



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**DETECCIÓN DE INFECCIONES SENCILLAS Y MIXTAS
POR *Trypanosoma rangeli* Y *Trypanosoma cruzi* EN
MUESTRAS PROVENIENTES DE VECTORES DE
DIFERENTES REGIONES DE VENEZUELA
PRESERVADAS EN PAPEL FTA**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por el bachiller Juan Manuel Núñez
Prince como requisito parcial para
optar por el título de Licenciado en
Biología.

Tutor: Dra. Palmira Guevara Trejo

CARACAS, VENEZUELA

OCTUBRE 2009

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| Índice..... | i |
| Índice de Abreviaturas..... | iii |
| Resumen..... | iv |
| 1. Introducción..... | 1 |
| 2. Objetivos..... | 12 |
| 2.1. Objetivo General..... | 12 |
| 2.2. Objetivos Específicos..... | 12 |
| 3. Antecedentes..... | 13 |
| 4. Materiales y métodos..... | 18 |
| 4.1. Cultivo de Parásitos..... | 18 |
| 4.2. Identificación molecular de las especies <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i> | 19 |
| 4.3. Identificación de linajes de <i>T. cruzi</i> y las poblaciones de <i>T. rangeli</i> | 20 |
| 4.4. Marcaje de la sonda de ADN..... | 26 |
| 4.5. Hibridación molecular..... | 26 |
| 4.6. Normalización de las condiciones de preservación y recuperación de muestras y establecimiento de los niveles de sensibilidad de los ensayos de amplificación en filtros de papel FTA..... | 27 |
| 4.7. Evaluación de muestras provenientes de vectores preservadas en papel FTA para la presencia de <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i> | 28 |
| 5. Resultados..... | 32 |
| 5.1. Normalización de las condiciones de preservación y recuperación de muestras de vectores a partir de filtros FTA..... | 32 |
| 5.2. Establecimiento de los niveles de sensibilidad de los ensayos de amplificación..... | 35 |

| | |
|--|-----------|
| 5.3. Evaluación de muestras provenientes de vectores preservadas en papel FTA para la presencia de <i>T. rangeli</i> y <i>T. cruzi</i> | 36 |
| 5.3.1. Análisis de las muestras de triatomíneos por microscopía óptica..... | 37 |
| 5.3.2. Evaluación molecular para la detección de infecciones sencillas y mixtas por <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i> | 38 |
| 5.3.3. Evaluación molecular para la determinación de linajes..... | 41 |
| 6. Discusión de resultados | 56 |
| 7. Conclusiones | 63 |
| 8. Factibilidad | 65 |
| 9. Bibliografía | 66 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------|---|
| ADN..... | Ácido deoxiribonucleico |
| ARN..... | Ácido Ribonucleico |
| ADNk..... | Ácido deoxiribonucleico del kinetoplasto |
| ADNr..... | Ácido deoxiribonucleico ribosomal |
| dNTP..... | Dideoxinucleótido |
| EIR..... | Espaciador intergénico ribosomal |
| SSU..... | Sub-unidad pequeña del ADNr |
| ITS..... | Espaciador interno transcrito |
| PCR..... | Reacción en cadena de la polimerasa |
| pb..... | Pares de base |
| Kb..... | Kilopares de base |
| mL..... | Mililitros |
| μL..... | Microlitros |
| cm..... | Centímetros |
| mm..... | Milímetros |
| mM..... | milimolar |
| μM..... | Micromolar |
| TE..... | Tampón tris-sal sódica de etilen dietil tetra acetato |
| EDTA..... | Ácido etilendiaminotetraacético |
| SS..... | Solución Salina |
| SSC..... | Solución de citrato de sodio |
| SDS..... | Solución dodecil sulfato de sodio |
| TA..... | Temperatura ambiente |
| RP..... | Reactivo de Purificación |

RESUMEN

Los parásitos Trypanosoma rangeli y Trypanosoma cruzi, son protozoarios de los subgénero Herpetosoma y Schyzotrypanum respectivamente, familia Trypanosomatidae, orden Kinetoplastida, que han sido descrito en gran parte del continente Americano, superponiendo en muchos casos su distribución geográfica; *T. cruzi*, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, comparte con *T. rangeli* hospedadores vertebrados e invertebrados. Los hospedadores invertebrados de estos parásitos son hemipteros hematófagos (triatominos), y son capaces de transmitir *T. rangeli* al vertebrado durante la picadura y *T. cruzi* por contacto con las heces. Las semejanzas morfológicas y antigénicas entre estos parásitos dificultan los procesos de detección, por lo cual se han desarrollado herramientas que permitan una mejor identificación de estas especies, así como el estudio detallado de las variaciones intra-específica. *T. rangeli* ha sido considerado un complejo biológico con un grado significativo de polimorfismo genético, que permite separarlo en sub-grupos (grupos A, B, C y D) de amplia distribución en hospederos vertebrados e invertebrados. Por su parte, en *T. cruzi* se han descrito dos sub-grupos principales (linajes I y II). Estas muestras de diversidad genética hacen de estas especies un objeto interesante de estudio. De aquí la importancia del análisis del mayor número de aislados posibles, provenientes de diferentes regiones que permitan establecer las relaciones existentes entre estas sub-poblaciones a nivel biológico y taxonómico.

Con la finalidad de evaluar la distribución geográfica de estas especies y las sub-poblaciones que se encuentran circulando en vectores triatominos, utilizando ensayos de PCR especie-específicos para *T. rangeli* y *T. cruzi*, nos proponemos evaluar la presencia de infecciones sencillas y mixtas en muestras de triatominos de captura y xenodiagnosticos de

mamíferos domésticos provenientes de diferentes regiones de Venezuela, recolectadas en papel FTA.

En este trabajo se estandarizaron las condiciones de preservación y tratamiento de las muestras preservadas en papel FTA para su utilización en análisis con PCR; la evaluación del nivel de sensibilidad de la técnica mostró una detección de hasta 5 parásitos (0,5parásitos/ μ L) colocados en un disco de papel FTA de 0,5cm. de diámetro. Con esta metodología se analizaron 84 muestras de triatominos de captura provenientes de 76 triatominos capturados en zonas urbanas y rurales de los estados Sucre, Miranda, Vargas, Aragua y Distrito Capital, de los cuales un 84% pertenece al género *Panstrongylus* que en su mayoría fueron capturados en zonas urbanas. El 76% de triatominos evaluados resultaron positivos a infecciones por *T. cruzi*, con prevalencia del linaje TCI (encontrado en el 55% de las muestras infectadas); no se detectaron triatominos infectados por *T. rangeli*. 71 de las muestras de triatominos capturados fueron analizadas al microscopio de luz, observando tripanosomas en el 21%, mientras que con los análisis por PCR el 76% de estas mismas muestras fueron positivas a *T. cruzi*. En las muestras provenientes de xenodiagnóstico se detectó la presencia de infección por *T. cruzi* en 45 muestras (63%), sugiriendo la contaminación de estas durante el proceso de toma.

1. INTRODUCCION

Trypanosoma rangeli y *Trypanosoma cruzi*, son protozoarios de los subgénero Herpetosoma y Schyzotrypanum respectivamente, familia Trypanosomatidae, orden Kinetoplastida. Ambos flagelados son parásito de diversas especies de animales domésticos y silvestres, humanos e insectos triatominos particularmente aquellos del género *Rhodnius*, los cuales están ampliamente distribuido en el continente Americano. La presencia de *T. rangeli* ha sido descrita en países de Centroamérica (Méjico, Guatemala, El Salvador, Costa Rica y Panamá) y en Suramérica (Colombia, Venezuela, Perú, Ecuador y Brasil) (Cuba Cuba, 1998; Paláu, 2001). Esta distribución geográfica de *T. rangeli* se superpone en muchos casos con *T. cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, con el cual comparte vectores, hospedadores y reservorios, como marsupiales y otros mamíferos incluyendo el humano (Mejía, 2004).

T. rangeli y *T. cruzi* son biológica y bioquímicamente distintos; aun así poseen antígenos comunes, de hasta un 60% de similitud antigénica (Mejía, 2004), lo cual puede generar confusiones en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas por infecciones con *T. rangeli* como resultado de la reactividad cruzada. Por lo que un aspecto primordial en el estudio de *T. rangeli*, es la imperiosa necesidad de su correcta identificación y diferenciación con *T. cruzi*.

En la actualidad, tanto la epidemiología como los aspectos fundamentales de la biología del parasitismo del *T. rangeli* continúan mal comprendidas y representan un campo importante de estudio para la investigación científica; en especial aquellos aspectos

relacionados con las interacciones entre el parásito y el hospedador vertebrado, donde *T. rangeli* es considerado como no patógeno. (Cuba Cuba, 1998)

En su desarrollo en el hospedador invertebrado, se ha comprobado que *T. rangeli*, a diferencia de *T. cruzi*, es un agente patógeno causando daños en diferentes aspectos del insecto, como interferencia con la ecdisis, deformaciones de los insectos, alteraciones en el comportamiento alimenticio, problemas en la digestión de la sangre ingerida, reducción en el número de hemocitos en hemolinfa y letalidad (Cuba Cuba, 1998; Grisard, 1999; Paláu, 2001; Mejía, 2004).

Uno de los aspectos más importante en la biología de estos organismos es lo relativo a su ciclo de vida (Figura 1). Ambas especies de parásitos ingresa al intestino del triatomino en su forma tripomastigote durante la alimentación por ingestión de sangre de un mamífero infectado, y al alcanzar el intestino medio comienzan a multiplicarse. En el caso de *T. rangeli*, subpoblaciones de los flagelados entran al hemocele atravesando el epitelio intestinal, invadiendo la hemolinfa en donde se multiplican libremente como formas tripomastigotes y epimastigotes, y también intracelularmente en los diversos tipos de hemocitos, donde se pueden observar formas esferomastigotes, tripomastigotes y amastigotes en división en el citoplasma. Los epimastigotes de la hemolinfa se dirigen y agrupan alrededor de las glándulas salivares pudiendo atravesarlas y alcanzar el lumen en donde se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, capaces de permanecer libres en la saliva. Estos últimos son la forma infectiva del parásito y pueden ser inoculados a un nuevo hospedador vertebrado a través de la picadura. (D' Alessandro y Saravia, 1992; Cuba Cuba, 1998)

Los tripomastigotes de *T. cruzi* que ingresan al intestino medio, se diferencian a epimastigotes y se multiplican para luego migrar al intestino posterior como formas tripomastigotas metacíclicas, las cuales son expulsadas con las heces del triatomino durante el proceso de alimentación.

Alternativamente, en el ciclo selvático, puede ocurrir la transmisión de *T. rangeli* y *T. cruzi* a mamíferos insectívoros por la ingesta de triatominos infectados (Schaub, 2006), o mediante la transmisión directa del parásito por la picadura entre triatominos por cleptofagia en el caso de *T. rangeli* (Añez, 1982). En el humano, adicionalmente a las vías tradicionales de transmisión de estos parásitos (picadura y contacto con las heces), puede transmitirse la infección de forma congénita (entre una madre y el feto), o adquirir los parásitos durante transfusiones de sangre contaminada, e incluso por el consumo accidental de triatominos contaminados.

Tomando en cuenta todos los aspectos relativos al ciclo de vida de *T. rangeli* y sus características particulares, se ha determinado que la detección en hemolinfa, en las glándulas salivares del triatomino y el ser transmitido durante la picadura al vertebrado susceptible, son los parámetros biológicos considerados indispensables en la identificación y caracterización del parásito (Cuba Cuba, 1998; Azambuja, 2005). Es posible observar organismos clasificados como Tipo-*T. rangeli* (*T. rangeli*-“like”) en el intestino del insecto, los cuales no proliferan en la hemolinfa o en las glándulas salivares, lo cual indica que la presencia de este tripanosoma en el intestino de un triatomino no es una prueba de que éste sea uno de sus vectores (D’Alessandro-Bacigalupo y Saravia, 1992). D’Alessandro (1992) reporta una lista de especies de triatominos de los géneros *Rhodnius* y *Triatoma* con el potencial de ser vectores naturales y experimentales de *T. rangeli*, basado en el criterio de

su presencia en las glándulas salivares, lo que indica que estos pueden transmitir la infección mediante la picadura; en esta lista se observa que las especies más susceptibles a las infecciones naturales por *T. rangeli* en glándulas salivares pertenecen al género *Rhodnius*. Otros trabajos incorporan a especies pertenecientes a los géneros *Triatoma* y *Panstrongylus* a esta lista de triatomíneos capaces de portar y transmitir naturalmente *T. rangeli* y *T. cruzi* (Vallejo y col, 2008; Patterson y col, 2009).

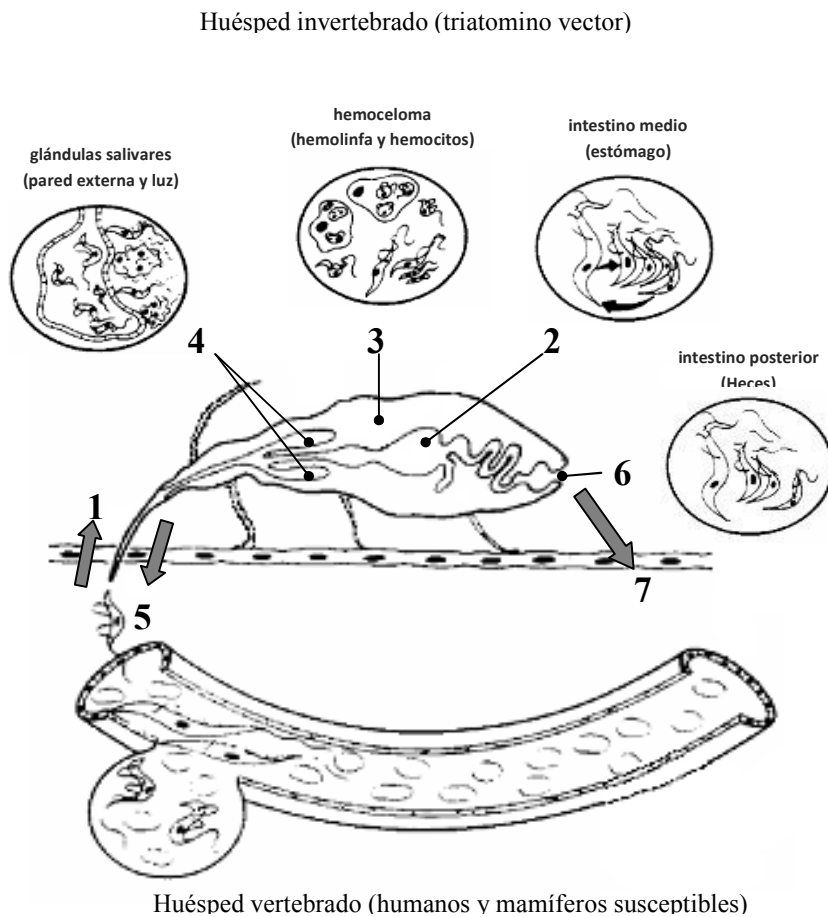


Fig. 1 Ciclo de vida de *T. rangeli* y *T. cruzi* en el vector triatomino. El triatomino ingiere los tripomastigotes de ambos parásitos durante el proceso de alimentación en un mamífero infectado (1). En el intestino medio los flagelados se diferencia a formas epimastigotas (2). Subpoblaciones de epimastigotes de *T. rangeli* son capaces de atravesar el epitelio

intestinal e invadir el hemocele, donde se multiplican y diferencian a amastigotes al invadir los hemocitos de la hemolinfa, los cuales al ser liberados se diferencian a epimastigotes largos y metacíclicos (3). De estos, las formas epimastigotes invaden las glándulas salivares (4) donde se diferencian a tripomastigotes metacíclicos; las formas infectivas del parásito que pueden ser inoculadas a un mamífero no infectado (5); Los epimastigotes de *T. cruzi* permanecen en división en el intestino medio (2) y se diferencian a tripomastigotes metacíclicos que migran al intestino posterior (6) y son liberados con las heces durante el proceso de alimentación del triatomino (7). (Modificado de Cuba Cuba, 1998).

Las interacciones entre el parásito y el insecto han sido en su mayoría estudiadas en condiciones de laboratorio con infecciones experimentales, siendo las poblaciones de triatominos que se encuentran infectados en la naturaleza, un objetivo interesante de estudio por su importancia epidemiológica, taxonómica y en estudios evolutivos. La capacidad vectorial de una especie de triatomino, depende en gran medida de su grado de asociación con el humano y los reservorios silvestres, en función de esto la población de vectores es a veces descrita como doméstica, peridoméstica o selvática. La mayoría de las especies de triatominos son selváticas, transmitiendo los parásitos entre mamíferos asociados a este tipo de hábitat, sin embargo al menos 10 especies de triatominos parecen tener relación estrecha con poblaciones domésticas en regiones específicas de Latinoamérica, mientras otras 20 especies son descritas como vectores secundarios porque en ocasiones invaden las casas desde hábitats peridomésticos (Vallejo y col, 2008).

Considerando la susceptibilidad de las especies del género *Rhodnius* a determinadas cepas de *T. rangeli* (Vallejo y col., 2002), se ha especulado que este tripanosoma, como resultado de una fuerte presión evolutiva, desarrolló mecanismos para escapar de la

respuesta inmune de estos insectos. Alternativamente se ha propuesto que el flagelado es capaz de degradar, inhibir o resistir a los diversos factores antiparasitarios formados en la hemolinfa del insecto infectado. (Cuba Cuba, 1998)

Una particularidad de los ciclos de vida de estos tripanosomas, es que en cada uno de los compartimientos en los cuales se desarrollan existen características fisicoquímicas diferentes (pH, temperatura, composición química, microbionta, etc.), las cuales requieren de los parásitos características metabólicas diferentes para sobrevivir. *T. rangeli* y *T. cruzi* son capaces de diferenciarse morfológica y metabólicamente para adaptarse a estos cambios. Es pues la gran plasticidad en su morfogénesis lo que hace de estas especies un modelo único en biología y fisiología celular (Cuba Cuba, 1998).

En la actualidad son utilizadas gran variedad de métodos basados en parámetros inmunobioquímicos y moleculares que permiten la identificación y caracterización de *T. rangeli*, así como su diferenciación de *T. cruzi*. (Tabla 1).

