UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Genotipificación molecular de poblaciones de *Trypanosoma cruzi* presentes en especies secundarias de triatominos capturados en etapa de vigilancia entomológica entre los años 2010-2016 en las Regiones Oriental y Occidental del Paraguay

DAYSI KARINA PINEDA SANABRIA

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Agosto, 2021

UNIVERSIDADNACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

GENOTIPIFICACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* PRESENTES EN ESPECIES SECUNDARIAS DE TRIATOMINOS CAPTURADOS EN ETAPA DE VIGILANCIA ENTOMOLÓGICA ENTRE LOS AÑOS 2010-2016 EN LAS REGIONES ORIENTAL Y OCCIDENTAL DEL PARAGUAY.

DAYSI KARINA PINEDA SANABRIA

Tutora: PROF. Q.A ZUNILDA SANCHEZ, MSc.

Co-tutora: PROF. DRA GRACIELA RUSSOMANDO, MSc, PhD.

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Agosto, 2021

Pineda Sanabria, Daysi Karina.

Genotipificación molecular de poblaciones de *Trypanosoma cruzi* presentes en especies secundarias de triatominos capturados en etapa de vigilancia entomológica entre los años 2010-2016 en las regiones Oriental y Occidental del Paraguay / Daysi Karina Pineda Sanabria, Tutora: Zunilda Elizabeth Sánchez, Co-tutora: Graciela Russomando .- - San Lorenzo: UNA, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, 2021.

xvii, 83 p. ; il.

Tesis (Magíster en Ciencias Biomédicas) -- UNA, IICS, FCQ, 2021

1. *Triatominae*. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. *Trypanosoma cruzi*-Genética.

CDD: (ed.18ª) 616.9363
P653g

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

EL/LA **PROF. Q.A. ZUNILDA ELIZABETH SÁNCHEZ LEÓN MSc.**, DOCENTE INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado "**Genotipificación molecular de poblaciones de *Trypanosoma cruzi* presentes en especies secundarias de triatominos capturados en etapa de vigilancia entomológica entre los años 2010-2016 en las Regiones Oriental y Occidental del Paraguay.**", constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante Daysi Karina Pineda Sanabria, para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 24 días del mes de Mayo del 2021.

Tutora: Prof. Q.A. Zunilda Sánchez, MSc.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

EL/LA **PROF. DRA. GRACIELA RUSSOMANDO .MSc. PhD.** DOCENTE INVESTIGADOR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado "**Genotipificación molecular de poblaciones de *Trypanosoma cruzi* presentes en especies secundarias de triatominos capturados en etapa de vigilancia entomológica entre los años 2010-2016 en las Regiones Oriental y Occidental del Paraguay.**", constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta el/la estudiante **Daysi Karina Pineda Sanabria para** optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 24 días del mes de Mayo del 2021.

Co-Tutor(a): Prof. Dra. Graciela Russomando.MSc. PhD.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

LA **B.C. PAMELA ESTHER MONGELÓS DACUNTE, MSc**, COORDINADORA DEL PROGRAMA DE POSTGRADO, DEPENDIENTE DE LA UNIDAD DE DOCENCIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN Y DE LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado "**Genotipificación molecular de poblaciones de *Trypanosoma cruzi* presentes en especies secundarias de triatominos capturados en etapa de vigilancia entomológica entre los años 2010-2016 en las Regiones Oriental y Occidental del Paraguay.**", constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **Daysi Karina Pineda Sanabria** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas bajo la dirección de la docente investigadora **PROF. Q.A Zunilda Sánchez MSc** considerando que el trabajo de tesis reúne los requisitos de formato necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en San Lorenzo, a los 24 días del mes de Mayo del 2021.

_____

B.C. Pamela Esther Mongelós Dacunte, MSc.
Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas

Para el encuadernado final, para la defensa pública de la tesis se debe incluir la siguiente página, no corresponde para la predefensa.

Título del trabajo de tesis.

Trabajo de tesis para optar el título de Magíster en Ciencias Biomédicas.
Daysi Karina Pineda Sanabria
Aprobado el _____ de 2021

Tribunal examinador:

Evaluador 1 nombre completo, Institución, Ciudad, País

Evaluador 2 nombre completo, Institución, Ciudad, País

Evaluador 3 nombre completo, Institución, Ciudad, País

Evaluador 4 nombre completo, Institución, Ciudad, País

_____
Q.A. Zunilda Sánchez MSc.
Tutor

_____
Prof. Lic. Laura Joy, MSc.
Directora de Postgrado FCQ

DEDICATORIA

A mis padres, a mi esposo y a mi abuela que me acompaña desde arriba.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme salud y la fuerza necesaria para culminar este trabajo.

A toda mi familia por apoyarme y comprenderme en este camino.

A mi abuela que me guía y acompaña desde arriba.

A la profesora Q.A Zunilda Sánchez MSc. tutora del proyecto, por la oportunidad que me dio para realizar mi trabajo de tesis, su acompañamiento, confianza, paciencia y contribución para la culminación de este trabajo.

A la Dra. Graciela Russomando co-tutora del trabajo de tesis, jefa del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología (al momento de iniciar el trabajo de tesis) por la oportunidad, por su apoyo constante e incondicional, su contribución intelectual y paciencia para la culminación de este Trabajo.

A las funcionarias del departamento de Biología Molecular y Biotecnología por la ayuda brindada en diferentes aspectos en especial a la Dra. Leticia Rojas y la Dra. Eva Nara, por sus enseñanzas y acompañamiento para la utilización del Analizador de Fragmentos ABI 310.

A la Dra. Magalí Martínez por acompañamiento y enseñanzas.

A la Dra. Nidia Acosta y Elsa López del departamento de Medicina tropical por la donación de las cepas de referencias utilizadas en el estudio.

A las autoridades del SENEPA y funcionarios del Departamento de Entomología.

A las Autoridades del CONACYT ente financiador, por la oportunidad de poder realizar esta maestría.

A las autoridades del Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud.

A mis compañeros de maestría por el apoyo moral e incondicional durante estos años,

¡Muchas gracias!

GENOTIPIFICACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* PRESENTES EN ESPECIES SECUNDARIAS DE TRIATOMINOS CAPTURADOS EN ETAPA DE VIGILANCIA ENTOMOLÓGICA ENTRE LOS AÑOS 2010-2016 EN LAS REGIONES ORIENTAL Y OCCIDENTAL DEL PARAGUAY.

Daysi Karina Pineda Sanabria*, Zunilda Elizabeth Sánchez,Graciela Russomando****

***Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción**

****Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción**

RESUMEN

El principal vector del *Trypanosoma cruzi* en América del Sur ha sido el *Triatoma infestans*, sin embargo en la última década se ha declarado la disminución de transmisión de la enfermedad por esta especie en áreas endémicas. El *T. cruzi* interactúa con triatominos silvestres y reservorios mamíferos, por lo que el riesgo permanente de la invasión de viviendas por especies secundarias como *Triatoma sordida*, *Triatoma guasayana*, *Pastrongilus megistus* y otras deben ser vigiladas para evitar el proceso de adaptación y colonización de las viviendas. Las poblaciones de *T. cruzi* pueden agruparse en 2 grupos filogenéticos principales: linaje 1 y linaje 2 (correspondientes a 6 grupos de *T. cruzi*: TCI al TCVI), esta clasificación se obtiene con los genes: miniexón, 24Sα rRNA y 18S rRNA. Este estudio se planteó con el objetivo de detectar infección natural en especies secundarias de triatominos capturados en etapa de vigilancia entomológica en áreas endémicas del país y genotipificar *T. cruzi* por PCR y por electroforesis capilar automatizada en un equipo ABI 310. Se analizaron un total de 759 ejemplares (4 especies), capturados en el intra y peridomicilio de 7 departamentos de las dos regiones del Paraguay durante los años 2010 al 2016. Se detectó infección natural con *T. cruzi* en 17 ejemplares, de los cuales tan solo en 6 ejemplares se pudo genotipificar *T. cruzi* (4 en *T. sordida*, Dpto. Concepción; 1 en *T. guasayana*, Dpto. Pte. Hayes; y 1 en *P. geniculatus*, Dpto. de Cordillera; este último capturado en el intradomicilio). Los electroferotipos obtenidos con las cepas de referencias permitieron demostrar que la técnica es reproducible, es muy específica y que es factible estimar en rangos el tamaño de los productos amplificados obtenidos para los genes miniexón y 24αS. La determinación de genotipos de *T. cruzi* en triatominos que circulan en una determinada región y su infestación intra o peridomiciliar, son indicadores que permiten conocer la dinámica de transmisión del parásito.

Palabras claves: Triatominae, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma cruzi* – Genética.

GENOTIPIFICACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* PRESENTES EN ESPECIES SECUNDARIAS DE TRIATOMINOS CAPTURADOS EN ETAPA DE VIGILANCIA ENTOMOLÓGICA ENTRE LOS AÑOS 2010-2016 EN LAS REGIONES ORIENTAL Y OCCIDENTAL DEL PARAGUAY.

Daysi Karina Pineda Sanabria*, Zunilda Elizabeth Sánchez,Graciela Russomando****

***Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción**

****Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción**

ABSTRACT

The main vector of *Trypanosoma cruzi* in South America has been *Triatoma infestans*; however, in the last decade the decrease in transmission of the disease by this species has been declared in endemic areas. *T. cruzi* interacts with wild triatomines and mammalian reservoirs, so the permanent risk of the invasion of dwellings by secondary species such as *Triatoma sordida*, *Triatoma guasayana*, *Pastrongilus megistus* and others must be monitored to avoid the process of colonization and adaptation. The identification of genes such as: mini-exon, 24Sα rRNA and 18S rRNA have shown that *T. cruzi* populations can be grouped into 2 main phylogenetic groups: lineage 1 and lineage 2 (corresponding to 6 groups of *T. cruzi*: TcI to TcVI). This study was proposed with the objective of detecting natural infection in secondary triatomine species captured in endemic regions under entomological surveillance and to perform *T. cruzi* genotyping by PCR and by capillary electrophoresis in an automated ABI 310. A total of 759 specimens (4 species) were analyzed, captured in the intra and peridomicile in 7 departments of the two regions of Paraguay during the years 2010 to 2016. Natural infection with *T. cruzi* was detected in 17 specimens. Genotypes of *T. cruzi* were detected in 6 of them: (4 in *T. sordida*, Concepción Department; 1 in *T. guasayana*, Pte. Hayes Department; and 1 in *P. geniculatus*, Cordillera Dept. captured intradomiciliary. The electroferotypes obtained with the reference strains, allowed to demonstrate that this technique is reproducible, specific and that the size of the amplification products can be estimated in ranges for the miniexón and 24αS genes. The identification of *T. cruzi* genotypes in triatomines that circulate in specific regions and their intra or peridomiciliary infestation, are indicators that allow to understand the dynamic of vector transmission of this parasite.

Key words: Triatominae, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma cruzi* - Genetics.

INDICE

1 MARCO TEÓRICO 15

1.1 Enfermedad de Chagas. Agente causal 16

1.1.1 Mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas 16

1.1.2 Parásito 17

1.1.3 Morfología y ciclo de vida.....18

1.1.4 Genética de *T. cruzi* 19

1.1.5 Distribución de genotipos de *T. cruzi* detectados en América 20

1.1.6 Vectores 22

1.1.7 Situación entomológica del país 24

1.1.8 Técnicas de genotipificación molecular de *T. cruzi.* 25

1.1.9 ABI 310 para la identificación de genotipos de *T. cruzi.* 26

2 OBJETIVOS 28

2.1 Objetivo general 29

2.2 Objetivos específicos.....29

3 METODOLOGÍA.....30

3.1 Diseño y población de estudio.....31

3.1.1 Localización de la investigación.....31

3.1.2 Tipo de investigación 31

3.1.3 Población 31

3.1.4 Criterios de inclusión.....32

3.1.5 Criterios de exclusión 32

3.1.6 Variables.....32

3.2 Elaboración de base de datos, obtención de información epidemiológica.....32

3.3 Disección de Triatominos.....32

3.4 Extracción de ADN 33

3.5 Cuantificación de ADN 33

3.6 Detección de *T. cruzi* por PCR con cebadores especie-específica 33

3.7 Identificación de genotipos de *T. cruzi* por PCR con cebadores miniexón, 24Sα rRNA y 18S rRNA. 35

3.7.2 Condiciones de amplificación de la región del miniexón.....36

3.7.3 Amplificación del gen rRNA 18Sα 36

3.8 Estandarización ABI 310 (Analizador de fragmentos) 36

3.8.1 Prueba sensibilidad y de especificidad/reproducibilidad con cepas de referencia de *T. cruzi*. 36

4 RESULTADOS 38

4.1 Información epidemiológica obtenida a partir de la base de datos. 39

4.2 Detección de *T. cruzi* por la técnica PCR con cebadores especie-específicos. .41

4.2.1 Detección de infección natural con *T. cruzi* en los triatominos analizados 41

4.3 Identificación de Genotipos de *T. cruzi* por PCR con cebadores miniexón, 24Sα rRNA y 18S$\boldsymbol{\alpha}$ rRNA.....43

4.3.1 Identificación de genotipos de *T. cruzi* en los ejemplares de triatominos con infección natural con *T. cruzi*. 43

4.4 Estandarización ABI 310 (Analizador de fragmentos) 45

4.4.1 Prueba sensibilidad y de especificidad/reproducibilidad con cepas de referencia de *T. cruzi* 45

4.4.2 Identificación de genotipos en las muestras biológicas de triatominos con infección natural detectados en el estudio 46

4.4.3 Pruebas de sensibilidad en el ABI 310, empleando muestras biológicas de triatominos infectados naturalmente conservados en un biobanco. 47

4.4.4 Genotipos de *T. cruzi* en especies secundarias detectados en triatominos de 7 departamentos de las dos regiones del País. Análisis realizado con productos de PCR en geles de agarosa.....49

4.4.5 Electroforesis capilar de las muestras biológicas de triatominos con infección natural detectados en el proyecto.....50

5 DISCUSIÓN.....52

6 CONCLUSIÓN.....60

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....63

8 ANEXOS.....71

8.1 Anexo 1. 72

8.3 Anexo 3: 76

8.4 Anexo 4. Electroferogramas.....77

8.5 Anexo 5: 79

Listado de Figuras

Figura 1: Esquema del ciclo biológico de *T. cruzi*. Imagen adaptada de la Center for Disease Control and Prevention image Library (14). 19

Figura 2: Distribución de genotipos de *T. cruzi* en América. Gráfico adaptado de Moya y col, 2016 (11).....22

Figura 3: Especies de triatominos reportados en Paraguay (SENEPA 2005) 23

Figura 4: Productos de amplificación por PCR de cepas de referencia de *T. cruzi* y muestras de triatominos con cebadores TCZ1/TCZ2 y 121/122. 42

Figura 5: Electroforesis de los productos de amplificación del gen miniexón de cepas de referencia (MNCl2 para TCII y X10CL1 para TCI) y en 3 muestras de triatominos infectados naturalmente con T. cruzi. 44

Figura 6: Electroforesis de los productos de amplificación del gen 24rSα y miniexón en muestras de triatominos infectados naturalmente con T. cruzi.....44

Figura 7: Electroferograma. MiniExón. Producto de amplificación con cebadores TC2 y TC, de la cepa de referencia MNCL2. 77

Figura 8: Electroferograma. 24rSα producto de amplificación con los cebadores D71 y D72, de la cepa de referencia ClBrener. 77

Figura 9: Electroferograma. 24rSα producto de amplificación con los cebadores D71 y D72, de una muestra del Biobanco. 78

Lista de tablas

Tabla 1: Clasificación de genotipos de *T. cruzi* (15, 17, 18).....20

Tabla 2: Población de estudio. Características de triatominos proveídos por el SENEPA. 31

Tabla 3: Productos de amplificación esperados con los cebadores 24Sα, 18Sα y miniexón para cada genotipo. 37

Tabla 4: Productos de amplificación esperados con los cebadores 24Sα y Miniexón, linajes y UDTs correspondientes. 37

Tabla 5: Distribución de los triatominos por departamento según especies, estadío (ninfas o adultos), lugar de captura (intradomicilio/peridomicilio) y número de viviendas infestadas. 40

Tabla 6: Infección natural con *T. cruzi* detectada en 17 ejemplares de especies secundarias por sitio de captura y estadío. 42

Tabla 7: Reproducibilidad de la marcación y corrida en el ABI 310 con cepas de referencia. 45

Tabla 8: Tamaños de bandas obtenidas con el ABI 310, empleando muestras biológicas de triatominos infectados naturalmente conservados en un biobanco. 48

Tabla 9: Genotipos de *T. cruzi* en especies secundarias de triatominos detectados en departamentos de las dos regiones del país. Análisis realizado con productos de PCR en geles de agarosa. 50

Tabla 10: Secuencias de cebadores empleados en el trabajo de tesis.....72

Tabla 11: Secuencias de cebadores marcados con fluoróforos empleados con el analizador de fragmentos ABI 310. 73

Tabla 12: Amplificación de ADN nuclear. 74

Tabla 13: Amplificación de ADN Kinetoplastídico. 74

Tabla 14: Amplificación de la región del miniexón. 75

Tabla 15: Amplificación de la región del 24rSα y 18rSα. 75

Tabla 16: Equivalencia en distintas unidades de masa de ADN de T. cruzi para una determinada concentración de parásitos. 76

Tabla 17: Distribución de especies de Triatominos en el Paraguay por Departamentos. 79

ABREVIATURAS

IICS: Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud

UNA: Universidad Nacional de Asunción.

