusivamente al tracto intestinal de los insectos. (Morales y col., 2001), para luego realizar la extracción del tracto digestivo medio y posterior, realizando un corte en la parte posterior del abdomen y en los laterales del mismo y extrayendo con una pinza entomológica todo el contenido, proceso realizado en atmósfera de cámara de flujo laminar y con pinzas y tijeras estériles. Un macerado de las heces y tractos extraídos de los tres triatomíneos de cada grupo por separado, fue utilizado para los cultivos microbiológicos, todo bajo condiciones de esterilidad, realizado en el laboratorio de Microbiología Ambiental, IZET.

En el caso de los grupos B y C (B: alimentado con sangre de conejo y C: con sangre de gallina, ambos sin parásitos) se sometieron al estudio microbiológico antes de la ingesta inicial e infección del grupo experimental del grupo A (tiempo 0, muestreo 1) para conocer las condiciones previas al ensayo (antes de comenzar los experimentos los grupos venían siendo alimentados con sus respectivas fuentes sanguíneas).

El macerado del grupo A (expuesto a la infección por *T. cruzi* y alimentado con sangre de conejo) fue observado al microscopio de luz (400x) en cada muestreo post ingesta en busca de parásitos, para determinar el periodo prepatente de la infección artificial, y posteriormente para garantizar la presencia de formas multiplicativas e infectivas reconocidas como epimastigotes, tripomastigotes metacíclicos y formas de transición

respectivamente (Perlowagora y Moreira, 1994), todas indicativos del mantenimiento de la infección en los triatomíneos del grupo A a lo largo del ensayo.

4.4 Aislamiento de la microbiota y descripción morfológica

Para la obtención de la biota microbiana presente en el tracto intestinal de los triatomíneos, infectados y no infectados, se utilizó el macerado de heces y tractos extraídos de las ninfas de *P. geniculatus* de cada grupo por separado, como material de siembra. Este procedimiento se realizó en campana de flujo laminar, en condiciones de esterilidad.

Una vez obtenido el material de cultivo, se realizaron diluciones seriadas del mismo hasta 10^{12} en solución salina estéril (0.85%) y cada dilución se sembró por duplicado, en medio agar tripticosa de soya en placas de petri estériles por método de superficie. Se observaron las placas a las 24 y 48 horas de la siembra, describiendo morfológicamente las colonias que crecieron en el medio, en base a caracteres como la textura, color, forma, tipo de bordes y elevación (Manual de procedimientos de laboratorio y productos BBL, 1974).

La abundancia fue estimada a través del Conteo de unidades formadoras de Colonia (UFC) y cálculo del título bacteriano, posteriormente se realizó el aislamiento según el protocolo de BBL (Manual de Procedimientos de laboratorio y productos BBL). Otra porción del macerado fue cultivado en agar malta, para así determinar la presencia de hongos, para el cual se realizaron diluciones seriadas hasta 10^2 en solución salina estéril (0.85%). Se realizaron menos diluciones debido a que las concentraciones de hongos en general son siempre menores que las concentraciones bacterianas, y en grandes diluciones no se obtendría crecimiento.

Para el aislamiento de hongos el material de las diluciones seriadas fue sembrado en medio agar malta, así como también una porción del material sin diluir (se siembra el material puro por si las concentraciones de hongos son muy bajas y no crecen en las siembras de las diluciones). Se realizó la incubación a temperatura ambiente por 7 días y se procedió a la descripción morfológica de los hongos en base a color, textura, forma y envés. Luego de la caracterización morfológica se estableció un cepario, proceso que también fue aplicado a las cepas bacterianas aisladas (Manual de procedimientos de laboratorio y productos BBL, 1974).

4.5 Descripción micromorfológica

Una vez establecido el cepario se procedió a la descripción micromorfológica de las cepas bacterianas, por el método de coloración diferencial Gram (ver apéndice b)

A los hongos hallados se les realizaron microcultivos siguiendo la siguiente metodología: se colocó una gota de alcohol, agua o ácido láctico sobre un portaobjeto, sobre la cual se ubicó un trozo del hongo a cultivar, crecido sobre las placas de agar, e inmediatamente se adicionó una gota de lactofenol-azul de algodón, pasándose la preparación por un mechero para que el agar se derritiese. La preparación ya fundida fue cubierta con un cubreobjeto y el exceso de líquido fue removido con un papel absorbente o secante. Para sellar las preparaciones semipermanentes, se utilizó esmalte de uñas (brillo), pudiéndose almacenar por varios meses, para su observación al microscopio (100X) (Samson, 1988; 1991).

En la Figura No 5 se describe la marcha analítica usada para las muestras control y problema.

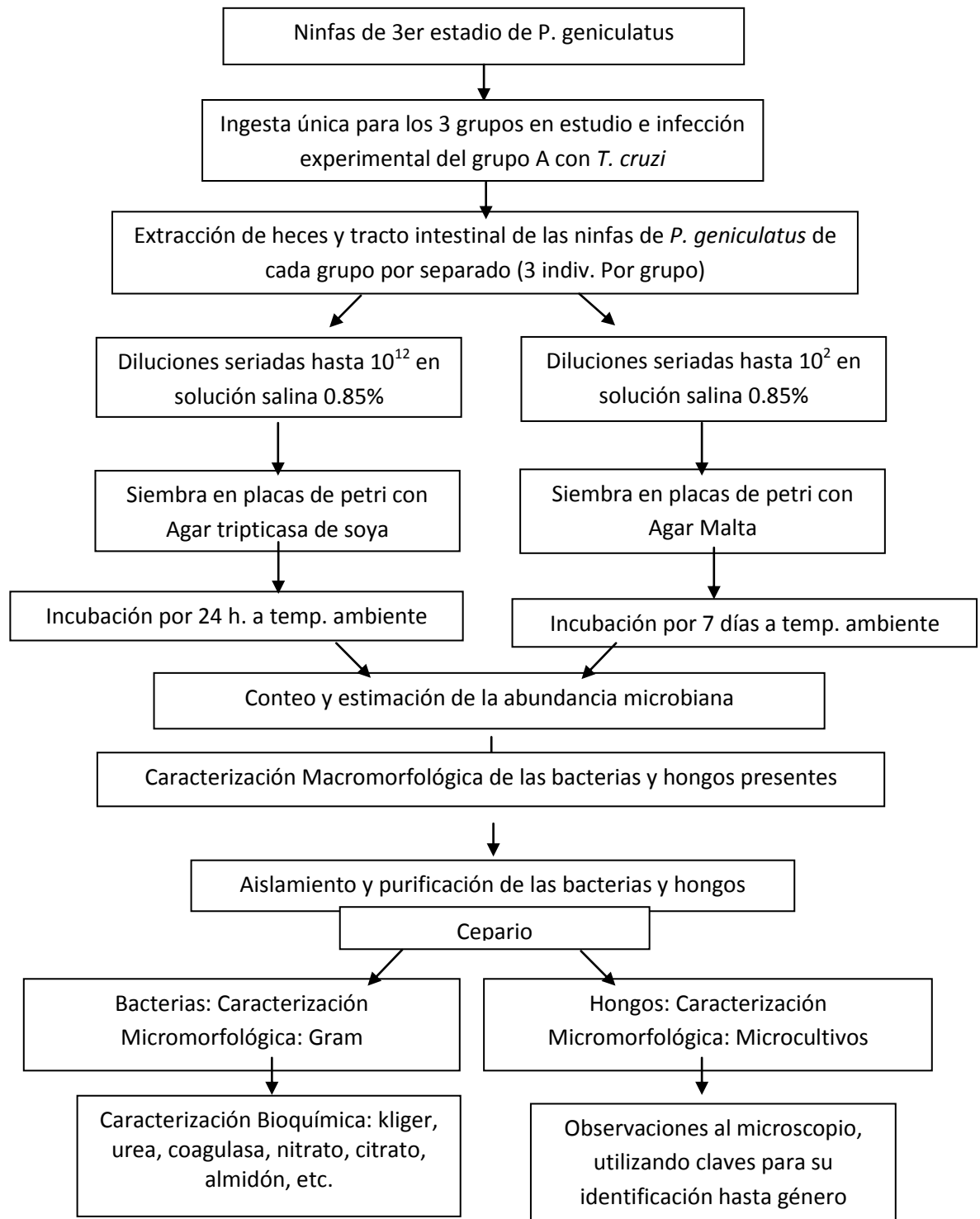


Figura 5. Marcha analítica usada para la realización del experimento

4.6 Caracterización bioquímica

Una vez realizada la descripción morfológica, se hizo la caracterización bioquímica de las cepas bacterianas halladas, a través de pruebas químicas específicas para enterobacterias. Estas fueron escogidas en virtud de que el material de estudio vino de heces y tracto intestinal de triatomos.

Se realizaron además otra serie de pruebas específicas para otro grupo bacteriano no perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, como el caso del género *Pseudomonas*, (Mac Faddin, 1978). Tabla II

Tabla II. Medios selectivos para la caracterización bioquímica de las cepas, cambios apreciables según la respuesta bioquímica y su significado

Medio de Cultivo	Utilización	Cambio en el medio	Significado
Kligler Hierro Agar	Medio de cultivo para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de glucosa y lactosa, y a la producción de ácido sulfhídrico.	1. Pico de flauta alcalino (rojo) y una capa profunda ácida (amarillo)	1. Organismos que solo fermentan glucosa
		2. Pico de flauta ácido (amarillo) y una capa profunda ácida (amarillo)	2. Organismos que fermentan glucosa y lactosa
		3. Pico de flauta alcalino (rojo) y una capa profunda alcalina (rojo) o sin cambio	3. Organismos que no fermentan glucosa o lactosa. Usan las pectonas.
		4. Ennegrecimiento del medio	4. Producción de H ₂ S
		5. Burbujas o fractura del agar	5. Producción de gas
	Medio utilizado para la diferenciación de	1. El medio de color verde	1. organismo capaz de utilizar como única fuente de

Simmons Citrato Agar	enterobacterias, en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono.	pasa a ser azul intenso (+) 2. Se mantiene el color original del medio (-)	carbono el citrato 2. No puede utilizar el citrato como fuente de carbono
Caldo Urea	Medio utilizado para diferenciar microorganismos en base a la actividad ureásica.	1. coloración rosa intenso en el medio de cultivo (originalmente naranja) (+) 2. Se mantiene el color original del medio (-)	1. organismo capaz de desdoblar la Urea 2. No puede desdoblar la Urea
Caldo Nitrato	Determinar la capacidad de un microorganismo de reducir los nitratos a nitritos o nitrógeno libre	Fase 1 1. Cambio de color a rojo intenso al agregar reveladores (originalmente amarillo muy claro) (+) 2. El medio se mantiene igual (-) Fase 2 1. Cambio de color al agregar revelador (-) 2. El medio se mantiene igual (+)	Fase 1 1. Reducción del nitrato a nitrito. 2. No reducen el nitrato Fase 2 1. No reducen el nitrato reveladores 2. Reducción del nitrato a a nitrógeno libre
Agar base sangre	Medio para propósitos generales, para el aislamiento y cultivo de numerosos microorganismos, como para la observación de hemólisis.	1. halo traslúcido alrededor del sitio de siembra (medio originalmente rojo) (+) 2. no produce cambios en el medio. (-)	1. organismo capaz de coagular el plasma por acción de la enzima coagulasa 2. organismo incapaz de coagular el plasma

Agar almidón	Este medio se destina para la determinación de la capacidad de hidrólisis de almidón.	<ol style="list-style-type: none"> 1. zona traslucida.al agregar el revelador (el medio se torna azul intenso) (+) 2. Medio azul intenso al agregar el revelador (-) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. el almidón ha sido hidrolizado 2. No hubo hidrólisis de almidón
Gelatina Nutritiva	Para investigar la presencia de microorganismos proteolíticos.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Medio se torna liquido (originalmente sólido) (+) 2. El medio se mantiene igual (-) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Enzimas proteolíticas del m.o. actúan sobre la gelatina 2. Sin acción proteolítica
Caldo MR - VP	El Medio <i>MR-VP</i> es utilizado para la diferenciación de organismos coliformes en base a las pruebas de Rojo de metilo y Voges-.Proskauer.	<ol style="list-style-type: none"> 1. El medio cambia de De anaranjado a rojo (+) 2. De anaranjado a Amarillo(-) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. acidificación del medio 2. pH. neutro
Medio SIM	Es un medio semisólido destinado a verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ennegrecimiento del medio (+) 2. color rojo al agregar revelador (+) 3. crecimiento bacteriano alrededor del área de siembra (+) 4. Sin cambio (-) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Producción de H₂S 2. Producción de indol 3. organismo motil
Pseudomonas agar P	Medio de cultivo utilizado para el aislamiento, la detección y la diferenciación de especies de <i>Pseudomonas</i> spp. en	<ol style="list-style-type: none"> 1. zona color azul, azul-verdoso que rodea la colonia (+) 2. zona de color rojo alrededor de la colonia (+) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. presencia del pigmento piocianina, solo presente en ciertas especies de <i>Pseudomonas</i> 2. presencia del pigmento piorrubina, solo presente en ciertas

	base a la producción de fluoresceína.	3. Sin cambios en el medio(-)	especies de Pseudomonas 3. Ausencia de los pigmentos
Pseudomonas agar F	Medio de cultivo utilizado para el aislamiento, la detección y la diferenciación de especies de Pseudomonas spp. en base a la producción de piocianina.	1. Observación de pigmento de color amarillo, amarillo-verdoso fluorescente que rodea la colonia (+) 2. sin cambios en el medio (-)	1. presencia del pigmento fluoresceína, solo presente en ciertas especies de Pseudomonas 2. Ausencia del pigmento
Agar Cetrimide	Es un medio selectivo utilizado para el aislamiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	1. Observación de coloración verde fluorescente. (+) 2. Sin cambios en el medio (-)	1. presencia de los pigmentos fluoresceína y piocianina, solo presentes conjuntamente en <i>P. aeruginosa</i> 2. ausencia de los pigmentos
Prueba de catalasa	Determinar la presencia de la enzima catalasa. Pseudomonas aeruginosa es positiva a esta prueba.	1. Observación de producción de burbujas en el medio (+) 2. Sin cambios en el medio (-)	1. Enzima catalasa presente 2. Ausencia de la enzima catalasa
Prueba de oxidasa	Determinar la presencia de la enzima citocromooxidasa en el microorganismo. Pseudomonas aeruginosa es positiva a esta prueba.	1. colonias bacterianas se tiñen de color lavanda que vira gradualmente a púrpura-negruzco intenso. (+) 2. Sin cambios en la coloración (-)	Enzima citocromooxidasa presente 2. Ausencia de la enzima citocromooxidasa

4.7 Tratamiento estadístico para el análisis de resultados

Para el análisis de los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas se utilizó el Análisis de *Cluster* o Análisis de conglomerados, donde las diversas pruebas bioquímicas fueron aplicadas por igual a todas las cepas bacterianas aisladas en los distintos muestreos. Mediante este análisis se visualizan gráficamente a través de dendrogramas, las coincidencias tanto positivas como negativas (ausencia o presencia de utilización) de cada prueba en cada cepa, y provee por tanto una estimación de la similitud total entre las cepas que conforman los grupos.