Tabla 1. Principales parámetros inmunobioquímicos y moleculares utilizados en la caracterización e identificación de *T. rangeli* y su diferenciación de *T. cruzi*. (Modificado de Cuba Cuba, 1998)

| Métodos Inmunobioquímicos | Métodos Moleculares |
|---|---|
| ✓ Aglutinación por lectinas: carbohidratos de superficie celular. | ✓ Análisis del ADN genómico. |
| ✓ Sensibilidad a la lisis mediada por complemento. | ✓ Análisis del ADNk por enzimas de restricción. |
| ✓ Detección de la enzima neuraminidasa. | ✓ Análisis de isoenzimas |
| ✓ Tipificación por anticuerpos monoclonales específicos. | ✓ Análisis por el método de RAPD. |
| ✓ Análisis por SDS-PAGE-Immunoblotting. | ✓ Análisis de cariotipos. |

Varios estudios han demostrado que los epimastigotes tanto de *T. rangeli* como *T. cruzi* presentan glucosa y manosa en su superficie celular, las cuales presentan aglutinación con lectinas de *Canavalia ensiformis*, *Pisum sativum* y *Lens culinaris*; y en particular Miranda Santos y Pereira (1984) reportaron la afinidad específica de las lectinas de *Vicia villosa* (N-acetilgalactosamina) por *T. rangeli*. La susceptibilidad ante la lisis mediada por el complemento también ha servido como parámetro de diferenciación, ya que en contraste con epimastigotes de *T. cruzi*, los epimastigotes de *T. rangeli* son resistentes a este proceso de lisis por rutas alternas. La detección de la enzima neuraminidasa por pruebas de fluorescencia del 2-(4-methylumbelliferyl-alpha-D.N.acetylneuraminic acid)-UV luz, ha permitido discriminar entre las dos especies de parásitos, en base a las cantidades fácilmente detectables de esta enzima en *T. rangeli*, en comparación con las de *T. cruzi*. El análisis comparativo de antígenos mediante diferentes técnicas (ELISA, inmunofluorescencia indirecta, inmunoblotting), ha demostrado una gran similitud antigénica, de al menos 60% entre las dos especies de tripanosomas americanos. (Guhl y Vallejo, 2003)

En relación a los estudios moleculares, se han realizado análisis de una batería de isoenzimas, entre las cuales se han descrito también tres específicas para *T. rangeli* (Neuron específica (NSE), Fosfoglucoasa mutasa (PGM) y Gliserofosfato isomerasa (GPI)) (Guhl y Vallejo, 2003). La caracterización con las isoenzimas ha podido identificar incluso dos grupos de *T. rangeli*, con características isoenzimáticas particulares, uno representado por aislados del Sur de Brasil, y otro por aislados de Honduras, Colombia y Venezuela (Steindel y col., 1994; Guhl y Vallejo, 2003). Este mismo criterio de caracterización ha permitido diferenciar tres grupos en las poblaciones de *T. cruzi*: zimodemo 1 (Z1), que en

Brasil aparece ampliamente en ambientes selváticos, zimodemo 2 (Z2) que parece estar mas asociado a infecciones en humanos en la región del cono Sur, y zimodemo 3 (Z3) que parece estar restringido a regiones del Amazonas (Miles y col., 1977). Estos grupos han sido fortalecidos por otros criterios, basados en estudios que involucran la utilización de marcadores moleculares para el análisis de secuencias de ADN del kinetoplasto (ADNk), y técnicas como el polimorfismo en el tamaño de fragmentos de restricción (RFLP) (Morel y col., 1980), los polimorfismos de ADN amplificado al azar (RAPD) (Steindel y col., 1993), o las secuencias de los genes 24S α ARNr y miniexon (Souto y Zingales, 1993; Souto y col., 1996) con las cuales se ha diferenciado *T. cruzi* en dos grupos principales, *T. cruzi* I (TCI) que incluye a los aislados del zimodemo 1, *T. cruzi* II (TCII) que incluye a los aislados de los zimodemos 2 y 3, y que a su vez es separado en cinco genotipo (IIa-IIe) (Vallejo y col., 2008). En 2007, O'connor y colaboradores realizaron análisis de secuencias del espaciador no transcrito del gen del miniexon, entre cepas pertenecientes al grupo TCI, evidenciando variabilidad genética dentro de este grupo, que permitiría separarlos en al menos tres sub-grupos.

Por otra parte se han realizado estudios de cariotipaje molecular, Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) e Hibridación con diversas sondas moleculares, para identificar bandas cromosómicas específicas de *T. rangeli* (Cuba Cuba, 1998). Los análisis de cariotipos han mostrado variaciones en el tamaño de bandas cromosómicas entre los 400 a 2.900 kb, lo que indica polimorfismo cromosómico entre las cepas aisladas de El Salvador, Honduras, Venezuela, Colombia y Panamá, y otras cepas de Brasil (Henriksson y col., 1996). En estudios realizados sobre el ADN nuclear mediante la utilización de sondas y en análisis por Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD) en el genoma de *T. rangeli*, se

corroborar también la existencia de dos sub-grupos (uno de cepas de Centro América, Colombia y Venezuela, y otro de cepas de Brasil). (Guhl y Vallejo, 2003)

Las metodologías fundamentadas en el análisis de ADNk, ADN “fingerprinting” (huella génica) y ADN ribosomales, emplean como herramienta principal la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Grisard, 1999). Con esta técnica se ha continuado el análisis sobre el polimorfismo que existe entre cepas de *T. rangeli* aisladas de diferentes vectores y hospedadores vertebrados en distintas regiones geográficas (Vallejo y col., 2002; Da Silva y col., 2004; Guevara, 2007). Así se han descrito dos grandes grupos, KP1 (+) y KP1 (-), basados en regiones conservadas del ADNk. Vallejo y col. (2002) indicaron que las cepas KP1(+) se encuentran distribuida en Colombia, Venezuela y países de Centro América donde se presenta en el domicilio la especie *Rhodnius prolixus*, mientras que la distribución de las cepas KP1 (-) no se ha establecido con precisión. Igualmente determinaron que algunas especies del género *Rhodnius* son susceptibles a *T. rangeli* KP1(+) y otras a KP1(-), proponiendo que cada especie de *Rhodnius* selecciona la sub-población de *T.rangeli* que será transmitida al hospedador vertebrado con la inoculación de saliva durante la picadura.

Por otra parte, se han realizado estudios con elementos repetidos del espaciador intergénico ribosomal (EIR) como marcador molecular de utilidad en la identificación de cepas de *T. cruzi* (González y col., 1994). Esta misma región ha sido evaluada como marcador molecular para la identificación y caracterización de *T. rangeli* (Guevara, 2007). En este caso se diseñó un ensayo de amplificación basado en las secuencias del EIR (Tr11/17) que permite, no solamente identificar los aislados de *T. rangeli* sino también discriminar por medio del tamaño de los fragmentos amplificados, cuatro grupos

coincidentes con los grupos A, B, C y D propuestos por Da Silva y colaboradores (2004), originalmente descritos en base a un estudio de los polimorfismos en la subunidad pequeña del gen ribosomal (SSU) y el espaciador interno transcrito del ARN ribosomal.

Se sabe que una misma población de *T. rangeli* puede circular entre mamíferos selváticos, humanos y triatomíneos, por lo que se requirieren más aislados de mamíferos y vectores de variadas regiones geográficas, adicionales a las estudiadas hasta la fecha, y nuevos marcadores moleculares deben ser investigados, para hacer conclusiones definitivas respecto a los factores determinantes de la segregación de *T. rangeli*, así como para dar algún estatus taxonómico a cada subgrupo. (Da Silva y col. 2004)

Muchos de los análisis de laboratorio implementados de forma rutinaria en diagnóstico e investigación de *T. cruzi* y *T. rangeli*, requieren de metodologías que involucren el crecimiento de las poblaciones naturales de parásitos aisladas en medios de cultivo, en mamíferos o en insectos triatomíneos, previo a su análisis. Se sabe que estas metodologías someten a dichas poblaciones de parásitos a un proceso de selección de subpoblaciones que puede conllevar a la pérdida de las características originales de la población natural (Deane y col, 1984); por tal motivo es importante la implementación de técnicas que permitan el estudio de muestras que contengan estos parásitos, sin poner en riesgo la integridad de las características de la población natural.

Entre las metodologías aplicadas para la detección del parásito en muestras biológicas se conoce la implementación del papel de filtro FTA (producto de la casa comercial Whatman) como soporte, el cual permite la preservación y transporte de la muestra hasta su posterior análisis. Este papel fue originalmente diseñado para la retención

y procesamiento de muestras de sangre (Orlandi y Lampel, 2000); y se ha desarrollado un protocolo adaptado para la detección de parásitos en muestras biológicas, en el cual se utiliza el papel de filtro FTA como matriz para la obtención del ADN genómico y su amplificación por PCR. Esta técnica ha demostrado ser muy práctica, rápida y reproducible al ser comparada con las técnicas moleculares comúnmente utilizadas en los laboratorios especializados para la preservación de muestras biológicas. Acoplada al PCR es muy sensible, detectando hasta la pequeña cantidad de 3 parásitos en una muestra (Orlandi y Lampel, 2000).

Utilizando marcadores, blancos del genoma nuclear y extracromosómico de los parásitos *T. cruzi* y *T. rangeli* y ensayos de amplificación especie-específicos, nos proponemos evaluar la presencia de infecciones sencillas y mixtas en muestras recolectadas en papel FTA provenientes de triatomíneos capturados en diferentes entidades federales de la República Bolivariana de Venezuela y en muestras de xenodiagnóstico; para evaluar la distribución geográfica de estas especies y las sub-poblaciones presentes, así como lo relativo a su relación parasito-vector triatomíneo.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL:

- ✓ Evaluar la presencia de infecciones sencillas y mixtas por *Trypanosoma rangeli* y *Trypanosoma cruzi* y caracterizar molecularmente los linajes y grupos en muestras provenientes de vectores y xenodiagnósticos de diferentes regiones de Venezuela, preservadas en papel FTA

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Normalizar las condiciones de preservación y recuperación de muestras contaminadas con *T. cruzi* y *T. rangeli* utilizando como medio de soporte papel de filtro FTA.
- ✓ Evaluar la sensibilidad de ensayos de PCR (ADNk, Sat195, Clon6 y P542) sobre muestras preservadas en papel FTA.
- ✓ Evaluar muestras provenientes de vectores y xenodiagnósticos de diferentes regiones de Venezuela preservadas en papel FTA para la presencia de *T. rangeli* y *T. cruzi*.
- ✓ Identificar linajes de *T. cruzi* y poblaciones de *T. rangeli* en el grupo de muestras positivas a la presencia de estos parásitos.

3. ANTECEDENTES

Las infecciones naturales sencillas y mixtas por *T. cruzi* y *T. rangeli* en triatomíneos han sido estudiadas en Venezuela desde finales de la década de los 40, cuando Pifano y Mayer (1949) reportan la aparición de este tipo de infecciones en triatomíneos capturados en el estado Yaracuy. En este trabajo se realizó una inspección al microscopio óptico de las muestras de contenido intestinal y saliva de los insectos, detectando un 8% de infecciones por *T. cruzi*, 18% de infecciones por *T. rangeli* y un 11% de infecciones mixtas. A partir de entonces, varios estudios han estado enfocados en el análisis de la distribución de las poblaciones de estos parásitos en el país, y en el estudio de la heterogeneidad tanto entre ambas especies como entre los aislados de cada una.

Más recientemente, Traviezo y Bofante-Garrido (2004) realizaron un estudio seroepidemiológico de la enfermedad de Chagas en individuos de una población del estado Lara de Venezuela, en el cual reportan un 24,2% con circulación de anticuerpos para *T. cruzi*. En este mismo trabajo evalúan 166 triatomíneos por xenodiagnóstico en los que se observó un 30,2% de infección por este parásito, que fue identificado al microscopio.

Los ensayos al microscopio se adoptaron como una herramienta rutinaria en el análisis para la detección de *T. cruzi*; posteriormente la utilización de ensayos moleculares surge como una herramienta alternativa no solo a nivel de diagnóstico, sino también en los estudios de polimorfismos en poblaciones de este parásito. Este tipo de variaciones intra-específica han sido reportadas desde finales de los años 70, con los trabajos de Miles y colaboradores (1977), quienes evaluaron varios aislados de *T. cruzi* de Brasil en base a perfiles de enzimas por electroforesis, lo cual permitió el agrupamiento de éstos en tres

zimodemos (Z1, Z2 y Z3), involucrados en ciclos de transmisión silvestres (Z1 y Z3) y ciclos de transmisión domésticos (Z2). Los trabajos realizados por Nunes y colaboradores (1997) utilizando marcadores moleculares en la secuencia del ARN del gen del espaciador líder (SL) de varias cepas de *T. cruzi*, aporta evidencia que soporta el agrupamiento de las cepas de *T. cruzi* aisladas en Brasil en dos grupos (en lugar de tres), *T. cruzi* I (TCI) asociado a ciclos silvestres y *T. cruzi* II (TCII) asociado a ciclos domésticos.

En Venezuela el estudio realizado por Añez y colaboradores en 2004, en el que se evaluaron patrones de ADN obtenidos por RAPD de aislados de *T. cruzi*, provenientes de pacientes chagásicos agudos del estado Barinas; reporta la predominancia del grupo TCI en, ubicando a este grupo en un entorno doméstico. También comentan diferencias en el perfil clínico de pacientes infectados con el grupo TCI en relación a los infectados con el grupo TCII. En este mismo año, Feliciangeli y colaboradores (2004) realizan el estudio molecular para la detección de *T. cruzi* en muestras de triatomíneos recolectadas en el estado Lara, Venezuela, e igualmente detectan una predominancia del linaje TCI, en las infecciones de estos insectos. Sin embargo, Crisante y colaboradores (2006) obtienen resultados en sus estudios que indican que los linajes TCI y TCII se encuentran circulando en Venezuela, con predominancia del linaje TCI, indiferentemente de la región geográfica y/o área endémica.

En relación a *T. rangeli*, se conoce que existe una gran variabilidad en las cepas de diferentes regiones en cuanto a su comportamiento en las especies de triatomíneos, evidenciando una diversidad en las poblaciones naturales, y sugiriendo que esta especie de tripanosoma es un complejo biológico (Guevara, 2007). En 1976, D'alejandro propuso

que *T. rangeli* podía ser considerado como un complejo de cepas variadas con una amplia distribución en ambos hospedadores vertebrados e invertebrados.

Grisard y colaboradores (1999) evaluaron cepas de *T. rangeli* de Brasil, Honduras, Colombia y Venezuela utilizando el gen del miniexon como marcador molecular, y establecieron que existen diferencias genéticas entre organismos de una cepa de Brasil estudiada, y las cepas aisladas los países de Centro América y del Norte de Sur América. Este trabajo se realizó secuenciando el gen del miniexon de dos cepas de *T. rangeli* las cuales fueron comparados con otras cepas ya descritas.

Vallejo y colaboradores (2002) realizaron estudios con marcadores moleculares en el ADN del minicírculo del kinetoplasto (ADNk). Analizando el ADN de aislados de *T. rangeli* provenientes de diferentes regiones geográficas (Brasil, Colombia, Honduras, Panamá y Venezuela) obtenidas a partir del intestino y glándulas salivares de triatomíneos, y con el diseño de un PCR dúplex utilizando tres iniciadores (S35/S36/KP1L) lograron amplificar regiones conservadas del ADNk a partir de las tres clases de minicírculos (llamadas KP1, KP2 y KP3). En este trabajo se plantea la separación de *T. rangeli* en dos grupos genéticos, diferenciados por la presencia o no del ADNk KP1, llamando las subpoblaciones KP1(+) y KP1(-), que presentaban una distribución geográfica definida: Con el grupo KP1(+) ubicado en regiones de Centro América (Colombia y Venezuela) y las del grupo KP1(-) en Brasil.

Utilizando otras herramientas moleculares, Da Silva y colaboradores (2004) clasifican a esta especie en cuatro subgrupos genéticos. Basados en los resultados obtenidos por RAPDs de 16 aislados de *T. rangeli* de humanos y mamíferos selváticos de diferentes

regiones geográficas (Brasil, Colombia, Panamá, El Salvador y Venezuela) identifican perfiles característicos que agrupan a estos aislados en cuatro subpoblaciones (A, B, C y D); y basados en una secuencia derivada del RAPD desarrollaron una PCR especie-específica para *T. rangeli*.

En su siguiente trabajo, Da Silva y colaboradores (2004) analizaron polimorfismos en la sub-unidad pequeña (SSU) y el espaciador interno transcrito de secuencias (ITS) del ADNr de aislados de *T. rangeli* de humano, mamíferos selváticos y triatomíneos de una amplia distribución geográfica; sus resultados les permiten sustentar la propuesta del agrupamiento de *T. rangeli* en las cuatro subpoblaciones descritas previamente (A, B, C y D), en los cuales los aislados de Venezuela forman parte del grupo A, y concluyen que estos grupos son independientes de la especie de hospedador mamífero y del origen geográfico del aislado.

La diversidad de las poblaciones de *T. rangeli* ha sido comprobada por Beltrame-Botelho y colaboradores (2005), quienes evaluaron la utilidad de las secuencias de espaciadores internos transcritos (ITS) entre ADNr 18S y ADNr 5.8S de varias cepas de *T. rangeli* (entre ellas las cepas venezolanas Macías y Palma 2), como herramienta para determinar la variabilidad intra-específica e inter-específica en comparación con *T. cruzi*. En sus conclusiones determinan que este marcador molecular es útil para la identificación inter-específica entre estos tripanosomatídeos; por otra parte recomiendan estudios del espaciador ITS en un mayor número de cepas de *T. rangeli* a fin de determinar su utilidad como marcador para el estudio de variaciones intra-específicas en análisis filogenéticos.

Otra región del genoma de *T. rangeli* usada como marcador genético para la identificación de este parásito y evaluación de sus polimorfismos, está basada en la secuencia del espaciador intergénico ribosomal (EIR). En los estudios realizados por Guevara (2007), quedó demostrada la utilidad de esta región no solo para la identificación de esta especie, sino también para la determinación de los grupos A, B, C, y D. En este trabajo se incorporaron aislados de Bolivia al grupo C. Al igual que en los trabajos de Da Silva y colaboradores (2004) se determinó que la separación de los grupos es independiente de la especie de hospedero y de la distribución geográfica de los diferentes aislados.

En cuanto a la metodología de preservación de muestras y aislamiento de ADN, Orlandi y Lampel (2000) basándose en metodologías de PCR con un papel de filtro, originalmente diseñado como un medio de preservación y procesamiento de sangre, desarrollaron un protocolo de extracción de ADN molde para su uso en PCR a ser utilizado en la identificación de parásitos protozoarios, con una sensibilidad de 10 a 3 parásitos aplicados directamente sobre los papeles de filtro.

Guevara y col (2007) demostraron la factibilidad de incorporar el diagnóstico molecular a la rutina del control epidemiológico utilizando los filtros FTA, al incrementar el tiempo de incubación, de 10 minutos a 24 horas, durante el tratamiento con el reactivo de extracción del ADN, y detectar mediante PCR, infecciones sencillas y mixtas por *T. cruzi* y *T. rangeli* en muestras de contenido intestinal y hemolinfa preservadas en papel de filtro.

4. MATERIALES Y METODOS

Para la realización de este proyecto se ha dispuesto de una serie de técnicas y metodologías en las áreas de microbiología, biología molecular, entomología y parasitología que han permitido, en primera instancia la detección de los parásitos *Trypanosoma rangeli* y *Trypanosoma cruzi* en muestras de triatomíneos preservadas en el papel FTA, seguida de la caracterización de grupos y linajes en las muestras positivas para los parásitos. La metodología a utilizada se describe a continuación:

4.1. Cultivo de parásitos.

Se cultivaron epimastigotes de las cepas de referencia para la especies *T. cruzi* y *T. rangeli* siguiendo las siguientes especificaciones. La cepa *T. rangeli* Triatomino, RHO/VE/98/TRIAT-1, fue cultivada y mantenida en medio bifásico compuesto de una fase sólida de Agar Sangre al 4% (DIFCO), suplementada con sangre de conejo desfibrinada al 15% y una fase líquida NNN (Novy, Mac Neal y Nicolle) (NaCl 0,1463%; KCl 0,045%; CaCl₂ 0,05% y NaHCO₃ 0,019%; pH 7.2). El cultivo se realizó en viales de 25 cm³ a temperatura ambiente. La cepa *T. cruzi* YBM, MHOM/VE/92/YBM, fue cultivada y mantenida en medio líquido LIT (Tryptosa 34,95%, Infusión de Hígado 4,66%, extracto de levadura 11,65%, glucosa 9,32%, NaCl 20,97%, KCl 0,93%, Na₂HPO₄ 17,47%, Hemina 0,047%).

4.2. Identificación molecular de las especies *T. cruzi* y *T. rangeli*.

Con la finalidad de detectar la presencia de los parásitos *T. cruzi* y *T. rangeli* en las muestras a evaluar, se normalizaron las condiciones para varios ensayos de PCR.