SENEPA: Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo.

MSP y BS: Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social

ADN: Acido desoxirribonucleico.

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa.

kDNA: ADN de cinetoplasto.

UDTs: Unidades discretas de Tipificación.

Z1, Z2, Z3: Zimodemas

TCI, TCII: *Tripanosoma cruzi* 1 y 2

ME: Miniexón

MO: Microscopía óptica

DBMyB: Departamento de Biología Molecular y Biotecnología

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Enfermedad de Chagas. Agente causal

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito Trypanosoma cruzi, afecta a aproximadamente 7 millones de personas en el mundo. Sus manifestaciones clínicas y características epidemiológicas son muy variables entre una zona y otra (1).

En Paraguay se estima que aproximadamente 165.000 personas estarían infectadas (2). Esta enfermedad es el resultado de la infección por el protozoario flagelado (T. cruzi), que circula entre insectos vectores de la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). La transmisión es zoonótica, representado por complejos y diversos ciclos de transmisión en el ambiente silvestre y doméstico, incluyendo unas 120 especies de mamíferos. La enfermedad de Chagas es endémica en América Latina e incluye a 21 países desde los 40° de latitud norte (sur de Estados Unidos) hasta los 45° de latitud sur (sur de Argentina y Chile) (1). En nuestro país la enfermedad se distribuye en todo el territorio nacional, con diferentes niveles de endemicidad; se consideran departamentos de alta endemicidad (Concepción, Cordillera, Paraguarí, San Pedro, Boquerón, Pte. Hayes y Alto Paraguay), de mediana endemicidad (Guaira, Caaguazú, Misiones, Ñeembucú), y de baja endemicidad (Itapúa, Alto Paraná, Amambay, Canindeyú, Caazapá, Central). La infección con T. cruzi es aún prevalente en Paraguay, con regiones silvestres que mantendrán por muchos años la transmisión del parásito, por lo cual es importante mantener y fortalecer la vigilancia a nivel nacional (3). En Paraguay y en países del Cono Sur de América Latina el principal vector causante de la enfermedad es el Triatoma infestans (4). Existen más de 130 especies vectoras de T. cruzi; en Centroamérica, Venezuela y Colombia los vectores principales son las especies Rhodnius prolixus, Triatoma dimidiata y Panstrongylus megistus (5).

La enfermedad presenta un curso clínico variable que se inicia con una fase aguda generalmente asintomática en la mayoría de los casos, con alta parasitemia y detección de *T. cruzi* en la mayoría de los órganos del hospedador. La fase crónica se caracteriza por baja parasitemia, no detectable por microscopia óptica, con manifestaciones clínicas a largo plazo que puede involucrar problemas cardíacos o gastrointestinales (6).

1.1.1 Mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas

Existen diversos mecanismos para la transmisión de la enfermedad de Chagas entre ellas están:

Transmisión vectorial: Es la principal vía de transmisión de *T. cruzi*, donde los parásitos presentes en las heces de los insectos vectores ingresan a través de laceraciones en la piel o a través de la mucosa de los mamíferos. Esta ha sido la principal vía de transmisión, causante de más del 80% de los casos conocidos en áreas endémicas (7).

Transmisión vertical: Puede ser transmitido de la madre al hijo por vía transplacentaria y por el amamantamiento, durante las fases aguda y/o crónica de la infección materna (8). En el país existe una frecuencia de transmisión transplacentaria de 5% (2).

Transfusiones y trasplantes: Los bancos de sangre y los transplantes de órganos son focos de transmisión. En América Latina los bancos de sangre han incorporado el tamizaje de anticuerpos para la detección de infección con *T. cruzi* en los años 1990 (7). En nuestro país la prevalencia en donantes de sangre es de 2,85% (2).

Transmisión Oral: Se da de manera inusual a través del consumo de frutas o alimentos contaminados. Es una forma importante de transmisión en el ciclo selvático y probablemente sea la más antigua, por ser la ruta natural para la infección de reservorios silvestre e inclusive reservorios domésticos. Concretamente, se han descrito casos al beber zumos de açaí, caña de azúcar o guayaba contaminada (7,8).

Accidentes de laboratorio: En profesionales que manipulan muestras que contienen el parásito o que trabajan directamente con el insecto vector podría contraer accidentalmente la enfermedad por inoculación debida a pinchazos o exposición a mucosas. Es un mecanismo de transmisión muy poco frecuente (8).

1.1.2 Parásito

Taxonomía

T. cruzi pertenece al:

Reino: Protista

Filo: Euglenozoa

Clase: Kinestoplastea

Orden: Tripanosomatida

Familia: Tripanosomatidae

Género*: Trypanosoma*

Especie: *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi se caracteriza por la presencia de una gran mitocondria o kinetoplasto (red compleja de miles de moléculas de DNA circular localizadas y concatenadas en su única

mitocondria). El DNA kinetoplastídico, representa alrededor del 20% del DNA celular y está compuesto por dos tipos de moléculas, los maxicírculos y los minicírculos (10).

Los maxicírculos contienen varios genes mitocondriales, en tanto que los minicírculos son más heterogéneos y su función es menos clara. Ambos círculos codifican para ARNs guías, indispensables para el procesamiento de los ARN mensajeros. En cada célula hay aproximadamente 20-50 copias de maxicírculos y entre 10.000-20.000 copias de minicírculos. Dado el elevado número de copias, este kDNA suele ser blanco de técnicas moleculares tanto para diagnóstico como para la tipificación de *T. cruzi* (11).

1.1.3 Morfología y ciclo de vida

El parásito *T. cruzi* presenta cuatro estadíos: epimastigotes, tripomastigotes sanguíneos, tripomastigotes metacíclicos y amastigotes.

Los epimastigotes: se encuentran en el intestino medio del insecto vector, las cuales se diferencian en **tripomastigotes metacíclicos** que es la forma infecciosa del parásito. Cuando esta alcanza un huésped vertebrado como el hombre, rápidamente invaden las células huésped y en el citoplasma se convierten en **amastigotes,** los cuales se multiplican hasta llenar casi completamente la célula; en este momento, los amastigotes se transforman en **tripomastigotes** muy móviles que rompen la célula y son liberados a la sangre, desde donde pueden invadir otras células (10).

El ciclo de vida del parásito es complejo e involucra tanto a huéspedes invertebrados como vertebrados. Los hospedadores y los vectores presentan una distribución diferencial en los distintos hábitats por lo que se ha caracterizado dos ciclos de transmisión denominados ciclo doméstico y ciclo selvático (12,13).

En el ciclo de transmisión selvática dependiendo de la región geográfica varían los vectores y hospedadores pero los hospedadores más comunes en este ciclo son los marsupiales, edentados y roedores (11).

En el ciclo doméstico sin embargo están involucrados el hombre, mamíferos sinantrópicos y un vector primario altamente domiciliado (11). En la **figura 1** se ilustra el esquema del ciclo biológico de *T. cruzi* en el insecto vector y en el huésped vertebrado.

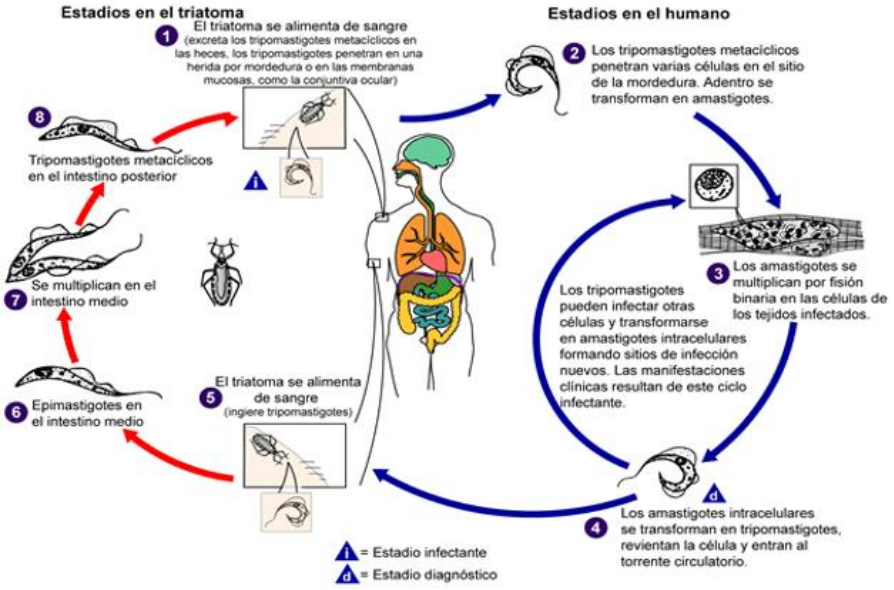

Figura 1: Esquema del ciclo biológico de *T. cruzi*. Imagen adaptada de la Center for Disease Control and Prevention image Library (14).

Figura 1: Esquema del ciclo biológico de *T. cruzi*. El ciclo de vida empieza cuando el insecto ingiere el parásito en su estadío tripomastigote sanguíneo del hospedador vertebrado infectado. Posteriormente estos alcanzan el intestino medio del insecto y se diferencian a epimastigote metacíclico, este se multiplica repetidamente por división binaria y se adhiere a las membranas peri-microvillares de las células intestinales para luego diferenciarse a tripomastigotes metacíclicos dentro de un proceso conocido como metaciclogénesis, ambas formas del parásito se pueden detectar en las heces y orina del vector. Cuando ocurre la infección por tripomastigotes metacíclicos estos infectan al hospedero vertebrado invadiendo células de diferentes tejidos y se diferencian en amastigotes replicandose en el citoplasma. Luego de la división celular estos se diferencian a tripomastigotes altamente móviles los cuales rompen la membrana celular para ser liberados al torrente sanguíneo. Estos tripomastigotes sanguíneos son capaces de infectar otras células o ser ingeridos por el insecto vector durante la ingesta de sangre del hospedador, continuando nuevamente el ciclo del parásito (7).

1.1.4 Genética de *T. cruzi*

La diversidad genética de *T. cruzi* es alta y existe un gran número de marcadores genéticos que pueden ser empleados para estratificar las especies en varias subdivisiones, con baja o alta resolución dependiendo del marcador empleado. Mediante técnicas de electroforesis, las poblaciones del parásito se clasificaron inicialmente en tres grupos, denominados zimodemas Z1, Z2 y Z3 (15, 16). Investigaciones posteriores los clasificaron en dos linajes filogenéticos llamados *T. cruzi* I (TcI) y *T. cruzi* II (TcII), siendo el segundo linaje subdivido en TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcIId y TcIIe. Según esto, Z1, Z2 y Z3, corresponderían a TcI, TcIIb y TcIIa respectivamente, mientras que los subgrupos TcIIc, TcIId y TcIIe son genotipos híbridos generados por fenómenos de

recombinación entre TcI con TIIb y TcIIb con TcIIc, respectivamente (17,18,19). Tiempo después, la comunidad científica reagrupó a las poblaciones de *T. cruzi* en seis diferentes "Unidades Discretas de Tipificación" o UDTs (DTU, "Discrete Typing Units"), en donde cada unidad correspondería a grupos de *T. cruzi* que están más estrechamente relacionados entre sí que con otros conjuntos cuando son definidas por marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos (16). A su vez, éstas se separan en dos grandes subdivisiones, llamadas DTU I y DTU II, siendo además el DTU II subdividido en 5 DTUs, IIa-e. Finalmente, un comité de expertos determinó por consenso en el año 2009, que la nomenclatura actual para los genotipos de *T. cruzi* los clasificaría en 6 grupos, desde *T. cruzi* I al VI (20). En la **tabla 1** se puede observar la clasificación de los genotipos y las unidades discretas de tipificación de *T. cruzi* y su equivalencia en linajes y sublinajes.

Tabla 1: Clasificación de genotipos de *T. cruzi* (15, 17, 18)

Zimodemas (Miles 1977)	**Linajes** (Tibayranc 1995)	**Sublinajes** (Brisse 2000)	**UDTS equivalencia** (Consenso Inter. 2009)
Z1, Z2, Z3	**TCI**	**I**	**TcI**
	TCII	**IIb**	**TcII**
		IIc	**TcIII**
		IIa	**TcIV**
		IId	**TcV**
		IIe	**TcVI**

1.1.5 Distribución de genotipos de *T. cruzi* detectados en América

Las poblaciones naturales de *T. cruzi* están compuestas por clones múltiples, distribuidos en 6 Unidades Discretas de Tipificación (UDTs TcI a TcVI) de diferente distribución geográfica y circulación en los ciclos de transmisión, además se han encontrado nuevos genotipos como el Tc Bat, asociado con murciélagos en Brasil, Panamá y Colombia (21).

Se ha observado una distribución geográfica heterogénea de estos genotipos, así, por ejemplo, TcI fue relacionado originalmente a ciclos silvestres, pero actualmente se sabe que su distribución geográfica es más extensa y ésta se da tanto en el ciclo doméstico como el selvático (22,23). Además, se ha observado que TcI se encuentra asociado a los ciclos domésticos y silvestres en Colombia, Venezuela y en algunos países de Centroamérica, y a los ciclos selváticos en la Amazonia, en tanto que TcII, TcV y TcVI son más comunes en los países del Cono Sur del continente americano (21). Al parecer, es posible encontrar todos los genotipos a lo largo del continente americano, pero con predominio de algunos de ellos en diferentes regiones geográficas. En cuanto a los genotipos de *T. cruzi* aislados de triatominos, en varios estudios se ha demostrado la asociación de genotipos de *T. cruzi* en algunas especies de vectores, por ejemplo, se ha encontrado predominancia de TcI en el intestino de *R. prolixus, Rhodnius colombiensis y Rhodnius pallescens* en vectores domésticos y silvestres en Colombia (20). Los genotipos TcIII y TcIV son los más raros, y se han relacionado con la transmisión selvática, con pocos reportes de infección en humanos (20). Ver **Figura 2**. En humanos han sido encontrados todos los genotipos, en Brasil los genotipos más comúnmente encontrados fueron TcII, TcIV y TcI (24). En Venezuela se encontraron los genotipos TcI y TcIV (25). En Bolivia el genotipo más común en humanos es TcV (26). En Paraguay se reportaron los genotipos TcII, TcIII y TcV (26). En Argentina los genotipos más comunes encontrados en humanos fueron TcV y TcVI (27, 28).

En nuestro país, utilizando diferentes técnicas, se ha reportado la circulación de los seis genotipos conocidos de *T. cruzi*, variando en frecuencia y distribución geográfica, tipos de hospedadores y ciclos de transmisión. Las áreas con mayor diversidad de genotipos detectados fueron la región del Chaco y el departamento de Concepción (17).

En un estudio realizado en el año 2017 por Acosta y col. con vectores del Chaco paraguayo y boliviano,de las cuatroespecies de triatominos capturadas se encontraron (*T. infestans, T. sordida, T. guasayana* y *T. platensis*), sólo *T. infestans* fue encontrado en el entorno doméstico, no se encontró domiciliación por *T. guasayana y T. sordida* (29). La infección natural por *T. cruzi*, todos detectados en *T. infestans*, fue de 5.4%(29). Además se reportaron los genotipos TcII, TcIII, TcV y TcVI circulando en estos vectores infectados, siendo los híbridos TcV y TcVI más frecuentes (29). Hasta el momento no se reportó que exista una relación directa entre genotipos y características biológicas relevantes así como susceptibilidad a drogas, infectividad al vector, manifestación clínica, etc (11).

Cuando se identifica los genotipos de *T. cruzi* es factible estimar el origen de la infección natural en los ejemplares tanto en vectores primarios como en secundarios, porque los genotipos están relacionados con los ciclos de transmisión domiciliar y silvestre (30).

