

INS -PRT CENAN. Las observaciones para detectar los problemas sanitarios nutricionales se realizaron en las operaciones preliminares y definitivas de preparación y en la forma de servir las raciones. Las observaciones fueron dirigidas a los aspectos de inocuidad pero referido a la calidad nutricional. Se empleó programa estadístico SPSS versión 15.0

Resultados

En 45% del total de los establecimientos evaluados se observó que el personal que prepara los alimentos carece de control médico vigente; 30,2% de los establecimientos no poseen pisos fáciles de limpiar y se observa grietas y perforaciones. El 15,4% de los establecimientos no tienen espacio suficiente para la preparación de los alimentos, 13,0% de los establecimientos tienen plagas de insectos o presencia de animales domésticos, 10,6% de los establecimientos no poseen equipos de limpieza y 8,4% de los establecimientos evaluados no tienen personal capacitado en buenas prácticas de higiene y manipulación de alimentos.

Conclusiones

- Existen condiciones poco adecuadas en los establecimientos en donde se preparan los alimentos de programas de asistencia alimentaria.
- El personal manipulador de los establecimientos carece de capacitación en buenas prácticas de preparación de alimentos.
- El personal manipulador de los establecimientos no realiza un control de su salud permanente.

ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Silvia Seraylán Ormachea³, Carlos Padilla Rojas⁴

Introducción

En la actualidad se sabe que el protozoo *Trypanosoma cruzi*, causante de la tripanosomiasis, deriva de múltiples linajes clonales y muestran una amplia diversidad genética como resultado de una propagación con poco o ningún intercambio genético.

En estudios previos de genética de población del parásito, empleando diferentes aproximaciones como la determinación de zimodemos, esquizodemos y otras técnicas moleculares que mostraban una amplia variabilidad genética, sin embargo, no correlacionaban con diferencias en el comportamiento infectivo y otras características biológicas del parásito.

Objetivo

Estandarizar la amplificación por PCR de las secuencias de ADN de *Trypanosoma cruzi* del gen 24S □ del RNA ribosomal (con amplificación de 125 y 110 pb) y del gen de la región intergénica del mini exón, (con amplificación 300 y 350 pb) para los linajes 1 y 2 respectivamente, con el objetivo de establecer la posible existencia de linajes diferentes de *Trypanosoma cruzi* en las regiones geográficas del sur y norte de nuestro país.

Material y Métodos

Se empleó *stocks* de cepas criopreservadas de *Trypanosoma cruzi* mantenidas en el Laboratorio de Reactivos de Diagnóstico; una de la región

3 Centro Nacional de Productos Biológicos

4 Centro Nacional de Salud Pública

sur (Arequipa) y la otra cepa 5110 de la región nororiental (San Martín), ambas aisladas de vectores. Se empleó como controles, las cepas referenciales de *Trypanosoma cruzi* Tulahuen y la cepa "Y", cada una de ellas perteneciente a un linaje determinado.

Cultivo del parásito y extracción del DNA

Los epimastigotes del *stock* de cepas de *Trypanosoma cruzi* se cultivaron en medio LIT suplementado con 15% de suero fetal bovino a 28 °C por dos semanas. Los parásitos se colectaron cerca de la mitad de la fase logarítmica de crecimiento.

La extracción del DNA se realizó empleando las indicaciones del protocolo del fabricante del kit de extracción "Extract-N- Amp Tissue Pcr Kit" de acuerdo con el siguiente protocolo:

- Resuspender 100 uL del cultivo de cada una de las cepas (Arequipa, Norte y Tulahuen) en 1000 uL del medio LIT en microviales de 2000 uL.
- Centrifugar a 8000 rpm por 15 minutos. Descartar el sobrenadante.
- Resuspender cada *pellet* en 200 uL de solución de extracción del kit (*Extraction solution*).
- Incubar a temperatura ambiente por diez minutos. La resuspensión se hace por pipeteo hasta conseguir una completa homogeneización. Incubar a 95 °C en baño maría por tres minutos.
- Adicionar a cada microvial 200 uL de solución neutralizante del kit (*neutralizing solution B*).
- Mezclar con *vortex* por cinco minutos. Guardar el DNA extraído a 4 °C.

Para verificar la extracción del DNA se corrió las muestras en un gel de agarosa al 1% con un voltaje de 80 voltios por 20 minutos. Para visualizar el DNA extraído se sumergió el gel en una solución de bromuro de etidio de 10 µg/mL

por ocho minutos y se visualizó las bandas en un transiluminador.

Amplificación por PCR de la región intergénica del Mini-exon

Se empleó tres oligonucleótidos como *primers*. Como *primers upstream* se usó dos oligonucleótidos derivados de una región hipervariable:

TC1:5'- GTGTCCGCCACCTCCTTCGGGCC-3';
TC2:5'-CCTGCAGGCACACGTGTGTGTG-3'
y un primer *dowstream* común, correspondiente a secuencias presentes en ambos linajes de *Trypanosoma cruzi*: TC : 5'-CCCCCCTCCCA-GGCCACACTG-3'

Amplificación del gen de RNA Ribosomal

La amplificación del gen 24S α del RNA ribosomal se realizó con dos *primers*:

D71-5'AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-3'
D72-5'-TTTTCAGAATGGCCGAACAGT-3', de acuerdo con los protocolos descritos por Souto (1993).