Este análisis permitió conocer asociaciones que no parecían evidentes *a priori* pero que llevaron a visualizar, grupos con idéntica respuesta a todas las pruebas bioquímicas aplicadas, a los cuales se les denominó “grupos de identidad funcional” (GIF). Las cepas bacterianas con características metabólicas únicas (que no se asocian) se denominaron grupos funcionales (GF).

Cada grupo de identidad funcional, fue indicativo de que funcionalmente las cepas bacterianas involucradas estarían cumpliendo un mismo rol metabólico en el medio, independientemente de la ubicación taxonómica artificial que se les atribuya.

5. Resultados

5.1 Estudio de la biota bacteria

La siembra en agar trypticasa de soya permitió el reconocimiento de diversos morfotipos bacterianos, en base a forma de la colonia, color, relieve, textura y tipo de bordes.

En cuanto a la abundancia bacteriana se logró observar que la tendencia de las poblaciones de bacterias en los 3 grupos fue similar, con un aumento notorio a los 15 días post - ingesta y a partir del mismo una disminución de la abundancia en los 3 grupos de estudio para los muestreos a los 45 y 75

días post ingesta (solo el grupo A aumento ligeramente), y finalmente un aumento en el número de morfotipos descritos para el último muestreo en los 3 grupos (Figura 6).

Los grupos A y B presentaron igual diversidad de morfotipos en los tres primeros muestreos, a partir del cuarto la diversidad disminuyó en el grupo B. Es de notar que en el grupo A, el grupo infectado experimentalmente con *T. cruzi*, y modelo triatomino de igual procedencia y con una misma fuente alimenticia (Sangre de Conejo), se mantuvo la diversidad e incluso aumentó.

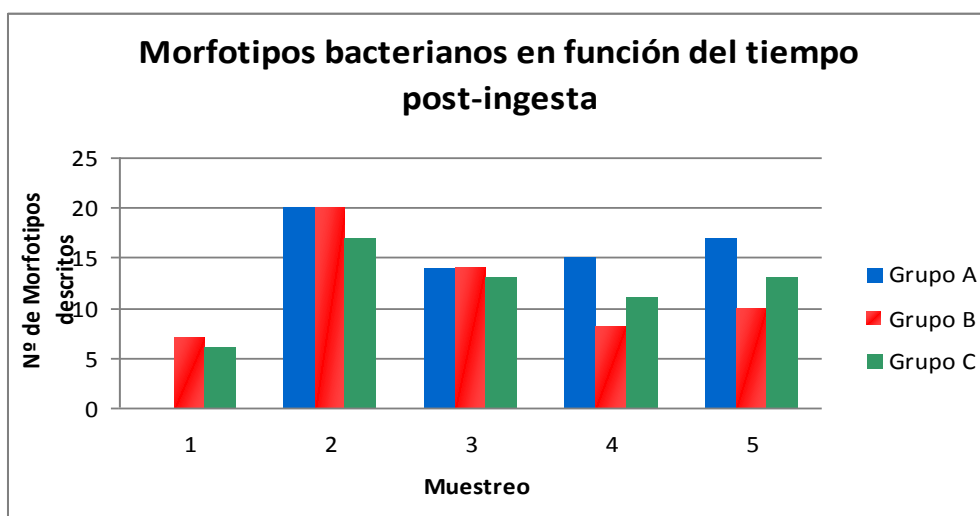


Figura 6. Variación en el número de morfotipos bacterianos descritos para los 3 grupos de estudio en los distintos muestreos. Muestreo 1: solo grupos B y C evaluados antes de la ingesta única. Muestreo 2: los 3 grupos evaluados a los 15 días de la ingesta única. Muestreo 3: los 3 grupos evaluados a los 45 días de la ingesta única. Muestreo 4: los 3 grupos evaluados a los 75 días de la ingesta única. Muestreo 5: los 3 grupos evaluados a los 125 días de la ingesta única (A: alimentado con sangre de conejo e infectada experimentalmente, B: alimentado con sangre de conejo y C: alimentado con sangre de gallina).

Las abundancias bacterianas, si bien mostraron una tendencia a la disminución en función del tiempo post - ingesta, alcanzaron valores del orden de 10^{11} unidades formadoras de colonias.

Las figuras 7 y 8 muestran los valores de abundancia para cada tipo de siembra y el rango de desviación entre el cual oscilan nuestros valores.. Las abundancias estarían oscilando en un rango de 3 ordenes de magnitud por encima o por debajo de los valores obtenidos, representando los valores máximos de error, mas a pesar de este error se observó homogeneidad en la data, indicando la poca ponderación del mismo.

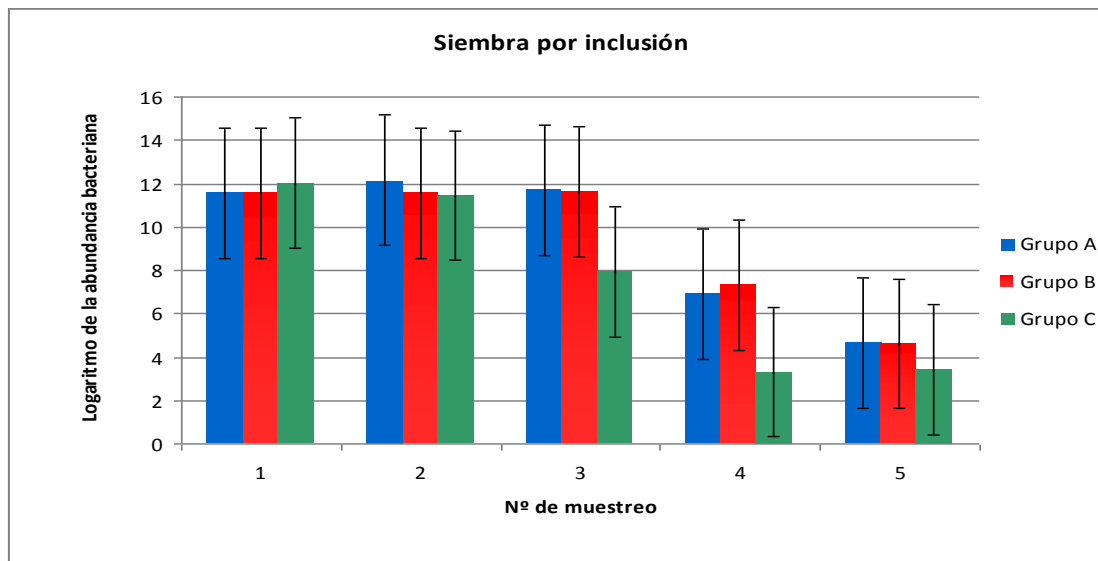


Figura 7. Variaciones en la abundancia bacteriana en la siembra por inclusión según el muestreo, en cada valor de abundación se señala el error standard. Muestreo 1: solo grupos B y C evaluados antes de la ingesta única. Muestreo 2: los 3 grupos evaluados a los 15 días de la ingesta única. Muestreo 3: los 3 grupos evaluados a los 45 días de la ingesta única. Muestreo 4: los 3 grupos evaluados a los 75 días de la ingesta única. Muestreo 5: los 3 grupos evaluados a los 125 días de la ingesta única (A: alimentado con sangre de conejo e infectada experimentalmente, B: alimentado con sangre de conejo y C: alimentado con sangre de gallina).

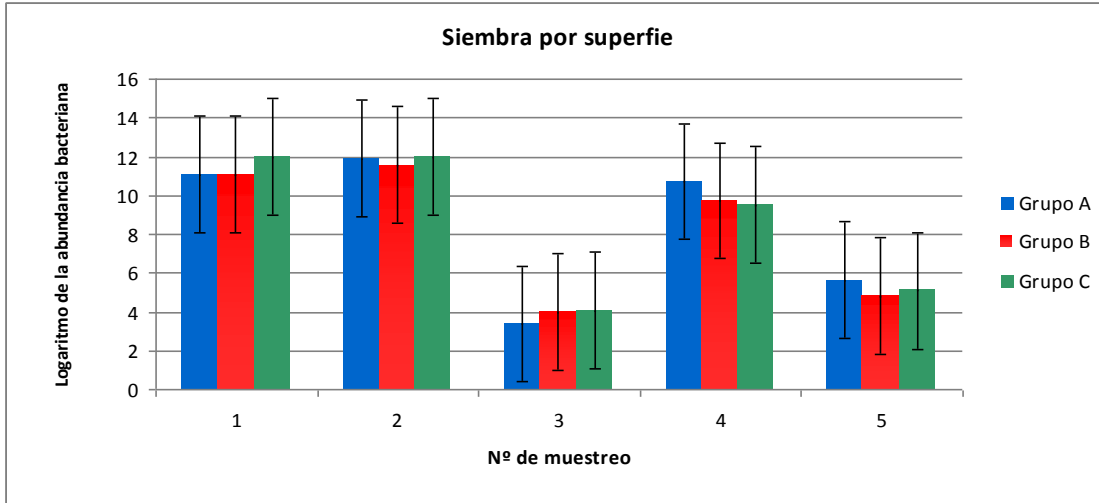


Figura 8. Variaciones en la abundancia bacteriana en la siembra por superficie según el muestreo, en cada valor de abundación se señala el error standard. Muestreo 1: solo grupos B y C evaluados antes de la ingesta única. Muestreo 2: los 3 grupos evaluados a los 15 días de la ingesta única. Muestreo 3: los 3 grupos evaluados a los 45 días de la ingesta única. Muestreo 4: los 3 grupos evaluados a los 75 días de la ingesta única. Muestreo 5: los 3 grupos evaluados a los 125 días de la ingesta única (A: alimentado con sangre de conejo e infectada experimentalmente, B: alimentado con sangre de conejo y C: alimentado con sangre de gallina).

En cuanto a las formas celulares presentes tenemos que la predominante para todos los muestreos y grupos, fueron los bastones Gram negativos, seguido de los cocos Gram negativos y un pequeño porcentaje de cocobastones también negativos (Figura 9). Las pruebas de Gram indicaron que en un principio la predominancia de los Gram negativos fue desapareciendo según avanzaba el ayuno hasta llegar a porcentajes similares a los de las cepas Gram positivas (Bastones en su gran mayoría) en el último muestreo (Figura 10).

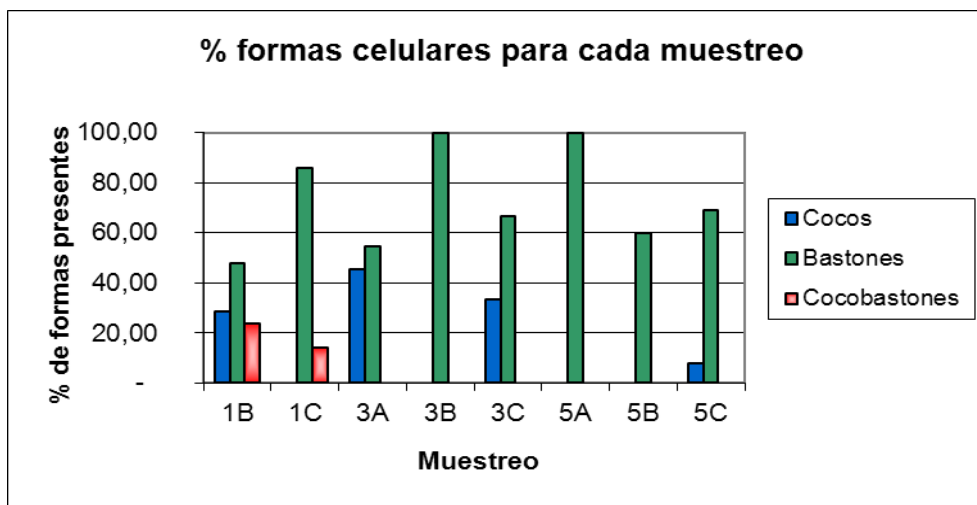


Figura 9. Porcentaje de Formas celulares para cada muestreo y grupo de estudio

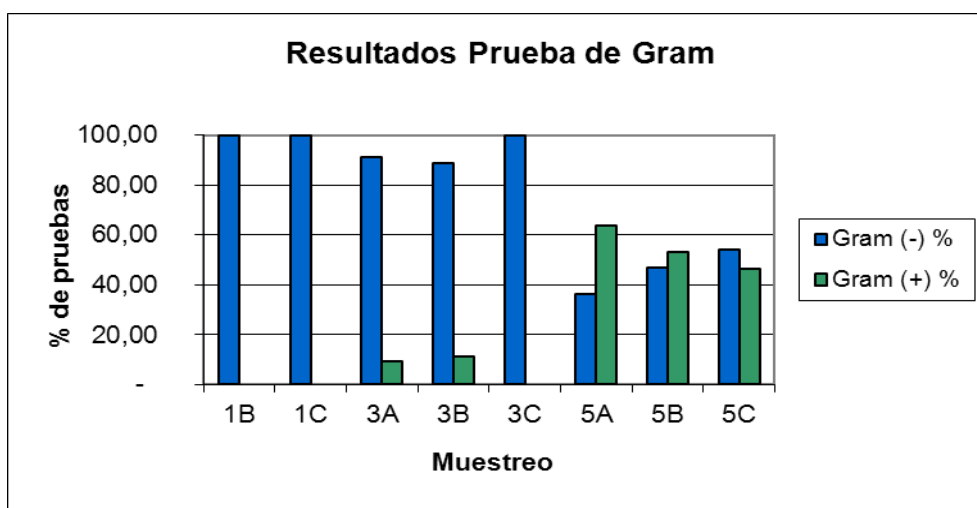


Figura 10. Resultado porcentual de las pruebas de Gram

5.2 Pruebas bioquímicas

Se realizaron pruebas bioquímicas para la identificación de organismos del género *Pseudomonas*, debido a reportes de su presencia en el tracto digestivo de otros insectos hematofagos (Gouveia y col. en el 2008). Los resultados fueron analizados, mediante el uso de analisis cluster, para observar si existian asociaciones entre los grupos bacterianos en cuanto a funcionalidad.

La marcha bioquímica reveló la presencia de enterobacterias de los géneros: *Serratia*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Salmonella*, de los cuales solo el género *Serratia* se ha descrito en otros triatomos (Azambuja y col., 2004). La figura 11, resume las características bioquímicas de los principales géneros de enterobacterias.