Mapa de distribución de genotipos de *T. cruzi* en las Américas

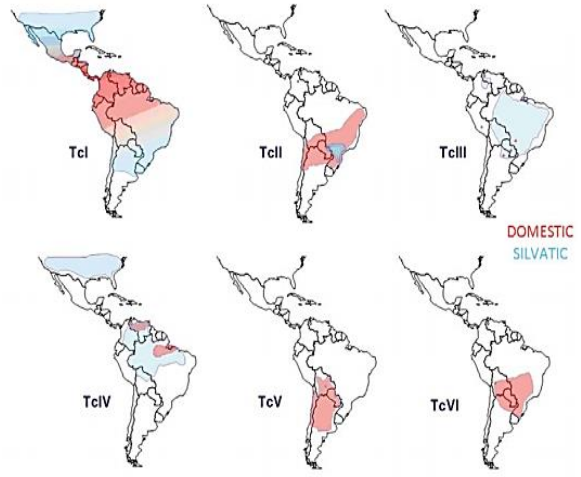

Figura 2: Distribución de genotipos de *T. cruzi* en América. Gráfico adaptado de Moya y col, 2016 (11).

1.1.6 Vectores

Los triatominos representan la sub familia de los *Reduviidae* caracterizado por ser hematófagos (se alimentan de sangre) además son insectos hemimetábolos es decir, de huevo pasan por cinco estados ninfales (muy parecidos a los adultos pero de menor tamaño y carecen de alas) y luego al estadío adulto. Estos insectos deben alimentarse por lo menos una vez en cada estadío para que pueda completar su ciclo de vida (6,31). Existen más de 130 especies de triatominos, de los cuales, solo 3 géneros agrupan a los vectores principales: *Triatoma*, *Rhodnius* y *Pastrongylus* (32). Sin embargo, más del 50% de las especies de esta subfamilia se han infectado natural o experimentalmente con el parásito, y debido a su comportamiento y fisiología similares, todas deben considerarse como vectores potenciales (33).

La especie más domiciliada en los países del Cono Sur de América es *T. infestans*, y en la Región Andina y América Central *R. prolixus*. Estas especies están siendo controladas por programas regionales y nacionales que han destinado recursos para eliminar las poblaciones domiciliarias basadas en estrategias que involucra el rociado con insecticidas. En la última década se han reportado otras especies que establecen colonias en el domicilio, y algunas, como *T. dimidiata*, han logrado invadir residencias urbanas y

rurales. Algunas especies como *Panstrongylus rufotuberculatus, Rhodnius stali*, y *Eratyrus mucronatus* en Bolivia y *P. geniculatus* fueron reportados en la región del Amazonas y también se informó su presencia en vías de domiciliación en Brasil (34,35). En Paraguay según datos publicados por el SENEPA, se reportaron 8 especies de triatominos en total, entre las que se encuentran: *T. infestans* (vector principal) *T. sordida*, *T. guasu*, *T. guasayana*, *P. geniculatus*, *P. megistus*, *T. platensis* y *Rhodnius sp*. (considerados vectores secundarios) (36). En la **figura 3** se observan las diferentes especies reportadas en el país.

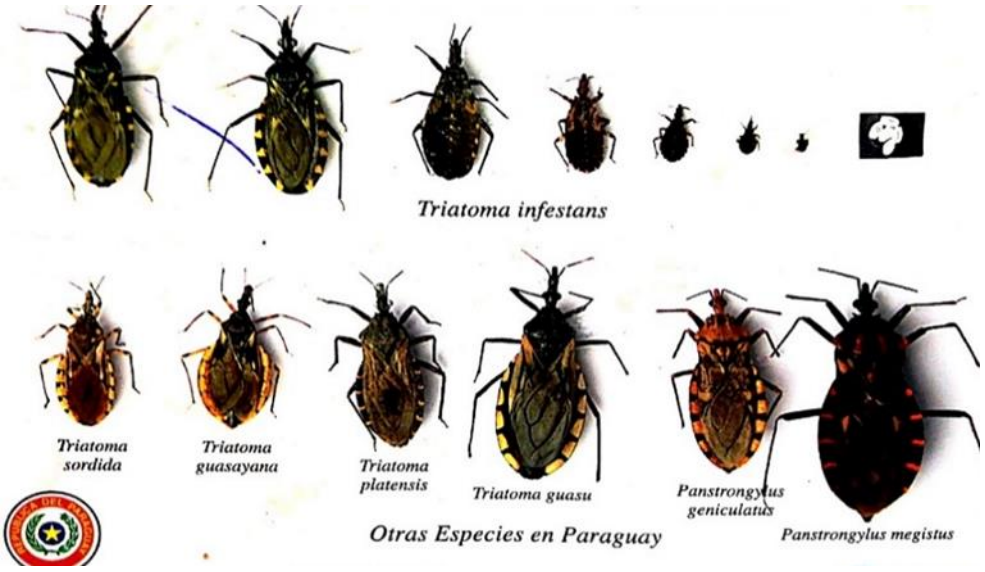

Figura 3: Especies de triatominos reportados en Paraguay (SENEPA 2005)

Se ha reportado en un estudio datos acerca de la distribución, hábitats y comportamiento de triatominos peridomiciliarios y silvestres en las regiones Oriental y Occidental del país, en ambas regiones geográficas la mayor densidad corresponde a *T. sordida*, como vector nativo adaptado al peridomicilio. En la región chaqueña, *T. guasayana* presenta abundante densidad en ambientes silvestres muy próximo a las viviendas, y en ocasiones es capaz de llegar a áreas próximas al domicilio atacando directamente a humanos y animales domésticos (3).

En la región Oriental del Paraguay, se ha logrado una cobertura de vigilancia activa que permite mantener la interrupción de la transmisión vectorial declarada en el año 2008. Es así que en el año 2012, se evaluaron 150.100 unidades domiciliares en áreas históricamente endémicas y se rociaron 1.251 viviendas. Se notificaron y analizaron

triatominos procedentes de 109 viviendas, de los cuales tan solo cuatro (4%) ejemplares eran de la especie *T. infestans* (tres en Paraguarí y uno en Cordillera), todas en peridomicilio. La mayor infestación se debió a la especie *T. sordida* en un 75 %, seguido de *T. guasayana* en un 10% y *P. geniculatus* en un 6%. En lo referente a la interrupción de la transmisión vectorial, se logró la certificación en Alto Paraguay en el 2012; en Boquerón en el 2016, y la recertificación de la transmisión vectorial intradomiciliar por *T. infestans* en la Región Oriental en el año 2018 (37). En noviembre del año 2018, Paraguay recibió la certificación como "país libre de la transmisión vectorial domiciliaria del *T. cruzi*, en el marco de la "24 Reunión de la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa Subregional Cono Sur de eliminación de *T. infestans* y la Interrupción de la Transmisión Transfusional de la Tripanosomiasis Americana (Incosur/Chagas)" (1).

1.1.7 Situación entomológica del país

A partir de los avances obtenidos en la eliminación y control de la transmisión vectorial domiciliaria de *T. cruzi*, se observaron cambios en la dinámica de transmisión que propician la emergencia de otros escenarios entomológicos, tales como la ocurrencia de ciclos peridomésticos o silvestres que involucran a especies autóctonas (6). En Paraguay se han realizado estudios referentes a *T. sordida*, (considerado un vector secundario) para determinar su capacidad vectorial, teniendo en cuenta la disminución de la población del vector principal y la invasión de ésta especie secundaria a las viviendas de áreas endémicas. Uno de los primeros estudios realizados en el país con la especie *T. sordida* fue en una localidad del departamento de Paraguarí en el año 1996, donde de un total de 246 triatominos capturados, 23 eran *T. sordida*, todos negativos para *T. cruzi*, un ejemplar capturado en el domicilio y el 4,3% presentaba sangre humana como fuente de alimentación (38). En otro trabajo publicado por Sánchez y col. en el año 2012 con ejemplares de la especie *T. sordida* capturados en etapa de vigilancia entomológica, se ha demostrado la capacidad vectorial de esta especie en ambas regiones del Paraguay, en ese mismo trabajo se reportó que en el departamento de Concepción de la Región Oriental existía 44% de colonización intradomiciliar y 10,6% de infección natural con *T. cruzi* en ejemplares de *T. sordida* (6). En un trabajo publicado por nuestro grupo de estudio, en el año 2016 se reportó en la Región Occidental o Chaco, infestación y colonización en el intradomicilio y peridomicilio por *T. sordida* en 12 (8.2%) y 79 (53.7%) viviendas de 147 evaluadas, respectivamente, así también se detectó infección con *T. cruzi* en 21% de los triatominos analizados, en la identificación de genotipos por caracterización molecular en dos ejemplares ninfas se detectó el genotipo TcII, además adultos y ninfas en el

peridomicilio de 4 viviendas dieron positivo para el genotipo TcI y se estimó un elevado riesgo de transmisión de *T. cruzi* intradomiciliar (39). Estos resultados evidenciaron la capacidad adaptativa de esta especie en el domicilio, y un incremento de su potencial vectorial para transmitir la enfermedad de Chagas en áreas del Paraguay (6,40). Otro estudio de nuestro grupo publicado en el año 2018 con vectores secundarios del Chaco Paraguayo, reveló un índice de infestación por la especie *T. sordida* en viviendas del 19% e infección natural por *T. cruzi* del 47% dentro del peridomicilio (40), lo que indicaría que esta especie secundaria tendría una potencial capacidad vectorial en la transmisión de la enfermedad de Chagas (41). Muchas especies nativas adquieren importancia epidemiológica debido a la capacidad de intercambio entre hábitats selváticos y domésticos, así como para reemplazar el nicho ecológico de triatominos domiciliarios (4). Por esta razón es importante considerar la presencia de especies nativas de focos selváticos como: *T. sordida, T. guasayana, P. megistus* y otras especies en el proceso de colonización de las viviendas humanas y que son clasificados como potenciales vectores de la enfermedad, lo que podría confirmarse si estos vectores de especies secundarias llegan a cumplir con todos los indicadores entomológicos tales como: tasa de infestación (presencia de vectores discriminada por lugar de captura intra y peridomicilio, colonización (presencia de ninfas en las viviendas) e infección natural (32).

1.1.8 Técnicas de genotipificación molecular de *T. cruzi.*

Una de las primeras formas de clasificar las cepas de *T. cruzi* fue por medio de métodos bioquímicos, donde se analizaban productos de expresión génica utilizando izoenzimas. La electroforesis de isoenzimas fue uno de los ensayos empleados para detectar diferencias entre enzimas con propiedades catalítica similares, pero con distintas estructura molecular, lo que permitía agruparla en diferentes cepas en los llamados zimodemos asociándolos con sus perfiles isoenzimáticos idénticos, con esta técnica se llegó a identificar 3 zimodemas en cepas de Brasil (42,43).

Posterior a eso se empezaron a emplear varias técnicas con diferentes marcadores moleculares para la identificación y clasificación de cepas de *T. cruzi* , una de las técnicas antiguamente empleada fue el análisis de patrones de restricción de los minicírculos de ADNk donde se pudo identificar dos grupos de poblaciones conocidas como esquizodemo (44). Luego se utilizaron los maxicírculos del ADNk y los espaciadores no transcriptos del ARN ribosomal con las cuales se formaron dos grupos conocidos como cinetodemos (45,46).

Cuando se analizaron por vez primera los genes ribosomales 18S, 5.8 S y 24Sα, y la región intergénica del miniexón, se observó la existencia de dimorfirmo entre las cepas evaluadas y estos estudios demostraron que *T cruzi* podía ser clasificado en dos linajes conocidos como TcI y TcII (47,48).

Estos marcadores moleculares de *T. cruzi* identificados, permitió la clasificación en dos grupos filogenético: linaje 1 correspondiente al zimodema 2 y linaje 2 correspondiente a zimodema 1. El zimodema 3 no se pudo clasificar en ninguno de los dos linajes (49,50).

Otros grupos de investigación continuaron trabajando con la caracterización de *T. cruzi* implementando técnicas mucho más sensibles, y que permitiera la clasificación de todas las cepas. Se emplearon técnicas como la amplificación al azar de regiones polimórficas del ADN conocida como "RAPD" (Random Amplified Polymorphic DNA). El empleo de estos ensayos y el uso de la electroforesis de multilocus de enzimas (MLEE) han identificado la existencia de seis UDTs (unidades discretas de tipificación). Este término se propuso para describir conjuntos de poblaciones que son genéticamente similares entre sí y pueden ser identificados con marcadores comunes (17,51,52).

Una de las técnicas empleadas en este trabajo es la PCR, que por su sensibilidad permiten identificar el parásito directamente en las muestras biológicas, sin cultivo previo, usando como blancos de reacción los marcadores moleculares como el gen ribosomales 24Sα rRNA y 18S rRNA y el gen miniexón (ME). Estos genes constitutivos han demostrado ser de gran valor en la investigación de la diversidad genética del mismo.

1.1.9 ABI 310 para la identificación de genotipos de *T. cruzi.*

Esta técnica consiste en una electroforesis capilar conocida como analizador de fragmentos, pues permite discriminar fragmentos de ADN que difieren en hasta en un par de bases. Los cebadores que flanquean el blanco a amplificar por PCR, son conjugados con fluoróforos que responden a diferentes longitudes de onda, de modo que durante la electroforesis pasan por un lector (láser) y producen espectros de emisión tras la excitación del láser dentro del equipo cada fragmento amplificado. De esta manera cada fluoróforo se puede emplear para diferentes regiones blanco de interés. Este mecanismo de detección da lugar a una alta sensibilidad, a la resolución de un solo nucleótido, a la detección diferencial de los productos y a la cuantificación relativa, además hace que el trabajo sea más práctico ya que elimina el uso de geles de agarosa y poliacrilamida, como también deja de lado el uso de reactivos cancerígenos como el bromuro de etidio. Permite una interpretación precisa, reproducible y objetiva de los productos de PCR y el archivado automático de los datos. La reproducibilidad interanalítica e intranalítica de

determinación de tamaños mediante electroforesis capilar es de aproximadamente 1-2 nucleótidos (53,54).

Justificación: En Paraguay, el SENEPA del MSP y BS se encarga de la vigilancia entomológica de Chagas y registra datos necesarios para la construcción de los indicadores de uso más corriente para determinar riesgo de transmisión de infección con *T. cruzi* tales como: tasa de infestación (presencia de vectores discriminada por lugar de captura intra y peridomicilio, colonización (presencia de ninfas en las viviendas) e infección natural (32). En la actualidad, después de la disminución de la población del vector principal (*T. infestans*), existe un riesgo permanente de re-infestación de las viviendas por *T. infestans* como también el riesgo de la invasión de viviendas por especies secundarias como el *T. sordida* y otras. Muchas especies nativas adquieren importancia epidemiológica debido a la capacidad de intercambio entre hábitats selváticos y domésticos, así como para reemplazar el nicho ecológico de triatominos domiciliarios (4). Por esta razón es importante considerar los indicadores entomológicos mencionados y la presencia de especies nativas de focos silvestres como: *T. sordida, T. guasayana, P. megistus* y otras especies que puedan colonizar las viviendas humanas y su clasificación como potenciales vectores de la enfermedad. En Paraguay muy poco se ha descrito sobre la infección natural de especies silvestres presentes en el domicilio y peridomicilio, por lo que se propone realizar éste estudio a fin de conocer la capacidad de transmisión de éstas especies secundarias detectando infección natural en las mismas, como así también identificar el genotipo de *T. cruzi* presente en los ejemplares infectados que relacionado con los datos entomológicos ayudará a comprender mejor la dinámica de transmisión del parásito.

Se propone por vez primera determinar los genotipos del *T. cruzi* empleando una electroforesis capilar (analizador de fragmentos ABI310), que permite identificar el tamaño de fragmentos amplificados por PCR, con cebadores marcados con fluoróforos de los genes conservados gen ribosomal 24Sα rRNA, 18S rRNA y el gen miniexón (ME) mediante el análisis de electroferogramas (55).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Identificar los genotipos de *T. cruzi* presentes en especies secundarias de triatominos (*T. sordida, T. guasayana, T. guasu y P. geniculatus*) capturados en etapa de vigilancia entomológica en las regiones Oriental y Occidental del Paraguay entre los años 2010 al 2016.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar índices de infestación y colonización, especie, lugar de captura (intra/peridomiciliar), a partir de una base de datos elaborada con los registros entomológicos provenientes del SENEPA contenidos en las fichas que acompañan a los ejemplares de las diferentes viviendas para la obtención de datos epidemiológicos.