Para la identificación molecular de *T. rangeli* se utilizó un ensayo de amplificación basado en una secuencia repetitiva del genoma nuclear, denominada P542 cuya amplificación se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos P542-R1 y P542-R2 (Tabla 2). La mezcla de reacción de este ensayo incluyó cada oligonucleotido a una concentración final de 1 mM, 1,25 U de enzima Taq polimerasa (Invitrogen); 1x de tampón de reacción (Invitrogen), MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0,2 mM, en un volumen de 25 µL. Para cada reacción los parámetros de ciclaje fueron programados en un termociclador MJ RESEARCH modelo PTC-200 de la siguiente manera: Un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 4 minutos, luego 29 ciclos con tres pasos a 94°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto, y un ciclo de extensión final a 75°C por 5 minutos. El producto esperado para esta amplificación es un fragmento de 450 pb, el cual fue evaluado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, tampón TAE 1X. (Vargas y col., 2000)

La identificación de *T. cruzi* se realizó mediante la amplificación de secuencias repetidas dispersa en su genoma: el satélite 195 (Sat-195) (Moser y col., 1989) y el repetido Clon6 (C6) (Araya y col., 1997). La amplificación por PCR del fragmento de la secuencia repetitiva del ADN nuclear de *T. cruzi*, Sat-195, se realizó utilizando los oligonucleotidos TCZ1 y TCZ2 (Tabla 2), a una concentración de 0,5 mM, 1 U de enzima Taq polimerasa (Invitrogen), 1x de tampón de reacción (Invitrogen), MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0,2 mM, en un volumen de 25 µL. Los parámetros de ciclaje se realizaron de la siguiente manera: 30 ciclos

a 94°C por 10 minutos, 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y finalmente 72°C por 10 minutos. El producto de esta amplificación es un fragmento de 188 pb, y fue evaluado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, tampón TAE 1X. (Moser y col. 1989)

Para la amplificación de Clon6 se emplean los oligonucleotidos Clon6 F y Clon6 R (Tabla 2) a una concentración de 0,4 mM, 2,5 U de enzima Taq polimerasa (Invitrogen), 1x de tampón de reacción (Invitrogen), MgCl₂ 1,9 mM, dNTPs 0,4 mM, en reacción con un volumen de 25 µL. Los parámetros del ciclado se realizaron de la siguiente manera: Un ciclo inicial a 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de tres pasos a 95°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto y 75°C por 1 minuto; posteriormente un ciclo a 50°C por 1 minuto y un ciclo final a 72°C por un minuto. El producto de amplificación fue evaluado mediante electroforesis en gel de agarosa 2%, esperando en este caso un fragmento de 325 pb. (Araya y col., 1997).

La detección simultánea de infecciones mixtas por *T. cruzi* y *T. rangeli* se realizó con la amplificación de una región del ADNk utilizando los oligonucleotidos 121-122 (Tabla 2), que permiten la amplificación del ADNk tanto en *T. cruzi* como en *T. rangeli*, con las siguientes condiciones de reacción: Los oligonucleotidos a una concentración final de 1 µM, 0,025 U de enzima Taq polimerasa (Invitrogen); 1x de tampón de reacción (Invitrogen), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, en un volumen de 25 µL. Los parámetros de ciclaje se realizaron de la siguiente manera: Un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 4 minutos, 68°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos, seis ciclos de tres pasos a 94 °C por 1 minuto, 64°C por 1 minuto y a 72°C por 1 minuto, y final mente un ciclo a 72°C por 5 minutos. El producto de esta amplificación genera un fragmento de 330 pb para *T. cruzi* y

en el caso de *T. rangeli* un fragmento de 760 pb y un grupo de bandas entre 300 y 450 pb, los cuales fueron evaluados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3%, TAE 1X.

En un grupo de muestras se utilizaron los oligonucleótidos S35 y S36 que anclan en regiones conservadas del ADNk tanto de *T. cruzi* como de *T. rangeli*, (Tabla 2) a una concentración de 1 mM, 0,05 U de enzima Taq polimerasa (Invitrogen), 1x de tampón de la enzima (Invitrogen), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, en reacción con un volumen de 25 µL. Los parámetros del ciclado se realizaron de la siguiente manera: 1 ciclo de tres pasos a 94°C por 4 minutos, 68°C por 2 minutos y 72°C por 2 minutos, posteriormente 5 ciclos de tres pasos a 94°C por 1 minuto, 66°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto. Tanto los oligonucleótidos del ensayo ADNk 121/122 como los del ensayo S35/S36 reconocen las regiones conservadas de los minicirculos de *T. cruzi* y *T. rangeli*, generando en el primero un fragmento de 330 pb y en la segunda especie de tripanosoma una banda definida de 760 pb y un grupo heterogéneo de bandas entre 300 y 450 pb (Sturm y col., 1989; Vallejo y col., 2002).

4.3. Identificación de linajes de *T. cruzi* y las poblaciones de *T. rangeli*.

Las muestras con resultados positivos para la identificación de *T. cruzi* y/o *T. rangeli*, fueron evaluadas para la identificación de los linajes de *T. cruzi* y los grupos de *T. rangeli*.

La identificación de los linajes de *T. cruzi* se llevo a cabo usando los ensayos PCR D71-D72 (Souto y Zingales, 1993) y PCR Miniexon (Souto y col., 1996). El ensayo de PCR D71/D72 ancla en la región 24S del ARNr (Tabla 3) y genera un producto de amplificación de 110 pb para el linaje TCI y otro de 125 pb para el linaje TCII. La reacción

estuvo compuesta por los oligonucleotidos D71 y D72 a una concentración de 1 μ M cada uno, 1.25 U de enzima Taq polimerasa (Invitrogen), 1x de tampón de reacción (Invitrogen), $MgCl_2$ 3 mM, dNTPs 200 μ M, en un volumen de 25 μ L. El programa de amplificación utilizado se inició con un primer ciclo de 5 minutos a 94 °C, seguido de diez ciclos con tres pasos a 94 °C, 60 °C, 72 °C, con una duración de 1 minuto cada uno, 25 ciclos con tres pasos a 93 °C, 60 °C, 72 °C, 1 minuto de incubación a cada temperatura, y un ciclo a 60 °C por un minuto, para finalizar con un ciclo a 72 °C por 5 minutos (Souto y Zingales, 1993).

El ensayo de PCR Miniexon, se realizó con los oligonucleotidos TC1 (específico para el grupo I), TC2 (específico para el grupo II) y TC (común para ambos grupos), anclados en la región intergénica de los genes miniexon, el cual permiten la amplificación de un fragmento de 350 pb con el ADN del grupo TCI y un fragmento de 300 pb con el ADN del grupo TCII (tabla 3). La mezcla de reacción estuvo compuesta por cada oligo a una concentración de 1 μ M, 1.25 U de enzima Taq polimerasa (Invitrogen), 1x de tampón de reacción (Invitrogen), $MgCl_2$ 1.5 μ M, dNTPs 200 μ M, en un volumen de 25 μ L. Esta reacción se llevó a cabo bajo un programa de amplificación se que inició con un ciclo a 94 °C por 1 minuto, seguido de 27 ciclos a 94 °C, 55 °C y 72 °C, por 30 segundos para cada temperatura, para finalizar con un ciclo a 72 °C por 10 minutos (Souto y col., 1996). Los productos de esta reacción fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%, TBE 1X.

La identificación de las poblaciones de *T. rangeli* en aquellas muestras que resultaran positivas a la presencia de este parasito, sería realizada con el ensayo de PCR EIR-Tr11/17 (Guevara, 2007), el cual amplifica fragmentos entre 300 pb y 350 pb (Tabla 3), el cual utiliza el programa de amplificación que se inicia con un ciclo de

desnaturalización por un minuto, 10 ciclos con tres pasos a 95 °C, 55 °C, 72 °C por 1 minuto para cada temperatura, luego 25 ciclos a 94 °C, 55 °C y 72 °C por 1 minuto a cada temperatura, para finalizar con 5 minutos a 72 °C.

Tabla 2: Secuencias de iniciadores y tamaño del producto de amplificación del PCR para identificación de *T. rangeli* y *T. cruzi*

| Blanco | Secuencia iniciadora | Tamaño del producto de PCR (pb) | Organismo que identifica | Referencia |
|----------------|--|---|---|-----------------------|
| P542 | R1: 5'-CGC GGC TCG CAC TGC ACC TC-3' R2: 5'-GGC GCA TCC ACC GAG CAC TG-3' | 450 | <i>T. rangeli</i> | Vargas y col., 2000 |
| Clon6 | F: 5'-GAT GCG CAT TTG TTA CGA-3' R: 5'-CTG GCT GGC CTT GTA TCC-3' | 325 | <i>T. cruzi</i> | Araya y col., 1997 |
| Sat 195 | TCZ1: 5'-CGA GCT CTT GCC ACA CGG GTG CT-3' TCZ2: 5'-CCT CCA AGC AGC GGC TAG TTC AGG-3' | 188 | <i>T. cruzi</i> | Moser y col., 1989 |
| ADNk | 121: 5'-AAA TAA TGT ACG GG(T/G) GAG ATG CAT TA-3' 122: 5'-GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA-3' | 330 (<i>T. cruzi</i>) 760 } (<i>T. rangeli</i>) 300 a 450 } | <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i> | Espinola y col., 2003 |
| | S35: 5'-AAA TAA TGT ACG GGA GAT GCA TGA-3' S36: 5'-GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT-3' | 330 (<i>T. cruzi</i>) 760 } (<i>T. rangeli</i>) 300 a 450 } | <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i> | Sturm y col., 1989 |

Tabla 3: Descripción de ensayos de amplificación para la determinación de linajes de *T. cruzi* y grupos de *T. rangeli*.

| Blanco | Secuencia iniciadora | Tamaño del producto de PCR (pb) | Organismo que identifica | Referencia |
|--|--|--|--------------------------|------------------------|
| ARNr α Sub-unidad mayor | D71: 5'-AAG GTG CGT CGA CAG TGT GG-3' D72: 5'-TTT TCA GAA TGG CCG AAC AGT-3' | 110 (linaje TCI) 125 (linaje TCII) | <i>T. cruzi</i> | Souto y Zingales, 1993 |
| Miniexon | TC1: 5'-GTG TCC GCC ACC TCC TTC GGG CC-3' TC2: 5'-CCT GCA GGC ACA CGT GTG TGT G-3' TC: 5'-CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG-3' | 350 (linaje TCI) 300 (linaje TCII) | <i>T. cruzi</i> | Souto y col., 1996 |
| EIR | Tr11: 5'-CTC GAG AGA GCG GTG ATA ATG AGA C-3' Tr17: 5'-GTT GGA GAT GTG GAC GTG C-3' | 344 (Grupo A) 305 (Grupo B) 313 (Grupo C) 350 (Grupo D) | <i>T. rangeli</i> | Guevara, 2007 |

4.4. Marcaje de la sonda de ADN

Las sondas de ADN que se utilizaron para la hibridación de los productos de amplificación se obtuvieron mediante la incorporación de UTP digoxigenina durante la amplificación por PCR del ADN genómico de las cepas de referencia *T. rangeli* Triatomino y *T. cruzi* YBM, con los oligonucleotidos específicos de cada uno de los ensayos de amplificación que se realizaron (P542, Clon6, Sat195 y ADNk).

4.5. Hibridación molecular.

Los productos de amplificación de cada ensayo de PCR fueron separados en gels de agarosa al 2% y 3% (ver sección 4.2 de materiales y métodos), para su posterior registro fotográfico y transferencia a membranas de Nylon (Amersham Biosciences, Hybond-N+) mediante transferencia a membrana de Nylon al vacío, en el LKB 20016 VacuGene. El procesamiento del gel se realizó agregando consecutivamente las siguientes soluciones: solución alcalina (NaOH 2%; NaCl 8,7%) durante 3 minutos, solución amortiguadora (Tris-HCl 12%; NaCl 8,7%) por 3 minutos, y por último de solución de transferencia 20X SSC (NaCl 17,5%; Citrato de Sodio 8,8%) durante 45 minutos.

Una vez realizada la transferencia, la membrana se fijó durante 30 segundos con luz UV (en un transiluminador) y fue secado a temperatura ambiente. La membrana fue seguidamente incubada con solución de hibridación (50% de formamida; SSC 5x; SDS 0,2%; N-lauril sarcosina 0,1%; ADN de esperma de salmón 0,1mg/mL) (Sambrook y col. 1989), durante 3 horas a 37°C. La hibridación se realizó con la sonda marcada, luego de su desnaturalización a 90 °C por 10 min, con digoxigenina (1mL de solución de hibridación, 1µL de sonda) en una incubación a 37°C por una noche. Los lavados secuenciales de la

sonda se realizaron con solución SSC 2X, 0,1% SDS a 37°C una vez, seguido de cuatro lavados con solución SSC 1X, 0,1% SDS a 60°C, y un lavado con solución de lavado III (SSC 0,2X, 0,1% SDS) a 65°C. En cada caso los lavados fueron de 15 minutos.

Para la detección de la sonda hibridada, la membrana fue enjuagada con tampón de ácido maléico (pH 7,5) e incubada durante 3 horas en solución bloqueante (Tampón Ácido maleico, Agente bloqueante) con agitación a temperatura ambiente. Luego se incubó la membrana con una dilución 1/5000 del anticuerpo (Antidigoxigenina-AP conjugado) en solución de bloqueo por 30 minutos con agitación a temperatura ambiente, seguido de dos lavados con tampón de lavado (0,3% Tween20 en tampón de ácido maléico) por 15 minutos a temperatura ambiente y la posterior incubación con tampón de detección (Tris-HCl 0.1M, NaCl 0.1 M), seguidamente se añadió el sustrato quimioluminiscente CSPD, para luego incubar por 5 minutos a 37°C, las membranas fueron expuestas durante 30 minutos y tres horas a películas BIOMAX MS (Kodak), para luego revelar la imagen al sumergirlas en solución reveladora y solución fijadora (Kodak).

4.6. Normalización de las condiciones de preservación y recuperación de muestras y establecimiento de los niveles de sensibilidad de los ensayos de amplificación en filtros de papel FTA.

Partiendo de las condiciones para la purificación de ADN a partir de papel de filtro FTA establecidas por Guevara y colaboradores (2007), se evaluaron los parámetros de volumen de muestra, tiempo de secado, tiempo de incubación en el reactivo de purificación (RP), y tamaño del papel, en cuanto a su rendimiento en los ensayos de amplificación, los cuales son registrados en la sección de Resultados.

Los ajustes en la metodología para la normalización de las condiciones experimentales y el establecimiento de la sensibilidad de los ensayos de amplificación se realizaron utilizando diluciones seriadas en solución salina de epimastigotes de *T. rangeli* Triatomino y *T. cruzi* YBM, en concentraciones estimadas por conteo en el hemocitometro y partiendo desde 1×10^3 hasta 0,05 parásitos, que fueron colocados en discos de papel de filtro FTA de 0,5 cm de diámetro, los cuales se dejaron secar a temperatura ambiente (TA). Estos discos fueron sometidos al protocolo de extracción de ADN siguiendo las instrucciones de la casa comercial con modificaciones (Guevara y col., 2007); brevemente, se realizaron dos incubaciones de sucesivas de 30 min cada una con 200 μ L de un RP (FTA Purification Reagent, Whatman, WB120204), para posteriormente realizar un lavado con 200 μ L de tampón TE (10 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 8), y un período final de secado a TA durante una noche.

4.7. Evaluación de muestras provenientes de vectores preservadas en papel FTA para la presencia de *T. rangeli* y *T. cruzi*.

Un bloque de muestras se obtuvo de triatominos capturados por particulares en sus domicilios o peridomicilios, durante los meses de septiembre del años 2005, abril de 2008 y entre los meses de abril y mayo del año 2009, en diferentes localidades del Distrito Capital, de los estados aledaños Miranda y Vargas, y del estado Sucre (Figura 2). Los triatominos fueron entregados en la Sección de Entomología Médica del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela (UCV) a cargo del Dr. Matias Reyes Lugo, o al Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Biología Experimental (LGM-IBE), de la Facultad de Ciencias de la UCV a cargo de la Dra. Palmira Guevara. Los ejemplares recibidos fueron identificados con la utilización de las claves de Ramírez-Pérez (1985) y

Carcavallo y colaboradores (1998), y se llevó un registro con los datos de especie, sexo, localidad donde fue capturado y hora de captura.

Las muestras de contenido intestinal y hemolinfa fueron obtenidas de los insectos mediante la disección, cortando en la parte posterior del abdomen a nivel del ámpula rectal para exponer la cavidad abdominal. Utilizando una jeringa de 1 mL, se inyectaron por el ámpula rectal aproximadamente 200 μ L de solución salina (0.85%) (SS) que permitieron diluir el contenido intestinal. El líquido recuperado de la cavidad abdominal fue colocado sobre el papel FTA y secado a temperatura ambiente para realizar posteriormente los análisis de PCR. Paralelamente se tomó una gota del contenido intestinal en SS para la observación de las muestras al microscopio de luz.

Un segundo bloque de muestras provenientes del municipio Andrés Eloy Blanco, estado Lara (Figura 2), fue recolectado y proporcionado por la Dra. Evamarys Rodríguez del Centro de Investigaciones en Salud Pública Jacinto Convit de la Universidad Central de Venezuela. 68 de estas muestras consistieron en la hemolinfa recolectada a partir de xenodiagnósticos realizados a mamíferos domésticos (perros y gatos) de domicilios visitados en el municipio, utilizando ninfas sanas de la especie *Rhodnius prolixus* en estadio II con 20 días de ayuno. Las muestras fueron codificadas con un número de casa y el nombre del animal (Tabla 4). Los triatomíneos fueron lavados en SS (0,8%), y las muestras de hemolinfa fueron recuperadas luego de cortar los tres pares de patas del insecto y colectadas en el disco de papel FTA. También fueron colectadas las muestras de hemolinfa de tres triatomíneos capturados en tres de los domicilios visitados. En todos los casos las muestras de heces de los triatomíneos del xenodiagnóstico y los capturados fueron

evaluadas al microscopio de luz en el Centro de Investigaciones en Salud Pública Jacinto Convit.

Todas las muestras colocadas en los filtros FTA, fueron tratadas bajo el protocolo de extracción con el RP descrito en la sección 4.3 de materiales y métodos, bajo las condiciones establecidas en el proceso de normalización y determinación de la sensibilidad de la metodología (ver sección Resultados, Fig. 4)

Se realizaron los PCR P542 para la detección de *T. rangeli* en algunas de las muestras, y para evaluar la presencia de *T. cruzi* en otro grupo se realizó el PCR Sat195, y para la detección de ambas especies se realizó el PCR 121-122 (Tabla 2), determinando de esta manera la existencia de infecciones simples y mixtas de estos parásitos en las muestras.

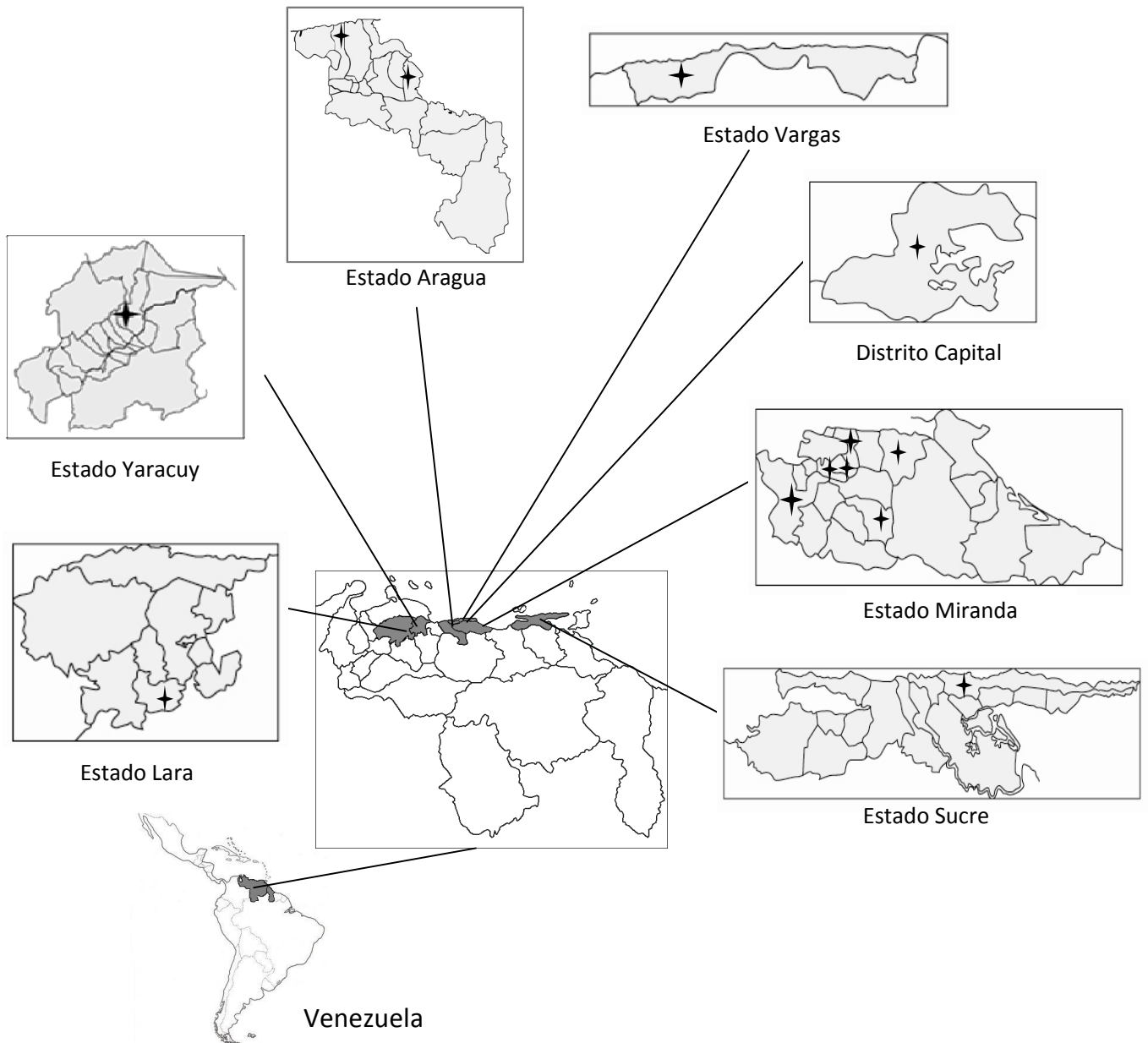


Figura 2. Ubicación de las localidades de procedencia de las muestras. Las estrellas (✦) indican los municipios de cada entidad federal donde se recolectaron las muestras. Estado Lara: Municipio Andrés Eloy Blanco; Estado Aragua: Municipios Girardot y Santos Michelena; Estado Vargas: Municipio Vargas; Distrito Capital: Municipio Libertador; Estado Miranda: Municipios Baruta, El Hatillo, Sucre, Independiente, Zamora y Guacaipuro; Estado Sucre: Municipio Arismendi; Estado Yaracuy: Municipio San Felipe.