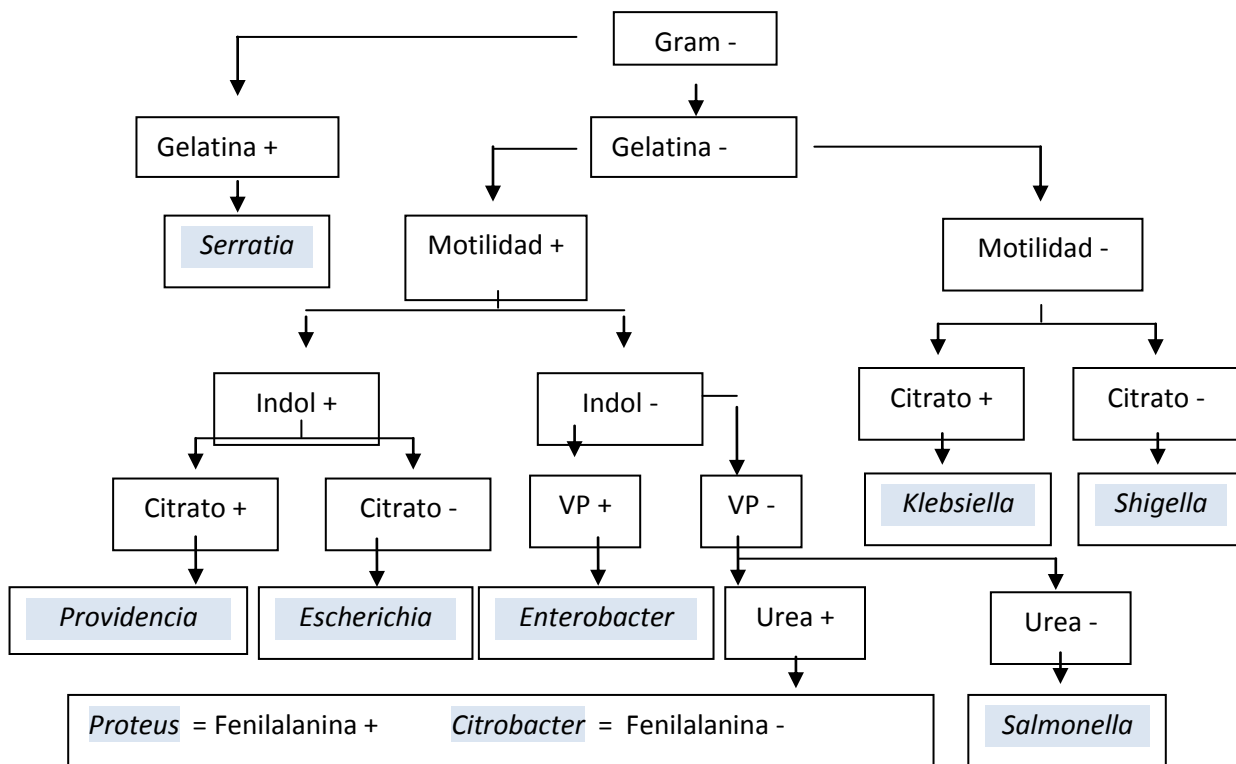


Figura 11. Identificación de los principales géneros de Enterobacteriaceae mediante el análisis funcional.

La batería de pruebas bioquímicas aplicadas, mostró cambios significativos en cada etapa de la digestión analizada (antes de la ingesta única, y a los 45 y 125 días post - ingesta), en cuanto a la predominancia de capacidades metabólicas para la mayor parte de los grupos bacterianos presentes para cada muestreo, señalando diferencias funcionales en la microbiota para cada una de estas etapas.

Las características más predominantes durante el análisis bioquímico de los muestreos para todos los grupos fueron la reducción de nitrato, la producción de H₂S, la utilización de citrato como fuente única de carbono y la hidrólisis del almidón

En el análisis del 1er muestreo, se observó que un 85% de las cepas del grupo B y un 91% de las cepas del grupo C tienen la capacidad de liberar azufre enzimáticamente probablemente de los diferentes aminoácidos que lo contienen, produciendo ácido Sulhídrico (H₂S), reacción que se da en medio ácido, acidez producto de la fermentación de los hidratos de carbono como la glucosa y la lactosa, característica que también se hizo presente en las cepas de los dos grupos para este muestreo (Figura 12).

En un 90% y 91% de las cepas de B y C respectivamente, se observó la capacidad de reducir el nitrato en nitritos o en nitrógeno libre, proceso a asociado a la degradación de materia orgánica (Mc Faddin, 1978). La utilización de citrato también estuvo representada en un 60% de las cepas en B y en 57% de las cepas en C (Figura 12).

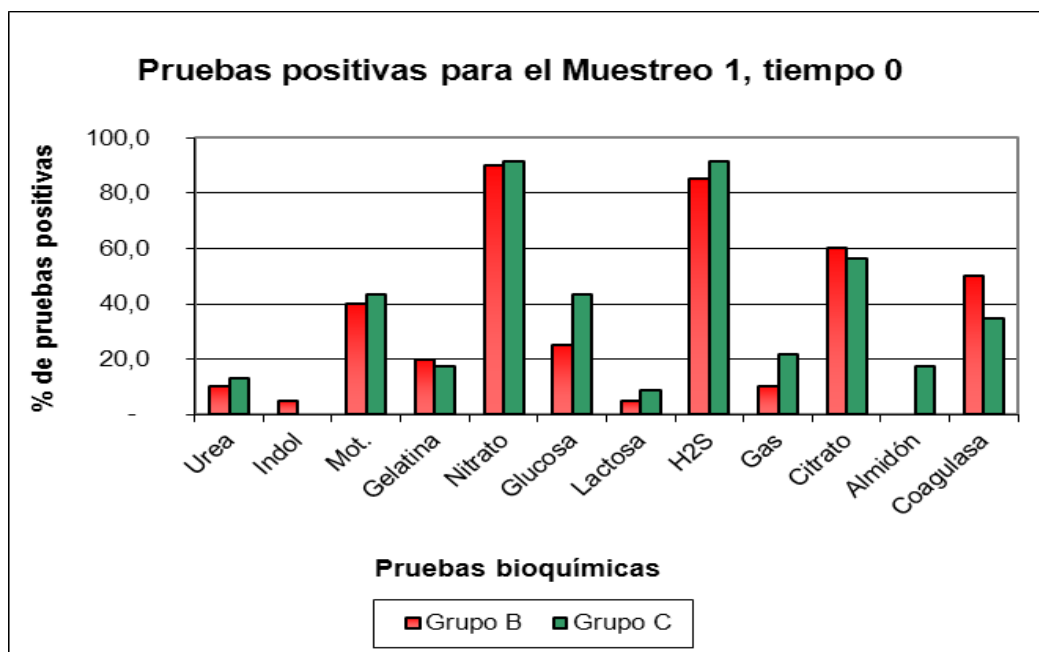


Figura 12. Proporción de pruebas positivas (no excluyentes) para los grupos del muestreo 1, previo a la ingesta única (B: alimentado con sangre de conejo y C: alimentado con sangre de gallina).

Al analizar bioquímicamente el 3er muestreo observamos cambios drásticos en las características predominantes para este ensayo en referencia al primer muestreo. Las más evidentes son las presentes en el grupo B, donde si bien se mantiene un alto porcentaje en la reducción de nitrato, hay un aumento brusco en la producción de la enzima amilasa, capaz de hidrolizar el almidón (71 % de las cepas) (Figura 13).

Los Grupos A y C por su parte mostraron en el 3er muestreo, disminuciones en las cepas capaces de reducir nitratos, mostrando porcentajes de 27 y 56 % respectivamente, igual al grupo B, se observó un aumento de las cepas que crecen en agar *Pseudomonas* F y P, así como el aumento en las cepas capaces de hidrolizar almidón, aunque en menor proporción. La utilización de citrato disminuyó en todos los grupos (Figura 13). La producción de ácido Sulhídrico (H₂S), es una característica bioquímica que desaparece en el 3er muestreo, así como la capacidad de degradar glucosa.

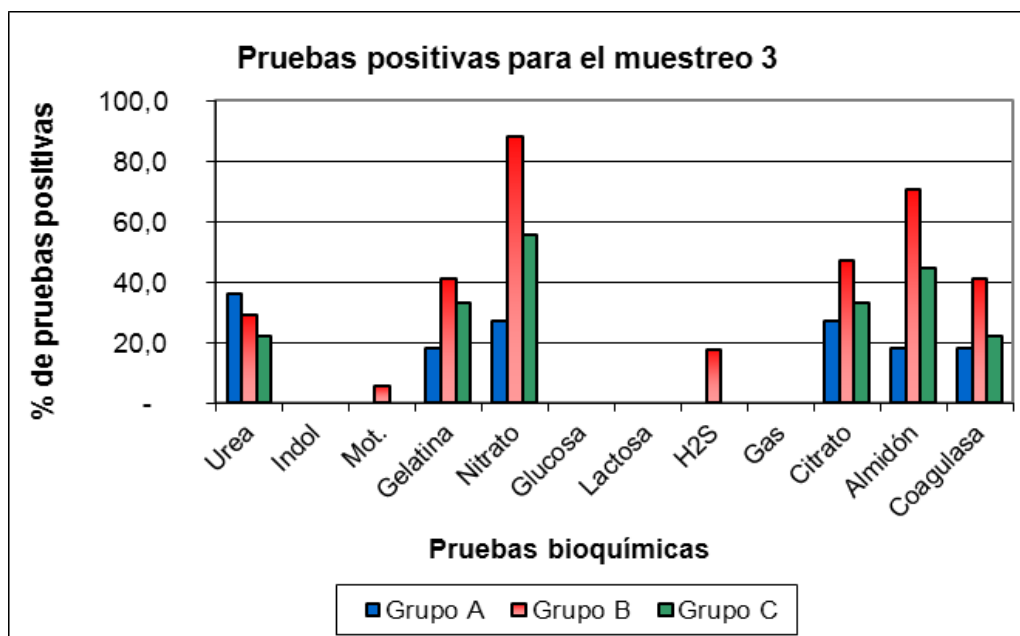


Figura 13. Proporción de pruebas positivas para los grupos del muestreo 3, a los 45 días de la ingesta única (A: alimentado con sangre de conejo e infectada experimentalmente, B: alimentado con sangre de conejo y C: alimentado con sangre de gallina).

En el último muestreo, la reducción de nitratos se presentó en altos porcentajes en las cepas para todos los grupos (81% en A, 100% en B y 92% en C) y vuelve a tener valores relevantes la utilización de citrato como fuente de carbono. Desapareció la producción de amilasa, por lo que las pruebas en agar almidón dieron negativas en su totalidad para los 3 grupos(Figura 14).

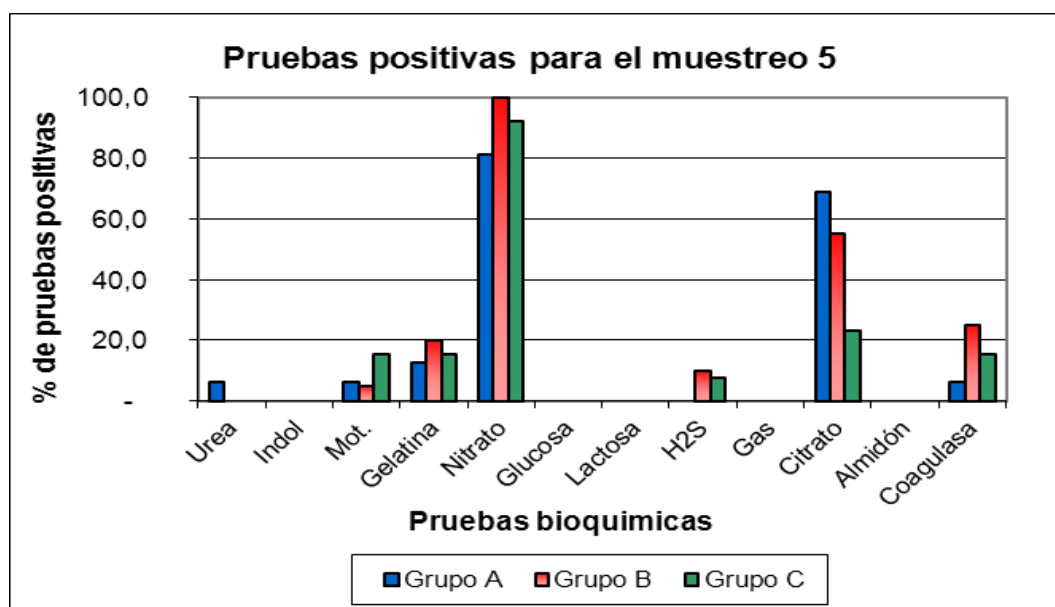


Figura 14. Proporción de pruebas positivas para los grupos del muestreo 5, a los 125 días de la ingesta única (A: alimentado con sangre de conejo e infectada experimentalmente, B: alimentado con sangre de conejo y C: alimentado con sangre de gallina).

Por su parte la abundancia del género *Pseudomonas* parece favorecida por el ayuno del vector, pues como observamos en la Figura 15, hay mayor abundancia de las mismas en los últimos dos muestreos, para todos los grupos de estudio. Otra observación de interés, es que en el grupo A, infectado experimentalmente, se registran los menores porcentajes de aparición de *Pseudomonas*.

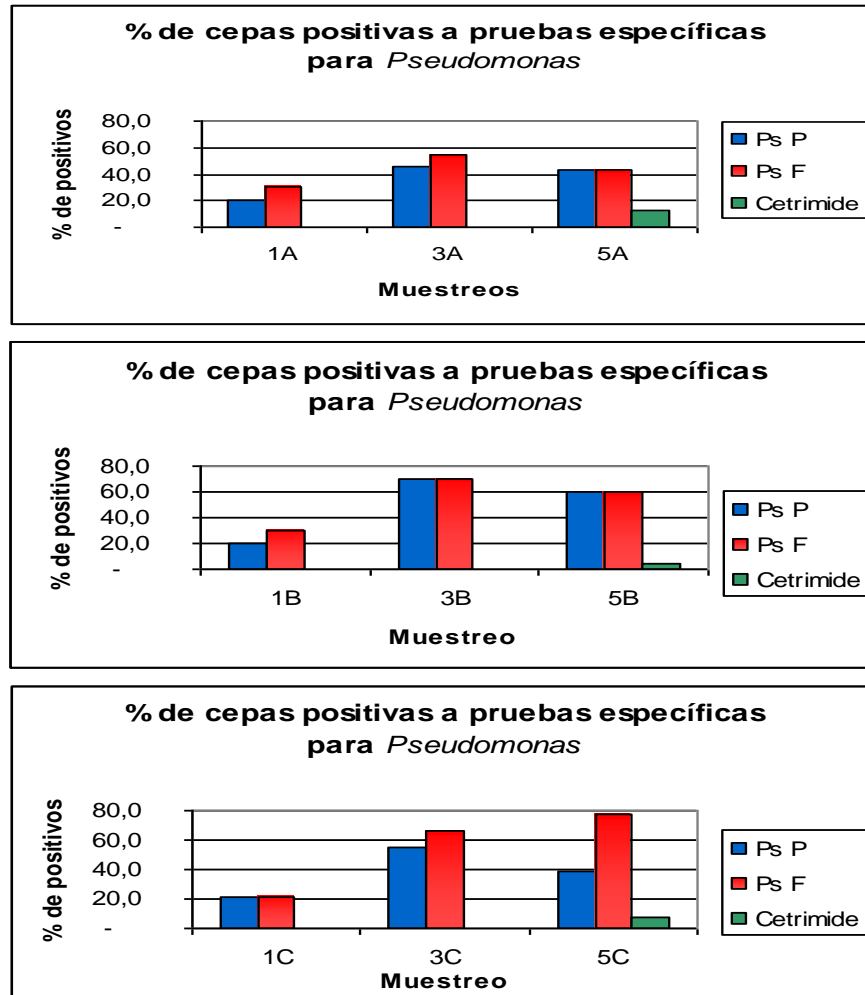


Figura 15. Porcentajes de aparición del género *Pseudomonas* para los 3 grupos de estudio en cada muestreo. Muestreo 1: evaluación antes de la ingesta única y evento de infección del grupo A. Muestreo 3: los 3 grupos evaluados a los 45 días de la ingesta única y evento de infección del grupo A. Muestreo 5: los 3 grupos evaluados a los 125 días de la ingesta única y evento de infección del grupo A. (PsP: *Pseudomonas* agar P, PsF: *Pseudomonas* agar F, la composición y función de estos medio se encuentra descrita en la tabla II).