- Detectar infección natural con *T. cruzi* en los ejemplares de triatominos analizados por el método PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

- Estandarizar el Analizador de Fragmentos ABI 310 para identificación de genotipos de *T. cruzi* por tamaño de fragmentos.

- Determinar los genotipos de *T. cruzi* presentes en los ejemplares con infección natural con *T. cruzi*.

3 METODOLOGÍA

3.1 Diseño y población de estudio

3.1.1 Localización de la investigación

La investigación se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, ubicada dentro de Campus de la Universidad Nacional de Asunción.

3.1.2 Tipo de investigación

El tipo de investigación responde al observacional descriptivo de corte transverso

3.1.3 Población

Se trabajó con una población total de 759 ejemplares de triatominos de 4 especies secundarias (*T. sordida, T. guasayana, T. guasu y P. geniculatus*), provenientes de los departamentos de Concepción, Paraguarí, Cordillera y San Pedro de la Región Oriental y los departamentos de Boquerón, Pte. Hayes y Alto Paraguay de la región Occidental (**Ver Tabla 2**), Los ejemplares fueron capturados en etapa de vigilancia entomológica durante los años 2010 al 2016 por funcionarios de campo del SENEPA y fueron clasificados taxonómicamente según Lent y Wygodzinsky (56) y analizados por microscopía óptica (MO) para la detección de *T. cruzi* en heces en el laboratorio de Entomología del SENEPA, (todos los ejemplares fueron negativos por MO). Estos ejemplares quedaron en el laboratorio del SENEPA por un tiempo y posteriormente fueron remitidos al departamento de Biología Molecular y Biotecnología del IICS, donde fueron conservados (ejemplares enteros) a -20ºC hasta su procesamiento.

Tabla 2: Población de estudio. Características de triatominos proveídos por el SENEPA.

	Especie de triatominos					
Departamento	***T. sordida***	***P. geniculatus***	***T. guasu***	***T. guasayana***	**Viviendas infestadas**	**Total ejemplares**
Concepción	638				240	638
Paraguarí		2	1	1	2	4
Cordillera		1	2		3	3
San Pedro				1	1	1
Boquerón		1		13	14	14
Pte. Hayes	89			5	26	94
Alto Paraguay	3			2	5	5
Total	730	4	3	22	291	**759**

3.1.4 Criterios de inclusión

- Triatominos de especies secundarias (*T. sordida, T. guasayana, T. guasu* y *P. geniculatus)* identificados por especies y estadío por el laboratorio de Entomología del SENEPA, capturados dentro del Programa de vigilancia entomológica por funcionarios del SENEPA.
- Triatominos de especies secundarias en estadío de ninfas (N); cuarto estadío ninfal y adultos (A), clasificados por tamaños.
- Ejemplares en buenas condiciones de conservación.

3.1.5 Criterios de exclusión

Ejemplares que no contaban con todos los datos entomológicos mínimos necesarios para el estudio como procedencia, sitio de captura, estadío y especie.

3.1.6 Variables

Estadío: Variable cualitativa dicotómica; se clasificaron en dos grupos: ninfas y adultos. Esta variable se utilizó para tener un indicador de colonización de las viviendas. La presencia de ninfas dentro de las viviendas indica colonización.

Sitio de captura: Variable cualitativa dicotómica; se clasificaron de acuerdo al lugar en que se capturaron los ejemplares; peridomicilio o intradomicilio de la vivienda.

Infección con *T. cruzi*: Variable cualitativa dicotómica, se clasificaron en positivos o negativos. A las muestras positivas se les realizó la caracterización genética.

Genotipos: Variable cualitativa politómica, se realizó la caracterización para conocer los genotipos y se clasificaron en (TCI, TCII, TCIII, TCIV, TCV, TCVI).

3.2 Elaboración de base de datos, obtención de información epidemiológica

La base de datos se elaboró en formato Excel, con datos entomológicos que contenían las fichas que acompañaban a los ejemplares proveídos por funcionaros del SENEPA donde se anotaron los datos entomológicos como: lugar de captura (intra/peri), departamento, localidad, estadío (ninfa/adulto), especie y el resultado de infección natural con *T. cruzi* por MO.

3.3 Disección de Triatominos

En el laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología del IICS se realizaron las disecciones de los ejemplares (almacenados previamente a -20°C), se realizó la disección del contenido abdominal para obtener las heces de cada triatomino, se colocó la parte disectada de cada muestra en microtubos de 1.5 ml, con 500 ul de solución tampón

(10mM Tris, pH 7.4, 1mM EDTA, 150 mM NaCl y 1% SDS). Las muestras se llevaron a ebullición por 15 minutos y posterior a eso se realizó una centrifugación a 8000 rpm por 5 minutos, luego se guardaron a -20°C hasta el momento de la extracción.

3.4 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, se utilizó una alícuota del proceso mencionado anteriormente, en casos de viviendas a la cual correspondía un sólo ejemplar, se tomó 300 ul del sobrenadante resultante del proceso de disección y se colocó en un nuevo tubo de 1,5 ml para empezar la extracción. En el caso de las viviendas con más de un ejemplar adulto se prepararon pooles, tomando volúmenes iguales del sobrenadante de cada tubo preparado inicialmente de cada ejemplar hasta completar un volumen final de 300 ul. Este mismo procedimiento se realizó con las ninfas provenientes de una misma vivienda. Se prepararon un total de 140 pooles (un promedio de 4 ejemplares por vivienda) y 200 tubos individuales (una muestra por tubo). Cada tubo fue incubado con 10 ul de proteinasa K (20ug/ml) a 60°C por 1 hora. Luego se inactivó la enzima por calentamiento a 95°C por 10 minutos (57).

El ADN fue extraído aplicando el método Fenol-Cloroformo, para precipitar el ADN se colocó 500ul de Etanol puro, Glicógeno (20ug) y Acetato de sodio 3M pH 5,4 en un 10% del volumen recuperado. El ADN obtenido se resuspendió en 100ul de H_2O bidestilada estéril (58).

3.5 Cuantificación de ADN

Se prepararon diluciones 1/20 del ADN resuspendido para la cuantificación de ADN, que se llevó a cabo en el espectrofotómetro Bioware DNA (WPA, UK) obteniéndose la concentración de ADN en ng/ul y la pureza según la relación de absorbancia a 260/280. Las muestras que no tuvieron una relación 260/280 igual o superior a 1 fueron re-precipitadas y las que con eso aún no alcanzaron una pureza aceptable fueron sometidas a una re-extracción con PCI (Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico) y Fenol, luego se realizó la precipitación y resuspensión del ADN. Se repitió la extracción con nueva alícuota del resuspendido inicial, de las muestras cuya pureza de ADN no mejoraron con el proceso anterior mencionado.

3.6 Detección de *T. cruzi* por PCR con cebadores especie-específica

El método que se empleó para la detección de *T. cruzi* fue la PCR convencional, involucrando la amplificación de secuencias repetitivas de ADN nuclear de *T. cruzi* y ADN kinetoplástídico, se utilizaron los cebadores TCZ1/TCZ2 y los cebadores 121 y

122 respectivamente descrito por Moser y col. (59). El producto de la primera reacción fue un fragmento de 198 pb y de la segunda reacción fue un fragmento de 330 pb. Los reactivos utilizados para ambas reacciones de PCR fueron: 1x Buffer, 2 mM $MgCl_2$, 0,4 mM dNTPs, 0,5 uM cebadores TCZ1/TCZ2 y los cebadores 121/122, 1U de Taq polimerasa (Genbiotech-Argentina). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 50ul, con 5 ul de ADN, en una concentración entre 100 y 200 ng/ul. El programa de amplificación ya se encontraba estandarizado en el departamento de Biología Molecular y Biotecnología del IICS-UNA y se describe en el **Anexo 2**. Se utilizó el termociclador Thermo Fisher/Applied Biosystems. En cada tanda de muestras amplificadas se incluyó como control positivo ADN extraído de cultivos de parásitos (cepa de referencia; Cl Brener) proveído por el departamento de Medicina Tropical del IICS-UNA, éste control positivo fue cargado en una concentración tal que su equivalencia en cantidad de parásitos correspondió a 10 y 100 parásitos, ésta estimación se realizó a partir de la concentración de ADN medida y el empleó de la relación: 10^{-6} ng de ADN= 1fentogramo y 200 fentogramo = 1 parásito. En el Anexo 4 se muestra la cantidad de parásitos correspondientes a una determinada masa de ADN según Koy y col y la que se empleó como referencia en este estudio (60).

Los productos fueron analizados en geles de agarosa al 2%, teñidos con Bromuro de etidio y visualizados bajo un transiluminador UV.

Prueba de sensibilidad

Se realizó la prueba de sensibilidad en la detección de ADN nuclear (con cebadores TCZ1 y TCZ2) y ADN Kinetoplastídico (con cebadores 121 y 122) para lo cual se prepararon diluciones de ADN de cepas de referencia $X_{10}Cl_1$ y $Mncl_2$ equivalentes a 10, 100 y 1000 parásitos. La equivalencia a cantidad de parásitos se estimó a partir de la concentración de ADN cuantificado y empleando la relación: 10^{-6} ng de ADN= 1fentogramo y 200 fentogramo = 1 parásito (60). Posterior a esto, se trabajó con las muestras de ADN de los ejemplares de triatominos.

Observación: Los pooles que dieron positivos para *T. cruzi*, fueron desglosados para su identificación en forma individual.

3.7 Identificación de genotipos de *T. cruzi* por PCR con cebadores miniexón, 24Sα rRNA y 18S rRNA.

Cabe destacar que la identificación de los genotipos de T. cruzi en muestras biológicas (intestino de los triatominos con infección natural), requiere de una concentración alta de parásitos para su detección. Los genes rRNA 24Sα, 18S rRNA y el espaciador no transcrito del gen miniexón, son genes constitutivos que por experiencia en el laboratorio con cepas de referencia requieren entre 1000 y 5000 parásitos para obtener una amplificación por PCR convencional que permita la visualización de los productos en geles. Por lo expuesto, fue necesario aumentar el volumen de la muestra de ADN extraido a 10uL para 50uL de reacción para cada gen blanco.

Debido al bajo número de ejemplares positivos para T. cruzi, se decidió incluir para la estandarización en el equipo ABI 310, además de las cepas de referencia, muestras biológicas conservadas a -20C en el biobanco del laboratorio de BMyB. Estas muestras corresponden a ADN ya extraído de intestino de triatominos, 9 muestras con productos de PCR fuertes (+++), equivalentes a 1000 parásitos con cebadores especie específicos 121/122; para asegurar su detección en el electroforesis capilar.

Para la corrida en el analizador de fragmentos ABI 310 se emplearon para las PCRs los mismos cebadores pero sintetizados con fluoróforos: el fluoróforo FAM para los genes miniexón y 24Sα rRNA, y el fluoróforo JOE para el gen 18S rRNA. La secuencia de todos los cebadores empleados se describen en el Anexo 1.

Las cepas de referencias provenientes de cultivo de parásitos, las mismas fueron proveídas por el Departamento de Medicina Tropical del IICS: $X_{10}Cl_1$ para **TcI,** $MNCl_2$ para **TcV,** TU18 para **TcII,** Cl Brener para **TcVI.**

Prueba de sensibilidad

Se llevó a cabo una prueba de sensibilidad para identificar los genotipos de *T. cruzi* por PCR con cebadores miniexón, 24Sα rRNA y 18S rRNA, empleando diluciones de ADN de cultivos de las cepas de referencia**,** $MnCl_2$ y $X_{10}Cl_1$. La concentración de ADN se determinó con el espectofotómetro Bioware DNA (WPA, UK) y para la cuantificación de parásitos se empleó la equivalencia de parásitos descrita previamente, 10^{-6} ng de ADN = 1fentogramo y 200 fentogramo = 1 parásito para estimar la equivalencia de ADN a cantidad de parásitos (60).

3.7.1 Condiciones de amplificación del gen rRNA 24Sα

Los cebadores empleados fueron: D71 y D72, se trabajó con concentraciones finales de reactivos de Buffer 1x, 2mM $MgCl_2$, 0,5 mM dNTPS, cebadores 0,2 uM cada uno, 0,5

uL DMSO y 1U de Taq polimerasa. (Genbiotech- Argentina) en un volumen final de 50uL.

Las condiciones de ciclado ya estaban estandarizadas y se describen en el **Anexo 2**. Los productos amplificados fueron de: 110 pb, 125/130 pb y 120 pb.

3.7.2 Condiciones de amplificación de la región del miniexón

Se emplearon los cebadores TC1-TC2 y TC, se trabajó con concentraciones finales de Buffer 1x, 2mM $MgCl_2$, 0,5 mM dNTPS, cebadores TC1 y TC2 0,05 Um, TC 0,01 uM, 2.5 % DMSO y 1U de Taq polimerasa (Genbiotech- Argentina) en un volumen final de 50uL.

Las condiciones de termociclado ya estaban estandarizadas y se describen en el **Anexo 2.** Los productos amplificados fueron de 350pb y 300pb.

3.7.3 Amplificación del gen rRNA 18Sα

Se emplearon los cebadores V1 y V2, se trabajó con concentraciones finales de reactivos de Buffer 1x, 2mM $MgCl_2$, 0,5 mM dNTPS, cebadores 0,2 uM, 0,5 uL DMSO y 1U de Taq polimerasa (Genbiotech- Argentina en un volumen final de 50uL. Las condiciones de termociclado ya estaban estandarizadas, se describen en el **Anexo 2**. Los productos amplificados fueron: 150pb, 160pb o 165pb.

Todos los productos fueron analizados en geles de agarosa al 3%, teñidos con Bromuro de etidio y visualizados bajo un transiluminador UV.

3.8 Estandarización ABI 310 (Analizador de fragmentos)

3.8.1 Prueba sensibilidad y de especificidad/reproducibilidad con cepas de referencia de *T. cruzi*.

Se utilizaron cepas de referencia X10Cl1 para **TcI**, MNCl2 para **TcV**, TU18 para **TcII**, Cl Brener para **TcVI** (cada cepa correspondiente a un genotipo específico) para determinar la sensibilidad y especificidad de la reacción de PCR con los cebadores marcados con fluoróforos en las corridas del analizador de fragmento ABI 310.

Para determinar la reproducibilidad de la electroforesis capilar se corrieron 2 veces cada muestra y en tiempos diferentes, los productos de reacción por PCR.

Para evaluar la calidad de la detección de los picos en los electroferogramas, se realizaron corridas en el ABI 310 con 1 y 2 uL de productos de PCR, correspondientes a diferentes reacciones de amplificación de las cepas de referencia. En el ABI 310 se analizaron los productos de las PCRs con cebadores marcados con fluoróforos, que recibieron un tratamiento previo que consistió en agregar a cada tubo de reacción: 11,7 uL de

formamida y 0,3 uL de fluoróforo ROX (Marcador), luego se desnaturalizó a 95°C por 4 min y se enfrió a 4°C por 4 min.

La estandarización se hizo con las cepas de referencia, cuyos tamaños de productos de PCR para cada gen y cada cepa eran conocidos. Los valores obtenidos en el electroferograma del ABI 310 para un mismo gen y con cepas diferentes permitió establecer pequeños rangos de valores, tamaños de fragmentos con muy poca diferencia por la sensibilidad del equipo. Luego se corrieron las muestras del biobanco y por último se corrieron las muestras biológicas previamente amplificadas. Se utilizó 2 uL de producto de PCR de cada muestra.

La clasificación de los genotipos de T. cruzi se realizó en base a las tablas 3 y 4 , por combinación de los productos amplificados de los genes ribosomales y miniexón.

Tabla 3: Productos de amplificación esperados con los cebadores 24Sα, 18Sα y miniexón para cada genotipo.

PCR	TCI *	TCII *	TCIII *	TCIV *	TCV *	TCVI *
24Sαr	110	125	110	120	110/125	125
18Sαr	160	165	163	155	165	165
M.E	350	300	250 ó nada	400 ó nada	300	300

* Pares de base **(pb)** **Adaptado de Acosta y col (25)**

Tabla 4: Productos de amplificación esperados con los cebadores 24Sα y Miniexón, linajes y UDTs correspondientes.

ME (pb)	24Sαr (pb)	Linajes	UDTs
350	110	TcI	TCI
Negativo	120/125/130	TcIIa	TCIV
300	125	TcIIb	TCII *
Negativo	110	TcIIc	TCIII
300	110 y débil 125	TcIId	TCV
300	125	TcIIe	TCVI *

Adaptado de Brisse y col (2000 y 2001) (17,18)

***Para los genotipos TCII Y TCIII se podría emplear otros marcadores para la discriminación.**

4 RESULTADOS

4.1 Información epidemiológica obtenida a partir de la base de datos.

Se elaboró una base de datos con los registros proveídos por el Departamento de Entomología del SENEPA, correspondiente a cada vivienda donde fueron capturados los triatominos por funcionarios del SENEPA en etapa de vigilancia entomológica.