5. RESULTADOS

5.1. Normalización de las condiciones de preservación y recuperación de muestras de vectores a partir de filtros FTA.

La conservación y procesamiento de muestras de heces y hemolinfa se inició siguiendo el procedimiento diseñado por Guevara y colaboradores, 2007; sin embargo fue necesario reevaluar los parámetros relativos al grado de saturación del filtro, tamaño del disco a procesar, volumen del reactivo de purificación y tiempo de incubación durante el procesamiento, hasta lograr una amplificación en muestras control, consistentes en cantidades conocidas de parásitos de cultivo.

El ensayo de varias combinaciones de estos parámetros permitió establecer el protocolo mostrado en la figura 4, bajo el cual fueron tratadas las muestras. En la figura 3 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de el grado de saturación del papel FTA; en este ensayo se saturaron tres discos de papel FTA de 0,5 cm de diámetro con 100 μ L, 50 μ L y 25 μ L respectivamente, de un cultivo de *T. rangeli* Triatomino diluido hasta 5000 parásitos/mL. Secciones de 1 a 2 mm de diámetro de estos papeles cortadas con sacabocados (marca Harris UNI-CORE™), fueron sometidas al protocolo de extracción con el reactivo de purificación con dos incubaciones de 30 min. en volúmenes de 200 μ L a temperatura ambiente, seguido de un lavado con tampón TE; como se indica en la figura 4. Estos discos fueron utilizados para realizar el ensayo de PCR P542. En los carriles 5 y 6 correspondientes a papeles bañados con 50 μ L y 25 μ L, se observó la banda de 450 pb correspondiente al control positivo de ADN de *T. rangeli* en el carril 3, mientras que para el papel saturado con 100 μ L no se observó la amplificación de este fragmento.

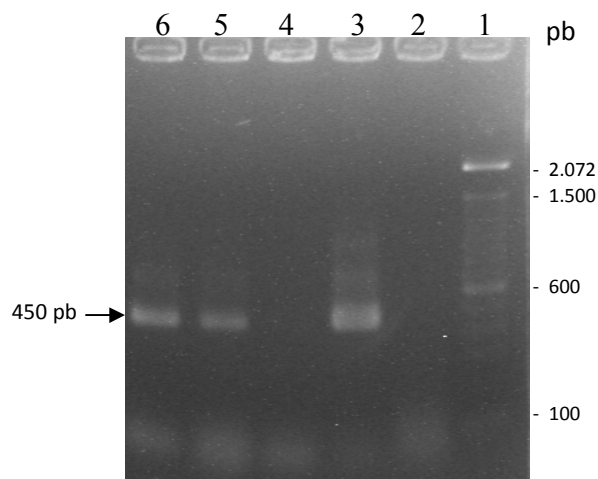


Figura 3. Normalización de los niveles de saturación del disco de papel FTA. Resultado del ensayo de PCR P542 usando como ADN templado secciones de 1,2 mm tomados de discos de 0,5 cm. de diámetro saturados con volúmenes variables de una dilución de 5000 parásitos/mL de un cultivo de *T. rangeli*. Gel de agarosa 2%, TAE 1X. Carril **1**. Marcador de peso molecular 100 pb.; carril **2**. H₂O; carril **3**. ADN de *T. rangeli* Triatomino; carril **4**. 100 μL; carril **5**. 50 μL; carril **6**. 25 μL. La flecha indica el peso molecular de la banda esperada.

La figura 4 muestra el esquema del protocolo normalizado para la preservación de la muestra en el papel FTA y el tratamiento a seguir para la purificación del ADN a ser amplificado. La toma y procesamiento de las muestras se realizó en discos de papel FTA de 0,5 cm de diámetro procurando impregnar con la muestra hasta la saturación y permitiendo que secase completamente a TA. Para el procesamiento de los filtros contentivos de las muestras se cortaron hasta 5 secciones de 1 a 2 mm. de diámetro, los cuales fueron incubados con 200μL del RP a TA durante 30 minutos, para luego descartar el reactivo y realizar una nueva incubación por 30 minutos mas con la misma cantidad del RP, el cual fue descartado para realizar un lavado con 200 μL de buffer TE (10 mM, Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8) y dejar secar a TA para luego usar una de las secciones como ADN molde en la reacción de PCR.

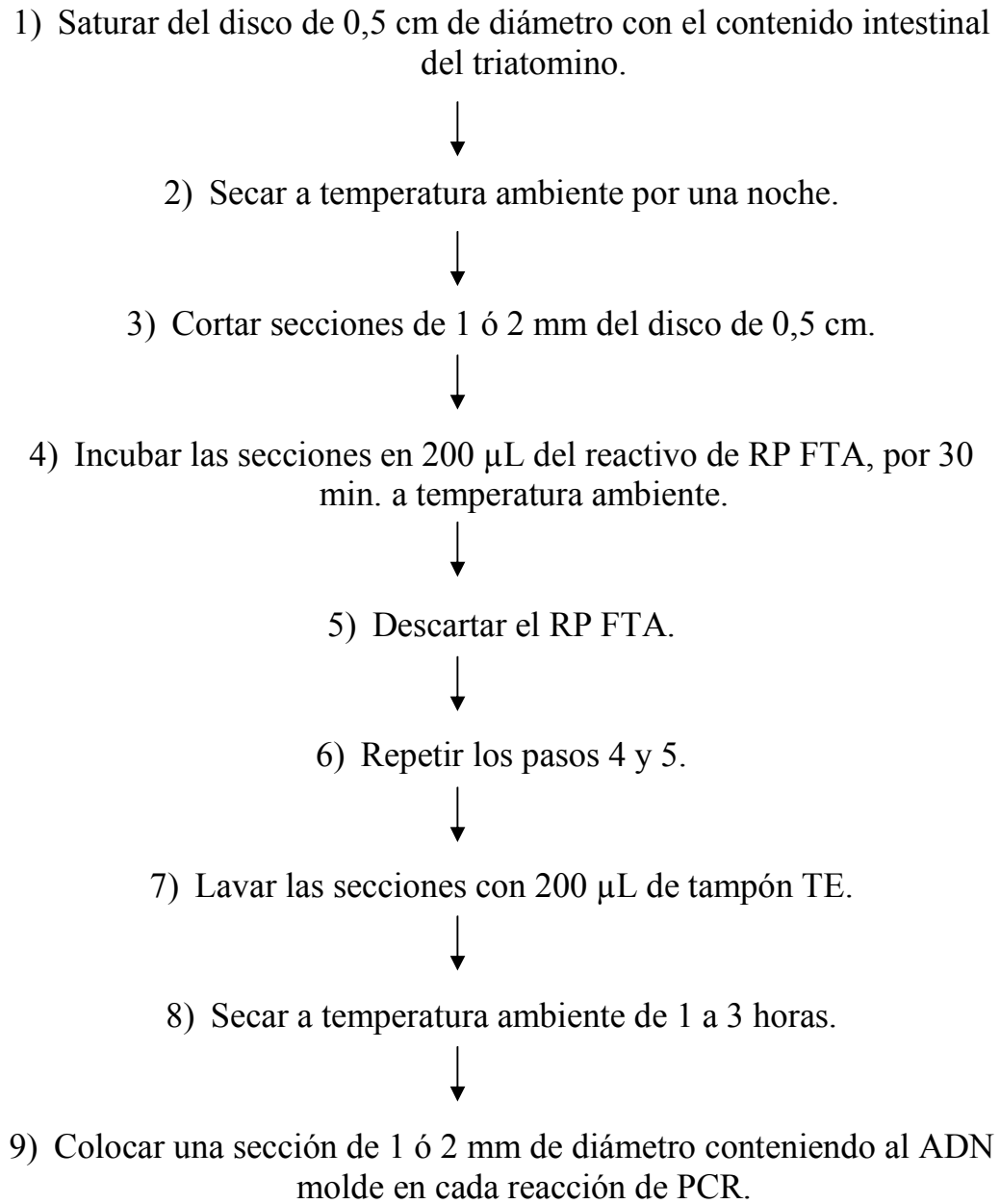


Figura 4. Esquema de tratamiento establecido para la extracción de ADN de muestras preservadas en papel FTA.

5.2. Establecimiento de los niveles de sensibilidad de los ensayos de amplificación.

Una vez establecidas las condiciones de preservación y extracción de muestras en papel FTA, se procedió a determinar la sensibilidad de la técnica de preservación y recuperación de ADN en papel FTA, para detectar ADN de tripanosomas, mediante pruebas moleculares utilizando diluciones seriadas de epimastigotes de cultivo de *T. rangeli* Triatomino, colocadas en discos de 0,5 cm de diámetro del papel FTA y tratados bajo el protocolo descrito anteriormente en la figura 4. La evaluación realizada permitió una sensibilidad de detección desde 500 parásitos/ μ L hasta 0,5 parásitos/ μ L para el ensayo PCR P542, y se reporta en la figura 5.

De acuerdo al esquema de trabajo diseñado, los filtros fueron impregnados con un rango diluciones del cultivo de *T. rangeli* desde 500 parásitos/ μ L hasta 0,005 parásitos/ μ L. 10 μ L de cada una de estas diluciones fueron colocados en discos de 0,5 cm. colocando un número total de parásitos de 5000, 1000, 500, 100, 50, 10, 5, 1, y 0,5 parásitos por filtro respectivamente. Secciones de 1 mm. de estos discos fueron tratadas bajo el protocolo presentado en la figura 4 y usados como ADN templado en la determinación de la sensibilidad de la técnica. Los canales 4 al 10 de la figura 5 demuestran la amplificación de fragmento de 450 pb, determinando que a nivel del análisis en gel de agarosa, el ensayo es capaz de detectar hasta 5 parásitos en 10 μ L ò 0,5 p/ μ L en una muestra (carril 10).

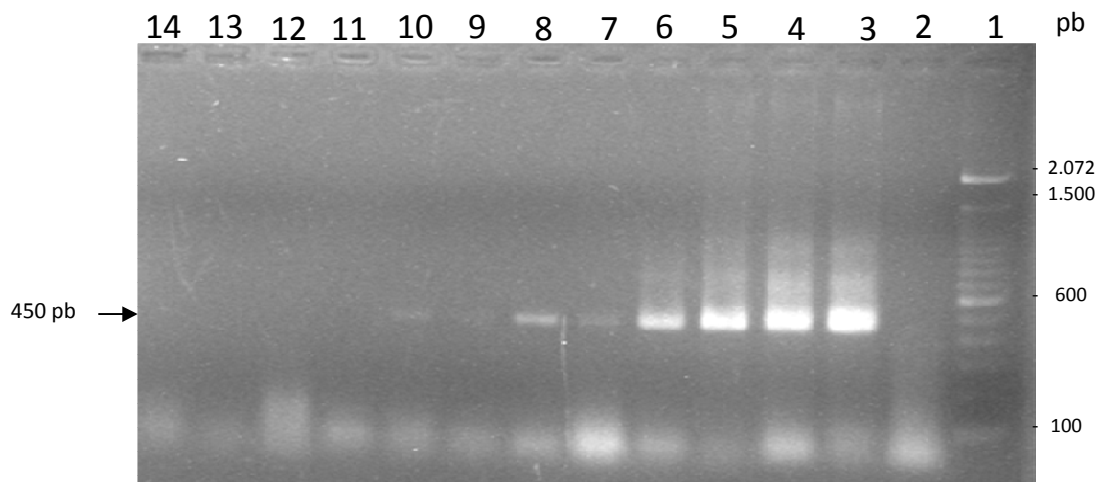


Figura 5. Evaluación de los niveles de sensibilidad del ensayo de PCR P542 sobre muestras preservadas en papel FTA. PCR P542 sobre diluciones seriadas de un cultivo de epimastigotes de *T. rangeli* preservadas y procesadas en discos de papel FTA de 0,5 cm. de diámetro. Gel de agarosa 2% TAE 1X. Carril 1. Marcador de peso molecular 100 pb.; carril 2. H₂O; carril 3. ADN de *T. rangeli* Triatomino; carril 4. 500 p/μL; carril 5. 100 p/μL; carril 6. 50 p/μL; carril 7. 10 p/μL; carril 8. 5 p/μL; carril 9. 1 p/μL; carril 10. 0,5 p/μL; carril 11. 0,1 p/μL; carril 12. 0,05 p/μL; carril 13. 0,01 p/μL; carril 14. 0,005 p/μL. La flecha indica el peso molecular de la banda esperada.

5.3. Evaluación de muestras provenientes de vectores preservadas en papel FTA para la presencia de *T. rangeli* y *T. cruzi*.

Los resultados de las evaluaciones moleculares con los ensayos P542, Sat195, ADNk para la determinación de las infecciones sencillas y mixtas con *T. cruzi* y *T. rangeli* se reportan para el primer bloque de muestras (estados Sucre, Miranda, Vargas, Yaracuy, Aragua y Distrito Capital) en las imágenes de las figuras 7 a 12, como muestras representativas del total de los ensayos realizados que se resumen en las tablas 4 y 5, conjuntamente con los resultados de las evaluaciones al microscopio de las heces de los triatominos. Las figuras 13 a 16 muestran los resultados del segundo bloque de muestras (estado Lara), los cuales son resumidos en la tabla 6. En todos los gels se

presentan los controles positivos y negativos, que demuestran la especificidad del ensayo, el control del procesamiento y ensayo, descartando los falsos positivos con productos esperados para todos los controles.

El primer grupo analizado estaba conformado por un total de 84 muestras, de las cuales 6 correspondieron a hemolinfa, 18 a contenido intestinal y 60 a una mezcla de ambos fluidos diluidos con solución salina. Estas muestras fueron colectadas a partir de 76 triatominos capturados en doce municipios de seis estados de Venezuela. 40 triatominos del estado Miranda (municipios Baruta, El Hatillo, Sucre, Independiente, Guaicaipuro y Zamora), 11 del estado Sucre (municipio Arismendi), 7 del estado Vargas (municipio Vargas), 4 del estado Aragua (municipios Santos Michelena y Girardot), 4 del estado Yaracuy (municipio San Felipe) y 10 del Distrito Capital (municipio Libertador). De estos, 8 corresponden al Género *Rhodnius*, 65 al Género *Panstrongylus*, 1 al Género *Triatoma*, y 2 al Género *Eratyrus* (Tabla 4). El segundo grupo de muestras analizado estaba conformado por 71 muestras de hemolinfa, de las cuales 3 correspondieron a muestras de triatominos capturados intradomiciliariamente, y las restantes 68 a triatominos de xenodiagnóstico de los mamíferos domésticos que habitaban los 29 domicilios visitados.

5.3.1. Análisis de las muestras de triatominos por microscopia óptica.

La evaluación de las muestras frescas de los triatominos se realizó solo para las muestras procesadas en el LGM-IBE y las provenientes del estado Sucre (tablas 4 y 5), para el resto de los triatominos (seis del estado Miranda y tres del estado Lara) provenientes de capturas y xenodiagnósticos no disponemos del resultado de la evaluación por microscopia óptica.

Las muestras de contenido intestinal y mezcla de hemolinfa-contenido intestinal de 71 de los triatominos fueron analizadas al microscopios de luz. 15 de estas muestras resultaron positivas al examen microscopio para la presencia de tripanosomas, observando formas flageladas como las presentadas en la figura 6.

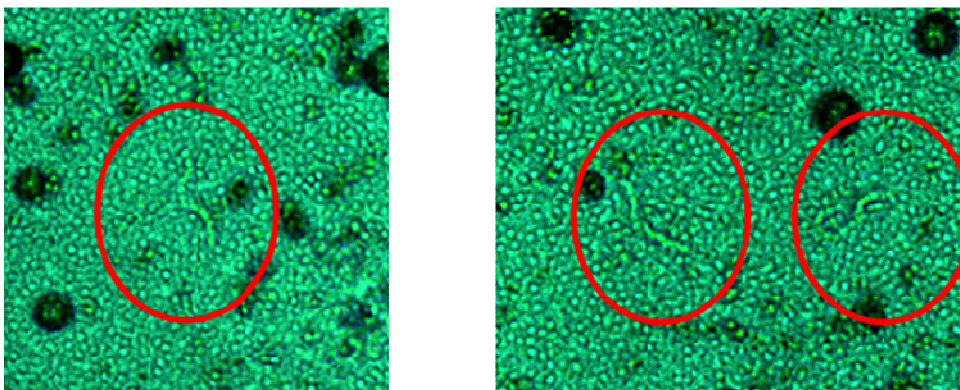


Figura 6. Diagnostico al microscopio (400X) de infecciones en muestras de heces de triatominos. Los círculos señalan los flagelados encontrados en la muestra extraída del triatomino 25.

5.3.2. Evaluación molecular para la detección de infecciones sencillas y mixtas por *T. cruzi* y *T. rangeli*.

El primer bloque de muestras preservadas en papel FTA fue analizado inicialmente con los ensayos de PCR Sat195 y Clon6 para la detección de *T. cruzi*, P542 para detección de *T. rangeli* y ADNk utilizando los oligonucleótidos S35-S36, para la detección de infecciones *T. cruzi* y *T. rangeli*, A partir del resultado positivo obtenido con la utilización del ensayo de PCR ADNk con los oligonucleótidos 121-122, se adoptaron estos indicadores para los análisis subsecuentes.

Las muestras de diecisiete de los triatominos del primer bloque fueron evaluadas con los ensayos PCR P542, Clon6 y Sat195, obteniendo como resultado ocho muestras

positivas a la presencia de *T. cruzi* por el ensayo PCR Sat195, correspondientes a los triatomos identificados con los números 1, 4, 5, 13, 14, 15, 16 y 17 en la tabla 4. Los resultados del ensayo PCR Sat195 fueron confirmados por hibridación en membrana de Nylon con sonda marcada con digoxigenina. En la figura 7 (sección A, carriles 3, 6 y 7) se muestran los resultados positivos de las muestras de los triatomos 1, 4 y 5; en todas estas se observa una banda de peso molecular de 188 pb similar al control positivo de *T. cruzi* YBM, lo que indica la infección por *T. cruzi*, verificado en la hibridación con la sonda (sección B, carriles 3, 6 y 7).