5.3 Análisis de Cluster

El análisis de cluster aplicado a los dos grupos del primer muestreo reveló que existen diferencias en la biota microbiana según el tipo de fuente alimenticia. El grupo B alimentado con sangre de conejo y el grupo C alimentado con sangre de gallina solo compartieron 3 grupos de identidad funcional, es decir, con iguales características metabólicas (figura 16).

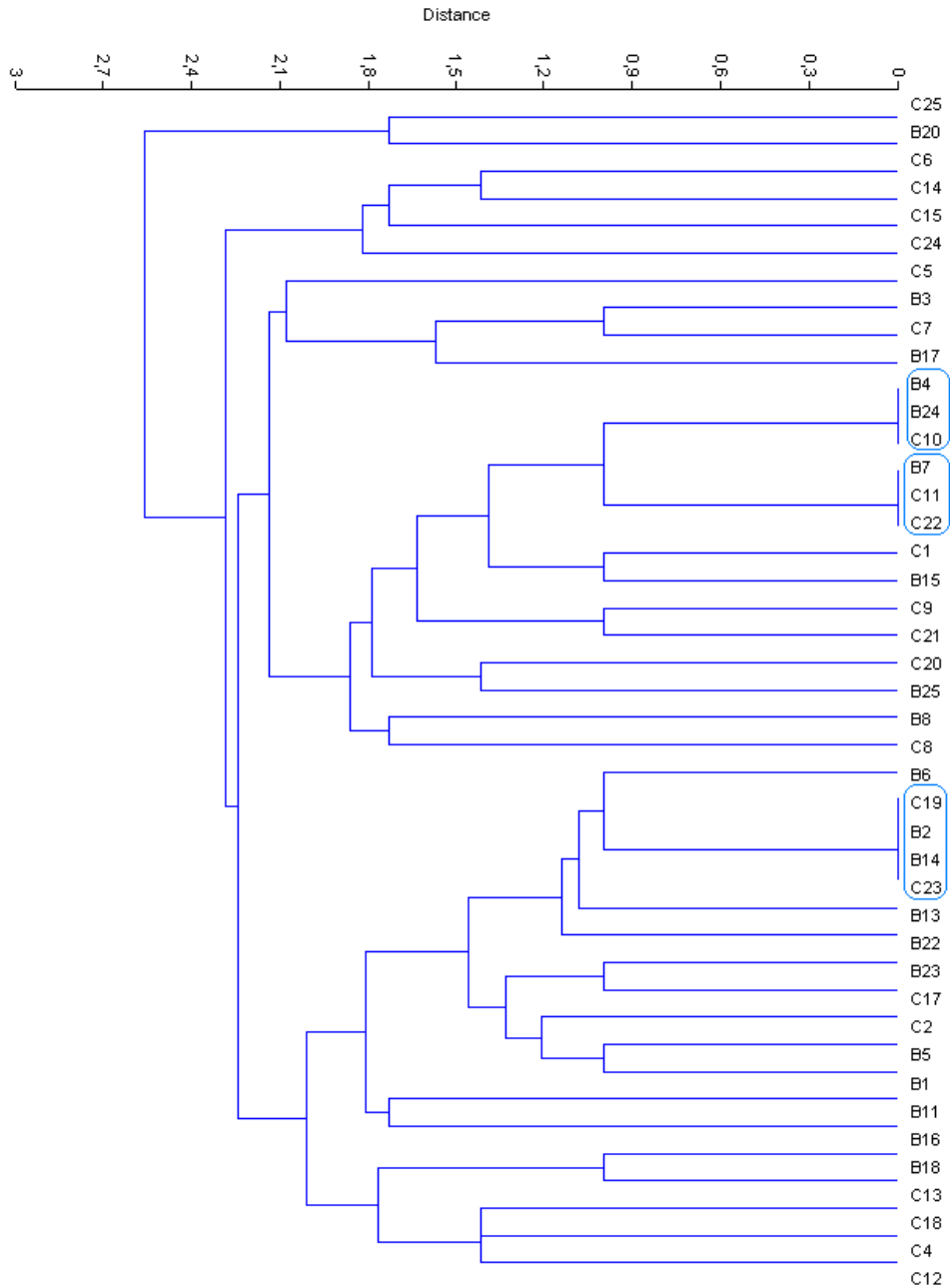


Figura 16. Análisis de clúster de los grupos B (alimentado con sangre de conejo) y C (alimentado con sangre de gallina) del primer muestreo, previo al evento de infección (A = B). Los recuadros corresponden a los grupos de identidad funcional que comparten B y C. El grupo B fue alimentado con sangre de conejo y el grupo C con sangre de gallina

Por otra parte se realizó un seguimiento de los tres grupos para observar si la biota presente al comienzo del ensayo se mantenía a medida que la sangre era digerida. Al realizar los análisis de clúster que se muestran en las figuras 17, 18 y 19 se visualizó que no existen

grupos de identidad funcional que se mantengan a lo largo de los 3 muestreos para ninguno de los grupos de estudio.

El clúster obtenido al comparar los 3 muestreos del grupo A muestra 8 grupos de identidad funcional, pero solo uno de ellos involucra microorganismos de dos de los muestreos, mientras que los demás solo agrupan cepas de un mismo ensayo. Esto es indicativo de que las cepas bacterianas presentes en cada etapa del muestreo son funcionalmente distintas, y dado que las características metabólicas de los grupos bacterianos son en general constantes, estaríamos en presencia de grupos bacterianos diferentes en el 1er, 3er y 5to muestreo (Figura 17).

Cabe recordar que en el clúster del grupo A en el tiempo post - ingesta se incluye el grupo B del primer muestreo, pues antes del evento de infección experimental, el grupo A y B formaba una misma población (misma procedencia y fuente alimenticia), por lo que el grupo A poseía la misma biota inicial que B.

La variación de la biota microbiana presente en el grupo A, es también observable en los otros dos grupos de estudio, pues en todos los pocos grupos de identidad funcional presentes, son solo agrupaciones de cepas de un mismo muestreo, es decir, las cepas presentes un muestreo no permanecen en los muestreos sucesivos.

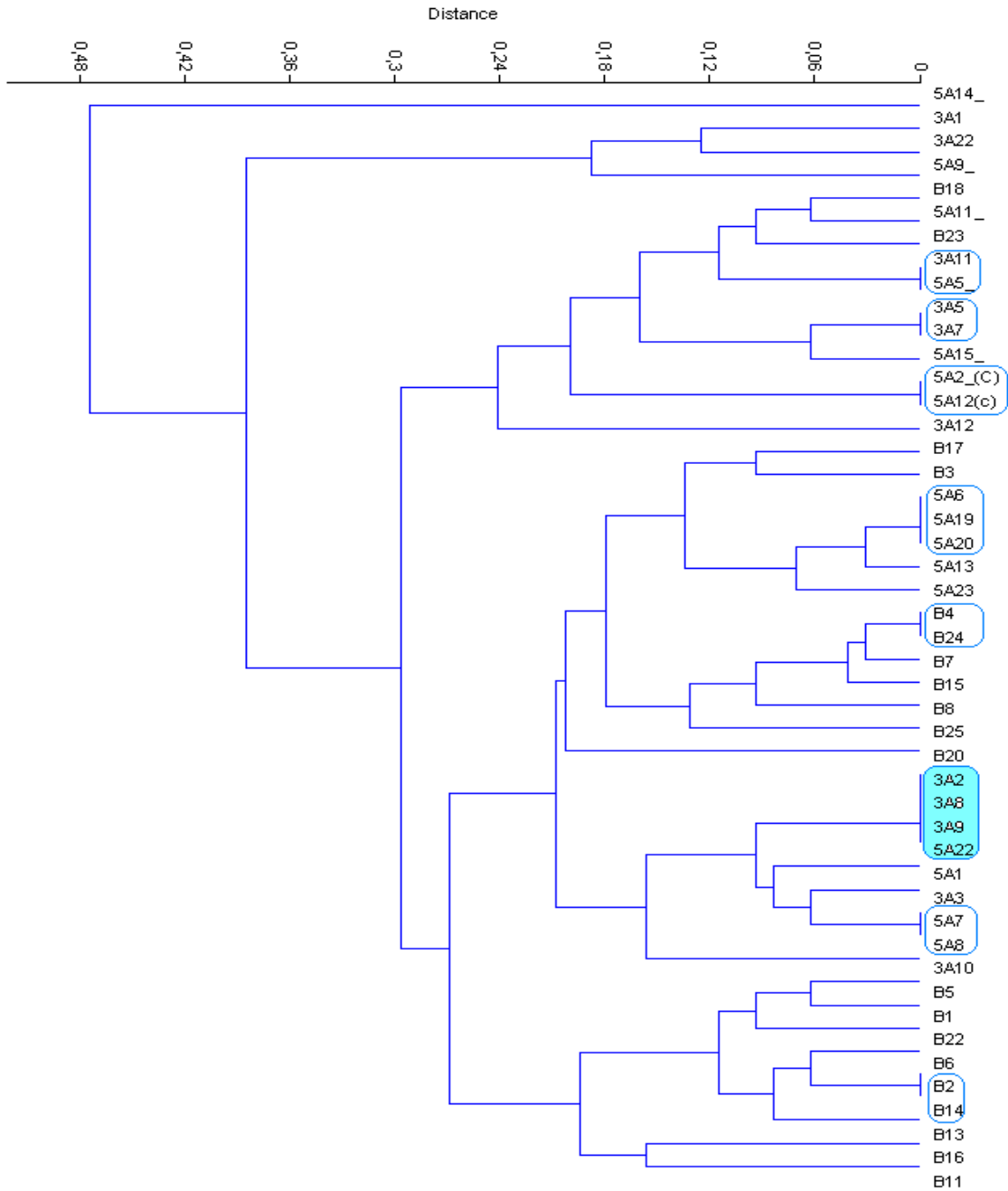


Figura 17. Análisis de clúster comparativo del Grupo A en los 3 muestreos. Se observa que solo existe un grupo de identidad funcional compartido por los muestreos 3 y 5 (azul intenso), los demás grupos de identidad señalados por recuadros, solo aparecen asociando organismos de un mismo muestreo. (Para señalar el muestreo y el grupo de estudio se utilizó la nomenclatura del siguiente ej: 5 A 7 = Muestreo 5, Grupo A, cepa número 7.) En este análisis se incluye el grupo B del primer muestreo, pues antes de la infección experimental, el grupo A y B formaba una misma población (misma procedencia y fuente alimenticia), por lo que el grupo A poseía la misma biota inicial que B. El grupo A fue alimentado con sangre de conejo y se encontraba experimentalmente infectado para los muestreos n° 3 (45 días) y 5 (125 días).

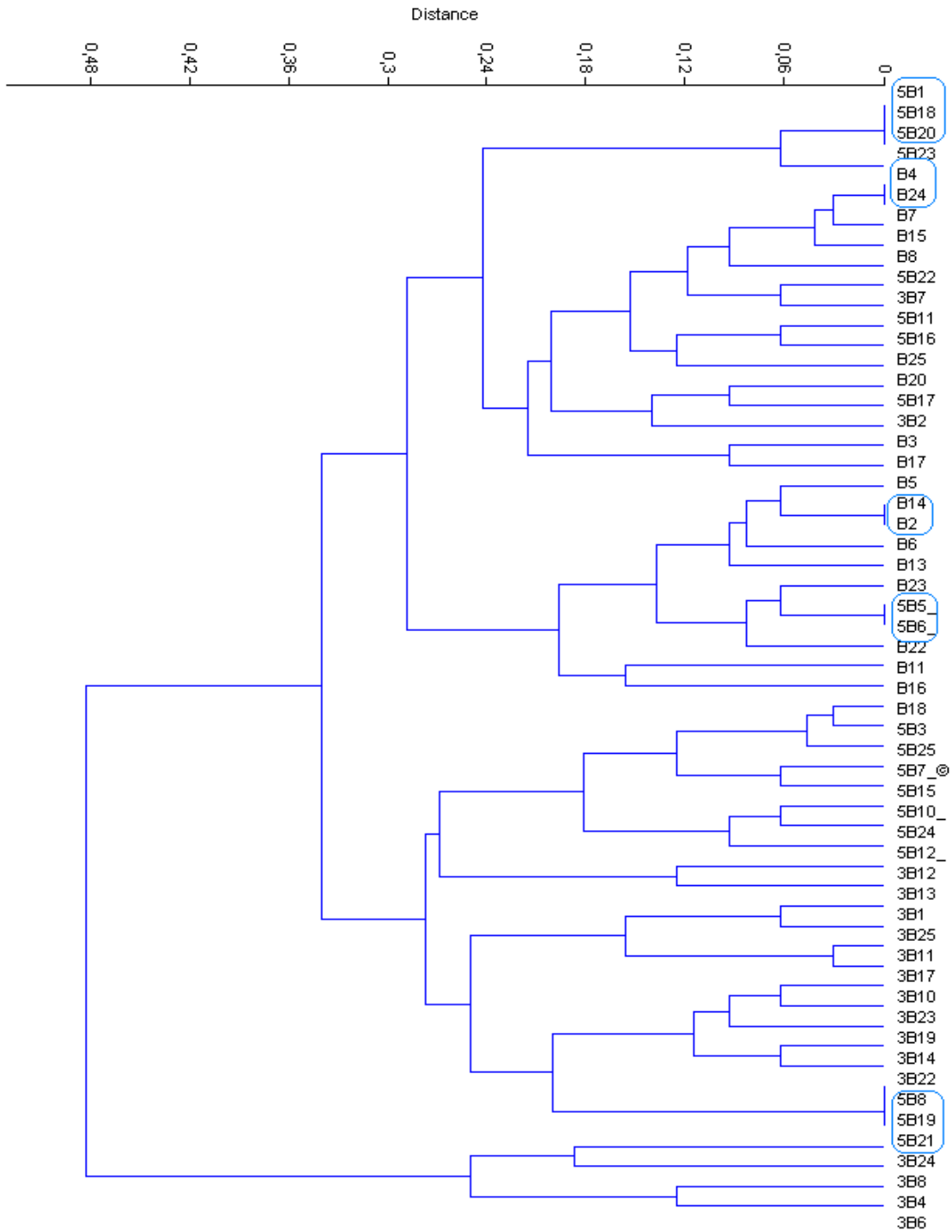


Figura 18. Análisis de cluster comparativo del Grupo B en los 3 muestreos. Se observa que no existen grupos comunes entre los muestreos, pues los grupos de identidad solo aparecen asociando organismos de un mismo muestreo, siendo señalados con recuadros. (Para señalar el muestreo y el grupo de estudio se utilizo la nomenclatura del siguiente ej: 3 B 12 = Muestreo 3, Grupo B, cepa número 12). El grupo B fue alimentado con sangre de conejo sin infección.