Del análisis de la base de datos se obtuvo información epidemiológica sobre la especie de triatomino capturado, el estadío (ninfa/adulto), el sitio de captura (intradomiciliar o peridomiciliar), la procedencia y el número de viviendas infestadas por departamento.

Se trabajó con un total de 759 ejemplares procedentes de los departamentos Concepción, Paraguarí, Cordillera y San Pedro, de la Región Oriental y los dptos, Boquerón, Pte. Hayes y Alto Paraguay de la Región Occidental.

En el dpto. de Concepción se capturaron un total de 638 triatominos de la especie *T. sordida*, de los cuales 43 ejemplares fueron capturados en el intradomicilio y 595 ejemplares en el peridomicilio, de los capturados en el intradomicilio, 8 eran ninfas y 35 eran adultos, de los capturados en el peridomicilio 289 ejemplares eran ninfas y 306 eran adultos. Las viviendas infestadas fueron un total de 240.

Del dpto. de Paraguarí se analizaron 4 ejemplares, 2 de las especie *P. geniculatus*, 1 de la especie *T. guasu* y 1 de la especie *T. guasayana*, de los 4 ejemplares, 2 fueron capturados en el intradomicilio y 2 en el peridomicilio, todos eran adultos. Las viviendas infestadas fueron 2.

En el dpto. de Cordillera se capturaron 3 ejemplares adultos; 2 de la especie *T. guasu* y 1 de la especie *P. geniculatus.* 2 ejemplares fueron capturados en el intradomicilio y 1 ejemplar en el peridomicilio, Las viviendas infestadas fueron 3.

En el dpto. de San Pedro se capturó en una vivienda un ejemplar adulto de la especie *T. guasayana* en el intradomicilio.

En el dpto. de Boquerón se capturaron 14 ejemplares; 13 de la especie *T. guasayana* y 1 se la especie *P. geniculatus,* 2 ejemplares correspondientes al intradomicilio y 12 al peridomicilio. Las viviendas infestadas fueron 14.

En el dpto. de **Presidente Hayes** se capturaron 94 ejemplares, 5 de la especie *T. guasayana* y 89 de la especie *T. sordida*, 9 ejemplares eran del intradomicilio y 85 del peridomicilio. Las viviendas infestadas fueron 26. En el dpto. de **Alto Paraguay** se capturaron 5 ejemplares de 5 viviendas, 2 de las especie *T. guasayana* y 3 de la especie *T. sordida*, todos del peridomicilio. Estos resultados se resumen en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Distribución de los triatominos por departamento según especies, estadío (ninfas o adultos), lugar de captura (intradomicilio/peridomicilio) y número de viviendas infestadas.

			Intradomicilio	**Peridomicilio**	
Departamento	**Viviendas infestadas**	**Especie**	**Nº ejemplares**	**Nº ejemplares**	**Total**
Concepción	240	*T. sordida*	43 (8 N/35 A)	595(289N/306A)	638
Paraguarí	2	*P. geniculatus* *T. guasu* *T. guasayana*	1 A 1 A	1A 1 A	4
Cordillera	3	*T. geniculatus* *T. guasu*	1 A 1 A	 1 A	3
San Pedro	1	*T. guasayana*	1 A		1
Boquerón	14	*P. geniculatus* *T. guasayana*	1 A 1ª	 12 A	14
Pte. Hayes	26	*T. guasayana* *T. sordida*	 9 A	5 A 80 A	94
Alto Paraguay	5	*T. guasayana* *T. sordida*	 3 A	2 A	5
Total	**291**				**759**

A: estadío adulto. N: estadío ninfa.

Tabla elaborada con información proveída por funcionarios del departamento de Entomología del SENEPA

4.2 Detección de *T. cruzi* por la técnica PCR con cebadores especie-específicos. Prueba de sensibilidad

La prueba permitió la detección mínima de hasta 10 parásitos, visualizados con Bromuro de etidio en un transiluminador en un gel de agarosa al 2%. Se aplicó para cada producto de PCR amplificado cuantificado, un valor en cruces de intensidad de bandas visualmente observados equivalente a los parásitos estimados: banda débil (+) 10 parásitos, banda de mediana intensidad (++) 100 parásitos y banda fuerte (+++) por arriba de 100 parásitos. Esta estimación era fundamental para aplicar a los productos de PCR de las muestras biológicas, con el fin de evaluar la factibilidad de poder genotipificar por ser una técnica dependiente de la cantidad de parásitos presentes (óptima cantidad entre 1000 y 5000 parásitos) **Figura 4**.

4.2.1 Detección de infección natural con *T. cruzi* en los triatominos analizados

De 759 ejemplares analizados se logró detectar infección natural con T. cruzi en 17 ejemplares. De los 17 infectados, 12 eran del peridomicilio, 11 de la especie T. sordida y 1 de la especie T. guasayana. En el intradomicilio se detectaron 5 ejemplares infectados naturalmente, todos adultos de las especies: T. sordida (2), P. geniculatus (2) y T. guasayana (1). No se encontraron ninfas infectadas naturalmente en el intradomicilio. Ver **Tabla 6**.

En la **figura 4** se pueden observar tanto los productos obtenidos con controles positivos (cepas de referencia) y su equivalencia en cantidad de parásitos, como así también los productos de amplificación de los ejemplares *T. cruzi* positivos con amplificados de 198 pb obtenidos con los cebadores TCZ1 y TCZ2 y 330 pb obtenidos con los cebadores 121 y 122.

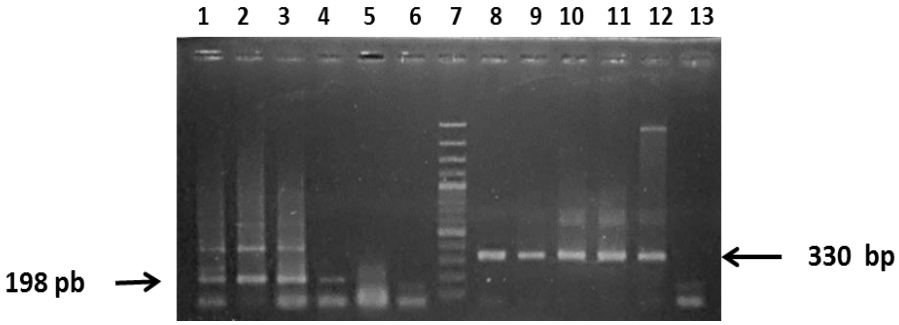

Figura 4: Productos de amplificación por PCR de cepas de referencia de *T. cruzi* y muestras de triatominos con cebadores TCZ1/TCZ2 y 121/122.
Carriles 1 al 6, reacciones de PCR con cebadores TCZ1/TCZ2 con productos de 198 pb y carriles 8 al 13, productos amplificados con cebadores 121,122 con productos de 330 pb. Carril 1 y 2: Control positivo (cepa de referencia $X_{10}Cl_1$) intensidades de bandas correspondientes a 10 y 100 parásitos respectivamente. Carril 3,4: muestras de triatominos con infección natural con *T.* cruzi con intensidades de banda de 100 y 10 parásitos respectivamente. Carril 5: muestra de triatomino sin infección natural con *T. cruzi.* Carril 6: control negativo de reacción (agua). Carril 7: marcador de peso molecular de 100 pb. Carriles 8 y 9 corresponden a controles positivos (cepas de referencia $X_{10}Cl_1$), 100 y 10 parásitos respectivamente. Carriles 10, 11 y 12: correspondientes a ejemplares de triatominos infectados con *T. cruzi* con intensidades de bandas equivalentes a 100 parásitos. Carril 13: control negativo de reacción (agua).

Tabla 6: Infección natural con *T. cruzi* detectada en 17 ejemplares de especies secundarias por sitio de captura y estadío.

Departamento	Especie	Nº Ejemplares capturados	Infección natural con *T. cruzi,* sitio de captura, estadío
Concepción	*T. sordida*	638	9 P (8A/1N) 1 D (A)
Paraguarí	*P. geniculatus* *T. guazú* *T. guasayana*	2 1 1	1 D (A)
Cordillera	*P. geniculatus* *T. guazú*	1 2	1D (A)
San Pedro	*T. guasayana*	1	
Boquerón	*T. guasayana*	14	1D (A)
Pte. Hayes	*T. guasayana* *T. sordida*	5 89	1P (A) 2P (1A/1N) 1D (A)
Alto Paraguay	*T. guasayana* *T. sordida*	2 3	
Total		**759**	**17**

D: intradomiciliar. **P:** peridomiciliar. **A:** adulto. **N:** ninfa

4.3 Identificación de Genotipos de *T. cruzi* por PCR con cebadores miniexón, 24Sα rRNA y 18S*α* rRNA.

Prueba de sensibilidad

Se logró detectar ADN con los cebadores empleados para genotipificar recién a partir de 1000 parásitos y 5000 parásitos. Ver **figura 5**.

4.3.1 Identificación de genotipos de *T. cruzi* en los ejemplares de triatominos con infección natural con *T. cruzi*.

Las 17 muestras de triatominos con infección natural para *T. cruzi* fueron sometidas a las PCRs específicas para identificar genotipos con los cebadores del gen miniexón y de los genes ribosomales 18S rRNA y 24Sα rRNA. En 8 de las 17 muestras de triatominos infectados naturalmente se logró amplificar al menos uno de los tres genes específicos. Esta baja sensibilidad, coincide con la intensidad de las bandas observadas con los cebadores 121/122, donde los 8 muestras presentaron intensidades de bandas moderadas (++) y altas (+++), sin embargo en las 11 restantes se estima que la cantidad de ADN de *T. cruzi* estaba por debajo del límite de detección por ser genes constitutivos (los productos de amplificación de las 11 muestras se visualizaron débiles positivos con los cebadores de especie específico para *T. cruzi*). Teniendo en cuenta que para la genotipificación se requieren productos de amplificación de al menos 2 blancos, fue factible genotipificar *T. cruzi* en tan solo 6 de las 17 muestras positivas iniciales, se emplearon como blancos 2 genes: el gen del miniexón y el gen 24 rSα para la asignación de los genotipos. En la **figura 5** se pueden observar los productos amplificados del gen miniexón con controles (cepas de referencia) y de 3 muestras de triatominos infectados naturalmente con *T. cruzi* que arrojaron productos de amplificación para este gen.

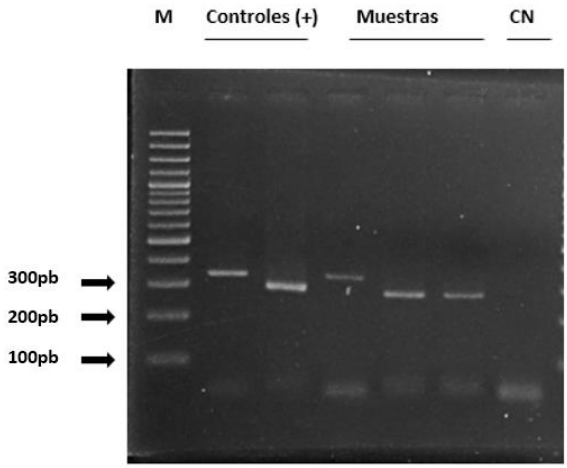

Figura 5: Electroforesis de los productos de amplificación del gen miniexón de cepas de referencia (MNCl2 para TCII y X10CL1 para TCI) y en 3 muestras de triatominos infectados naturalmente con T. cruzi.

Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb. Carril 2: cepa de referencia ($X_{10}Cl_1$) con un producto de 350 pb para Tcl. Carril 3: cepa de referencia ($MNCL_2$), con un producto de 300 pb correspondiente a TcII. Carriles 4,5 y 6: productos de amplificación de muestras de triatominos infectados naturalmente con *T. cruzi* con tamaños de 350 pb (correspondiente al genotipo TCI, carril 4) y 300pb (correspondiente al genotipoTCII, carriles 5,6).Carril 7: control negativo de reacción (agua).

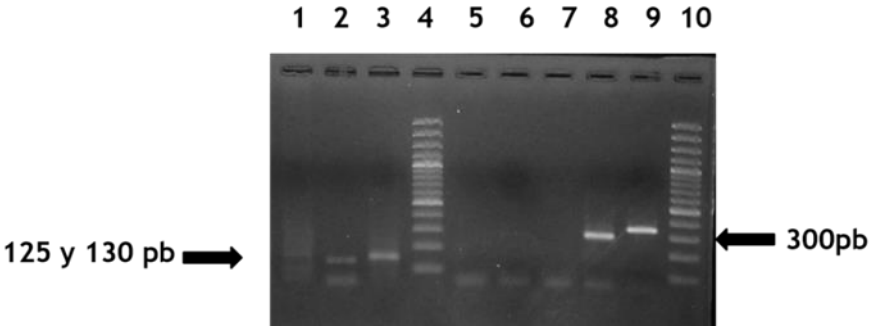

Figura 6: Electroforesis de los productos de amplificación del gen 24rSα y miniexón en muestras de triatominos infectados naturalmente con T. cruzi.

Carril 1: Muestra biológica con una banda débil de 125 pb aproximadamente. Carril 2: Muestra biológica con una banda de 125pb aproximadamente. Carril 3: Muestra Biológica con una banda de aproximadamente 130 pb (Brisse 2000) Carril 4: Marcador de peso molecular de 100pb. Carriles 5, 6, 7: Productos negativos para el gen miniexón. Carril 8 y 9: productos de amplificación de muestras de triatominos infectados naturalmente con T. cruzi con tamaños de 300 pb (correspondiente al linaje TcII, carril 8) y 350pb (correspondiente al linaje TcI, carril 9). Carril 10: Marcador de peso molecular de 100 pb.

4.4 Estandarización ABI 310 (Analizador de fragmentos)

4.4.1 Prueba sensibilidad y de especificidad/reproducibilidad con cepas de referencia de *T. cruzi*

Se obtuvo reproducibilidad para ambos genes con las cepas de referencia, como se puede observar en la **Tabla 7.** Luego de al menos 2 repeticiones en diferentes tiempos y en diferentes corridas.

Si se comparan los tamaños esperados para cada gen y para cada cepa de referencia, por ejemplo 110 y 125, con los tamaños obtenidos en el electroferotipo para cada gen se puede estimar un rango de valores de 102 a 105, para el tamaño esperado de 110 y un valor de 119 en el electroferotipo para un tamaño esperado de 125.

Tabla 7: Reproducibilidad de la marcación y corrida en el ABI 310 con cepas de referencia.

	Tamaños obtenidos		**Tamaños esperados**		
Cepas de referencia	**ME ***	**24rSα ***	**24rSα ***	**ME***	**Genotipo**
$X_{10}CL_1$	333,9/332,83/332,87	105,18/104,99	110	350	TCI
$MNCl_2$	284,8/284,3/285,52	102,59/102,69/ 103,66	110	300	TCV
ClBrener	285,2/285,5/284,9	119,71	125	300	TCVI
TU18	284,3/284,6/284,5	119,66	125	300	TCII

Posteriormente se analizaron muestras biológicas del biobanco, también para la estandarización con el ABI 310. Estas muestras se evaluaron con dos fines, uno fue la factibilidad de obtener tamaños de fragmentos con el equipo ABI310 empleando directamente muestras biológicas (muestras de ADN extraídos a partir de triatominos). ADN de triatominos infectados naturalmente con *T. cruzi*, un total de 9 muestras de ejemplares con productos de PCR fuertes (+++) con cebadores especie específicos 121/122. La otra finalidad era la de estimar también los rangos de tamaño de los electroferotipos para cada gen, teniendo en cuenta que la cantidad de ADN de *T. cruzi* presente en las muestras del biobanco era suficiente para genotipificar en geles de agarosa. Los tamaños de los productos obtenidos con cada gen y visulizados en agarosa se compararaon con los tamaños obtenidos en los electroferotipos. Los tamaños de los productos obtenidos y la genotipificación se detallan en la **tabla 8.**

En la **tabla 8**, se observan los productos obtenidos con el ABI 310 en las 9 muestras de triatominos con infección natural con *T. cruzi* y conservadas en el biobanco. Se asignaron los genotipos correspondientes a cada muestra por combinación de tamaños de productos con los 2 cebadores basándonos en la clasificación de Brisse y col. Fue factible genotipificar 7 de las 9 muestras en el ABI 310. La muestra TCH 217 arrojó un valor en el ABI 310 de un tamaño de fragmento bien claro de 139 pb, sin embargo este valor no se encontraba dentro del rango de tamaño estimado para 125pb, por lo que se repitieron las PCRs en geles de agarosa con controles de tamaños de bandas que permitan esclarecer si se trataba de un producto de PCR de un tamaño de 125 pb, o mayor. Se constató que el producto amplificado correspondía a un tamaño de 130pb, coincidiendo con la clasificación de Brisse y col (13, 14) de genotipo IIa correspondiente a la clasificación actual de TcIV.