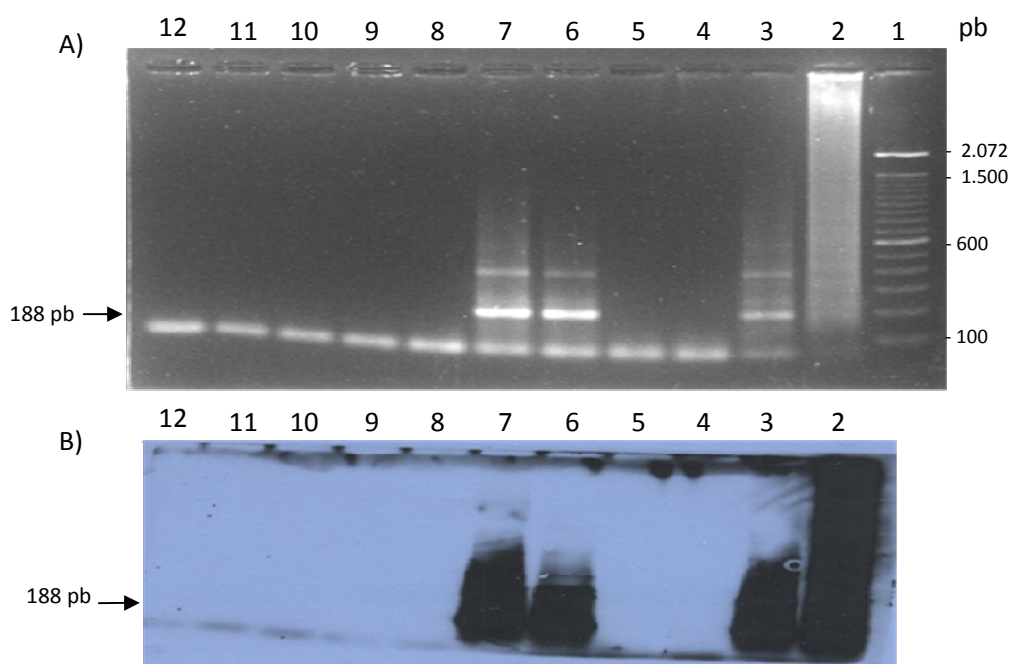


Figura 7. Identificación de *T. cruzi* por PCR Sat195-Hibridación en muestras de triatomos preservadas en papel FTA, provenientes del municipio Arismendi del estado Sucre. A) Corrida electroforética en gel de agarosa 2% TAE 1X de los productos de la PCR Sat195. B) Hibridación en membrana de nylon con sonda Sat195 marcada con digoxigenina a los 30 min de exposición. Carril 1. Marcador de peso molecular 100pb; carril 2. ADN de *T. cruzi* YBM; carril 3. Triatomo 1; carril 4. triatomo 2; carril 5. triatomo 3; carril 6. triatomo 4; carril 7. triatomo 5; carril 8. triatomo 6; carril 9. triatomo 7; carril 10. triatomo 8; carril 11. triatomo 9; carril 12. triatomo 11. La flecha indica el peso molecular de la banda esperada.

Considerando que el PCR ADNk permite la detección simultánea de ambas especies de tripanosomas (ver figura 8), adoptamos este ensayo como prueba inicial en el esquema de evaluación.

En los análisis realizados con la PCR ADNk empleando los oligonucleótidos S35 y S36, fue confirmada la presencia de *T. cruzi* en las muestras que corresponden a los triatomos identificados con los números 4 y 5 respectivamente; resultado que fue confirmado por hibridación con sonda marcada con digoxigenina y mostrado en la figura 8, en la que se observan bandas similares en el gel y en la hibridación con la sonda para las muestras de los carriles 10 y 11 considerando el resultado del control positivo con ADN de *T. cruzi* en el carril 2.

Los ensayos realizados con la PCR ADNk utilizando los oligonucleótidos 121 y 122 arrojaron resultados que identificaron ADN de *T. cruzi* para la mayoría de las muestras analizadas; de un total de 63 muestras analizadas con estos iniciadores, 54 que corresponden a 51 triatomos, resultaron positivas a la presencia de *T. cruzi* (tabla 4).

De los 76 triatomos analizados, 58 (76%) resultaron positivos a la presencia de *T. cruzi*. La presencia de *T. rangeli* no fue detectada en ninguna de las muestras analizadas.

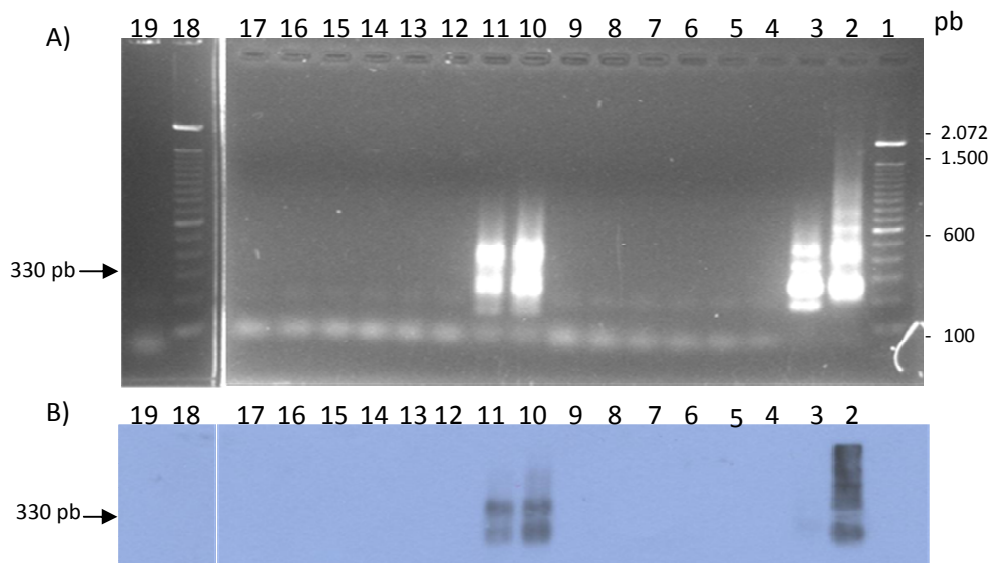


Figura 8. Análisis por PCR ADNk-Hibridación con los oligonucleotidos S35-S36 en muestras de heces y hemolinfa de triatominos preservadas en papel FTA, provenientes del municipio Arismendi del estado Sucre. A) Corrida electroforética en gel de agarosa 2% TAE 1X de los productos de la PCR ADNk. B) Hibridación en membrana de nylon con sonda marcada con digoxigenina a los 30 min. de exposición. Carriles 1 y 18. Marcador de peso molecular 100pb; carril 2. ADN de *T. cruzi* Y; carril 3. ADN de *T. rangeli* Triatomino; carril 4. H₂O; carril 5. Triatomino 1 (hemolinfa); carril 6. Triatomino 1 (contenido intestinal); carril 7. Triatomino 2 (hemolinfa); carril 8. Triatomino 2 (contenido intestinal); carril 9. Triatomino 3 (contenido intestinal); carril 10. Triatomino 4 (contenido intestinal); carril 11. Triatomino 5 (contenido intestinal); carril 12. Triatomino 6 (contenido intestinal); carril 13. Triatomino 7 (contenido intestinal); carril 14. Triatomino 8 (contenido intestinal); carril 15. Triatomino 9 (contenido intestinal); carril 16. Triatomino 10 (contenido intestinal); carril 17. Triatomino 11 (contenido intestinal); carril 19. Triatomino 12 (hemolinfa). La flecha indica el peso molecular de la banda esperada.

5.3.3. Evaluación molecular para determinación de linajes

La determinación de los linajes de *T. cruzi* en las muestras que resultaron positivas a la presencia de este parásito, se llevó a cabo evaluando el polimorfismo de la región del ARNr 24S con el ensayo de PCR D71-72 en un grupo de estas muestras, y polimorfismos de la región intergénica de los genes minixon con el ensayo PCR Minixon. En el primer bloque de muestras analizado (Figura 9A), se observaron patrones de bandas en el gel entre

las que se puede distinguir la banda de 110 pb correspondiente al linaje TCI de *T. cruzi*, presente en el control positivo para este linaje (figura 9, carril 12). Al realizar la hibridación con una sonda específica para indicar el producto del linaje TCI, fue posible observar dos muestras positivas con señal de hibridación correspondientes a 110 pb para las muestras de los triatomino 4 y 17 en los carriles 4 y 9 de la figura 9B; adicionalmente se observó hibridación de la sonda específica para el linaje TCI, con el producto de PCR del control de linaje TCII, con ADN de la cepa *T. cruzi* CL Brener en el carril 11 de dicha Figura.

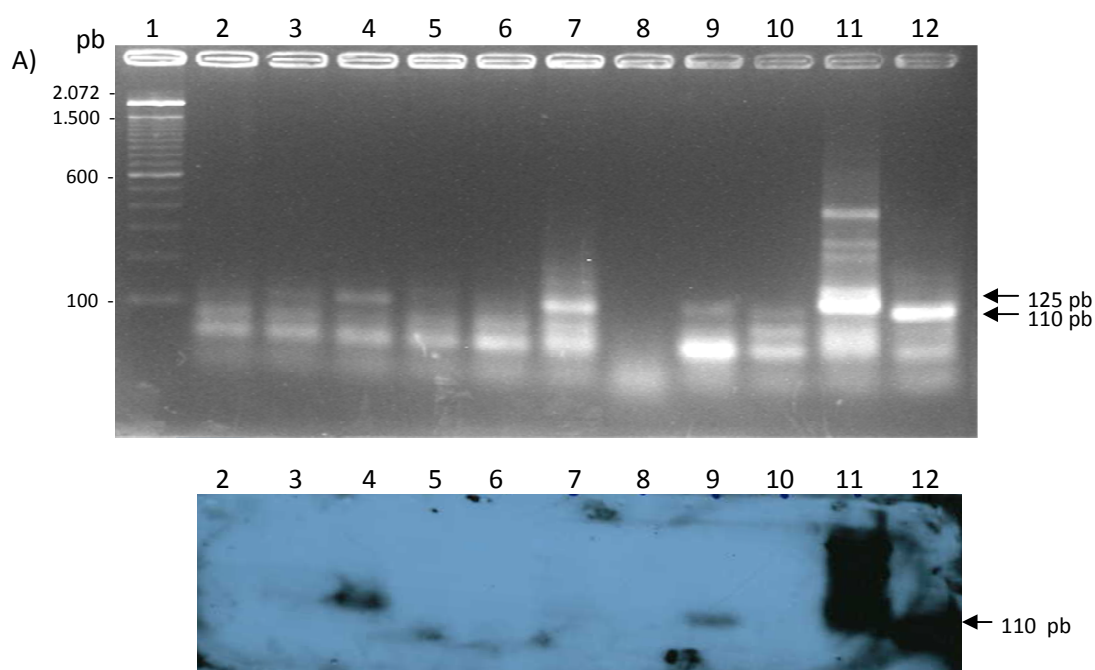


Figura 9. Determinación de los linajes de *T. cruzi* mediante PCR D71-D72-Hibridación de muestras infectadas con *T. cruzi*. A) Corrida electroforética en gel de agarosa 3% TAE 1X de los productos de la PCR D71-D72. B) Hibridación en membrana de Nylon con sondas de *T. cruzi* YBM (Linaje TCI) marcadas con digoxigenina, después de 12 horas de exposición. Carril 1. Marcador de peso molecular 100pb; Carril 2. Triatomino 1; Carril 3. Triatomino 3; Carril 4. Triatomino 4; Carril 5. Triatomino 13; Carril 6. Triatomino 14; Carril 7. Triatomino 15; Carril 8. Triatomino 16; Carril 9. Triatomino 17; Carril 10. H₂O; Carril 11. ADN de *T. cruzi* CL brener; Carril 12. ADN de *T. cruzi* YBM. Las flechas indican los tamaños del amplicon de 110 pb para el linaje TCI y 125 pb para el linaje TCII.

Durante el desarrollo de los análisis de las muestras con el ensayo PCR D71-D72, se presentaron complicaciones para la obtención de bandas definidas en los controles positivos de ambos linajes, lo cual dificultó el análisis de los resultados de amplificación de las muestras procesadas. Por tal motivo se adoptó el ensayo de PCR Miniexon, que permite igualmente diferenciar entre los linajes TCI y TCII con productos de amplificación de 350 pb y 300 pb respectivamente, para evaluar el resto de las muestras y verificar los resultados obtenidos con el ensayo PCR D71-D72. Los resultados obtenidos con el ensayo PCR Miniexon se presentan en las figuras 10 y 11. De las 58 muestras positivas a la presencia de *T. cruzi*, 42 corresponden al linaje TCI, que representa el 55% del total de triatomíneos infectados, en estos resultados se confirmó el linaje de las muestras de los triatomíneos 4 y 17, obtenido por el ensayo PCR D71-D72 (figura 9). 6 de las muestras de triatomíneos infectadas contienen ADN de *T. cruzi* correspondiente al linaje TCII, equivalentes al 8% del total de muestras infectadas. No se observó amplificación de fragmentos para ninguno de los linajes en 10 de las muestras de triatomíneos analizadas con este ensayo.

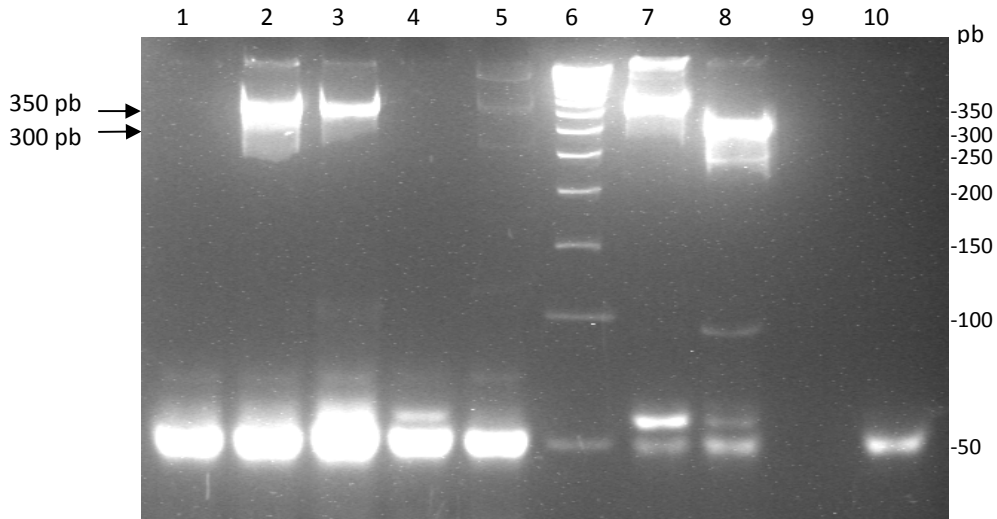


Figura 10. Determinación de linajes de *T. cruzi* mediante el ensayo PCR Miniexon de las muestras de los triatominos 44, 45, 46, 48 y 49, positivas a la presencia de *T. cruzi*. Corrida electroforética en gel de poliacrilamida 6% TBE 1X de los productos de la PCR Miniexon. Carril 1. Triatomino 44; Carril 2. Triatomino 45; Carril 3. Triatomino 46; Carril 4. Triatomino 48; Carril 5. Triatomino 49; Carril 6. Marcador de peso molecular de 50 pb; Carril 7. ADN de *T. cruzi* YBM; Carril 8. ADN de *T. cruzi* CL brener; Carril 9. Vacio; Carril 10. H₂O. Las flechas indican el tamaño de los amplicones para los linajes TCI (350 pb) y TCII (300 pb).

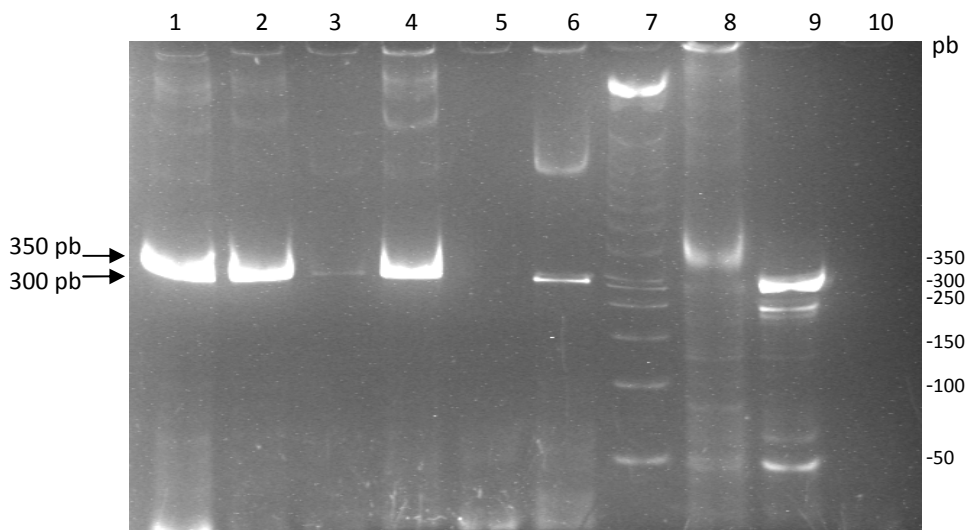


Figura 11. Determinación de linajes de *T. cruzi* mediante el ensayo PCR Miniexon de las muestras de los triatominos 71, 72, 73, 74, 75 y 76, positivas a la presencia de *T. cruzi*. Corrida electroforética en gel de poliacrilamida 6% TBE 1X de los productos de la PCR Miniexon. Carril 1. Triatomino 71; carril 2. Triatomino 72; carril 3. Triatomino 73; carril 4. Triatomino 74; carril 5. Triatomino 75; carril 6. Triatomino 76; carril 7. Marcador de peso molecular de 50 pb; carril 8. ADN de *T. cruzi* YBM; carril 9. ADN de *T. cruzi* CL brener; carril 10. H₂O. Las flechas indican el tamaño de los amplicones para los linajes TCI (350 pb) y TCII (300 pb).

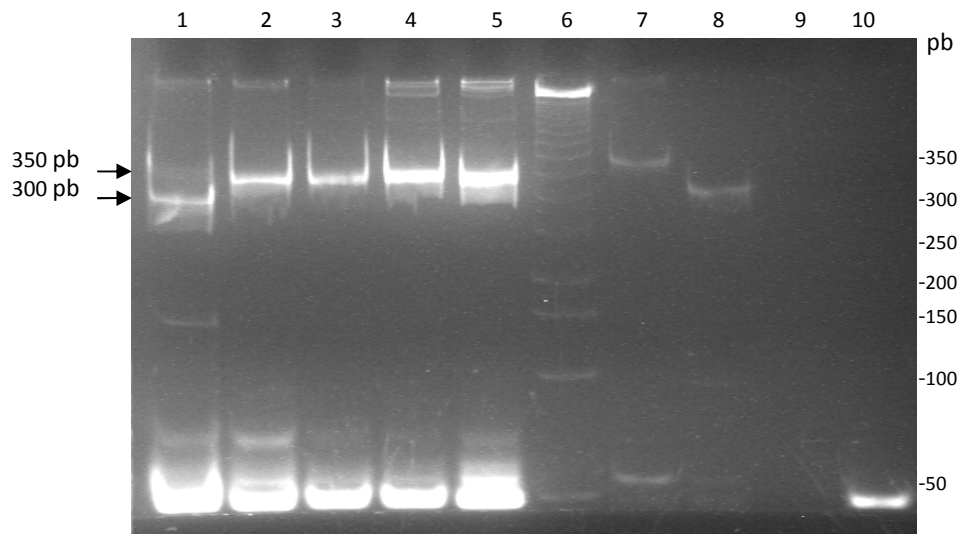


Figura 12. Determinación de linajes de *T. cruzi* mediante el ensayo PCR Miniexon de las muestras de los triatominos 66, 67, 68, 69, 70, positivas a la presencia de *T. cruzi*. Corrida electroforética en gel de poliacrilamida 6% TBE 1X de los productos de la PCR Miniexon. Carril 1. Triatomino 66; carril 2. Triatomino 67; carril 3. Triatomino 68; carril 4. Triatomino 69; carril 5. Triatomino 70; carril 6. Marcador de peso molecular de 50 pb; carril 7. ADN de *T. cruzi* YBM; carril 8. ADN de *T. cruzi* CL brener; carril 9. Vacío; carril 10. H₂O. Las flechas indican el tamaño de los amplicones para los linajes TCI (350 pb) y TCII (300 pb).