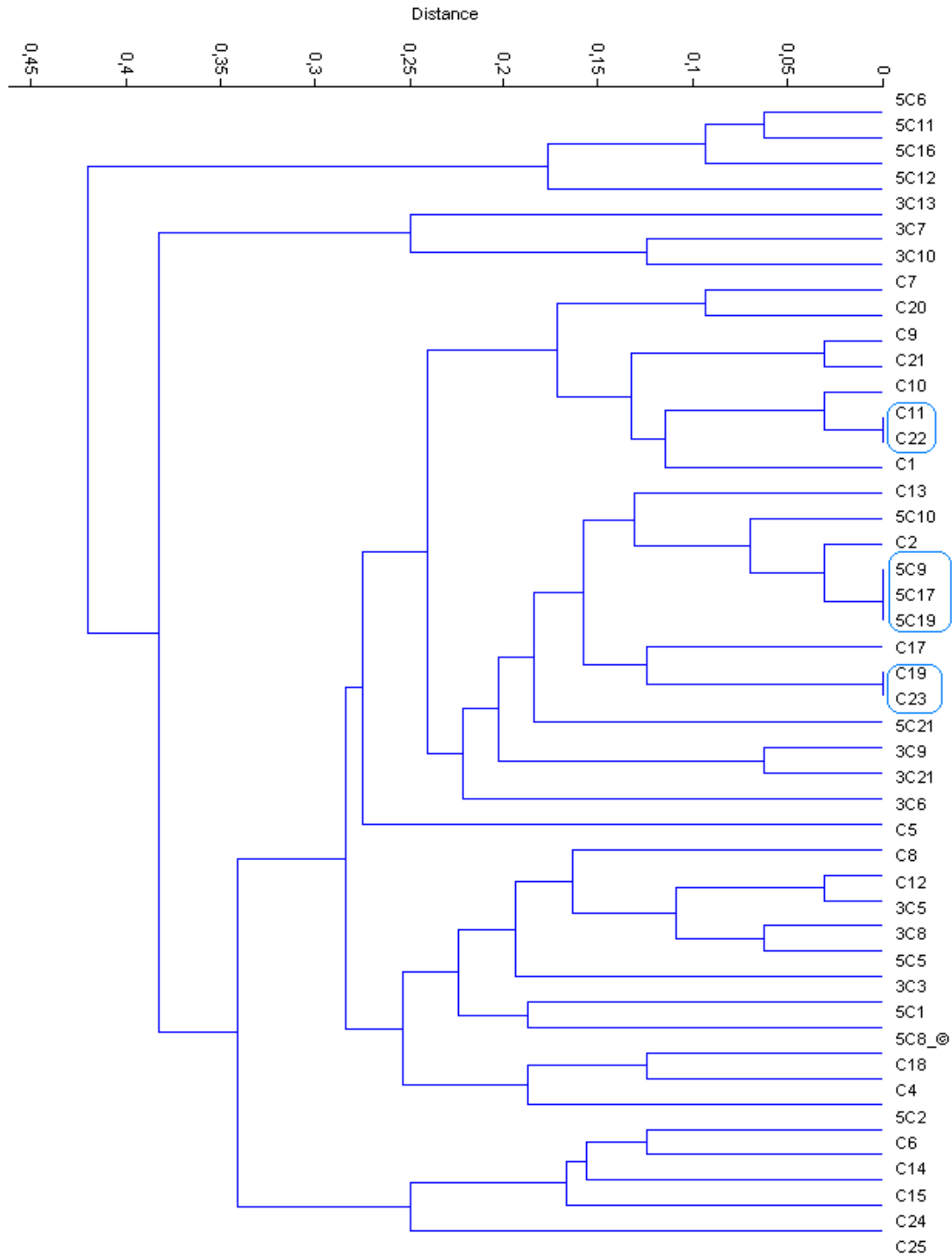


Figura 19. Análisis de cluster comparativo del Grupo C en los 3 muestreos. Se observa la ausencia de grupos de identidad funcional entre varios muestreos, pues grupos de identidad funcional presentes solo asocian organismos de un mismo muestreo, siendo señalados con recuadros. (Para señalar el muestreo y el grupo de estudio se utilizó la nomenclatura del siguiente ej: 3 C 6 = Muestreo 3, Grupo C, cepa número 6). El grupo C fue alimentado con sangre de gallina sin infección.

Al comparar los grupos A, B y C durante el 3er muestreo es llamativo, que solo existe un grupo funcional compartido entre A y C y uno compartido entre B y C, por lo que se tienen una gran cantidad de grupos funcionales independientes entre si, ausentes en el muestreo 1 (Figura 20).

Para el 5to muestreo, momento de prolongado ayuno de los triatomos, (125 días post – ingesta) se observaron 3 grupos de identidad funcional compartidos entre A, B y C, así como un 4to grupo de identidad compartido solo por A y B, prevalecientes en esta etapa de la digestión, con similitudes funcionales, aunque la mayor parte de la biota microbiana se mostró diferente para todos los grupos (Figura 21).

El grupo de identidad funcional conformado por las cepas 5A2, 5A12, 5B7 y 5C8 que se observa en la figura 21, resulto ser un grupo cuyas pruebas bioquímicas dieron positivas en medios exclusivos para *Pseudomonas*, entre ellos el medio agar Cetrimide, exclusivo para *Pseudomonas aeruginosa*, cepas que solo se encuentran presentes en el 5to muestreo en los 3 grupos.

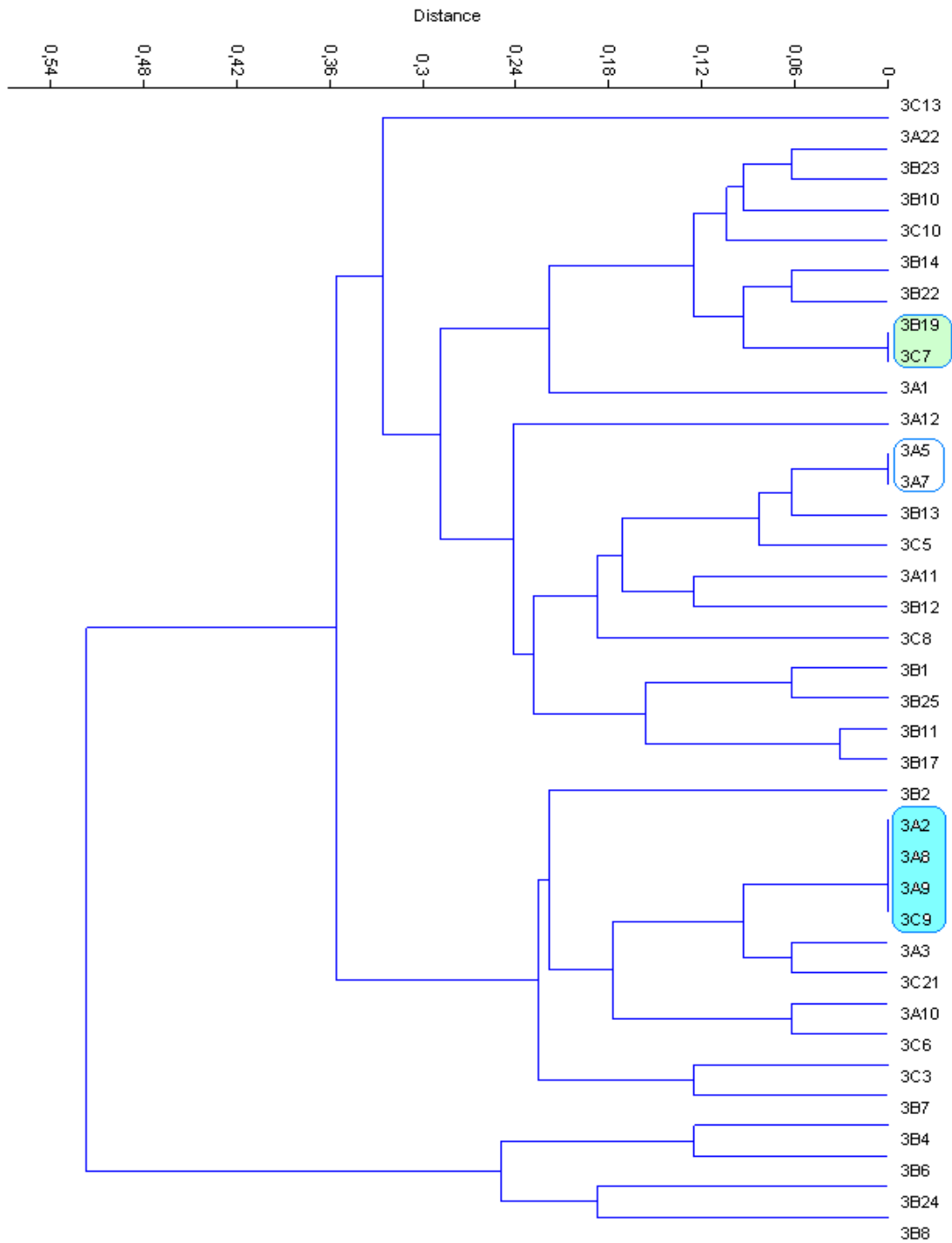


Figura 20. Análisis de cluster comparativo de los Grupos A, B y C en el 3er muestreo. Se observa que solo existe un grupo compartidos entre A y B (señalado en verde) y un grupo compartidos entre A y C (señalado en azul), pues el otro grupo de identidad solo asocia organismos de un mismo grupo de estudio. (Para señalar el muestreo y el grupo de estudio se utilizó la nomenclatura del siguiente ej: 3 A 2 = Muestreo 3, Grupo A, cepa número 2.) El grupo A fue alimentado con sangre de conejo y experimentalmente infectado, El grupo B fue alimentado con sangre de conejo sin infección y el grupo C fue alimentado con sangre de gallina sin infección.

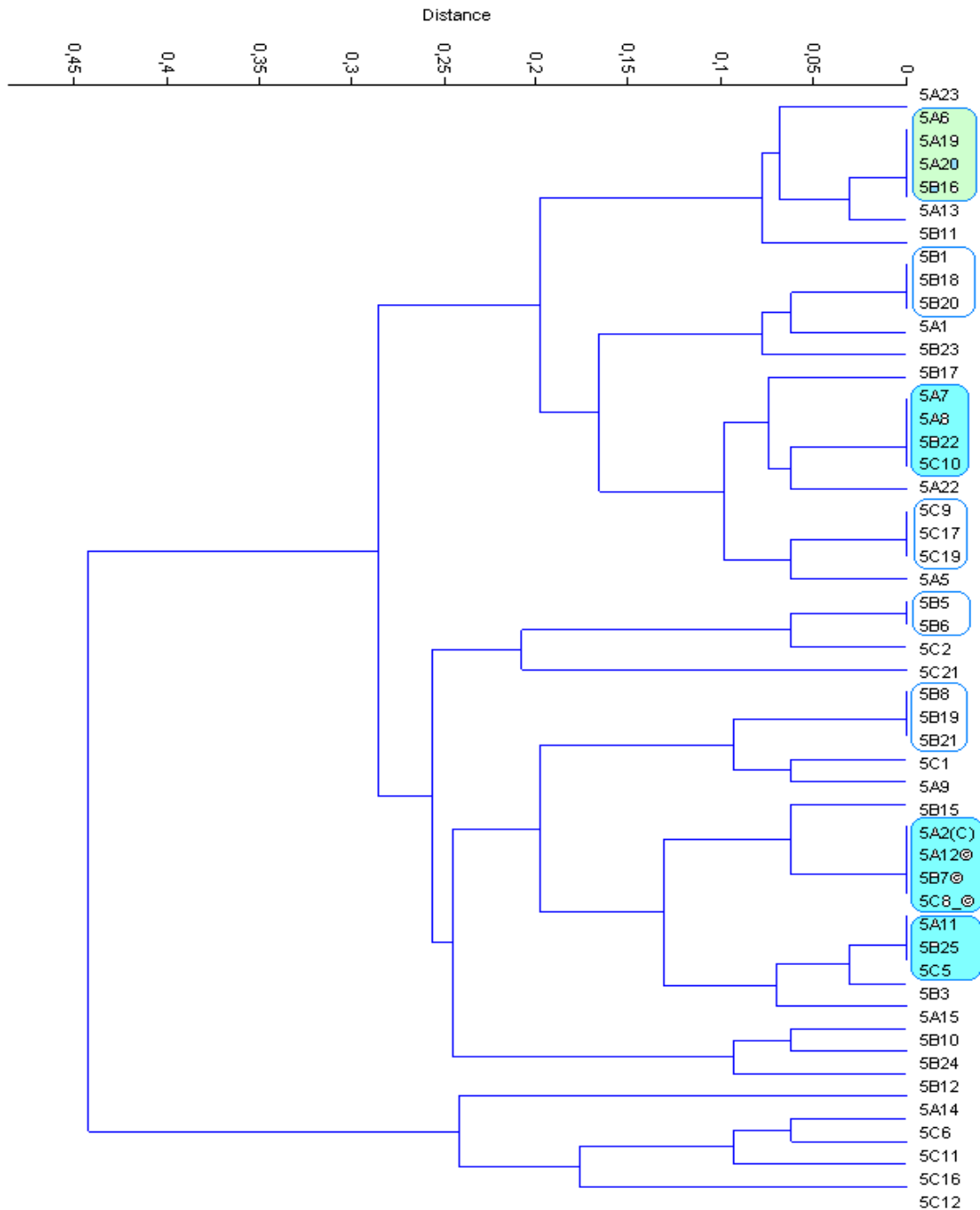


Figura 21. Análisis de cluster comparativo de los Grupos A, B y C en el 5to muestreo. Se observa que existen 3 grupos compartidos entre A, B y C (señalados en azul) y un grupo compartido por A y B (señalado en verde), los demás grupos de identidad, (señalados con recuadros) solo aparecen asociando organismos de un mismo grupo de estudio (Para señalar el muestreo y el grupo de estudio se utilizó la nomenclatura del siguiente ej: 5 A 7 = Muestreo 5, Grupo A, cepa número 7). El grupo A fue alimentado con sangre de conejo y experimentalmente infectado, El grupo B fue alimentado con sangre de conejo sin infección y el grupo C fue alimentado con sangre de gallina sin infección.

5.4 Estudio de la biota fúngica

Tras la siembra en agar malta se han aislado alrededor de 10 morfotipos distintos de hongos, logrando identificar hasta los momentos por observación al microscopio (100X) de los microcultivos de 4 y 7 días, individuos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y un grupo con características similares al género *Chrysosporium*, en base a sus estructuras reproductivas, los tres primeros han sido ya descritos en triatominos.

El género *Aspergillus*, se presentó como un hongo filamentoso, con hifas tabiculares y conidióforas cuya cabeza está localizada en el extremo de un hifa, compuesta por una vesícula rodeada por una corona de fiálides (células conidiógenas) en forma de botella directamente insertadas sobre la vesícula. De las fiálides se desprenden las esporas (conidios) (Figura 22).