4.4.2 Identificación de genotipos en las muestras biológicas de triatominos con infección natural detectados en el estudio

Una vez estandarizada la técnica con las cepas de referencia, se corrieron los productos de las 8 muestras de triatominos positivas para *T. cruzi* detectadas en el estudio que amplificaban con cebadores no marcados, y que presentaban buena intensidad de banda en los geles de agarosa. Estas 8 muestras fueron las seleccionadas para correr con los cebadores marcados en el ABI 310.

De las 8 muestras positivas para *T. cruzi*, tan solo 2 muestras emitieron pico de fluorescencia para la reacción 24Sα con tamaños de 106,24 y 106,26 respectivamente. Estos tamaños de bandas corresponden a 110pb y la no detección del miniexón, permitiría estimar que se trata de 2 muestras del genotipo TcIII.

Debido a que no se tuvo buenos resultados con las muestras del estudio se decidió trabajar con muestras del biobanco del DBMyB del IICS conservadas desde el año 2016 a -20°C, estas muestras eran ADN extraídos del contenido intestinal de triatominos.

La diferencia con las muestras del estudio es que los ejemplares que se utilizaron para la extracción fueron remitidos al IICS pocas semanas posterior a su captura, no así los ejemplares del estudio, ya que estos tardaron meses en ser remitidos al IICS y se desconoce las condiciones de conservación en que fueron mantenidos antes de llegar al IICS.

4.4.3 Pruebas de sensibilidad en el ABI 310, empleando muestras biológicas de triatominos infectados naturalmente conservados en un biobanco.

Con el fin de evaluar la factibilidad de obtener tamaños de fragmentos con el equipo ABI310 empleando directamente muestras biológicas (muestras de ADN extraídos a partir de triatominos) conservados en el biobanco del DBM y B del IICS, a – 20°C conservados desde el año 2016, correspondientes a triatominos infectados naturalmente con *T. cruzi*, se decidió emplear como parte de la estandarización 9 muestras de ejemplares con productos de PCR fuertes (+++) con cebadores especie específicos 121/122.

En la **tabla 8**, se observan los productos obtenidos con el ABI 310 en las 9 muestras de triatominos con infección natural con *T. cruzi* y conservadas en el biobanco. Fue factible genotipificar 7 de las 9 muestras en el ABI 310. La muestra TCH 217 arrojó un valor en el ABI 310 de un tamaño de fragmento bien claro de 139 pb, (tamaño esperado de 125 o 130pb) por lo que se repitieron las PCRs y las electroforesis en geles de agarosa con controles de tamaños de bandas que permitan esclarecer si se trataba de un producto de PCR de un tamaño de 125 pb, o mayor. Se constató que el producto amplificado correspondía a un tamaño de 130pb, coincidiendo con la clasificación de Brisse y col (13, 14) de genotipo IIa correspondiente a la clasificación actual de TcIV.

Tabla 8: Tamaños de bandas obtenidas con el ABI 310, empleando muestras biológicas de triatominos infectados naturalmente conservados en un biobanco.

Tamaños en el ABI 310 Tamaños en gel de agarosa

Muestras	M.E	24rSα	M.E	24rSα	Genotipos (Brisse,2000)
TSSP 34-1	-	110,9	-	110	TcIII (IIc)
TSSP 52-8	-	104,62	-	110	TcIII (IIc)
TSCo27-1	334,1	112,43	350pb	110	TcI (I)
TSP 248	332,2	105,45	350pb	110	TcI (I)
TCH 217	-	139	-	≃ 130	TcIV (IIa)
TCH 228	-	-	-	125	TcIV (IIa)
TCH215-2	-	105,5	-	110	TcIII (IIc)
TCH 217-2	-	-	-	125	TcIV (IIa)
TCH 203	-	110,16	-	110	TcIII (IIc)

La **Tabla 8** nos demuestra que es factible obtener productos amplificados con cebadores marcados y su análisis en el ABI 310 en muestras biológicas y no solo en cultivos de cepas de referencia.

Los valores obtenidos con las cepas de referencia y con las muestras biológicas del biobanco genotipificadas previamente en la electroforesis capilar, permiten establecer un rango de tamaños de fragmentos para cada gen y para cada genotipo con el analizador de fragmentos al comparar los tamaños obtenidos en el ABI 310 y los tamaños esperados de acuerdo al genotipo, para cada cepa estudiada.

No se obtuvo productos con los cebadores de la reacción 18S rRNA.

4.4.4 Genotipos de *T. cruzi* en especies secundarias detectados en triatominos de 7 departamentos de las dos regiones del País. Análisis realizado con productos de PCR en geles de agarosa.

Fue factible genotipificar por técnicas convencionales de PCR/agarosa a 6 muestras de tratominos de las 17 muestras con infección natural detectadas con cebadores especie específicos. En la **Tabla 9**, se describe el genotipo detectado, la localización de la captura, la especie y el estadío. Dos ejemplares de *T. sordida* del dpto. de Concepción estaban infectados naturalmente con el genotipo TcI de *T. cruzi*, de los cuales uno de ellos fue capturado en el intradominicilio y el otro en el peridomicilio. En Concepción también se detectaron ejemplares de *T. sordida* con los genotipos TcIII y TcV en el peridomicilio. Se detectó el genotipo TcIII en un ejemplar de *T. guasayana* capturado en el peridomicilio de una vivienda del dpto. de Pte. Hayes y en un ejemplar de *P. geniculatus* capturado en el intradomicilio de una vivienda del dpto. Cordillera.

Tabla 9: Genotipos de *T. cruzi* en especies secundarias de triatominos detectados en departamentos de las dos regiones del país. Análisis realizado con productos de PCR en geles de agarosa.

		Intradomicilio		Peridomicilio	
Departamento	**Especie**	**Infección Natural con *T. cruzi***	**Genotipos/ Estadío.**	**Infección Natural con *T. cruzi***	**Genotipos/Estadío**
Concepción	***T. sordida***	**1**	**TCI. (A)**	**3**	**TCI. (A)**
					TCIII. (A)
					TCV. (N)
Cordillera	***P. geniculatus***	**1**	**TCIII (A)**	-	-
Pte. Hayes	***T. guasayana***			**1**	**TCIII(A)**

4.4.5 Electroforesis capilar de las muestras biológicas de triatominos con infección natural detectados en el proyecto

Una vez estandarizada la técnica con las cepas de referencia y con las del biobanco, se corrieron los productos de las 8 muestras de triatominos positivas para T. cruzi detectadas en el proyecto que amplificaban con cebadores no marcados, y que presentaban buena intensidad de banda en los geles de agarosa. Estas 8 muestras fueron las seleccionadas para correr con los cebadores marcados en el ABI 310 porque dieron buenos resultados al amplificar los genes especificos y su visualización en geles de agarosa.

Sin embargo, de las 8 muestras positivas para T. cruzi, tan solo 2 muestras emitieron pico de fluorescencia para la reacción 24Sα con tamaños de 106,24 y 106,26 respectivamente. Estos tamaños de bandas se corresponden con el de 110pb y la no detección del miniexón, permitiría estimar que se trata de 2 muestras del genotipo TcIII.

La diferencia entre las muestras del biobanco con las muestras del estudio, es que los ejemplares conservados en el biobanco fueron remitidos al IICS pocas semanas posterior a su captura, no así los ejemplares del estudio, ya que estos tardaron mas de 1 mes en ser remitidos al IICS y se desconoce las condiciones de conservación en que fueron mantenidos antes de llegar al IICS

5 DISCUSIÓN

Un total de 759 ejemplares de triatominos, de las especies *T. sordida, T. guasayana, T. guasu, y P. geniculatus* fueron incluidos en este estudio, todos capturados en el domicilio y/o peridomicilio. En Paraguay, según datos publicados por el SENEPA, se han registrado hasta la fecha la circulación de 8 especies de triatominos; entre las que se encuentran: *T. infestans, T. sordida, T. guasu, T. guasayana, P. geniculatus, P. megistus, T. platensis y Rhodnius sp.* Entre ellas, el *T. infestans* y el *T. sordida* se destacan por su importancia epidemiológica (36).

En la tabla publicada por el Departamento de Entomología del SENEPA (36) se observa la distribución por departamentos de las especies encontradas en el Paraguay. **Ver Anexo 4**. Los 759 ejemplares de triatominos que han sido incluidos en este estudio fueron capturados por funcionarios del SENEPA en fase de vigilancia entomológica en 7 departamentos: Concepción (*T. sordida*), San Pedro (*T. guasayana*), Cordillera (*P.geniculatus y T. guasu*), Paraguarí (*P. geniculatus, T. guasayana y T. guasu*), Alto Paraguay (*T. guasayana y T. sordida*), Pte Hayes (*T. guasayana y T. sordida*) y Boquerón (*T. guasayana*).

Tan solo 17 triatominos (2,2%) de los 759 ejemplares analizados con cebadores especie específico arrojaron positividad para infección natural con *T. cruzi*, de los cuales la mayoría fueron de la especie *T. sordida*, 13/17 (76,4%), 10 del Dpto. Concepción y 3 del Dpto. Pte. Hayes. Este resultado resalta una vez más la importancia del vector *T. sordida* como un vector secundario en Paraguay para la enfermedad de Chagas (6).

Al analizar los hallazgos en el Dpto. de Concepción, cabe resaltar que 638 de los 759 (84%) triatominos totales de este estudio eran ejemplares de *T. sordida* del citado departamento, se observó que 43 ejemplares (8 ninfas y 35 adultos) fueron capturados en el intradomicilio de los cuales resultó positivo 1 ejemplar adulto infectado con *T. cruzi* del genotipo TcI, además de registrarse nuevamente colonización intradomiciliar de esta especie. Los otros 9 ejemplares positivos eran del peridomicilio, de los cuales 8 eran adultos infectados y una ninfa infectada.

En Pte. Hayes también *T. sordida* fue la especie mayoritaria 89 (94,7%) del total de 94 ejemplares, encontrándose 3 ejemplares con infección natural, uno de ellos adulto intradomiciliar y 2 de ellos en el peridomicilio (1 adulto y 1 ninfa). Estos hallazgos resaltan la problemática del peridomicilio con animales mamíferos pequeños, infectados con *T. cruzi* que facilitan la capacidad vectorial de *T. sordida* al invadir y colonizar las viviendas (3).Sin embargo, si se analiza que tan solo 9 (1,4%) de los 638 ejemplares de *T. sordida* evaluados del Dpto. de Concepción y 3 (3,4%) de los 89 ejemplares de *T. sordida* evaluados del Dpto. de Pte. Hayes resultaron infectados naturalmente con *T. cruzi* resulta un porcentaje de infección mucho menor en comparación con trabajos anteriores de nuestro grupo de estudio publicados donde se reportaron hasta un 10,6 % de infección natural con *T. cruzi* en dicha especie en el Dpto. de Concepción y 17,3% en el Chaco Paraguayo (6, 40).

En el año 2018, se han reportado infecciones naturales en la especie *T. sordida* en Paraguarí, Cordillera y San Pedro del 19%, 44% y 20% respectivamente (39).

En los Dptos. Pte. Hayes y Boquerón, se capturaron 5 y 14 ejemplares de la especie *T.. guasayana* respectivamente. En la Región Occidental o Chaco, la especie *T. guasayana* debería ser monitoreada, al detectar infección natural con *T. cruzi* en un ejemplar adulto capturado dentro del domicilio en Boquerón y un ejemplar adulto con *T. cruzi* del genotipo TcIII en el peridomicilio en Pte. Hayes.

En los departamentos de Paraguarí y Cordillera, triatominos adultos capturados dentro del domicilio de la especie *P. geniculatus* estaban infectados naturalmente con *T. cruzi*, uno de ellos presentó el genotipo TcIII.

La presencia de ejemplares con genotipos relacionados al ambiente selvático encontrados en el domicilio pone en evidencia el riesgo de ingreso continuo de especies secundarias. La presencia de estas especies generalmente se da ya que el nicho ecológico de los mismos es invadido y destruido, como consecuencia de las urbanizaciones. Es importante considerar la presencia de especies nativas de focos selváticos en proceso de colonización en la vivienda ya que las mismas son clasificadas como vectores potenciales para la transmisión de la enfermedad de Chagas (3).

Cabe destacar que estas muestras son de especies selváticas, en nuestro país no hay mucho reporte de infección de estos vectores diferentes a *T. sordida*. Existen pocos trabajos en el país que reportan infección natural con *T. cruzi* en triatominos de especies selváticas, y que invaden el domicilio. En un trabajo realizado en huésped y reservorios del Gran Chaco se reportó infección en un ejemplar de *T. guasayana* (41).

En relación a los genotipos de *T. cruzi* detectados con los cebadores del gen miniexón y y 24 Sα rRNA, se resalta que el genotipo TcIII fue detectado en 3 ejemplares, 1 ejemplar del departamento de Concepción capturado en el peridomicilio, 1 ejemplar del departamento de Cordillera de la especie *P. geniculatus* capturado en el domicilio y un ejemplar del departamento de Pte. Hayes de la especie *T. guasayana* capturado en el peridomicilio.

En un trabajo publicado por Acosta y col, en el año 2017 donde se estudiaron los reservorios de *T. cruzi* se reportó que el genotipo TcIII estaba muy asociado con la especie de armadillo, es decir es un genotipo comúnmente encontrado en áreas silvestres. En el mismo trabajo también se reportó mayor asociación del genotipo TcV con el entorno doméstico, sin embargo en éste estudio el genotipo TcV fue detectado en un ejemplar de *T. sordida* (ninfa) del peridomicilio del Dpto. de Concepción (29).

Existen estudios que reportan que la presencia de ciertos genotipos está relacionado con la especie del vector, existiendo factores de la microbiota del vector involucrados en esto y que sugieren que la preferencia de los vectores por un hábitat u otro está relacionado a ciertas condiciones ambientales, por ejemplo la temperatura, esto podría demostrar el movimiento continuo de ciertas especies entre el domicilio y peridomicilio de las viviendas (61).

Es importante conocer los diferentes factores que influyen en la dinámica de transmisión entre el insecto vector y el parásito lo que ayudaría a mejorar el sistema de vigilancia.

En un trabajo realizado en Colombia por Gómez y col en el año 2016, se estudió la importancia de infección en vectores de especie selvática y encontraron predominio del genotipo TcI, así como infección mixta de los genotipos TcII, TcV y TcVI (62).

Los genotipos TcIV y TcIII son comúnmente encontrados y relacionados al entorno selvático. TcV y TcVI están bastante relacionados al entorno doméstico, a TcI se lo relacionaba exclusivamente al entorno selvático pero ahora es común encontrarlo también en el ciclo doméstico (62).

La presencia del genotipo TcIII en las especies selváticas reportadas en el trabajo, nos indica que estos insectos se infectaron posiblemente en su hábitat natural y luego fueron ingresando a las viviendas. Estos insectos eran adultos, lo que no indica colonización, pero su presencia dentro de las viviendas pondría en riesgo una futura adaptación al nicho ecológico que pertenecía al *T. infestans*.

Con el fin de facilitar el análisis del tamaño de los productos de amplificación por PCR de los genes miniexón, 18S rRNA y 24Sα rRNA, cuya combinación de productos define el genotipo de *T. cruzi*, se empleó el analizador de fragmentos ABI 310. La estandarización requirió de cepas de referencia y las que se utilizaron fueron: X10CL1, MNCl2, TU18, CLBrener, cuyos genotipos específicos (clasificados con tamaños de productos de PCR) ya fueron descritos previamente (17,18).

Los electroferotipos obtenidos con las cepas de referencia en reiteradas corridas, permitió demostrar que existía reproducibilidad y posteriormente, se estimaron los rangos para cada gen al comparar los tamaños esperados según publicaciones y los tamaños obtenidos en el ABI 310. Se realizaron varios intentos para identificar los tamaños de fragmentos en el analizador genético de las 6 muestras de triatominos con infección natural con *T. cruzi* demostrada y factibles de genotipificar por tamaño en geles de agarosa al 3%. Sin embargo, no fue posible obtener resultados, por lo que se optó por introducir un grupo de muestras de ADN extraídas de triatominos con infección natural con *T. cruzi* para probar con más cantidad de muestras y así demostrar que sí era posible obtener resultados con muestras biológicas.