Tabla 4. Resumen de resultados de las muestras de triatomos analizadas por microscopía de luz y por PCR. (-): Negativo a la presencia de tripanosomas; (+): Positivo a la presencia de tripanosomas; (+): Positivo a la presencia de *T. cruzi* por PCR; Diag. Micro.: Diagnostico por microscopía óptica; Diag. PCR: Diagnostico por PCR; D.C.: Distrito Capital; S/D: Sin datos; NR: No realizado.

| # Triatomino | Especie | Fecha | Localidad | | Diag. Micro. | Diag. PCR | Linaje |
|--------------|-----------------------|--------|-----------|---------------|--------------|-----------|--------|
| | | | Estado | Municipio | | | |
| 1 | <i>Rhodnius</i> | S/D | Sucre | Arismendi | (-) | (+) | S/D |
| 2 | <i>Panstrongylus</i> | sep-05 | | Arismendi | (-) | (-) | NR |
| 3 | <i>Panstrongylus</i> | sep-05 | | Arismendi | (-) | (+) | S/D |
| 4 | <i>Rhodnius</i> | sep-05 | | Arismendi | (-) | (+) | TCI |
| 5 | <i>Rhodnius</i> | sep-05 | | Arismendi | (-) | (-) | NR |
| 6 | <i>Rhodnius</i> | sep-05 | | Arismendi | (-) | (-) | NR |
| 7 | <i>Rhodnius</i> | sep-05 | | Arismendi | (-) | (-) | NR |
| 8 | <i>Rhodnius</i> | sep-05 | | Arismendi | (-) | (-) | NR |
| 9 | <i>Rhodnius</i> | sep-05 | | Arismendi | (-) | (-) | NR |
| 10 | <i>Rhodnius</i> | sep-05 | | Arismendi | (-) | (-) | NR |
| 11 | <i>Rhodnius</i> | sep-05 | | Arismendi | (-) | (-) | NR |
| 12 | <i>Panstrongylus</i> | abr-08 | Miranda | Baruta | NR | (+) | TCI |
| 13 | <i>Panstrongylus</i> | abr-08 | | Baruta | NR | (+) | TCI |
| 14 | <i>Panstrongylus</i> | abr-08 | | Baruta | NR | (+) | S/D |
| 15 | <i>Panstrongylus</i> | abr-08 | | Baruta | NR | (+) | S/D |
| 16 | <i>Panstrongylus</i> | abr-08 | | Baruta | NR | (-) | NR |
| 17 | <i>P. geniculatus</i> | S/D | Vargas | Vargas | (-) | (+) | TCI |
| 18 | <i>P. geniculatus</i> | S/D | | Vargas | (+) | (+) | TCI |
| 19 | <i>P. geniculatus</i> | abr-09 | Miranda | Baruta | (-) | (+) | TCI |
| 20 | <i>P. geniculatus</i> | S/D | | Independiente | (-) | (+) | TCI |
| 21 | <i>P. geniculatus</i> | S/D | | Independiente | (-) | (+) | TCI |
| 22 | <i>P. geniculatus</i> | abr-09 | D.C. | El Hatillo | (-) | (+) | TCI |
| 23 | <i>P. geniculatus</i> | abr-09 | | Libertador | (-) | (+) | TCI |
| 24 | <i>P. geniculatus</i> | abr-09 | | Libertador | (-) | (+) | TCI |
| 25 | <i>P. geniculatus</i> | abr-09 | | Baruta | (+) | (+) | TCI |
| 26 | <i>P. geniculatus</i> | abr-09 | | Baruta | (+) | (+) | TCI |
| 27 | <i>P. geniculatus</i> | abr-09 | | El Hatillo | (-) | (+) | S/D |
| 28 | <i>P. geniculatus</i> | abr-09 | Miranda | Sucre | (+) | (+) | TCI |
| 29 | <i>P. geniculatus</i> | abr-09 | | El Hatillo | (+) | (+) | TCI |
| 30 | <i>P. geniculatus</i> | may-09 | | Baruta | (-) | (+) | S/D |
| 31 | <i>P. geniculatus</i> | may-09 | | Sucre | (-) | (+) | TCI |
| 32 | <i>P. geniculatus</i> | may-09 | | Guaicaipuro | (-) | (+) | TCI |

| | | | | | | | |
|----|----------------------------|--------|---------|------------------|-----|-----|-----|
| 33 | <i>P. geniculatus</i> | may-09 | | El Hatillo | (+) | (+) | TCI |
| 34 | <i>P. geniculatus</i> | may-09 | | Sucre | (-) | (+) | TCI |
| 35 | <i>P. geniculatus</i> | may-09 | | Baruta | (-) | (-) | NR |
| 36 | <i>P. geniculatus</i> | may-09 | | El Hatillo | (-) | (-) | NR |
| 37 | <i>P. geniculatus</i> | may-09 | D.C. | Libertador | (+) | (+) | TCI |
| 38 | <i>P. geniculatus</i> | S/D | Vargas | Vargas | (+) | (+) | TCI |
| 39 | <i>P. geniculatus</i> | S/D | | Vargas | (+) | (+) | TCI |
| 40 | <i>P. geniculatus</i> | may-09 | | Vargas | (-) | (+) | TCI |
| 41 | <i>P. geniculatus</i> | may-09 | Miranda | Baruta | (+) | (+) | TCI |
| 42 | <i>P. geniculatus</i> | dic-08 | | Sucre | (-) | (+) | TCI |
| 43 | <i>P. geniculatus</i> | may-09 | | Sucre | (+) | (+) | TCI |
| 44 | <i>P. geniculatus</i> | may-09 | | Baruta | (-) | (+) | S/D |
| 45 | <i>P. geniculatus</i> | may-09 | | Baruta | (-) | (+) | TCI |
| 46 | <i>P. geniculatus</i> | jun-09 | | Sucre | (-) | (+) | TCI |
| 47 | <i>P. geniculatus</i> | jun-09 | Vargas | Vargas | (-) | (-) | NR |
| 48 | <i>P. geniculatus</i> | jun-09 | D.C. | Libertador | (-) | (+) | |
| 49 | <i>Triatoma maculata</i> | may-09 | Vargas | Vargas | (-) | (+) | TCI |
| 50 | <i>P. geniculatus</i> | jun-09 | Aragua | Santos Michelena | (-) | (+) | TCI |
| 51 | <i>P. geniculatus</i> | jun-09 | | Santos Michelena | (-) | (+) | S/D |
| 52 | <i>P. geniculatus</i> | jun-09 | Miranda | Sucre | (+) | (+) | TCI |
| 53 | <i>P. geniculatus</i> | jun-09 | | Baruta | (+) | (+) | TCI |
| 54 | <i>P. geniculatus</i> | nov-07 | Yaracuy | San Felipe | (-) | (-) | NR |
| 55 | <i>P. geniculatus</i> | nov-07 | | San Felipe | (-) | (-) | NR |
| 56 | <i>Eratyrus mucrunatus</i> | nov-07 | | San Felipe | (-) | (-) | NR |
| 57 | <i>Eratyrus mucrunatus</i> | nov-07 | | San Felipe | (-) | (-) | NR |
| 58 | <i>P. geniculatus</i> | jun-09 | Aragua | Santos Michelena | (-) | (-) | NR |
| 59 | <i>P. geniculatus</i> | S/D | Miranda | Baruta | (+) | (+) | TCI |
| 60 | <i>P. geniculatus</i> | jun-09 | D.C. | Libertador | (-) | (+) | TCI |
| 61 | <i>P. geniculatus</i> | jun-09 | | Libertador | (-) | (+) | TCI |
| 62 | <i>P. geniculatus</i> | jun-09 | | Libertador | (-) | (+) | TCI |
| 63 | <i>P. geniculatus</i> | S/D | Miranda | Sucre | (-) | (+) | S/D |
| 64 | <i>P. geniculatus</i> | S/D | D.C. | Libertador | (-) | (+) | TCI |
| 65 | <i>P. geniculatus</i> | jul-09 | Miranda | Baruta | (+) | (+) | TCI |
| 66 | <i>P. geniculatus</i> | S/D | Aragua | Girardot | (-) | (+) | TCH |
| 67 | <i>P. geniculatus</i> | jun-09 | Miranda | Baruta | (-) | (+) | TCI |

| | | | | | | | |
|----|-----------------------|--------|---------|------------|-----|-----|------|
| 68 | <i>P. geniculatus</i> | jul-09 | | Sucre | (-) | (+) | TCl |
| 69 | <i>P. geniculatus</i> | jul-09 | | Zamora | (-) | (+) | TCl |
| 70 | <i>P. geniculatus</i> | jul-09 | D.C. | Libertador | (-) | (+) | TCl |
| 71 | <i>P. geniculatus</i> | S/D | Miranda | El Hatillo | (-) | (+) | TClI |
| 72 | <i>P. geniculatus</i> | may-09 | D.C. | Libertador | (-) | (+) | TClI |
| 73 | <i>P. geniculatus</i> | jun-09 | Miranda | Baruta | (-) | (+) | TClI |
| 74 | <i>P. geniculatus</i> | S/D | | Baruta | (-) | (+) | TClI |
| 75 | <i>P. geniculatus</i> | S/D | | Baruta | (-) | (+) | S/D |
| 76 | <i>P. geniculatus</i> | S/D | | El Hatillo | (-) | (+) | TClI |

Tabla 5. Resumen de los resultados del diagnóstico molecular de las muestras de triatomos de los estados Sucre, Miranda, Vargas, Distrito Capital, Aragua y Yaracuy.

| Por Estado | | | | Por Municipio | | | |
|----------------|-----------------------|-----------------------------|-----|------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------|
| Estado | Triatomos muestreados | Positivos a <i>T. cruzi</i> | % | Municipio | Triatomos muestreados | Positivos a <i>T. cruzi</i> | % |
| Estado Sucre | 11 | 3 | 27 | Arismendi | 11 | 3 | 27 |
| Estado Miranda | 40 | 37 | 93 | Baruta | 20 | 18 | 90 |
| | | | | El Hatillo | 7 | 6 | 86 |
| | | | | Sucre | 9 | 9 | 100 |
| | | | | Independiente | 2 | 2 | 100 |
| | | | | Zamora | 1 | 1 | 100 |
| | | | | Guaicaipuro | 1 | 1 | 100 |
| Estado Yaracuy | 4 | 0 | 0 | San Felipe | 4 | 0 | 0 |
| Estado Aragua | 4 | 2 | 50 | Santos Michelena | 3 | 1 | 33 |
| | | | | Girardot | 1 | 1 | 100 |
| Estado Vargas | 7 | 6 | 86 | Vargas | 7 | 6 | 86 |
| D.C. | 10 | 10 | 100 | Libertador | 10 | 10 | 100 |
| Total | | | | | 76 | 58 | 76 |

En el segundo bloque de muestras (71 muestras) provenientes del xenodiagnóstico de mamíferos domésticos y captura de triatominos del municipio Andrés Eloy Blanco del estado Lara fue analizado con el ensayo de PCR ADNk (121-122). Con esta metodología fue posible detectar una doble banda en la muestra 2639a, sugiriendo la presencia de una infección mixta por *T. cruzi* y *T. rangeli*, ya que en el análisis del producto de amplificación de la PCR de esta muestra se observa una banda correspondientes a la observada para ADN de *T. cruzi* (330 pb) y otra para el ADN de *T. rangeli* (760 pb y grupo de bandas entre 300 y 450 pb) (Figura 13 A, carril 4).

Este resultado fue verificado por hibridación de los productos de PCR con sondas marcadas con digoxigenina específicas para la detección del ADN de *T. cruzi*, realizadas con los oligonucleótidos 121-122. En este ensayo se observó la hibridación de la banda correspondiente al fragmento de 330 pb observado en el control positivo para el ADN de *T. cruzi* (Figura 13, carril 11). La presencia de *T. rangeli* en esta muestra fue descartada con el resultado obtenido por el ensayo PCR-P542 realizado, presentado en la figura 14, en la que se puede observar la ausencia del producto de amplificación de 450 pb observado para la presencia del ADN de *T. rangeli*, como es el caso del observado en el control positivo en el carril 4 de dicha figura; descartando así la presencia de infección mixta en esta muestra.

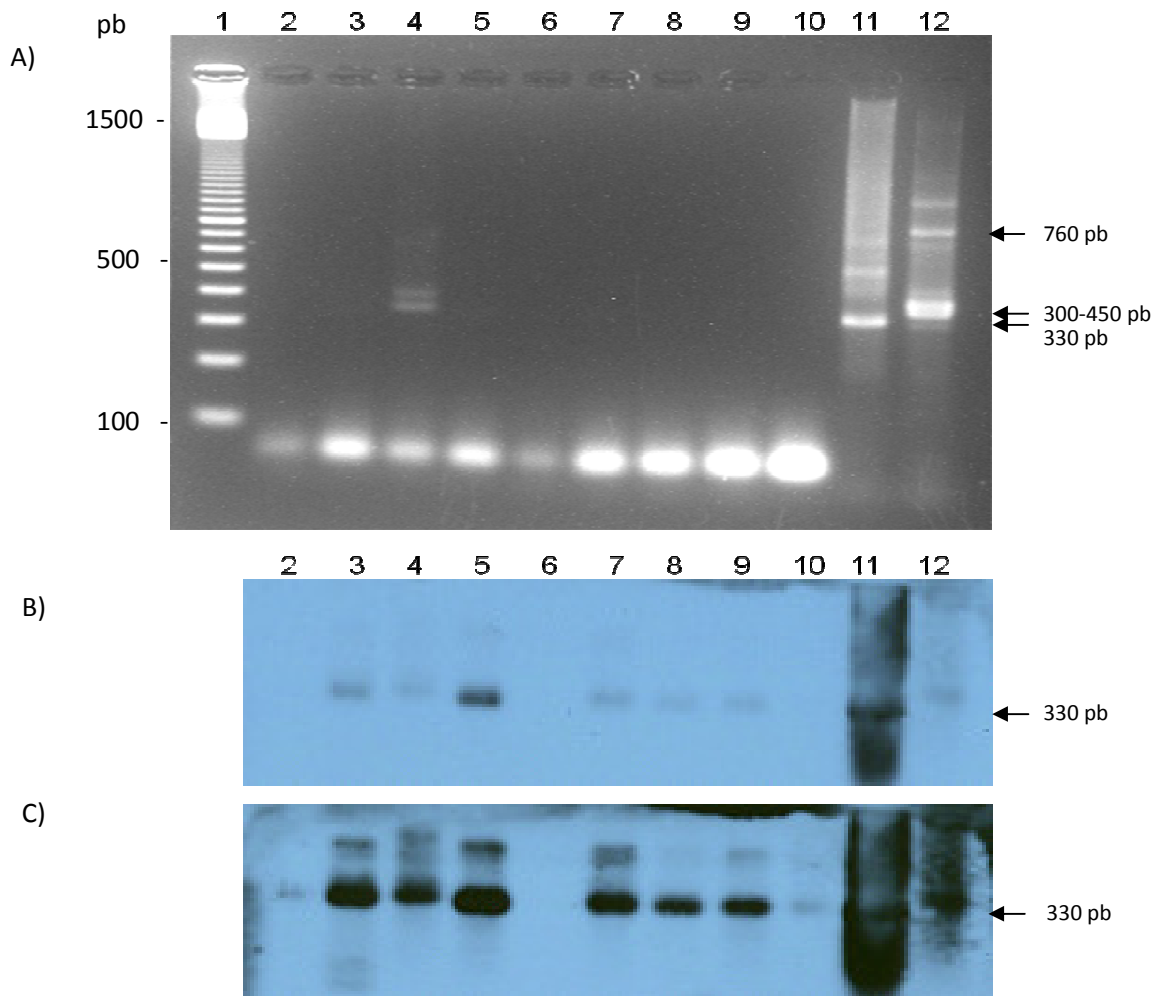


Figura 13. Análisis por PCR ADNk con los oligonucleotidos 121-122 e Hibridación de muestras de hemolinfa de triatominos de xenodiagnostico de mamíferos domésticos (perros y gatos) del municipio Andrés Eloy Blanco del estado Lara, preservadas en papel FTA. A) Corrida electroforética en gel de agarosa 3% TAE 1X de los productos de la PCR ADNk 121-122 de las muestras 2635b a la 6477b. B) y C) Hibridación en membrana de Nylon con sondas de *T. cruzi* YBM marcadas con digoxigenina, después de 30 min. y 3 horas de exposición respectivamente. Carril 1. Marcador de peso molecular 100pb; carril 2. Muestra 2635b; carril 3. Muestra 2635c; carril 4. Muestra 2639a; carril 5. Muestra 2639b; carril 6. Muestra 2639c; carril 7. Muestra 2639d; carril 8. Muestra 2640; carril 9. Muestra 6477b; carril 10. H₂O; carril 11. *T. cruzi* YBM; carril 12. *T. rangeli* Triatomino. Las flechas indican el tamaño de los amplicones para *T. cruzi* (330 pb) y *T. rangeli* (760 pb y grupo de bandas entre 300 y 450 pb).

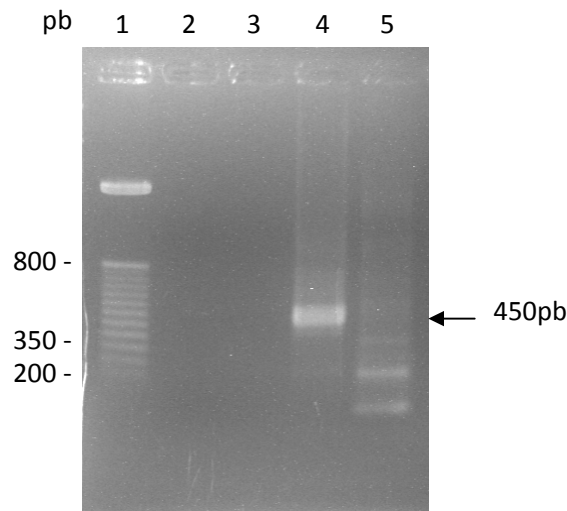


Figura 14. Evaluación de infección mixta en muestra de xenodiagnóstico. Análisis por PCR P542, de la muestra 2639a de hemolinfa de triatomino de xenodiagnóstico del municipio Andrés Eloy Blanco del estado Lara, preservadas en papel FTA, para detección de ADN de *T. rangeli*. Carril 1. Marcador de peso molecular de 50 pb; carril 2. Muestra 2639a; carril 3. H₂O; carril 4. *T. rangeli* Triatomino carril 5. *T. cruzi* YBM. La flecha indica el tamaño del amplicon esperado para *T. rangeli*.

En el análisis en gel de agarosa de los productos de la PCR ADNk 121-122 de 11 de las muestras de hemolinfa de xenodiagnóstico del estado Lara, se observaron patrones de banda que corresponden al observado con el ADN de *T. cruzi*, sugiriendo una contaminación de estas muestras durante el proceso de toma. Entre estas, una (2601a) corresponde a uno de los triatomino capturados intradomiciliariamente (Figura 15). Al realizar los ensayos de hibridación de estos productos de PCR, el número de muestras en las que se detectó ADN de *T. cruzi* se incrementó como puede observarse en las imágenes de las figuras 13, 15 y 16, B) y C) respectivamente.

Mientras que en análisis por gel de agarosa se detectaron 11 muestras con ADN de *T. cruzi*, la hibridación permitió la detección de otras 34 muestras, para un total de 45

muestras (63%) contaminadas por ADN de *T. cruzi*. Entre estas se encuentra la muestra de otro de los triatominos capturados intradomiciliariamente (muestra 2608b en la figura 16).