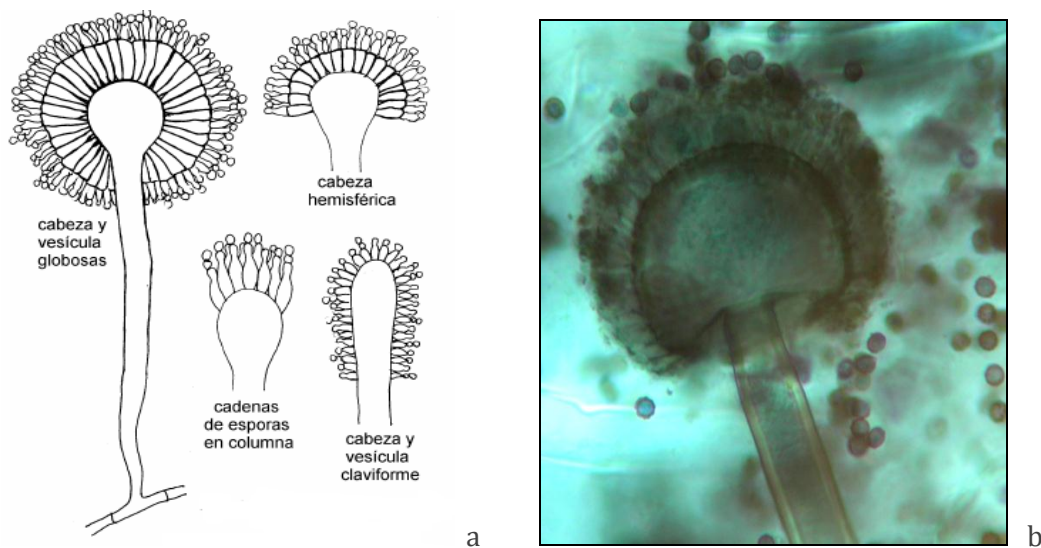


Figura 22. a. Esquema de las estructuras reproductivas de *Aspergillus* sp .b. Fotografía tomada al microscopio de una de las especies del género *Aspergillus* halladas en el estudio. (Foto: Joshimer Rodríguez)

Los *Penicillium* por su parte fueron reconocidos por los conidióforos, simples o ramificados y terminados por los racimos de fiálides en forma de botella. (Figura 23). Las esporas (conidios) se observaron en cadenas cerca de las extremidades de los fiálides (la más

joven en la base de la cadena), las ramificaciones de los conidióforos son una característica de importancia taxonómica (Carrillo, 2003).

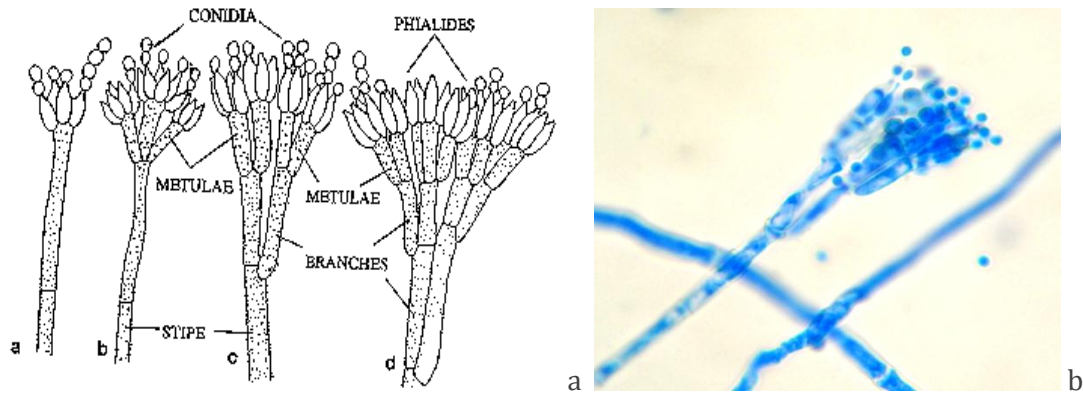


Figura 23. a. Esquema de las estructuras reproductivas de *Penicillium* sp .b. Fotografía tomada al microscopio de una de las especies del género *Penicillium* halladas en el estudio. (Foto: Joshimer Rodriguez)

El género *Trichoderma*, representa un grupo de hongos filamentosos que se reconoció por sus conidióforos hialinos y ramificados, con Fiálides también hialinas, en forma de frasco abultadas en la base, uniéndose a los conidióforos en ángulo recto. En cultivo forman colonias verdes, con parches amarillos y en ocasiones blanquecinos (Figura 24).

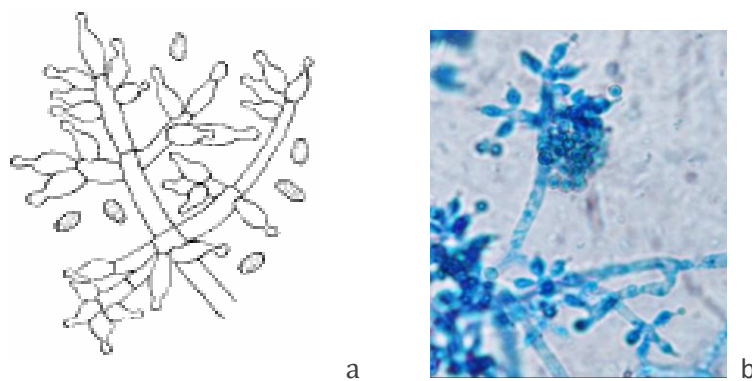


Figura 24. a. Esquema de las estructuras reproductivas de *Trichoderma* sp .b. Fotografía tomada al microscopio de una de las especies del género *Trichoderma* halladas en el estudio. (Foto: Joshimer Rodriguez)

El género *Chrysosporium* por su parte, presenta colonias de color beige en medio agar malta, donde las células conidiogénicas se producen directamente de las hifas vegetativas, (Figura 25), comprende aproximadamente 60 especies y no ha sido descrito en triatominos ni en otros insectos, algunas especies son patógenas oportunistas produciendo infecciones sistémicas y localizadas en el hombre y los animales. (Vidal, 1999; Argumedo y col., 2009; Guedez y col., 2009)

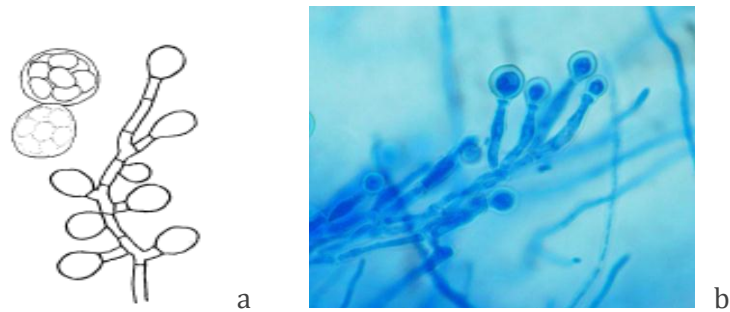


Figura 25. a. Esquema de las estructuras reproductivas de *Chrysosporium* sp. .b. Fotografía tomada al microscopio de una de las especies del género *Chrysosporium* halladas en el estudio. (Foto: Joshimer Rodríguez)

El género *Rhizopus* fue reconocido por la presencia de hifas aéreas, colonia blanca en las primeras fases pero que se vuelve oscura a medida que maduran los esporangios que se tornan negros, presencia de hifas con pie y esporas estriadas (Figura 26).

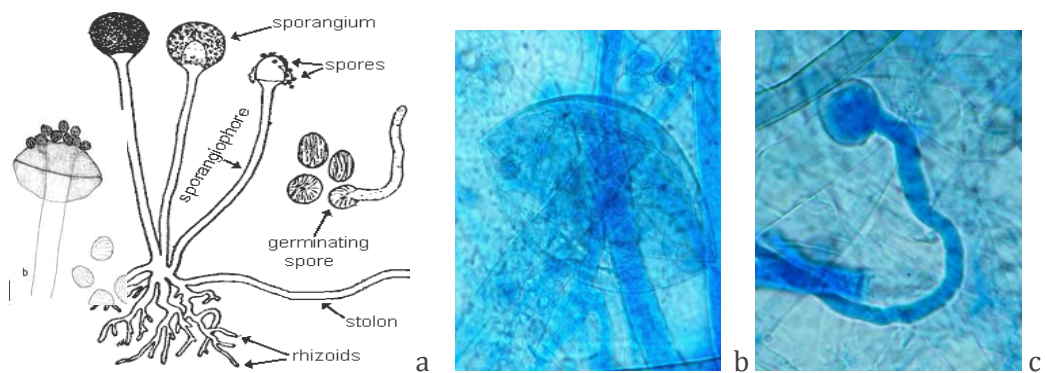


Figura 26. a. Esquema de representante del género *Rhizopus* b. Fotografía de la estructuraacampanada del representante del género *Rhizopus* aislado en nuestro ensayo. c. Fotografía tomada al microscopio de las esporas germinando de la especie del género *Rhizopus* hallada en el estudio (Fotos: Joshimer Rodríguez)

6. Análisis de resultados

6.1 Diversidad bacteriana

La disminución en la diversidad de la biota microbiana según transcurre el tiempo post-ingesta podría asociarse: a) con la disminución progresiva de nutrientes utilizados por los microorganismos en el tracto digestivo a medida que la sangre es digerida, por lo cual la tendencia de los 3 grupos de estudio es similar, ya que en los 3 la diversidad bacteriana disminuye en el tiempo. b) que los nutrientes no disminuyan pero las condiciones fisicoquímicas del medio cambian con la digestión sanguínea, dada su relación con el ayuno, el cual pareciera estar ejerciendo influencia en la diversidad de microorganismos presentes, posiblemente la biota que queda al final pudiese ser la que está altamente adaptada a estas condiciones de estrés nutricional, resultados que se corroboran con las pruebas de Gram, donde observamos grandes diferencias entre el primero y el último muestreo, principalmente en el aumento de las cepas Gram positivas.

Sin embargo, es importante resaltar que en los grupos control, si bien la tendencia es similar, el grupo B presenta una variedad de morfotipos mayor a la que presenta el grupo C en los 3 primeros muestreos, mientras que en los últimos dos muestreos la relación se invierte, siendo la variable que diferencia a B de C, la fuente alimenticia. Esta diferencia pueda estar fundamentada en el hecho de que la biota microbiana que se expresa para cada fuente sanguínea ingerida y sus componentes serológicos, serían condicionantes del microambiente en el tracto intestinal del insecto.

Ha sido descrito el aporte y metabolización de nutrientes esenciales por parte de los simbiontes a los triatomíneos, otros estudios señalan que diferencias observadas en el desarrollo de los vectores con diferentes fuentes alimenticias son el resultado de las características nutricionales de la sangre de los donadores, esto explicaría las diferencias en la

diversidad de organismos encontrados para los grupos control B y C, alimentados con sangre de mamífero y sangre aviar respectivamente. (Guarneri y col, 2000)

Se sabe además que en los triatominos existen numerosas relaciones interespecíficas no obligatorias y que este mutualismo puede llegar a ser esencial para el triatomino solo cuando se alimenta sobre cierto grupo de hospedadores (Friend y col, 1982)

El grupo A alimentado con sangre de conejo e infectado experimentalmente mostró una variedad de morfotipos mayor que los dos grupo controles para todos los muestreos, incluso cuando el grupo B fue alimentado con la misma fuente, siendo la única variable que los diferencia la presencia del parásito. Esto podría llevar a pensar que *T. cruzi* presenta sinergia con ciertos grupos bacterianos o ejercería influencia en la composición química del medio permitiendo la selección de grupos bacterianos (Eichler y Schaub, 2002).

La abundancia bacteriana que durante los primeros 3 muestreos se mantuvo por el orden de 10^{11} , disminuyó para los muestreos 4 y 5, como resultado del ayuno prolongado y la disminución de nutrientes en el medio. Estudios en *R. prolixus* y *T. infestans* señalan que la abundancia bacteriana en estos vectores esta por el orden de 10^9 (Eichler y Schaub, 2001), nuestros valores de abundancia son de mayor magnitud, Dos aspectos podrían explicar estos altos valores, errores del operador, acumulados durante las diluciones del material de siembra, o bien puede ser explicado por el mayor tamaño del género en estudio (*P. geniculatus*) y por consiguiente mayor volumen de contenido intestinal con respecto a otros triatominos . Otra explicación, radicaría en el hecho de que grupos bacterianos facultativos, transmitidos horizontalmente por coprofagia como ocurre entre los triatominos, pudiesen manifestarse como poblaciones de alta abundancia ya que se reinstalan en estos vectores una y otra vez favorecida además por el hecho de que los triatominos son gregarios (los triatominos se mantuvieron agrupados durante todo el experimento) y así puede darse la coprofagia como un evento frecuente y reiterativo (Grijalva y Giraldo, 2006).

A pesar que los datos de abundancia revelaron tres unidades por encima y o por debajo (error estándar), se debe considerar que de producirse errores significativos en alguno de los muestreos no podríamos haber obtenido una data de abundancia tan homogénea, y con tendencias similares como la observada para los 3 grupos en cada muestreo, siendo la única excepción la que se presenta en el grupo C, 3er muestreo en la siembra por inclusión, donde la abundancia es evidentemente menor a los grupos A y B. Esta tendencia se repitió en muestreos sucesivos, donde la abundancia en C siempre estuvo por debajo de los otros dos grupos de estudio. Esto abre la hipótesis de que la alta abundancia bacteriana estaría altamente influenciada por las condiciones fisicoquímicas o nutricionales del medio intestinal de los triatominos.

6.2 Pruebas bioquímicas

Al trabajar con simbioses del tracto digestivo, se tomó como base para el análisis funcional una marcha bioquímica para la identificación de bacterias de la familia de las Enterobacteriaceae. Si bien en el primer muestreo se encontraron colonias pertenecientes a los géneros *Klebsella* y *Enterobacter*, en el grupo B y *Serratia*, *Shigella* y *Salmonella* en el grupo C, es interesante señalar que se encontraron muchas cepas bacterianas que no formaban parte de esta familia, y que necesitarán a futuro la ampliación de estos estudios para ser identificadas taxonómicamente. No obstante el género *Pseudomonas*, pudo ser reconocido mediante pruebas específicas y una de las especies de *Pseudomonas* aislada de las ninfas de *P. geniculatus* fue atribuida a *P. aeruginosa*.

Encontramos que los géneros *Klebsella*, *Enterobacter* y *Serratia*, así como adicionalmente bacterias del género *Pseudomonas*, forman parte de la microbiota de otros insectos hematófagos como *Lutzomyia longipalpis*, vector de la Leishmaniasis (Gouveia y col. en el

2008), por lo que posiblemente la ingesta sanguínea y como ocurre su metabolización pudiese ser un factor condicionante el cual merece mayor estudio (Gouveia y col. en el 2008).

Los organismos clasificados como entéricos, y por lo tanto pertenecientes a la familia enterobacteriaceae, son degradadores de glucosa por definición, y la ausencia de esta capacidad en los microorganismos presentes en los muestreos 3 y 5, indica la desaparición de la biota de enterobacterias para ser sustituida por una microbiota que debe ser clasificada definitivamente como no entérica, y que siendo incapaz de obtener sus nutrientes de los hidratos de carbono acude a las pectonas del medio (Mc Faddin, 1978), pero que por su abundancia y prevalencia podríamos deducir que se encuentran bien adaptadas al lumen intestinal de estos insectos. La adquisición de microorganismos no entéricos puede estar relacionado con los hábitos coprófagos comunes entre los triatominos, ya que en las heces pueden desarrollarse diversidad de microorganismos que dada su adaptabilidad pueden o no prevalecer en el lumen intestinal (Friend y col, 1982).