Con las muestras del biobanco se obtuvo resultados favorables en el ABI 310, esto podría indicar que probablemente las muestras en estudio no contaban con las condiciones óptimas para ser visualizadas en el equipo, como podría ser el exceso de ADN foráneo.

Es importante mencionar que estas muestras a diferencia de las muestras en estudio, fueron obtenidas de ejemplares remitidos al IICS semanas después de haber sido capturados por funcionarios del SENEPA, por lo que las condiciones de conservación pudo haber favorecido su buena conservación , no así las muestras del estudio que fueron remitidas al IICS muchos meses después y se desconoce las condiciones de conservación en la que se encontraban antes de llegar al IICS donde se procedía al congelamiento a -20ºC hasta su procesamiento.

Esta técnica permitió obtener tamaños exactos de pares de base de cada reacción (miniexón, 24SαrRNA) con las cepas de referencia, y a pesar de que no se logró resultados con las muestras de éste estudio, se pudo obtener resultados con las muestras del biobanco, demostrando que es una técnica útil para identificación de genotipos de *T. cruzi*. Se sugiere probar con más cepas de referencia para obtener un patrón de clasificación de todos los genotipos, así como también aumentar la cantidad de muestras biológicas a ser analizadas en el equipo.

Debido a la baja sensibilidad en la detección de genotipos de *T. cruzi* (6/17) en los ejemplares analizados, fue necesario realizar varias reacciones de PCR con cebadores específicos para especie de *T. cruzi*, se decidió trabajar con mayor volumen de muestra de ADN, de 5ul empleado inicialmente a 10ul, con el objetivo de aumentar la concentración de ADN en 50 ul de reacción de PCR, cuyo rango fue de entre 100 y 500 ng totales de ADN por reacción (previa estandarización que permitió demostrar no inhibición de la reacción por el volumen de muestra biológica en la PCR). Con esa modificación se logró aumentar la intensidad de banda de los productos de PCR con cebadores para identificar *T. cruzi* (121-122), pero no se logró la amplificación con cebadores de genes constitutivos (miniexón, ribosomal) para la determinación de los genotipos.

Se estima que esta baja sensibilidad en la detección de genotipos puede deberse a la baja cantidad de parásitos presentes en las muestras, que a su vez podría deberse, a que los ejemplares no fueron originalmente conservados en las condiciones adecuadas luego de la captura, sumado a que fueron retirados muchos meses después para su disección y conservación en el IICS, reduciendo la sensibilidad de las reacciones de PCR.

Se realizó una clasificación de la intensidad del producto de PCR en gel de agarosa teñido con Bromuro de etidio de las 17 muestras biológicas PCR positivas para especie (cebadores 121/122) previamente a la caracterización de genotipos de *T. cruzi*. Esta clasificación en intensidades positivas: DP, +, ++, y +++; correspondientes a cantidades de parásitos en un rango de 10 a 1000 parásitos fue necesaria para interpretar los resultados de PCR cuando las reacciones se realizaban para genotipificar. Es sabido que la sensibilidad para la detección de los genes conservados 24Sα y miniexón, es de aproximadamente 1000 a 5000 parásitos para ser detectados en muestras biológicas (6).

Siguiendo con esta metodología, se observó productos de amplificación con los genes conservados para genotipificar en 8 de las 17 muestras analizadas, las 9 muestras que no se pudo genotipificar fueron aquellas en las que los productos de amplificación especie específico en gel de agarosa y teñido con Bromuro de etidio resultaron débiles positivos. Se realizaron varias pruebas para lograr obtener una mejor amplificación con cebadores no marcados y luego con cebadores marcados con fluoróforos sin que interfiera en la calidad de los electroferotipos en el ABI310. Finalmente se determinó que los electroferotipos podrían interpretarse con productos de PCR con un volumen de reacción de 20ul que contenga una cantidad de ADN en cada reacción de 7,5ul (concentración máxima de 100ng). Cabe destacar que la corrida en los capilares del ABI 310 y la detección de los fluoróforos es altamente sensible a la cantidad de producto de amplificación que se siembra de cada muestra.

Aun así, se obtuvieron mejores resultados de electroferotipo detectable y cuantificable en muestras biológicas del biobanco con el gen 24rSα, para el Miniexón sólo resultaron 2 muestras positivas,y con productos de la reacción 18rSα no se obtuvieron electroferotipos. Una muestra, codificada TCH 217 arrojó un valor en el electroferotipo con un tamaño de 139pares de base para el gen 24rSα en el Abi 310, y al no coincidir con los tamaños establecidos en la tabla publicada por Acosta y col (19) utilizada como referencia se decidió realizar una corrida en gel al 3% con muestras conocidas de tamaño 125pares de base y se pudo constatar de que se trataba de un tamaño mayor, estimándose que corespondía a un producto de amplificación de 130 pares de base, tamaño esperado según Brisse y col (17,18).

En cuanto a la estandarización del analizador de fragmentos ABI310 se obtuvo reproducibilidad en las cuatro cepas de referencia analizadas, lo que ayudó a definir un patrón de clasificación. En este punto una limitante fue el de no poder contar con más cepas de referencia, ya que eso ayudaría a definir un rango de tamaños de pares de bases para cada genotipo esto es fundamental ya que ayudaría a clasificar a los diferentes genotipos de acuerdo al rango establecido.

No fue posible la amplificación de la reacción 18S rRNA con las cepas de referencia, en casos como estos es necesario el uso de otros marcadores moleculares que permitan discriminar los diferentes genotipos, ya que existen ciertos genotipos como el TcII y TcVI que dan productos del mismo tamaño por lo que no basta sólo dos marcadores para la discriminación de los mismos (17,18). Una de las propuestas para diferenciar éstos genotipos es la implementación de un marcador molecular que permita diferenciar los genotipos TcII y TcVI como por ejemplo los cebadores P3 y P6, que generan productos de 625 pares de bases en las cepas TcVI, pero no en la TcII (18).

Para trabajos futuros se recomienda mantener un flujo de conservación de muestras adecuado desde la captura de los ejemplares hasta el momento de procesamiento, porque es sabido que las condiciones de conservación son factores claves en el momento de trabajar con muestras biológicas, lo que evitaría la degradación o alteración de las mismas a fin de optimizar los resultados finales. También se debe tener en cuenta que el tipo de muestra utilizado involucra la obtención de mucho ADN foráneo, se estima que esto pudo haber afectado la sensibilidad del ABI 310 causando inhibición en ciertos productos.

6 CONCLUSIÓN

Se logró obtener información epidemiológica de las muestras estudiadas, índices de infestación, colonización, especie, lugar de captura (intra/peri) de los ejemplares analizados a partir de una base de datos elaborada con los registros entomológicos provenientes del SENEPA contenidos en las fichas.

Se logró detectar infección natural con *T. cruzi* en 17 de los 759 ejemplares de triatominos analizados por el método PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

En este trabajo se pudo estandarizar el Analizador de Fragmentos ABI 310 para identificación de genotipos de *T. cruzi* por tamaño de fragmentos, con cepas de referencia y con muestras conservadas de un biobanco.

Fue posible detectar 6 genotipos de las 17 muestras positivas para *T. cruzi*, por el método convencional (electroforesis en geles de agarosa).

No fue posible determinar los genotipos de *T. cruzi* en las muestras con el analizador ABI 310, probablemente por baja carga parasitaria o degradación de ADN como consecuencia de las condiciones de conservación de los ejemplares previas al procesamiento de los mismos. Sin embargo se demostró que con cepas de referencia y muestras biológicas de un biobanco fue posible obtener fragmentos de tamaños esperados, lo que indica que el ABI 310 puede ser una técnica útil en el momento de genotipificar *T. cruzi* y es posible su uso para muestras biológicas, por lo que se recomienda para trabajos futuros aumentar la cantidad de muestras infectadas naturalmente con *T. cruzi* para obtener fragmentos con tamaños correspondientes para la asignación de los genotipos.

El ABI es una herramienta práctica, rápida, sensible y específica que lo hace ventajosa en comparación a las electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida, que generalmente son más trabajosas y proporcionan tamaños estimados de los fragmentos obtenidos.

Los datos obtenidos demuestran la importancia de la vigilancia de triatominos y la detección de *T. cruzi* en áreas rurales, donde los ecotopos portan reservorios y vectores capaces de participar en el ciclo de trasmisión de la enfermedad de Chagas. La proximidad entre los seres humanos y los vectores de *T. cruzi* en estos lugares podría contribuir a un mayor riesgo de transmisión de la enfermedad. Cabe señalar que áreas recientemente deforestadas para viviendas, antes pensadas para reducir el riesgo de esta enfermedad, pueden presentar un nuevo riesgo epidemiológico. El ciclo de transmisión está presente y activo, con una alta posibilidad de transmisión de enfermedades a animales y humanos.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- OPS/OMS | Enfermedad de Chagas en las Américas: una revisión de la situación actual de salud pública y su visión para el futuro. Informe: Conclusiones y recomendaciones; 2018 - Organización Panamericana de la Salud [Internet]. 2018. Disponible en: https://www.paho.org/es/documentos/enfermedad-chagas-americas-revision-situacion-actual-salud-publica-su-vision-para-futuro

2- OPS/OMS | Centro de prensa: Enfermedad de Chagas [Internet]. 2018. Disponible en: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=7837:2012-media-center-chagas-disease&Itemid=39693&lang=es

3- González-Brítez N. Dinámica poblacional de triatominos (Hemiptera- Reduviidae) relacionados con la transmisión de *Trypanosoma cruzi* en Paraguay , con énfasis en *Triatoma sordida*. Memorias del Inst Investig en Ciencias la Salud. 2013;11(2):105–11.

4- Silveira A C, Rojas de Arias A, Segura E, Guillén G, Russomando G, Shenone H, et al. El control de la enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur de América.Historia de una Iniciativa Internacional.OPAS,Universidade Federal do Triangulo Mineiro, Uberaba: 2002.306

5- Pereira Á, Pérez M. Tripanosomosis. Enfermedad de Chagas y enfermedad del sueño. OFFARM; 22(2):104–11. 2003

6- Sánchez, Z., Russomando, G. and Guillén, R.Enfermedad de Chagas: estudio de un vector secundario. Editorial Académica Española. Lap Lambert Academic Publishing GmbH & Co. KG., Saabrucken, Alemania, pp. 1–100. 2012.

7- Díaz ML. González CI. Enfermedad de Chagas agudo: transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* como una vía de transmisión re-emergente. rev.univ.ind.santander.salud 2014; 46(2): 177-188.

8- Moreno Elio A, Quintero Arelis C, Alarcón Marítza E, Lugo de Yarbuh Ana, Moreno Stelliana C, Araujo A Sonia et al . Investigaciones sobre la transmisión vertical de Trypanosoma cruzi en ratas Wistar crónicamente infectadas. Bol Mal Salud Amb Dic; 46(2): 2006;149-160.

9- Wainszelbaum M. Trypanosoma cruzi : Mecanismos reguladores de la metaciclogénesis Universidad de Buenos Aires Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Trypanosoma cruzi : Mecanismos reguladores de la metaciclogénesis. Univ Granada. 2012;185.

10- Díaz Martha Lucía, Torres Rodrigo, González Clara Isabel. Expresión diferencial entre estadios de *Trypanosoma cruzi I* en el aislamiento de un paciente con cardiomiopatía chagásica crónica de zona endémica de Santander, Colombia. Biomédica [Internet]. 2011 ; 31(4): 503-513

11- Macchiaverna NP. El rol de los humanos en la transmisión del Trypanosoma cruzi en un área rural del Chaco Argentino desde un enfoque epidemiológico molecular. 2018.

12- Buscaglia CA, Di Noia JM. Trypanosoma cruzi clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. Microbes Infect. 2003 Apr; 5(5):419-27.

13- Zeledón, R. Epidemiología, modos de transmisión y reservorios de la enfermedad de Chagas. En el Simposio 20 de la Fundación Ciba - Tripanosomiasis y leishmaniasis (con especial referencia a la enfermedad de Chagas) (eds K. Elliott, M. O'Connor y GEW Wolstenholme). 1974.

14- Centers for disease control and prevention. Parasite image library. Trypanosomiasis American. [Internet]. 2007.

15- Miles, M. Further enzimic characters of Trypanosoma cruzi in the first autochtonous patients with Chagas` disease in Amazonian Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1980. 74: 221-237.

16- Corrales, A. T.Detección y Genotipificación de *Trypanosoma cruzi* en insectos vectores silvestres del género Mepraia. Anales de La Universidad de Chile.2001

17- Brisse S, Verchoef J, Tibayrenc M. Characterisation of Large and Small subunit rRNA and mini-exón genes further supports the distinction of six Tripanosoma cruzi lineages. Int. J Parasitol. 2000;(31): 1218-26.

18- Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six Trypanosoma cruzi lineages. Int J Parasitol. 2001;31(11):1218-26.

19- Tibayranc M.Genetic epidemiology of parasitic protozoa and infectious agents; the need for an integrated approach.Int J Parasitol.1998;(28)85-104.

20- Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM et al. The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol. 2012; 12(2):240-53.

21- Padilla CP, Alvarado U, Ventura G, Luna-caipo D, Suárez M. y col Detección de unidades discretas de tipificación de *Trypanosoma cruzi* en triatominos recolectados en diferentes regiones naturales de Perú. Biomédica.2017;37.

22- Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sanchez H, Adamson S, Miles GA et al. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. Int J Parasitol. 2005; 35(2):225-33.

23- Miles, M. A., Llewellyn, M. S., Lewis, M. D., Yeo, M., Baleela, R., Fitzpatrick, S., Gaunt, M. W. and Mauricio, I. L.. The molecular epidemiology and phylogeography of Trypanosoma cruzi and parallel research on Leishmania: looking back and to the future. Parasitology 2009;136, 1509–1528

24- Barnabé C, Brisse S, Tibayrenc M. Population structure and genetic typing of Trypanosoma cruzi, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. Parasitology. 2000 ;120:513-26.

25- Carrasco HJ, Segovia M, Llewellyn MS, Morocoima A, Urdaneta-Morales S, Martínez C, Martínez CE, Garcia C, Rodríguez M, Espinosa R, de Noya BA, Díaz-Bello Z, Herrera L, Fitzpatrick S, Yeo M, Miles MA, Feliciangeli MD. Geographical distribution of Trypanosoma cruzi genotypes in Venezuela. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(6):e1707.

26- Del Puerto, F., Sánchez, Z., Nara, E., Meza, G., Paredes, B., Ferreira, E. and Russomando, G.. Trypanosoma cruzi lineages detected in congenitally infected infants and Triatoma infestans from the same disease-endemic region under entomologic surveillance in Paraguay. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.2010;82, 386–390.

27- Bontempi, I.A., Bizai, M.L., Ortiz, S., Manattini, S., Fabbro, D., Solari, A., Diez, C., Simple methodology to directly genotype Trypanosoma cruzi discrete typing units in single and mixed infections from human blood samples. Infect. Genet. Evol. 2016. 43, 123–129.

28- Bua J, Volta BJ, Perrone AE, Scollo K, Velázquez EB, Ruiz AM, De Rissio AM, Cardoni RL. How to improve the early diagnosis of Trypanosoma cruzi infection: relationship between validated conventional diagnosis and quantitative DNA amplification in congenitally infected children. PLoS Negl Trop Dis. 2013 Oct 17;7(10):e2476.

29- Acosta N, López E, Lewis MD, Llewellyn MS, Gómez A, Román F, et al. Hosts and vectors of Trypanosoma cruzi discrete typing units in the Chagas disease endemic region of the Paraguayan Chaco. Parasitology. 2017;144(7):884–98.

30- Acosta N, López E. Cepas de Trypanosoma cruzi en el Paraguay Trypanosoma cruzi strains in Paraguay. Mem Inst Investig Cienc Salud. 2013;9(2):78–89.

31- Garcia IE, Lima MR, Marinho CR, Kipnis TL, Furtado GC, Alvarez JM. Role of membrane-bound IgM in Trypanosoma cruzi evasion from immune clearance. J Parasitol. PMID: 9105302.,Medone.1997.

32- Organización Panamericana de la Salud. Taller del Cono Sur sobre la enfermedad de Chagas. Conceptualización de la vigilancia epidemiológica. Bs As. Argentina. 2003

33- Schofield, C. J.Triatominae. Biología y Control. Zeneca Public Health. p 71. 1994

34- Valente V de C. Potential for domestication of Panstrongylus geniculatus (Latreille, 1811) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in the municipality of Muana, Marajo Island, State of Para, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94(Suppl.1).1999:399-400.