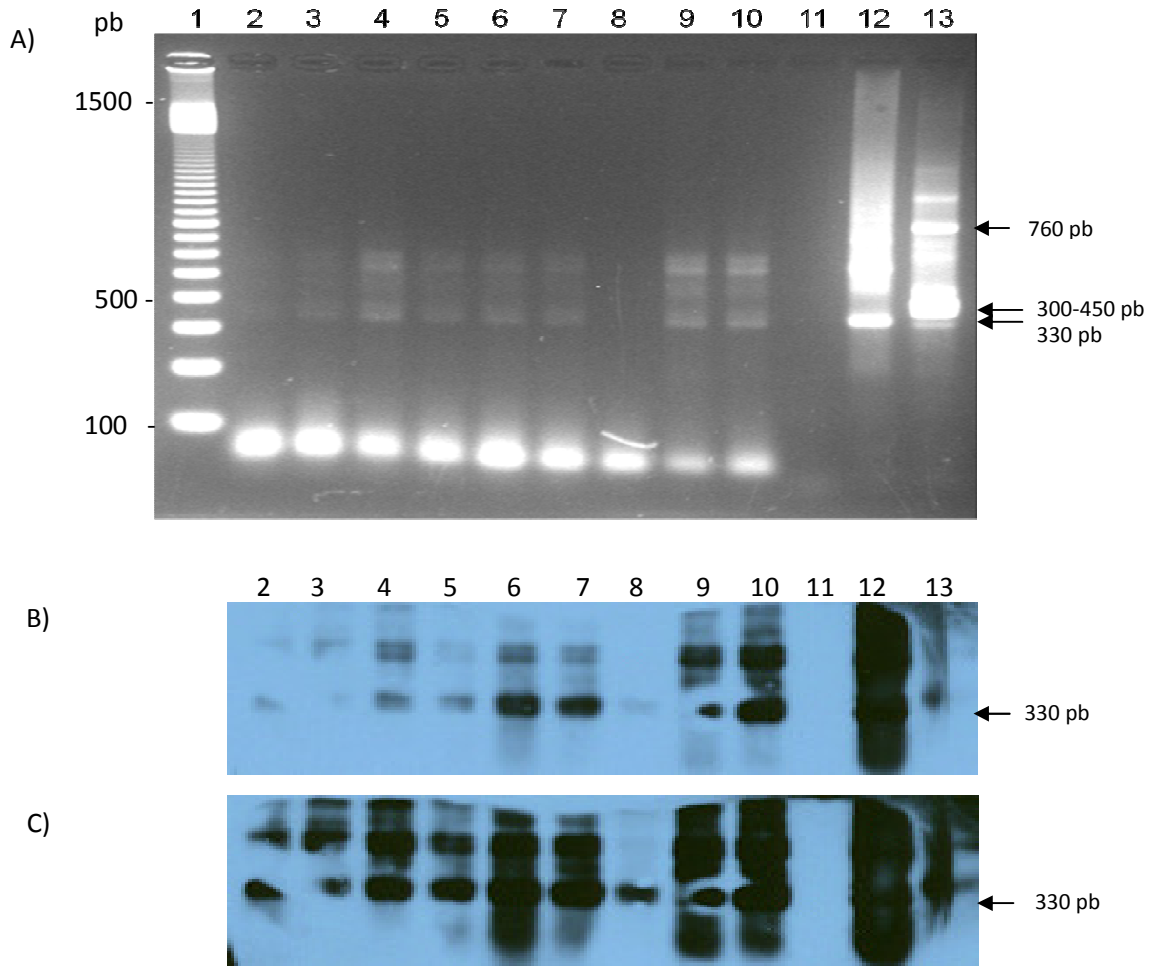


Figura 15. Análisis por PCR ADNk con los oligonucleotidos 121-122 e Hibridación de muestras de hemolinfa de triatominos de xenodiagnostico de mamíferos domésticos (perros y gatos) del municipio Andrés Eloy Blanco del estado Lara, preservadas en papel FTA. A) Corrida electroforética en gel de agarosa 3% TAE 1X de los productos de la PCR ADNk 121-122 de las muestras 2601a a la 2606. B) y C) Hibridación en membrana de Nylon con sondas de *T. cruzi* YBM marcadas con digoxigenina, después de 30 min y 3 horas de exposición respectivamente. Carril 1. MPM 100pb; carril 2. Muestra 2601a; carril 3. Muestra 2601b; carril 4. Muestra 2601c; carril 5. Muestra 2602; carril 6. Muestra 2605a; carril 7. Muestra 2605b; carril 8. Muestra 2605c; carril 9. Muestra 2605d; carril 10. Muestra 2606; carril 11. H₂O; carril 12. *T. cruzi* Y; carril 13. *T. rangeli* Triatomo. Las flechas indican el tamaño de los amplicones para *T. cruzi* (330 pb) y *T. rangeli* (760 pb y grupo de bandas entre 300 y 450 pb).

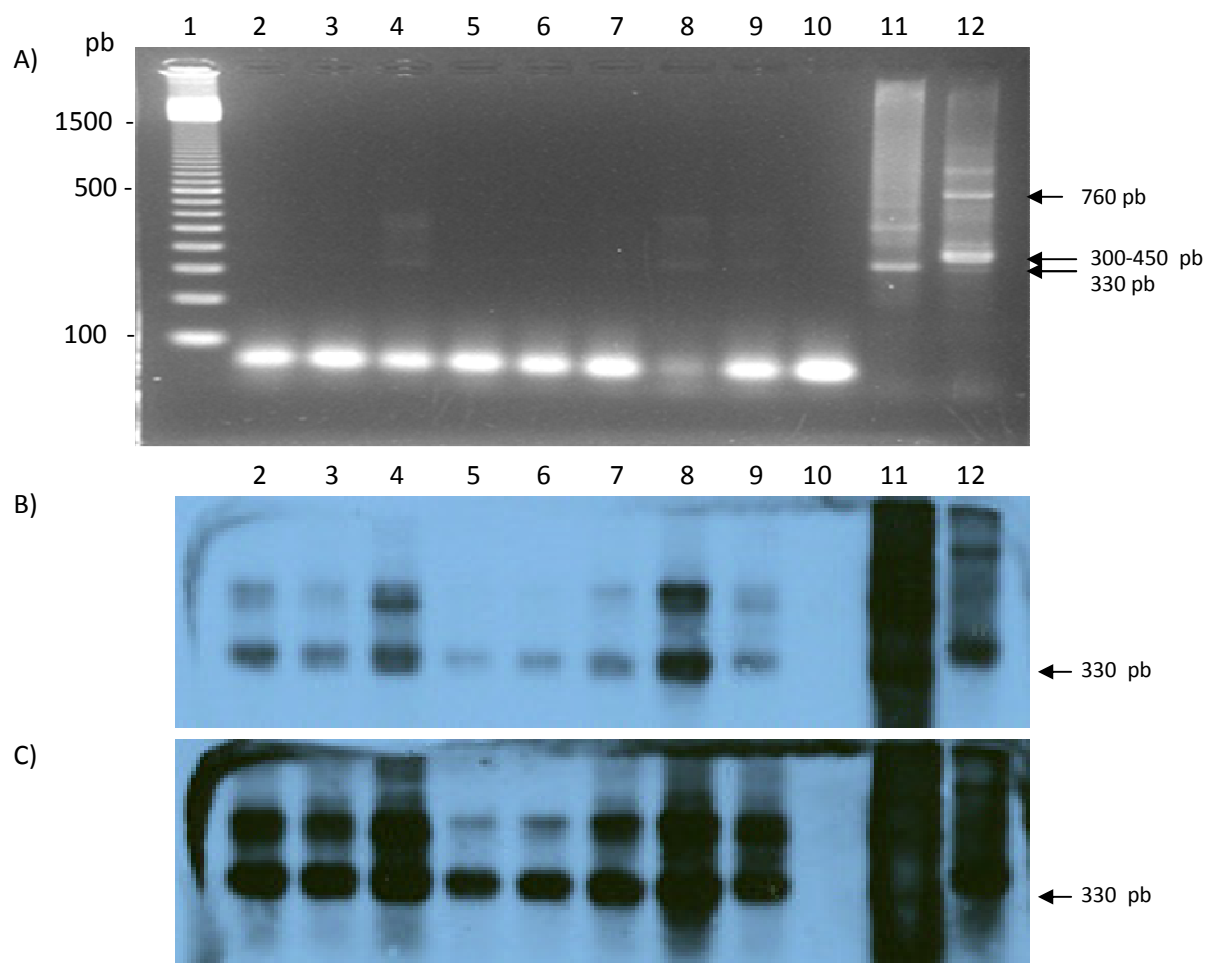


Figura 16. Análisis por PCR ADNk con los oligonucleotidos 121-122 e Hibridación, de muestras de hemolinfa de triatominos de xenodiagnostico de mamíferos domésticos (perros y gatos) del municipio Andrés Eloy Blanco del estado Lara, preservadas en papel FTA. A) Corrida electroforética en gel de agarosa 3% TAE 1X de los productos de la PCR ADNk 121-122 de las muestras 2606b a la 2608e. B) y C) Hibridación en membrana de Nylon con sondas de *T. cruzi* YBM marcadas con digoxigenina, después de 30 min y 3 horas de exposición respectivamente. Carril 1. Marcador de peso molecular 100pb; carril 2. Muestra 2606b; carril 3. Muestra 2607a; carril 4. Muestra 2607b; carril 5. Muestra 2608a; carril 6. Muestra 2608b; carril 7. Muestra 2608c; carril 8. Muestra 2608d; carril 9. Muestra 2608e; carril 10. H₂O; carril 11. *T. cruzi* YBM; carril 12. *T. rangeli* Triatomino. Las flechas indican el tamaño de los amplicones para *T. cruzi* (330 pb) y *T. rangeli* (760 pb y grupo de bandas entre 300 y 450 pb).

Tabla 6. Resumen de resultados del análisis por PCR de las muestras de hemolinfa de triatominos de xenodiagnóstico y captura, procedentes del municipio Andrés Eloy Blanco del Estado Lara. (-): Negativo a la presencia de tripanosomas; (+): Positivo a la presencia de tripanosomas; XD: Xenodiagnóstico.

| Código del domicilio | Animal doméstico y nombre | Fecha | Procedencia de la muestra | Diagnostico por PCR | Diagnostico por Hibridación |
|----------------------|---------------------------|--------|---------------------------|---------------------|-----------------------------|
| 2601a | . | abr-08 | Captura | (+) <i>T. cruzi</i> | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2601b | Perro Chipi | oct-08 | XD | (+) <i>T. cruzi</i> | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2601c | Perro Nevado | abr-08 | XD | (+) <i>T. cruzi</i> | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2602 | Perra Princesa | sep-08 | XD | (+) <i>T. cruzi</i> | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2605a | Perro Relámpago | sep-08 | XD | (+) <i>T. cruzi</i> | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2605b | Gato Pachite | sep-08 | XD | (+) <i>T. cruzi</i> | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2605c | Perro Pinto | sep-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2605d | Perro Soluta | oct-08 | XD | (+) <i>T. cruzi</i> | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2606a | Gata Pancha | sep-08 | XD | (+) <i>T. cruzi</i> | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2606b | Perra Canela | sep-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2607a | Perra Laica | oct-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2607b | Perra Canela | sep-08 | XD | (+) <i>T. cruzi</i> | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2608a | Perra Canela | sep-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2608b | . | jul-08 | Captura | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2608c | Perra Lapa | sep-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2608d | Perra Cuatro ojos | sep-08 | XD | (+) <i>T. cruzi</i> | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2608e | Gata Blanca | sep-08 | XD | (+) <i>T. cruzi</i> | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2613a | Perro Morocho | oct-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2613b | Perro Centinela | oct-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2613c | Perro Capitán | oct-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2614a | Perra Canela | sep-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2614b | Perro Bobi | sep-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2614c | Perra Turca | sep-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2614d | Perro Nevado | oct-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2621 | Perra Centinela | jul-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2627a | Perro Borracho | jun-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2627b | Perra Parchita | jun-08 | XD | (-) | (-) |
| 2627c | Perra Cariñosa | jun-08 | XD | (-) | (-) |
| 2628a | Perro Coqui | jun-08 | XD | (-) | (-) |
| 2628b | Gato Muñeco | jun-08 | XD | (-) | (-) |
| 2629 | Perro Lobo | jul-08 | XD | (-) | (-) |
| 2632a | Perra Anuta | jul-08 | XD | (-) | (-) |
| 2632b | Gata Pancha | jun-08 | XD | (-) | (-) |
| 2634a | Perra Mia | jun-08 | XD | (-) | (-) |

| | | | | | |
|-------|---------------------|--------|---------|---------------------|---------------------|
| 2634b | Perro Pinto | jun-08 | XD | (-) | (-) |
| 2634c | Gata Pancha | jul-08 | XD | (-) | (-) |
| 2635a | Perro Tarzan | jun-08 | XD | (-) | (-) |
| 2635b | Perra Princesa | jul-08 | XD | (-) | (-) |
| 2635c | Gata Jalela | jul-09 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2639a | Perra Gaviota | jun-08 | XD | (+) <i>T. cruzi</i> | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2639b | Perra Muñeca | jul-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2639c | Perra Buenas noches | jul-08 | XD | (-) | (-) |
| 2639d | Perro Nevado | jul-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 2640 | Gato | jun-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 6221a | Perro amarillo | abr-08 | XD | (-) | (-) |
| 6221b | Perro onza | may-08 | XD | (-) | (-) |
| 6223a | Perro | may-08 | XD | (-) | (-) |
| 6223b | Gato | may-08 | XD | (-) | (-) |
| 6223c | Perro Golito | may-08 | XD | (-) | (-) |
| 6228a | Gata Vieja | abr-08 | XD | (-) | (-) |
| 6228b | Perra Garrapata | abr-08 | XD | (-) | (-) |
| 6228c | Perro Pibul | abr-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 6228d | Gata Vieja | abr-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 6231a | Perra Pinta | abr-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 6231b | Gata Catira | abr-08 | XD | (-) | (-) |
| 6231c | Perro Ñeco | abr-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 6232 | Gato Chilo | abr-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 6475 | Perro Caribe | abr-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 6477a | . | abr-08 | Captura | (-) | (-) |
| 6477b | Perro Locho | sep-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 6477c | Perra Linda | sep-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 6477d | Gato Muslo | sep-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 6478a | Perra Estrella | jun-08 | XD | (-) | (-) |
| 6478b | Perra Peluca | jul-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 6484a | Perra Rubia | jun-08 | XD | (-) | (-) |
| 6484b | Perro Pinto | jun-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 6485a | Gata Pancha | jun-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 6485b | Perra Estrella | jul-08 | XD | (-) | (-) |
| 6485c | Perra Yegale | jul-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 6516a | Perro Canelo | abr-08 | XD | (-) | (+) <i>T. cruzi</i> |
| 6516b | Perro Solito | abr-08 | XD | (-) | (-) |

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El estudio de las infecciones en las poblaciones naturales de triatomíneos requiere de herramientas que permitan la recolección práctica y rápida de las muestras a analizar necesarias para la epidemiología molecular. La metodología aplicada en este trabajo, con la implementación del papel de filtro FTA como soporte para la muestra, ofrece ventajas en cuanto a su manipulación, por no requerir de estrictos niveles de cuidado para el manejo del papel; al almacenamiento, ya que las muestras preservadas pueden ser mantenidas a temperatura ambiente por largo tiempo, y al procesamiento, considerando que la extracción del ADN se realiza de forma rápida y sencilla. Una ventaja importante es que el ADN extraído por esta metodología permite su implementación directa en la amplificación con PCR, obteniendo resultados que reflejan las características originales de la población de microorganismos presentes, evitando la selección asociada al cultivo.

En este trabajo se evaluaron los parámetros para el tratamiento de muestras de triatomíneos preservadas en papel FTA, obteniendo como resultado el establecimiento de un protocolo rápido y efectivo, que permite la recuperación de ADN de tripanosomas conservado hasta por dos años en este soporte, permitiendo el estudio de las poblaciones de estos parásitos de una forma directa, con resultados que reflejan sus características originales, sin procedimientos intermediarios que pueden promover la selección de una población particular al implementar metodologías que involucren el cultivo *in vitro*, o el pase por mamíferos o insectos (Deane y col., 1984).

Los resultados obtenidos forman parte de un levantamiento de datos actualizados sobre las infecciones de parásitos *T. cruzi* y *T. rangeli* presentes en triatomíneos de vida silvestre en nuestro país, así como su aparición en animales domésticos, que aportan información valiosa en relación a la epidemiología de estos parásitos, necesaria en el desarrollo de estrategias de control.

Los resultados obtenidos reflejan un alto porcentaje de triatomíneos infectados por *Trypanosoma cruzi* (76%) en las zonas urbanas y zonas asociadas a bosques urbanos de cinco entidades federales de Venezuela. Todos los triatomíneos capturados en el estado Yaracuy resultaron negativos a la presencia de tripanosomas, tanto por examen microscopio como por análisis por PCR; es importante considerar que los triatomíneos capturados en este estado fueron preservados intactos a 4 °C durante dos años, antes de la extracción de la muestra para su preservación en papel FTA y posterior análisis. Esto pudo ocasionar que durante el tiempo de preservación se degradara el contenido microbiológico del intestino del triatomíneo y su material genético, lo cual impide su detección por técnicas moleculares.

Se encontró un 55% de presencia de linaje TCI, y 8% de linaje TCII. Considerando solo las poblaciones capturadas, la mayoría de los triatomíneos utilizados para este estudio provenían de zonas peri o intradomiciliarias, y el 84% de estos pertenecían a la especie *Panstrongylus geniculatus*.

Actualmente se sabe que las especies de este género se encuentran en un proceso de domiciliación (siendo capaces de colonizar exitosamente domicilios). Recientemente se ha reportado la presencia de ninfas y huevos de estos insectos en zonas peri e

intradomiciliarias en Venezuela (Reyes-Lugo y Rodriguez-Acosta, 2000; Reyes-Lugo, 2006) y en varias regiones de Colombia y Brasil (Patterson y col., 2009). Esta domiciliación puede presentarse de forma mixta con individuos de la especie *R. prolixus* (Feliciangeli y col., 2004); siendo *R. prolixus* catalogado frecuentemente como uno de los principales vectores de *T. cruzi* en Venezuela (Vallejo y col., 2008). En nuestro trabajo, esta simpatria se evidenció en el muestreo realizado en el municipio Arismendi del estado Sucre, en el cual fueron capturados individuos de los dos géneros, tanto en el sector peridomiciliario como intradomiciliario, en un ambiente de bosque húmedo y una casa rural. En contraste, los triatominos capturados en los estados Miranda, Vargas, Aragua y Distrito Capital (todos de la especie *P. geniculatus*, con excepción de uno de la especie *Triatoma maculata*) fueron encontrados en su mayoría en edificaciones bien acabadas de zonas urbanas o periurbanas que rodean la región capital (Gran Caracas) y se encuentran rodeadas por zonas boscosas. Estos resultados concuerdan con las observaciones que indican que estos triatominos son capaces de colonizar cualquier construcción contemporánea, independientemente del tipo o la calidad de la construcción (Reyes Lugo y Irauzquin, 1997).

Los resultados presentados en este trabajo con la presencia mayoritaria de *P. geniculatus* en domicilios del área metropolitana y sus alrededores, una positividad de 76% para *T. cruzi* y la prevalencia del linaje TCI, concuerdan con los reportes de Carrasco y col. (2005), quienes encuentran este linaje circulando en poblaciones de triatominos de la especie *P. geniculatus* del área metropolitana, con evidencia de alimentación en humanos y animales que circulan en el ambiente peri e intradomiciliario como perros, ratas, cerdos, vacas; siendo esta especie de triatomo un

factor de riesgo de enfermedad de Chagas en esta región, mientras que en otras regiones de América, como Brasil, este linaje (TCI) es considerado característico del ciclo selvático; las muestras en las que se detectó la presencia del linaje TCII corresponden a triatomíneos capturados en domicilios de zonas urbanas, pero muy ligadas a ambientes boscosos (bosque urbano), lo cual ubica a este grupo de insectos dentro de un ciclo de transmisión en el que están involucrados mamíferos silvestres de dicho bosque urbano y mamíferos que circulan en el entorno peri e intradomiciliario.