Dentro del género *Pseudomonas* se consiguieron varios morfotipos, mediante el crecimiento en medios selectivos como el agar *Pseudomonas* P, agar *Pseudomonas* F y agar Cetrimide, siendo la única cepa identificada claramente *P. aeruginosa*. La presencia de bacterias del género de *Pseudomonas*, específicamente la especie aeruginosa, nos lleva a pensar que los triatominos, o por lo menos el *P. geniculatus* pudiesen servir de vector no solo para el *T. cruzi* sino para bacterias patógenas y otros microorganismos, a través de procesos de contaminación fecal, ejerciéndose un potencial papel vectorial concomitante. Es interesante que el aislamiento de esta especie sea en el último muestreo, estando el vector bajo un ayuno prolongado con una menor diversidad bacteriana. Los estados de ayuno en estos vectores harían que su comportamiento sea más agresivo, convirtiéndolo en un vector más eficiente para el parásito y quizás para bacterias oportunistas como la *P. aeruginosa*, llevando a redimensionar el rol vectorial de *P. geniculatus*.

6.3 Análisis de Cluster

Al evaluar el análisis de cluster realizado para el primer muestreo, se observaron 3 grupos de identidad funcional comunes en entre los grupos B y C, lo que indicaría o bien la presencia de los mismos grupos bacterianos, de grupos muy afines o de grupos metabólicamente similares. Al mostrarse la mayoría de las cepas bacterianas aisladas, como grupos funcionales independientes, podríamos decir que la mayor proporción de las cepas bacterianas de A y B son diferentes entre sí (Figura 14), corroborando los reportes de la influencia de la fuente alimenticia en la biota microbiana presente en el vector, más aun tomando en cuenta las diferencias también observadas en las variedad de morfotipos bacterianos.

Si bien la predominancia de las mismas características bioquímicas en los grupos B y C indicaría el establecimiento de un medio intestinal químicamente similar, al observar el clúster vemos que estas características no son aportadas por los mismos grupos bacterianos, si no que probablemente hay grupos funcionalmente diversos que parecen acoplarse a la condición fisiológica del vector en cada caso.

Por otra parte al observar a los grupos A, B y C en el tiempo, notamos que no existe prevalencia de los grupos funcionales, pues los *clusters* que comparan los diferentes muestreos para cada grupo, poseen escasez o ausencia de grupos de identidad funcional que asocien cepas bacterianas de distintos muestreos. Distintas funcionalidades significarían distintos microorganismos, por considerarse las características bioquímicas de cada grupo, características diagnosticas en medios selectivos, implicando una posible sucesión bacteriana. Este reemplazo de unos microorganismos por otros parece estar directamente influenciado por el estrés alimenticio, ya que ocurre en todos los grupo independientemente de la fuente inicial de alimentación, sin embargo, las diferencias en la microbiota entre el grupo infectado

experimentalmente (A) y el grupo control sin infección y con igual fuente alimenticia (B) sugieren que esta sucesión también puede estar influenciada por la presencia o ausencia del *T. cruzi*.

Otro resultado de interés, es que según avanza el tiempo post ingesta, si bien la mayor parte de la biota microbiana es distinta para cada grupo, esta biota se compone de grupos bacterianos muy cercanos entre sí, (valores de distancia cercanos en el *cluster*). Para el tiempo 0 (muestreo 1) al comparar a B y C, las mayores distancias están próximas a 2.7, mientras que a los 45 días post ingesta la mayor distancia al comparar a A, B y C es de 0.51 aproximadamente, indicando que si bien los grupos bacterianos pueden ser distintos, están mucho más relacionados funcionalmente que en el tiempo 0, pudiendo esto relacionarse con una estabilización del microambiente bioquímico.

A los 125 días de ayuno, esta similitud se hace más evidente, pues la mayor distancia está por debajo de los 0.48. Al parecer el ayuno prolongando beneficia a ciertos grupos bacterianos específicos, muy cercanos metabólicamente, aunque la predominancia de los grupos funcionales sobre los grupos de identidad funcional nos indica que existen una gran proporción de microorganismos diferentes para cada grupo de estudio.

6.4 Diversidad fúngica

La descripción de la biota fúngica para los 3 muestreos analizados permitió la observación de diversos géneros de hongos, en los 3 grupos, algunos con más de un representante.

Al realizar la siembra en agar malta del material extraído durante el primer muestreo, se observó que mientras A y B presentan igual número e iguales morfotipos descritos, la biota fúngica de C es menor que la de los otros dos grupos de estudio. Esto indicaría que las

diferencias en la dieta, no solo afectan la biota bacteriana si no la abundancia de hongos en el vector. Para el 3er muestreo los morfotipos descritos para los grupos A y B disminuyen notablemente, mientras que en el grupo C la diversidad aumenta, resaltado una vez más la influencia de la dieta (Figura 23).

Este aumento en el número de morfotipos del grupo C para el 3er muestreo coincide con la disminución de la biota bacteriana descrita en los métodos de siembra por inclusión, donde el grupo C presenta disminuciones apreciables en cuanto a abundancia, lo que abriría la posibilidad de competitividad de nicho entre hongos y bacterias en el grupo C, alimentado con sangre de gallina para esta etapa de la digestión, mientras que en los grupos A y B, donde la abundancia de bacterias se mantiene elevada en la siembra por inclusión (10^{11}) se observa una disminución drástica en el número de morfotipos fúngicos.

Para el 5to muestreo si bien se observaron dos morfotipos de hongos en el grupo A, para los grupos B y C la abundancia de los mismos fue mayor, aislando 5 y 4 morfotipos respectivamente. Siendo un muestreo en el que la abundancia bacteriana ha disminuido considerablemente, es de esperar un aumento en el número de hongos, coincidente con los resultados de B y C, sin embargo, la disminución de los hongos presentes en el grupo A, y la previa aparición de las formas metacíclicas del parásito antes de realizar este muestreo, reafirman lo reportado por Morales y col. (2001) el cual señala que la presencia de *T. cruzi* en el vector limita la presencia de ciertos grupos de hongos y viceversa.

Esta limitación en la presencia conjunta de hongos y parásitos puede tener su fundamento en la competencia por ergosteroles por parte de hongos y tripanosomas. Es bien sabido que el ergosterol se encuentran en la membrana celular de los tripanosomatideos, así como también, conforma el principal esteroide presente en los hongos, por lo que pudiésemos estar presenciado fenómenos de competencia por este metabolito o alguno de sus precursores (Visval y col., 2005)

El análisis de hallazgos en la microbiota fúngica, se está enfocando hacia la aplicabilidad de algunos hongos como entomopatógenos y otros en la explicación de la probable capacidad que tengan de ser excretados con las heces de triatomíneos de crear un microambiente poco saludable y de riesgo, que se sumaría al papel de estos insectos como vectores del *T. cruzi*.

7. Conclusiones

- La diferencias en la microbiota entre el grupo A (infectado experimentalmente) y el grupo B que es su control (sin infección y con la misma fuente alimenticia) indica que la presencia de *T. cruzi* en el vector es sin duda un factor influyente en la química del medio intestinal y por tanto en la biota bacteriana y fúngica, pudiendo presentarse relaciones simbióticas y antagónicas que seleccionan la biota que prevalece en el insecto en presencia del parásito.

- La diversidad bacteriana es influenciada de manera determinante por varios factores:

1. El ayuno en el vector, pues las condiciones de estrés alimenticio permiten la prevalencia de determinados grupos bacterianos y la eliminación de otros no adaptados.
2. La fuente alimenticia del vector, ya que los grupos B y C (sin ayuno prolongado) alimentados con distintas fuentes sanguíneas, presentaron grandes diferencias entre los grupos bacterianos presentes en cada uno y 3. La presencia o ausencia del parásito.

- La presencia de especies bacterianas como *Pseudomonas aeruginosa*, patógeno oportunista, así como de diversos géneros de hongos nos indica que se puede estar subestimando el rol vectorial del *Panstrongylus geniculatus*, ya que este puede estar vehiculando no solo al *T. cruzi* sino a un número considerable de otros patógenos.

- Entre los grupos bacterianos presentes en el tracto intestinal de *P. geniculatus* (criado en laboratorio) se encuentran los géneros *Shigella*, *Klebsella*, *Salmonella*, *Enterobacter* y *Serratia*, de los cuales únicamente el género *Serratia* se ha descrito en otros triatominos.

- Entre los grupos de hongos presentes en el tracto intestinal de *P. geniculatus* (criado en laboratorio) se encuentran los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Chrysosporium* y *Rhizopus*, de los cuales ni *Chrysosporium* ni *Rhizopus* habían sido descritos en triatominos

8. Sugerencias

- La aplicación de baterías de pruebas bioquímicas no específicas para enterobacterias, dada la presencia de cepas bacterianas no pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae.

- La utilización de pruebas bioquímicas y moleculares para la clasificación a nivel de especie de los géneros de hongos hallados.

- La continuidad del estudio en triatominos silvestres, a modo de aproximarnos más a la microbiota real de estos vectores.

9. APENDICE A

Medios de cultivo utilizados

AGAR HIERRO DE KLIGER (AHK)

Usada para determinar la capacidad de degradar de hidratos de carbono simples específicos (lactosa y glucosa) incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gases, junto con la determinación de posible producción de ácido sulfhídrico (SH)₂.

En el medio AHK, se pudo conocer la capacidad de algunos organismos de fermentar ambos hidratos de carbono, solamente la glucosa, o ninguno de los dos, cuando La fermentación del hidrato de carbono se produjo esta pudo ser con o sin producción de gases (CO₂+ H₂). La fermentación se produce aeróbicamente (en el pico de flauta) y anaeróbicamente en la capa inferior del cultivo. Las reacciones en AHK se utilizan primariamente para la identificación de miembros de Enterobacteriaceae (entéricos), que son por definición bacilos Gram negativos, todos los cuales fermentan glucosa en ácido. Así mismo, existen muchos bacilos intestinales Gram negativos no entéricos, a cuya identificación o separación de las Enterobacteriaceae ayudan las reacciones en AHK.

La primera forma de fermentación en AHK después de 18 a 24h de incubación es un pico de flauta alcalino y una capa profunda ácida; esta reacción se observa en organismos capaces de fermentar solamente glucosa. El pico de flauta es alcalino lo que indica que se ha producido una degradación aeróbica de la glucosa. La baja concentración de la glucosa (0.1%) se consume por completo y el organismo comienza a utilizar las pectonas que se encuentran en el medio para obtener los nutrientes para su crecimiento. El catabolismo de las pectonas

produce la liberación de amoníaco (NH₃) dando un pH alcalino (medio color rojo). Sin embargo en la capa profunda del AHK se observa un color amarillo debido a la degradación anaeróbica de la glucosa, mas los productos terminales son ácidos dando un pH ácido (medio color amarillo).

Algunos organismos tienen la facultad de fermentar tanto glucosa como lactosa, dando una reacción en el medio de un pico de flauta ácido y una capa profunda ácida. La lactosa se encuentra en concentración 1%, es decir, 10 veces más que la glucosa; en un periodo de incubación de 18 a 24 h la concentración de lactosa en mayor cantidad aun no se ha consumido y todavía existe una condición ácida.

Otras bacterias son incapaces de fermentar la glucosa o la lactosa y acuden a la pectona que contiene el medio, produciendo un pico de flauta alcalino (degradación aeróbica de la pectona) y una capa profunda alcalina (degradación anaeróbica de la pectona) o una capa profunda sin cambios, si la bacteria no es capaz de catabolizar la pectona en condiciones anaerobias. La gama de resultados se resumen en la Tabla III

Tabla III. Interpretación de las reacciones en AHK

Cambios observados en el medio	Interpretación
Pico de flauta alcalino (rojo) y una capa profunda ácida (amarillo)	Organismos capaces solo de fermentar glucosa
Pico de flauta ácido (amarillo) y una capa profunda ácida (amarillo)	Organismos capaces de fermentar glucosa y lactosa
Pico de flauta alcalino (rojo) y una capa profunda alcalina (rojo) o sin cambio	Organismos incapaces de fermentar glucosa o lactosa. Utilizan las pectonas.

En el AHK también puede determinarse si hay producción de gas como producto del metabolismo de los hidratos de carbono. Los gases producidos son anhídrido carbónico e

hidrógeno, formando burbujas de gas, desplazamiento o ruptura del medio. Por su parte la producción de H₂S se evidencia por el precipitado negro del sulfuro ferroso.

ROJO DE METILO (RM)

La prueba de RM se fundamenta en la capacidad que poseen algunos microorganismos de actuar sobre la glucosa, a través del ácido pirúvico y producir una fermentación ácido mixta, capaz de bajar el pH a una cifra igual o inferior a 4,4. La prueba RM es positiva cuando el cultivo es lo suficientemente ácido como para permitir que el reactivo rojo de metilo mantenga un definido color rojo, es negativa cuando observamos un color amarillo (pH 6) (figura 27).

Tabla III. Reacciones del Caldo MR – VP ante el reveladores de rojo de metilo

RM	
Viraje	Microorganismo
De anaranjado a rojo	<i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter</i> y otros.
De anaranjado a Amarillo	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> y otros.

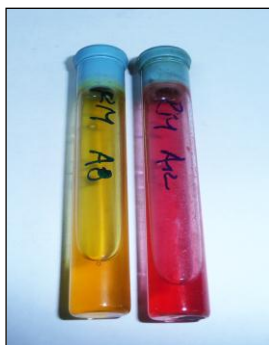


Figura 27. Der. Prueba negativa al rojo metilo. Izq. Prueba positiva al rojo metilo (Foto: Joshimer Rodriguez)

PRUEBA DE LA UREA

Determina la capacidad de un organismo para desdoblar la urea, en amoníaco y CO_2 , por acción de la enzima ureasa. La visualización del proceso se fundamenta en que la alcalinización producida en el medio de cultivo se detecta mediante un indicador de pH (rojo de fenol). La reacción positiva de esta prueba se presenta con una coloración rosa intenso en el medio de cultivo, cuando es negativa no se producen cambio en el medio que posee un color anaranjado.

PRUEBA DEL CITRATO

Determina la capacidad que poseen algunos microorganismos de utilizar como única fuente de carbono el citrato, produciendo alcalinidad. Los resultados positivos a esta prueba se presentan con una coloración azul intensa en el medio, mientras que la respuesta negativa no produce cambios en el medio que es de color verde (figura 28).



Figura 28 Prueba del citrato. Vial de la izquierda presenta un resultado negativo y el vial de la derecha un resultado positivo. (Foto: Joshimer Rodriguez)

PRUEBA DE REDUCCION DEL NITRATO

Algunos microorganismos utilizan el nitrato como una vía alternativa reduciéndolo a nitrito o a nitrógeno libre. Esta propiedad es una característica importante en la

diferenciación de muchos grupos bacterianos. La presencia de nitrito en el medio se demuestra añadiendo alfa-naftilamina y ácido sulfanílico, con la formación de un compuesto rojo: el parasulfobencenoazo-alfa-naftilamina.

Esta prueba se realiza en dos fases. En la primera se agregan los dos reactivos obteniendo un color rosado a rojo intenso cuando el nitrato es reducido a nitrito por el organismo, de no observar cambios se pasa a la fase dos, en la cual se agrega zinc al medio, la ausencia de cambios en la coloración indica la reducción de nitrito, mientras que el cambio de color a un rosado o rojo intenso indica la presencia de nitrato, es decir, que no ha sido reducido por el organismo (figura 29).