35- Vivas M RJ. Establecimiento de colonias de Panstrongylus geniculatus en laboratorio para el estudio del efecto de variables climáticas sobre su ciclo de vida. 2017;87(1,2):149–200.

36- Tesãi ha teko porãve Salud Pública y Bienestar Social. Pdf. Motenondeha de Ministerio 2017.

37- Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. SENEPAChagas - Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo[Internet].2012

38- González N, Gurtler R, Rojas de Arias A, De Marco R, Cousiño B. Feeding sources of domestic triatomines (*Hemiptera-Reduviidae*) in a endemic locality for Chagas disease. Mem IICS Annual Reports. 1997.

39- Sánchez Z, Russomando G, Pineda D, Guillén L, Paredes B, Villalba de Feltes C. *Triatoma sordida*: indicadores de adaptación y transmisión de *Trypanosoma cruzi* en intradomicilio del Chaco Paraguayo. Mem Inst Investig Cienc Salud 2016; 14(3):96-101.

40- Sánchez Z, Russomando G, Pineda D, Guillén L, Paredes B. Fuente de alimentación de ejemplares de *Triatoma sordida* en un área con alto riesgo de domiciliación en el Chaco Paraguayo. 2018; 16(1):78–83

41- Sánchez Z, Pineda D, Guillén L, Paredes B, Russomando G. *Triatoma sordida* en viviendas de áreas rurales del Paraguay: Infección natural con Trypanosoma cruzi y Fuente de alimentación. XI. Congreso Paraguayo de Infectología. Asunción- Paraguay 2017.

42- Guzmán Marín E del, Zavala Castro J, Acosta Viana K, Rosado Barrera M. Importancia de la caracterización de cepas de Trypanosoma cruzi. Rev Biomédica. 1999;10(3):177–84.

43- Miles, M. A., Póvoa, M. M., De Souza, A. A., Lainson, R., Shaw, J. J. and Ketteridge, D. S.. Chagas's disease in the Amazon Basin: the distribution of Trypanosoma cruzi zymodemes 1 and 3 in Pará State, north Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1981; 75, 667–674

44- Morel CM, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of Trypanosoma cruzi can be characterized by pattern of restriction endonucleases products of kinetoplast minicircles. Proc Natl Acad Sci (USA).1980; 77: 6810-6814

45- Dietrich P, Dussan Mdel P, Floeter-Winter LM, Affonso MH, Camargo EP, Soares MB. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal gene spacers of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma conorhini. Mol Biochem Parasitol. 1990;42(1):13-9.

46- Zavala-Castro JE, Velazco-Castrejón O, Hernández R. Molecular characterization of mexican stocks of Trypanosoma cruzi using total DNA. Am J Trop Med Hyg 1992; 47:201-9.

47- Souto PR., Fernández O., Macedo AM., Campbell DA., and Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of Trypanosoma cruzi. Molecular and Biochemical Parasitology.1996; 83:141-152.

48- Fernández O, Souto R, Castro JA, Borges J, Carrara N, Junqueira CV, et al. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. Am J Trop Med Hyg. 1998; 58(6):807-11.

49- Kawashita, S. Y., Sanson, G. F., Fernandes, O., Zingales, B. and Briones, M. R.. Maximum-likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of Trypanosoma cruzi intraspecific evolution. Molecular Biology and Evolution 2001;18, 2250–2259.

50- Miles, M. Further enzimic characters of Trypanosoma cruzi in the first autochtonous patients with Chagas` disease in Amazonian Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1980. 74: 221-237.

51- Tibayrenc, M., Neubauer, K., Barnabé, C., Guerrini, F., Skarecki, D. & Ayala, F.J. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity of random-primer DNA typing and multilocus isoenzyme electrophoresis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 1993;1335-1339.

52- Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O et al. new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104(7):1051-4.

53- Magaña Jonathan J, Arenas-Sordo María de la Luz, Gómez Rocío. La electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico. Rev. méd. Chile [Internet]. 2009 ; 137(7):946956.

54- Vratislav K, Joseph K, Edgar AA. Capillary Electrophoresis in Bioanalysis. Anal Chem. 2008;80(12):4533–50.

55- Lin MT, Rich RG, Shipley RF, Hafez MJ, Tseng LH, Murphy KM, et al. A molecular fraction collecting tool for the ABI 310 automated sequencer. J Mol Diagnostics [Internet]. 2007;9(5):598-603

56- Lent H, Wygodzinsky P. Revision of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), and the other significanse as vectors of Chagas disease. Bull Am Mus Nat Hist 1979; 163: 123-27.

57- Russomando G,Rojas de Arias A, Almirón M,Figueredo A,Ferreira ME,Moria K.Trypanosoma cruzi:Polimerase Chain Reaction-Based Detection in Dried Feces of Triatoma infestans.Exp.Parasitol.1996;(83):62-66

58- Sambrook J, Fritsh E, Maniati T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Sping Harbor Laboratory Press. New York E.U.A 1994.31.

59- Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1989; (7): 1477-82.

60- Leal JSS. Condición parasitológica de individuos con enfermedad de chagas crónica evaluados en condiciones de pre y posterapia con nifurtimox. 2012. 2012;93.

61- De Fuentes-Vicente JA, Gutiérrez-Cabrera AE, Flores-Villegas AL, Lowenberger C, Benelli G, Salazar-Schettino PM, et al. What makes an effective Chagas disease vector Factors underlying Trypanosoma cruzi-triatomine interactions. Acta Trop [Internet]. 2018;183:23–31.

62- Gómez, S., Torres, F., Díaz, M., González, J., & González Rugeles, C.. Relevancia de la infección natural por Trypanosoma cruzi en triatominos selváticos provenientes de seis municipios de Santander, Colombia. Revista Facultad de Ciencias de la Salud UDES, 2016; 3(1. S1), 37

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1.

Tabla 10: Secuencias de cebadores empleados en el trabajo de tesis.

Nombre	Secuencia	Autores
TCZ1	CGAGCTCTTGCCCACACGGGTGCT	Moser y col 1989
TCZ 2	CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG	
121	AAATAATGTACGGGGGAGATGCAT GA	Degrave y col
122	GTT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA	
D71	AGGTGCGTCGACAGTGTGG	Souto y col 1993/6
D72	TTTTCAGATGGCCGAACAGT	
TC1	GTGTCCGCCACCTCCTTCGGGCC	Fernández y col 1998
TC2	CCTGCAGGCACACGTGTGTGTG	
TC	CCCCCCTCCCAGGCCACACTG	
V1	CAA GCG GCT GGG TGG TTA TTC CA	Clark y Pung, 1994
V2	TTG AGG GAA GGC ATG ACA CAT GT	

Tabla 11: Secuencias de cebadores marcados con fluoróforos empleados con el analizador de fragmentos ABI 310.

MiniExón	**FAM λ_{max} 522nm**
Primer forward TC1	GTGTCCGCCACCTCCTTCGGGCC
Primer forward TC2	CCTGCAGGCACACGTGTGTGTG
TC Primer reverse	**FAM-**CCCCCCTCCCAGGCCACACTG
Ribosomal 24Sα	**FAM λ_{max} 522nm**
Primer forward	**FAM-** AAGGTGCGTCGACAGTGTGGTTTTCAGAATGGCCGAACAGT
Primer reverse	TTTTCAGAATGGCCGAACAGT
Ribosomal 18 Sα	**λ_{max} JOE 554nm**
Primer forward	**JOE-**CAAGCGGCTGGGTGGTTATTCCA
Primer reverse	TTGAGGGAAGGCATGACACATGT

8.2 Anexo 2: Programas de ciclados para las reacciones de PCR realizados en el trabajo de tesis.

Tabla 12: Amplificación de ADN nuclear.

Proceso	Temperatura °C/Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	**94°C/5 min.**	**35**
Desnaturalización	**94°C/1 min**	
Alineamiento	**64°C/30 min**	
Extención	**72°C/1min**	
Extensión Final	**72°C/1 min**	

Tabla 13: Amplificación de ADN Kinetoplastídico.

Proceso	Temperatura °C/Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	**95°C/5 min.**	**40**
Desnaturalización	**94°C/1 min**	
Alineamiento	**64°C/30 min**	
Extención	**72°C/1min**	
Extensión Final	**72°C/5 min**	

Tabla 14: Amplificación de la región del miniexón.

Proceso	**Temperatura °C/Tiempo**	**Ciclos**
Desnaturalización Inicial	**94°C/1min.**	**40**
Desnaturalización	**94°C/30seh**	
Alineamiento	**65°C/30 seg**	
Extención	**72°C/30 seg**	
Extensión Final	**72°C/10 min**	

Tabla 15: Amplificación de la región del 24rSα y 18rSα.

Proceso	**Temperatura °C/Tiempo**	**Ciclos**
Desnaturalización Inicial	**94°C/4 min.**	**45**
Desnaturalización	**94°C/1 min**	
Alineamiento	**60°C/1 min**	
Extención	**72°C/1min**	
Extensión Final	**72°C/10 min**	

8.3 Anexo 3:

Tabla 16: Equivalencia en distintas unidades de masa de ADN de T. cruzi para una determinada concentración de parásitos.

Concentración *T. cruzi*	Número de parásitos	ADN de *T. cruzi* en femtogramos (fg)	ADN de *T. cruzi* en nanogramos (ng)
1×10^{6}	1.000.000	200.000.000 fg	200 ng
1×10^{5}	100.000	20.000.000 fg	20 ng
1×10^{4}	10.000	2.000.000 fg	2 ng
1×10^{3}	1.000	200.000 fg	0,2 ng
1×10^{2}	100	20.000 fg	0,02 ng
1×10^{1}	10	2.000 fg	0,002 ng
1×10^{0}	1	200 fg	0,0002 ng
1×10^{-1}	0.1	20 fg	0,00002 ng
1×10^{-2}	0.01	2 fg	0,000002 ng
1×10^{-3}	0.001	0.2 fg	0,0000002 ng

Adaptado de Kooy y col(60).

8.4 Anexo 4. Electroferogramas

Electroferogramas del ABI 310 con la reacción: **A**) MiniExón. Producto de amplificación con cebadores TC2 y TC, de la cepa de referencia MNCL2 y **B)** 24rSα producto de amplificación con los cebadores D71 y D72, de la cepa de referencia ClBrener. **C)** 24rSα producto de amplificación con los cebadores D71 y D72, de una muestra del Biobanco.

A)

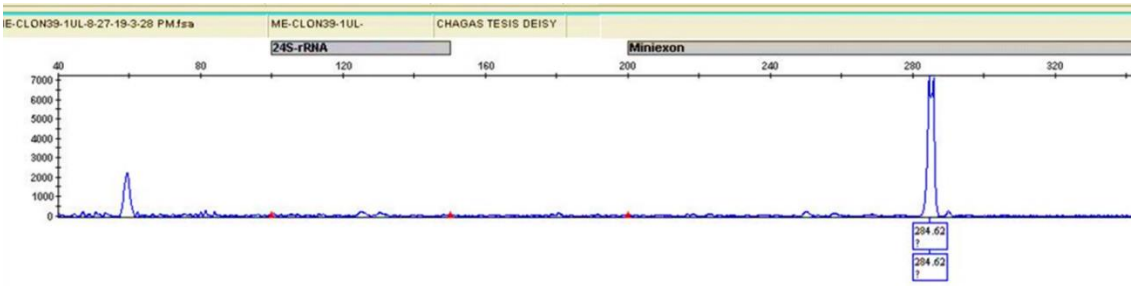

Figura 7: Electroferograma. MiniExón. Producto de amplificación con cebadores TC2 y TC, de la cepa de referencia MNCL2.

B)

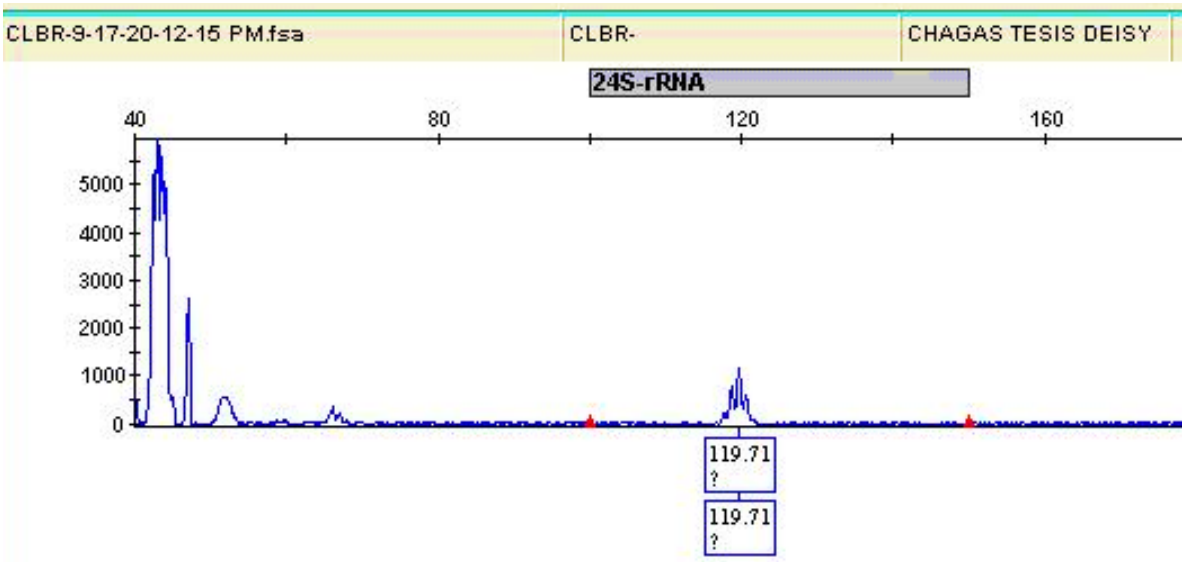

Figura 8: Electroferograma. 24rSα producto de amplificación con los cebadores D71 y D72, de la cepa de referencia ClBrener**.**

C)

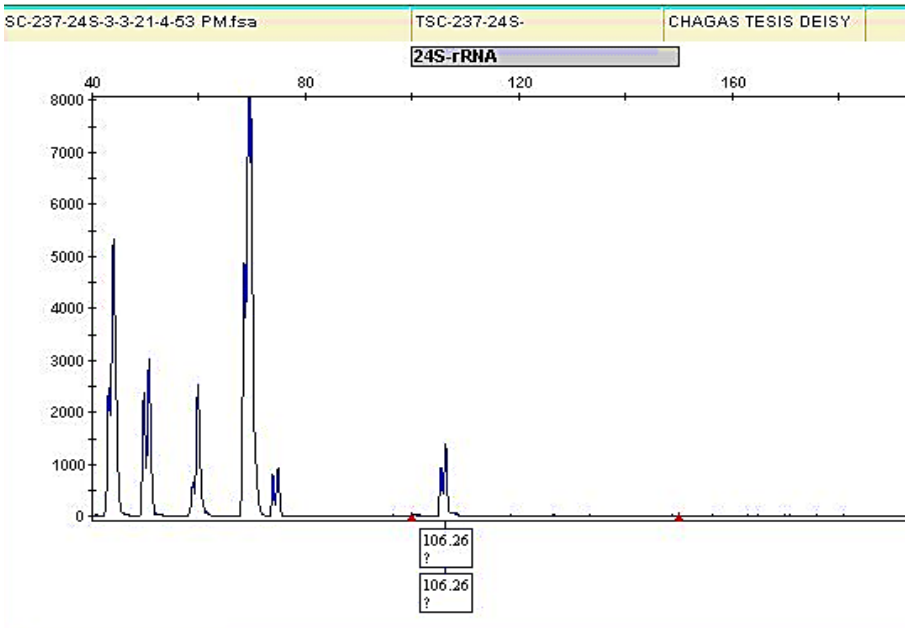

Figura 9: Electroferograma. 24rSα producto de amplificación con los cebadores D71 y D72, de una muestra del Biobanco**.**

8.5 Anexo 5:

Tabla 17: Distribución de especies de Triatominos en el Paraguay por Departamentos.

DEPARTAMENTOS	*T. infestans*	*T.sordida*	*T.guasu*	*T.guasayana*	*P.geniculatus*	*T. platensis*	*Rhodnius sp.*	*P.megistus*
CONCEPCION								
SAN PEDRO								
CORDILLERA								
GUAIRA								
CAAGUAZU								
CAAZAPA								
ITAPUA								
MISIONES								
PARAGUARI								
ALTO PARANA								
ÑEEMBUCU								
AMAMBAY								
PTE. HAYES								
BOQUERON								
ALTO PARAGUAY								

Fuente: Departamento de Entomología -SENEPA