Entre los factores que pueden predisponer a una especie de triatomíneo a ser un vector potencial de *T. cruzi* y/o *T. rangeli* se encuentran: primero la susceptibilidad del triatomíneo a la infección por *T. cruzi* y/o *T. rangeli*, en relación a la capacidad que tienen algunos triatomíneos de “seleccionar” la sub-población de *T. cruzi* o *T. rangeli* que se establece; nuestro trabajo refleja la susceptibilidad de *P. geniculatus* a las infecciones por *T. cruzi* del linaje TCI, mientras que el desarrollo de la especie *T. rangeli* en este insecto, parece verse desfavorecido, por la ausencia de infecciones por este parásito en las muestras evaluadas. Segundo, la eficiencia en la transmisión del parásito durante la alimentación (para la transmisión de *T. rangeli*), y el tiempo de defecación del insecto durante este proceso, lo cual puede facilitar la deposición del parásito (*T. cruzi*) sobre o cerca del hospedador. Se ha demostrado que *P. geniculatus* defeca durante la alimentación (Wolff y Castillo, 2000). Estas características, unidas al hallazgo de infecciones sencillas por *T. cruzi* de este y otros trabajos (Carrasco y col., 2005; Reyes-Lugo, 2006) y mixtas por *T. cruzi* y *T. rangeli* (Reyes-Lugo, 2006), confirman que las especies del género *Panstrongylus* cumplen con los requerimientos para ser un vector competente de ambos parásitos.

El alto porcentaje de infecciones por *T. cruzi* encontrado en este trabajo, sugiere la proximidad de los triatomíneos que se desarrollan en ambientes urbanos, a reservorios silvestres (marsupiales, primates, coatíes, murciélagos) o a reservorios semiantropicos (marsupiales, armadillos, perezas, perros, gatos, roedores), a partir de los cuales pueden adquirir las infecciones con este parásito, y mantener su circulación entre diferentes organismos. Por otra parte, el establecimiento de estos insectos de forma intradomiciliaria en conjunto con los altos porcentajes de infección en las especies del género *Panstrongylus*, incrementan el riesgo de transmisión de estos parásitos al humano, no solo por la picadura del insecto y el contacto con sus heces, sino también por el riesgo de posibles eventos de transmisión oral, como los que se han presentado recientemente en Venezuela (Patterson y col., 2009).

En relación a la metodología aplicada en este trabajo se evidenció la diferencia sustancial en relación a los niveles de sensibilidad entre la evaluación de las muestras de fluidos de triatomíneos por microscopio de luz y la metodologías de PCR, para la detección efectiva de tripanosomas. De las 71 muestras evaluadas al microscopio, 15 resultaron positivas a la presencia de tripanosomas (21%), mientras que por las metodologías de PCR implementadas, 54 de estas mismas muestras resultaron positivas a la presencia de *T. cruzi* (76%), lo cual representa un 55% (39 muestras) de triatomíneos infectados que no pudieron ser detectados por microscopía de luz. Este resultado justifica la incorporación de metodologías de diagnóstico molecular, a los protocolos de rutina de vigilancia y control epidemiológico que permitan la obtención de resultados más confiables, y una evaluación más precisa del porcentaje de infección en vectores.

En las muestras obtenidas por xenodiagnóstico resalta el hallazgo de infecciones simples por *T. cruzi* en 45 de las 71 muestras (63%). En el análisis por PCR de una de estas muestras (xenodiagnóstico realizado a un perro de la casa con el código 2639) se observó un patrón de bandas que sugería la presencia de una infección mixta por *T. cruzi* y *T. rangeli*; la presencia de *T. rangeli* fue descartada con un posterior análisis de PCR específico para esta especie, mientras que la presencia de *T. cruzi* fue confirmada por el análisis de PCR-hibridación especie-específico. El alto número de positividad a *T. cruzi* detectado es evidencia de una contaminación de las muestras de hemolinfa colocadas en el papel FTA durante su extracción. Los triatomíneos utilizados para este estudio provenían de frascos de xenodiagnóstico, los cuales previo a la toma de las muestras fueron lavados en SS; ocasionando que parásitos (*T. cruzi*) o su ADN que se encontraba en la región del recto antes del lavado, quedara en la región de las patas de donde se tomó la muestra una vez hecho el lavado, entrando en contacto con la hemolinfa y quedando en el papel de muestreo. Técnicas de laboratorio como las implementadas en este trabajo (PCR-Hibridación) requieren de una manipulación cuidadosa durante la toma y procesamiento de las muestras, ya que los altos niveles de sensibilidad de estas técnicas las hacen propensas a detectar pequeñas cantidades de contaminación en dichas muestras, lo cual representa un problema serio en labores de diagnóstico.

El estudio del desarrollo de *T. cruzi* y *T. rangeli* en el interior del vector triatomino, ha llevado al análisis de las interacciones entre estos parásitos y su vector a varios niveles, desde los modos de asociación a nivel estructural y el comportamiento de los parásitos en el interior del triatomino con estudios de microscopía óptica (Lacombe,

1980; Kollien y col. 1997; Oliveira y Souza 2001), la relación entre los polimorfismos en las poblaciones de estos parásitos y los triatomínicos que infectan (Miles y col., 1977; Nunes y col., 1997; D'alexandro, 1976; Grisard y col. 1999; Vallejo y col. 2002), hasta los cambios que ocurren durante la respuesta del sistema del vector triatomino durante la infección (Whitten y col., 2001; Azambuja y col. 2005). En este sentido, Lacombe (1980) en observaciones al microscopio, reporta formas de *T. cruzi* invadiendo el hemocele; sin embargo en análisis de intestinos de triatomínicos infectados por *T. cruzi* realizados por microscopía electrónica, Kollien y colaboradores en 1997, reportan formas de *T. cruzi* interactuando con células de la capa de membrana extracelular y el microbilio del intestino de triatomínicos, pero sin penetrar este epitelio hasta el hemocele. Adicionalmente se sabe que entre los cambios inducidos durante la respuesta a la infección por ambos parásitos en el insecto triatomino, los niveles de actividad de nitrato varían, pero durante una infección por *T. cruzi* son particularmente elevados; lo que podría explicar que este parásito no sea capaz de penetrar el tejido intestinal hasta el hemocele (Azambuja y col. 2005). De esta forma se refuerza el hecho de que las infecciones detectadas en la hemolinfa del 63% de los triatomínicos de xenodiagnóstico corresponde a una contaminación durante la toma de las muestras, más que a la presencia de *T. cruzi* en el hemocele de los insectos muestreados.

A la fecha desconocemos los resultados del xenodiagnóstico de las muestras del estado Lara, sin embargo el haber detectado la presencia de *T. cruzi* en estos triatomínicos nos permite evidenciar que *T. cruzi* se encuentra circulando no solamente entre poblaciones de triatomínicos y en mamíferos silvestres, sino en aquellos mamíferos que se desenvuelven en un entorno peri e intradomiciliario (perros y gatos).

7. CONCLUSIONES

El desarrollo de técnicas moleculares que faciliten la toma preservación y procesamiento de muestras, sigue siendo un requerimiento importante tanto para el diagnóstico, como para el estudio de polimorfismos a nivel genético en las especies *T. cruzi* y *T. rangeli*. En este trabajo se planteó la utilización de una técnica práctica y de rápida aplicación, que ofrece la ventaja de preservar por largo tiempo antes de su procesamiento. La técnica facilita el análisis directo de las muestras tomadas del triatmino, permitiendo evaluar la estructura de las poblaciones naturales, obviando procedimientos de mayor dificultad metodológica previos al análisis (infecciones de triatminos, pases por ratón o cultivo *in vitro*) que seleccionan las subpoblaciones.

La información obtenida en este trabajo forma parte del aporte al conocimiento sobre la epidemiología de *T. cruzi* y *T. rangeli* en los triatminos, en relación a la distribución geográfica de estos parásitos y su relación con los insectos vectores en Venezuela.

El análisis de nuestros resultados permite concluir que:

- Se logró normalizar y establecer un protocolo para la toma, preservación y tratamiento de muestras de triatminos, usando como soporte el papel de filtro FTA, para la evaluación por ensayos de amplificación de ADN dirigidos a la detección de *T. cruzi* y *T. rangeli* y la caracterización de los linajes y grupos de estas especies.

- El protocolo de trabajo establecido utilizando el papel de filtro FTA permitió una sensibilidad de detección para *T. rangeli* de 5 parásitos, y analizarlo bajo el ensayo de PCR P542.
- Se detectó la presencia de infecciones por *T. cruzi* en el 76% de las muestras de triatomíneos de captura evaluadas en seis entidades federales de la República Bolivariana de Venezuela (estado Sucre 27%, estado Miranda 93%, estado Yaracuy 0%, estado Aragua 50%, estado Vargas 86% y Distrito Capital 100%).
- Se evidenció la predominancia del linaje TCI de *T. cruzi* en las muestras de triatomíneos evaluadas, indiferentemente de la distribución geográfica.
- En los triatomíneos muestreados, *P. geniculatus* fue la especie predominante, con individuos capturados en su mayoría en zonas intradomiciliaria.
- En las muestras de xenodiagnóstico de perros y gatos domésticos del estado Lara, se detectó la presencia de *T. cruzi* en el 63% de las muestras, lo cual sugiere una contaminación con este parásito durante el proceso de toma y aplicación de las mismas en el papel de filtro FTA.
- En ninguna de las muestras evaluadas se detectaron infecciones sencillas por *T. rangeli* o mixtas por *T. cruzi* y *T. rangeli*, sugiriendo una interacción con la especie de triatomíneos predominante (*P. geniculatus*) desfavorable para *T. rangeli*.

8. FACTIBILIDAD

Este trabajo contó con el financiamiento del proyecto Misión Ciencia G-2007001442, Sub-Proyecto 2 “Desarrollo, Adaptación, Validación y Transferencia de Pruebas de Diagnóstico Molecular en Enfermedades Parasitarias a través de una Red de Laboratorios”.

Fue realizado en el laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Biología Experimental (IBE) de la Universidad Central de Venezuela, a cargo de la Dra. Palmira Guevara, y contó con el apoyo de la Sección de Entomología Medica del Instituto de Medicina Tropical (IMT) de la Universidad Central de Venezuela, a cargo del Dr. Matias Reyes-Lugo, y del Centro de Investigaciones en Salud Pública Jacinto Convit de la Universidad Central de Venezuela a cargo de la Dra. Evamarys Rodríguez.

9. BIBLIOGRAFIA

- Añez N., Crisante G., Da silva M., Rojas A., Carrasco H., Umezawa E., Stolf A., Ramirez J., Texeira M. 2004. Presominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas's disease. *Trop Med Int Health*. **9**: 1319-1326.
- Araya, J., Cano, M.I., Gomes, H.B.M., Novak, E.M., Requena, J.M., Alonso, C., Levin, M.J. y colaboradores 1997. Characterization of an interspersed repetitive DNA element in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*. **115**: 563-70.
- Azambuja, P., Garcia, E. 2005. *Trypanosoma rangeli* interactions within the vector *Rhodnius prolixus*- A mini review. *Mem. I. Oswaldo Cruz*. **100**: 567-572.
- Beltrame-Botelho, I.I., Gaspar-Silva, D., Steindel, M., Dávila, A.M.R., Grisard, E.C. 2005. Internal transcribed spacers (ITS) of *Trypanosoma rangeli* ribosomal DNA (rDNA): a useful marker for inter-specific differentiation. *Infec. Genet. Evol.* **5**: 17-28.
- Carcavallo RU, Galíndez Girón I, Jurberg J, Galvao C, Lent H. 1998. Pictorial keys for tribes, genera and species of the subfamily Triatominae. In Atlas of Chaga's disease vectors in the Americas. I: 393 pp.
- Carrasco H., Torrellas A., García C., Segovia M., Feliciangeli M. 2005. Risk of *Trypanosoma cruzi* I (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) transmisión by *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) in Caracas (Metropolitan Distric) and neighboring States, Venezuela. *Int J Parasitol.* **35**: 1379-1384.
- Cuba Cuba, C. 1998. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos de *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. *Rev. Soc. Bras. Med. Tro.* **31**: 207-220.
- D' Alessandro-Bacigalupo, A., Saravia, N. 1992. *Trypanosoma rangeli*, en Parasitic Protozoa. Academy Press. **2**:1-54.
- D' Alessandro, A. 1976. Biology of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera 1920. Academic Press. Londres.
- Da Silva, M., Noyes, H., Campaner, M., Junqueira, A. C. V., Coura, J.R., Añez, N., Shaw, J. y colaboradores. 2004. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*. **129**: 549-561.

Da Silva, M., Rodrigues, A.C., Campaner, M., Takata, C.S.A., Brigido, M.C., Junqueira, A.C.V., Coura, J.R. y colaboradores. 2004. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. *Parasitology*. **128**: 283-294.

De Oliveira MA., de Souza W. 2001. An electron microscopy study of penetration by *Trypanosoma rangeli* into midgut cells of *Rhodnius prolixus*. *J. Invertebr. Pathol.* **77** (1): 22-26.

Deane M., Sousa M., Pereira N., Goncalves A., Momen H., Morel C. 1984. *Trypanosoma cruzi*: Inoculation schedules and re-isolation methods select individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analyses. *J. Protozool.* **31**: 276-280.

Espinola C., Ribeiro M., Salles S., Riccioppo H., Carvalho C., Jansen A. Y colaboradores. 2003. Chronic Chagas' disease in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): Evaluation of parasitemia, serology, electrocardiography, echocardiography and radiology. *Am. Trop. Med. Hyg.* **68**: 683-691.

Feliciangeli M.D., Carrasco H., Patterson J.S., Suarez B., Martínez C., Medina M., 2004. Mixed domestic infestation by *Rhodnius prolixus* Stal 1859 and *Panstrongylus geniculatus* Latreille 1811 vector incrimination, and seroprevalence for *Trypanosoma cruzi* among inhabitants en El Guamito, Lara state, Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **71**: 501-505.

González, N., Galindo, I., Guevara, P., Novak, E., Scorza, J., Añez, N., Da Silveira, J. y colaboradores. 1994. Identification and detection of *Trypanosoma cruzi* by using a DNA amplification fingerprint obtained from the ribosomal intergenic spacer. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 153-158.

Grisard, E., Steindel, M., Guarneri, A., Eger-Mangrich, I., Campbell, D., Romanha, A. 1999. Characterization of *Trypanosoma rangeli* Strain Isolated in Central and South America: an Overview. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **94**: 203-209.

Grisard, E.C., Campbell, D.A., Romanha, A.J. 1999. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. *Parasitology*. **118**: 375-382.

Guevara P. 2007. Estudios Moleculares Aplicados a: i) La biología de *Leishmania*, *Trypanosoma rangeli* y *Trypanosoma cruzi* y ii) a la identificación y diagnóstico de microorganismos. Trabajo de Ascenso a Profesor Titular, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Guevara, P. 2004. Identificación y diagnóstico molecular de microorganismos. Manual de Laboratorio. Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela.

- Guevara, P., Quispe, S., Abreu-Blanco, M., Baldés, N., Reyes Lugo, M. 2007. Mejoramiento del procesamiento de muestras para la detección molecular de infecciones por *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* en vectores. *Salus*. **11**, Supl. N° 1: 91-92.
- Guhl, F., Vallejo, G. 2003. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920- An updated review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **98**: 435-442.
- Henriksson, J., Solarj, A., Rydaker, M., Sousa, O.E., Pettersson, U. 1996. Karyotype variability in *Trypanosoma rangeli*. *Parasitology*. **112**: 385-391.
- Mejía, A., Paláu, M., Zúñiga, C. 2004. *Trypanosoma rangeli*: Lo que se conoce y el impacto de su presencia. *MedUNAB*. **7**: 166-171.
- Miles M.A., Toyé P.J., Sarah C., Oswaldo D., Godfrey D.G. 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in rural area of Brasil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **71**: 217-225.
- Miranda Santos, I.K.F., Pereira, M.E.A. 1984. Lectin discriminates between pathogenic and non-pathogenic South American trypanosomes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **33**:839-844.
- Morel C, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **77** (11):6810-6814.
- Moser, D.R., Kirshhoff, L.V., Donelson, J.E. 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin. Microbiol.* **7**: 1477-1482.
- Nunes L., Ruth de Carvalho M., Buck G. 1997. *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader RNA and rRNA gene promoters. *Mol. Biochem. Parasitol.* **86**: 211-224.
- O'connor O., Bosseno M., Barnabé C., Douzery E., Brenière S. 2007. Genetic clustering of *Trypanosoma cruzi* I lineage evidenced by intergenic minixon gene sequencing. *Infect. Genet. Evol.* **7**: 587-593.
- Orlandi, P., Lampel K. 2000. Extraction-free, filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2271-2277.
- Paláu, M., Montilla, M., Zúñiga, C. 2001. Estudio del comportamiento de dos cepas de *Trypanosoma rangeli*. *MedUNAB*. **4**: 161-167.
- Patterson J., Barbosa S, Feliciangeli M. 2009. On the *Panstrongylus* Berg 1879: Evolution, ecology and epidemiological significance. *Acta Trop.* **110**: 187-199.

- Pereira, E.E.A., Moss, D. 1985. Neuraminidase activity in *Trypanosoma rangeli*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **15**: 95-103.
- Pifano F., Mayer M., 1949. Hallazgo de formas evolutivas del *Trypanosoma rangeli* en el jugo de la trompa de *Rhodnius prolixus* de Venezuela. *Arch. Venezolanas. Patol. Trop. Parasitol. Med.* **1**: 153-158.
- Ramírez-Pérez J. 1985. Chipos de Venezuela. Publicación de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental, Ministerio de Sanidad y Asistencia Social.
- Reyes Lugo M. 2006. Aspectos de la bioecología y el control de *Panstrongylus geniculatus* Latreille 1811 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) vector de la enfermedad de Chagas en Venezuela. Memorias II Reunión Internacional sobre Enfermedades Transmitidas por Vectores en las Américas y su Control. Pág.17-25
- Reyes-Lugo M., Iranzquin B. 1997. Desarrollo y sobrevivencia de los huevos y ninfas de *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) en un gallinero. *Archivos Venezolanos de Medicina Tropical.* **1**: 93-97.
- Reyes-Lugo M., Rodríguez-Acosta A. 2000. Domiciliation of sylvatic Chagas disease vector *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811 (Triatominae: Reduviidae) in Venezuela. *T. Roy. Soc. Trop. Med. H.* **94**: 508.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Segunda Edición.
- Schaub Günter A. 2006. Parasitogenic alterations of behaviour. *Int. J Med. Microbiol.* **296** Suppl 40: 37-40.
- Souto, R.P., Zingales, B. 1993. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol. Biochem. Parasit.* **62**: 45-52.
- Steindel M, Dias Neto E, de Menezes CL, Romanha AJ, Simpson AJ. 1993. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol.* **60** (1):71-79.
- Steindel, M., Dias-Neto, E., Carvalho, C.J., Menezes, C., Murta, S.M., Simpson, A.J. y colaboradores. 1994. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. *J. Euk. Microbiol.* **1**: 261-267.
- Sturm, N.R., Degraeve, W., Morel, C., Simpson, L. 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* **33**: 205-214.
- Traviezo L, Bonfante-Garrido R. 2004. Estudio seroepidemiológico de la enfermedad de Chagas en la localidad de Caballito, Municipio Simón Planas, Estado Lara, Venezuela. *Parasitol Latinoam.* **56**: 46-50.

Vallejo G., Guhl F., Carranza J., Lozano L., Sanchez J., Jaramillo J., Gualtero D. y colaboradores. 2002. kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. *Acta Trop.* **81**, 77-82.

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

Vargas, N., Souto, R.P., Carranza, J.C., Vallejo, G.A., Zingales, B. 2000. Amplification of a specific repetitive DNA sequence for *Trypanosoma rangeli* identification and its potential application in epidemiological microbiology. *Exp. Parasitol.* **96**: 147-159.

Whitten MM., Mello CB., Gomes SA., Nigam Y., Azambuja P., Garcia ES., Ratcliffe NA. 2001. Role of superoxide and reactive nitrogen intermediates in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae)/*Trypanosoma rangeli* interactions. *Exp. Parasitol.* **98** (1):44-57

Wolff M., Castillo D. 2000. Evidencias de domesticación y aspectos biológicos de *Panstrongilus geniculatus* (Latreille, 1811) (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Entomol. Chil.* **25**: 77-83.