Figura 29. Prueba de reducción de nitrato. De izq. a der: Dos resultados positivos muy evidentes dado el cambio de coloración, un debil positivo y un resultado negativo(Foto: Joshimer Rodriguez)

PRUEBA DE COAGULASA

Determinar la facultad de un organismo de coagular el plasma por acción de la enzima coagulasa, la cual aumenta la velocidad de coagulación del plasma, obteniendo como resultado final la formación de un coagulo de fibrina. La prueba positiva muestra un halo de coagulación alrededor del sitio de siembra, la negativa no produce cambios en el medio (figura 30)



Figura 30. Prueba de coagulasa. Se observa el halo de coagulación alrededor de una de las cepa, por lo que es positiva a esta prueba(Foto: Joshimer Rodriguez)

MEDIO SIM

Medio que permite determinar la formación de sulfuro, la producción de indol y la motilidad, en el marco diagnóstico de enterobacteriáceas. La motilidad se pone de manifiesto por la turbidez difusa del medio de cultivo alrededor del canal de siembra, la no motilidad se caracteriza por el crecimiento producido exclusivamente a lo largo de dicho canal. La producción de H₂S se reconoce por el ennegrecimiento de la zona de crecimiento. Para la demostración del indol se coloca reactivo de indol según KOVACS; la formación de indol da lugar a una coloración rojo-púrpura de la capa de reactivo.

ALMIDÓN

Esta prueba se utiliza para detectar la presencia de la enzima amilasa, que hidroliza el almidón. Si el almidón ha sido hidrolizado una vez que agreguemos yodo a la placa de siembra como revelador observaremos que el yodo reacciona con el almidón para formar un complejo de color azul oscuro, y en las áreas donde el almidón ha sido hidrolizado observaremos una zona translúcida (figura 31)

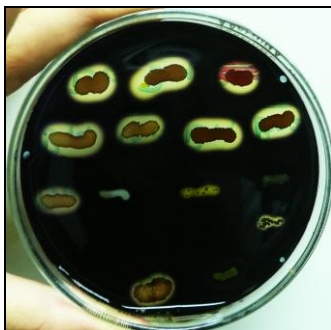


Figura31. Prueba del almidón. Las cepas con un halo traslucido alrededor hidrolizan el almidón del medio, por lo que el yodo no reacciona en esa región. (Foto: Joshimer Rodriguez)

LICUACIÓN DE LA GELATINA

La gelatina es una proteína que se obtiene por hidrólisis parcial del colágeno y proporciona un sustrato útil para determinar la acción de las enzimas proteolíticas de los microorganismos. La hidrólisis de la proteína es importante porque se obtienen aminoácidos.

AGAR PSEUDOMONAS F

Medio de cultivo utilizado para el aislamiento, la detección y la diferenciación de especies de *Pseudomonas* spp. en base a la producción de fluoresceína. Conocido también como medio King B. En el medio de cultivo, la tripteína y la peptona de carne aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la glicerina favorece la producción de pigmentos, la concentración de fosfatos estimula la producción de fluoresceína e inhibe la producción de piocianina y piorrubina.

AGAR PSEUDOMONAS P

Medio de cultivo utilizado para el aislamiento, la detección y la diferenciación de especies de *Pseudomonas* spp. en base a la producción de piocianina. Conocido también como medio King A. En el medio de cultivo, la peptona de gelatina aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la glicerina favorece la producción de pigmentos, las sales de magnesio y potasio estimulan la producción de piocianina y piorrubina e inhiben la producción de fluoresceína

CETRIMIDE

El agar cetrimide es un tipo de agar para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa*. Como su nombre indica, contiene cetrimide, que es el agente selectivo alternativo contra la flora microbiana acompañantes. El Cetrimide también mejora la producción de pigmentos de *Pseudomonas* como piocianina y fluoresceína, que unidos muestran un característico color verde.

PRUEBA DE CATALASA

Determinar la presencia de la enzima catalasa, capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno o agua oxigenada (H_2O_2) en H_2O y O_2 , que se desprende en forma de burbujas en el medio. *Pseudomonas aeruginosa* es positiva a esta prueba. (Figura 32)

PRUEBA DE LA OXIDASA

Determinar la presencia de la enzima citocromooxidasa en el microorganismo, usando diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina (reactivo de Kovacs). Este reactivo tiñe las colonias oxidasa positivas de color lavanda que vira gradualmente a púrpura-negruzco intenso. *Pseudomonas aeruginosa* es positiva a esta prueba. (Figura 32)

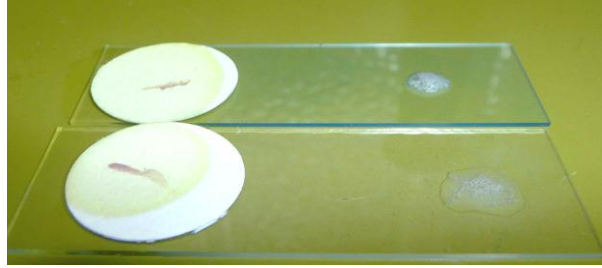


Figura 32. Der. Pruebas de Oxidasa, donde se aprecia la coloración lavanda de la colonia (resultado positivo). Izq. Prueba de catalasa, donde se observa la producción de burbujas (resultado positivo).

10. APENDICE B

Tinción de Gram

Para el método de coloración de Gram, se usaran cuatro reactivos diferentes. El primero es una solución de cristal violeta (cloruro de hexametil-p-rosanalina), que tiñe todas las células de color azul-violeta. El segundo reactivo es una solución de Lugol (yodo-yoduro de potasio), en la cual el yoduro reemplaza al cloruro en la molécula de cristal violeta y el complejo formado se vuelve insoluble en agua. Todas las células reaccionan de igual forma. La adición de un tercer reactivo, decolorante (acetona y etanol), remueve solamente el colorante de las células Gram negativas. La safranina, colorante de contraste y cuarto reactivo empleado en el método, hace visible las células Gram negativas al teñirlas de color rosa.

La estructura de la pared bacteriana es la base de la reacción diferencial frente a la coloración de Gram. Las bacterias teñidas de azul-violeta, llamadas Gram positivas, poseen grandes cantidades de ácido teicoico en sus paredes celulares; y las teñidas en rosa, por acción de la safranina, bacterias Gram negativas, poseen paredes compuestas por lipopolisacáridos (Llop y col. 2001).

11. Bibliografía

-Abad-Franch, F. y Monteiro, F. 2007. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*;102 (Suppl 1):57-70

-Análisis Cluster. http://www.uam.es/personal_pdi/economicas/rmc/documentos/cluster.PDF. (consulta octubre 20, 2009)

-Argumedo- Delira, R., Alarcón, A., Ferrera-Cerato, R. y Peña-Cabriales, J. 2009. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25: 257-269

-Azambuja, P., Garcia, E. y Ratcliffe N. 2005. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends Parasitol* 21: 568-572

-Azambuja, P., Feder D. y Garcia, E. 2004. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Exp Parasitol* 107: 89-96.

-Beard C., Durvasula R., Richards, F. 1998. Bacterial symbiosis in arthropods and control of disease transmission. CDCP and YALE University. 4: 581 – 591

-Beard C., Dotson E., Penninton, P., Eichler, S., Cordon-Rosales, C. Y Durvasula, R. 2001. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. ELSEVIER. 31:621 – 627

-Becton Dickinson de México. Manual de procedimientos de laboratorio y de productos BBL. 5 ed. México. 1974.

- Briceño-León, R. 2009. Chagas disease in the Americas: an ecohealth perspective. *Cad. Saúde Pública*. **1**: 71-82
- Carrillo, L. 2003. Hongos de los alimentos y forrajes. <http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos.pdf> (consulta Junio 5, 2010)
- DeLima y col., 2008. epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* de cultivo en niveles bajos de glucosa medios axénicos turnos de su competencia para diferenciar en tripomastigotes metacíclicos. *Parasitol. Exp.* **119**: 336-342
- Durvasula, R., Gumbs, A., Panackal, A., Kruglov, O., Aksoy, S., Merrifield, B., Richards, F. y Beard, C. 1997. Prevention of insect-borne disease: An approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proc. Natl. Acad.Sci.* **94**: 3274 – 3278
- Durvasula, R., Sundaram, R., Kirsch, P., Hurwitz, I., Crawford, C., Dotson, E. y Beard, C. 2008. Genetic transformation of a corynebacterial symbiont from the Chagas disease vector *Triatoma infestans*. *Exp. Parasitol.*; **119**: 94-98.
- Eichler, S. y Schaub, A. 2002. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Exp. Parasitol.*; **100**: 17 – 27
- Friend, W. y Smith, J. 1985. La fisiología de los triatominos con especial referencia a la alimentación por sangre. En: Carcavallo, R. U., J. J. Rabinovich & R. J. Tonn (eds.), Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas, OPS. Vol 1. Servicio Nacional de Chagas, Ministerio de Salud y Acción Social, Buenos Aires, Argentina, pp. 55-72.
- Gomez-Nuñez, J. y Fernández J. 1963. La colonia de *Rhodnius prolixus* en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. *Bol. Dir. Malariol. y San. Amb.* **3**:132-137.

- González, N., Carrasco, H., Urdaneta-Morales, S., Martínez, C. y Herrera, L. 2009. Comportamiento de genotipos de *Trypanosoma cruzi* en *Rhodnius prolixus* experimentalmente infectado: aproximación biológica y molecular a fenómenos de competencia. *Salus on line*. 12 : 175-184.
- Gouveia, C., Asensi, M., Zahner, V., Rangel, E. y Oliveira, S. 2008. Study on the Bacterial Midgut Microbiota Associated to Different Brazilian Populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). *Neot. Entom.* 37(5):597-601
- Grijalva O. y Giraldo G. 2006. Simbiosis bacteriana en insectos. *Bol. Museo de Entomología Universidad del Valle, Cali. Colombia* 7(2): 24-40.
- Guarneri, A., M. Pereira & L. Diotaiuti, 2000. Influence of the blood meal source on the development of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, and *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera, Reduviidae). *Journal of Janeiro - Abril 2009 - www.periodico.ebras.bio.br EntomoBrasilis* 2(1) 23 *Medical Entomology*, 37(3):373-379.
- Guedez, C., Cañizales, L., Castillo, C y olivar, R. 2009. Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp). *Rev. Soc. Ven. Mic.* 29:34-38
- Huerta, L., Martínez, J., Noguera-Torres, B., Ramsey, J. y Martínez-Romero E. 2007. Bacterias simbióticas de la chinche hematófaga *Triatoma pallidipenis*. www.microbiologia.org.mx/CONAMI/...Libres/Huerta-Lucia.doc (Consulta Octubre 20, 2009)
- Hypsa V. y Aksoy, S. 1997. Phylogenetic characterization of two transovarially transmitted endosymbionts of the bedbug *Cimex lectularius* (Heteroptera:Cimicidae). *Insect Mol Biol.* 6: 301 - 304.

- Hoare. 1972. The Trypanosomes of Mammals, Blackwell Sc. Pub, Oxford

- Feliciangeli, D. 2009. Control de la enfermedad de Chagas en Venezuela. Logros pasados y retos presentes. *Interciencia*. 34: 393 - 399

- Lent, H. y Wygodinsky, P. 1979. Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and THEIR significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American museum of Natural History*. New York, USA.

- Llop, A., Valdéz-Dapena, M y Zuazo, J. 2001. *Microbiología y parasitología medicas*. Editorial de ciencias medicas de Cuba. La Habana,Cuba.

- Luz, C., Rocha, L. y Nery, G. 2004. Detection of entomopathogenic fungi in peridomestic triatomine-infested areas in central Brazil and fungal activity against *Triatoma infestans* (Klug)(Hemiptera: Reduviidae). *Neotrop. Entom.* 33: 783 - 791

- Mac Faddin, J. 1978. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Panamericana. New York, USA.

- Morales, A., Reis, A., Vieira, A., Lara, G., Aguiar, R. y Cunha, P. 2001. Fungal flora of the digestive tract of *Panstrongylus megistus* (Reduviidae) used for experimental xenodiagnosis of *Trypanosoma* (Schizotripanum) *cruzi* (Chagas, 1909). *Rev. Iberoam. Micol.* 18: 79 – 82.

- Paracer, S. y Ahmadjian, V. 2000. *Symbiosis: An Introduction to Biological Associations*. Segunda edición. Oxford University Press. Inglaterra.

- Perlowagora, A., Moreira, C. 1994. *In vivo* differentiation of *Trypanosoma cruzi*. I. Experimental evidence of the influence of vector species on metacyclogenesis. Mem Inst Oswaldo Cruz 89: 603-618.
- Rey, L. 2002. Parasitología Médica. Segunda edición. Editorial GuanabaraKoogan; Rio de Janeiro, Brasil.
- Reyes, M. 2002. Importancia del chipo *Panstrongylus geniculatus* como transmisor del Chagas en Venezuela. <http://www.reyesr@camelot.rect.ucv.ve> (Consulta Septiembre 20, 2009)
- Reyes-Lugo, M., Rodríguez-Acosta, A. (2000) A domiciliation of the sylvatic Chagas disease vector *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811 (Triatominae: Reduviidae) in Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94: 508
- Rio, R., Hu, Y. y Aksoy, S. 2004. Strategies of the home-team: symbioses exploited for vector-borne disease control. *ELSEVIER*. 12: 325 – 336
- Rodríguez, J., Pavia, P., Calderón, C., Montilla, M., Nicholls, R. y Puerta, C. 2007. Estandarización de una prueba de PCR-RFLP para la identificación de *Rhodococcus rhodnii* en insectos triatominos. *Universitas Scientiarum*. 12: 11 – 22.
- Samson, R., Evans, H. y Largé, J. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer-Verlag, Berlín, Alemania.
- Samson, R. (1991). Problems caused by new approaches in fungal taxonomy. *Mycopathologia*. 116: 149-150.
- Sandoval, C., Duarte, R., Gutiérrez, R., Rocha, D., Angulo, V., Esteban, L., Reyes, M., Jurberg, J. y Galvão, C. (2004) Feeding sources and natural infection of *Belminus herreri* (Hemiptera,

Reduviidae, Triatominae) from dwellings in Cesar, Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz 99:137-140

-Schofield, C. 2000. *Trypanosoma cruzi*-The vector-parasite paradox. Mem Inst Oswaldo Cruz. 95: 535 - 544

-Stackebrand, E. 1988. Phylogenetic relationships vs. phenotypic diversity: how to achieve a phylogenetic classification system of the eubacteria. Can J Microbiol. 34: 552 – 556.

-Tejera, E. (1919) La trypanosomose americaine ou maladie de Chagas au Venezuela. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 12: 509-513.

-Vallejo, G., Guhl, F. y Schaub, G. 2009. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. Acta Trop. 110: 137 – 147

-Vidal, M. (1999). Taxonomía Molecular de Chrysosporium. [http://www.cibernetia.com/tesis es/CIENCIAS DE LA VIDA/BIOLOGIA MOLECULAR/6](http://www.cibernetia.com/tesis_es/CIENCIAS_DE_LA_VIDA/BIOLOGIA_MOLECULAR/6)
(Consulta Junio 5, 2010)

-Visbal, G., San-Blas, G., Murgich J. y Franco, H. 2005. Paracoccidioides brasiliensis, Paracoccidioidomycosis, and Antifungal Antibiotics. Infectious Disorders 5; 211-226.

-World Health Organization. -El Mal de Chagas: a cien años de su descubrimiento. www.paho.org/Spanish/ (Consulta agosto 18, 2009)

-www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm (consulta: Agosto 25 2009)

- Zabala, J. 2009. Historia de la enfermedad de Chagas en Argentina: evolución conceptual, institucional y política. Hist. cienc. saude-Manguinhos. 16: 57-74