Los productos amplificados se analizaron en una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV. Las muestras analizadas se clasificaron como *Trypanosoma cruzi* de linaje 1 (amplificación de fragmentos de DNA de 125 pb) y linaje 2 (amplificación de fragmentos de DNA de 110 pb)

Resultados

Se realizó amplificación por PCR de un dominio divergente del gen 24S α del RNA ribosomal empleando los primer D71 y D72, con 50 pM de cada uno de los primer y 50 ng de DNA genómico.

Se obtuvo los siguientes resultados en geles de poliacrilamida al 10% (tabla 1). La segunda aproximación para caracterizar las cepas en

Tabla 1. Clasificación de cepas en sus linajes correspondientes según el marcador del gen del RNA ribosomal.

Cepa de <i>Tripanosoma cruzi</i>	Amplificación del Gen del RNA ribosomal	Linaje
Cepa Arequipa	Banda de 110 pb	2
Cepa 5110 (norte)	Banda de 125 pb	1
Cepa Y	Banda de 125 pb	1
Cepa Tulahuen	Banda de 110 pb	2

estudio fue la amplificación por PCR de una región intergénica del miniexón, para lo cual se procedió a realizar la estandarización de la reacción mediante una curva de magnesio, diluciones del DNA y concentración de *primers*.

Las condiciones para amplificar el segmento de DNA de 350 pb empleando los primer Tc-Tc2 fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial a 95 °C por cinco minutos, 35 ciclos de amplificación con el siguiente esquema: 95 °C por 30", 57,8 °C por 30" y 72 °C por 30". Adicionalmente, una extensión final de 72 °C por cinco minutos. La concentración de cloruro de magnesio fue de 2 mM, 25 pM de cada uno de los *primers* y 25 ng de concentración de DNA genómico. Con este par de *primers* se pudo amplificar un segmento de DNA de las cepas Arequipa y Tulahuen y no de la cepa 5110 (norte) ni de la cepa Y.

Discusión

Sin duda, una de las áreas de investigación en la enfermedad de Chagas, ha sido el correlacionar marcadores moleculares con aspectos

epidemiológicos de la enfermedad, debido a que diversos aislamientos de *Tripanosoma cruzi* muestran un amplio rango de hospederos, inducen distintas manifestaciones clínicas en pacientes y muestran gran diversidad en las características biológicas y bioquímicas del parásito.

Algunos autores han encontrado que existe una secuencia de aproximadamente 100 pb localizada en el extremo 3' del gen 24S α del RNA ribosomal, de 16 cepas de *Tripanosoma cruzi* los cuales presentan dimorfismo que dividen a las cepas en dos grupos (1) a diferencia de otros (2) que encontraron una alta variabilidad entre las cepas de *Tripanosoma cruzi*.

Al respecto, (3) se analizó 88 aislamientos del parásito derivados de personas infectadas, insectos o animales del ciclo selvático originarios de Brasil, Bolivia, Chile, Venezuela y Argentina se incluyó, además, diez zimodemos de los grupos de cepas más representativos identificados por Tibayrenc (1988), en donde se agrupó a todas estas cepas en dos grupos. Adicionalmente, describieron dimorfismo en las cepas de *Tripanosoma cruzi* en el gen

Tabla 2. Clasificación de las cepas de *Tripanosoma cruzi* en sus linajes correspondientes

Cepa de <i>T. cruzi</i>	RNA ribosomal	Miniexón	Linaje
Cepa Arequipa	110 pb	350 pb (TC-TC2)	2
Cepa 5110 (Norte)	125 pb		1
Cepa Tulahuen	110 pb	350 pb(TC-TC2)	2
Cepa Y	125 pb		1

de la región intergénica del miniexón que correlacionaban con los genotipos del gen del RNA ribosomal.

Actualmente, diversos laboratorios están involucrados en determinar la relevancia de los dos linajes del parásito y sus subgrupos con respecto a las características epidemiológicas y biológicas de *Trypanosoma cruzi*. La aplicación de este modelo de dimorfismo en dos linajes, ha permitido que la enfermedad de Chagas no se considere como una sola entidad de enfermedad.

En ese sentido, con el presente trabajo se ha iniciado un estudio preliminar de tipificación molecular de los stocks de cepas de *Trypanosoma cruzi* criopreservadas mantenidas en el laboratorio, y que fueron analizadas para verificar un posible dimorfismo en el gen del RNA ribosomal y en el gen de la región intergénica del miniexón. De acuerdo con nuestros resultados para el primer marcador molecular se pudo determinar que la cepa Arequipa amplifica un segmento de DNA de 110 pb y para el segundo marcador un segmento de 350 pb, con lo cual podemos afirmar que esta cepa corresponde al linaje 2. En el caso de la cepa 5110 (norte) para el primer marcador amplificó un segmento de DNA de 125 pb que es compatible con el linaje 1.

Se sabe que la cepa Arequipa pertenece al ciclo doméstico, puesto que comparte un mismo nicho ecológico con el ser humano en tanto que la cepa norte está más asociada al ciclo selvático. Evidentemente es muy prematuro con estos resultados preliminares sacar algún tipo de conclusión válida en cuanto a posibles asociaciones de un determinado linaje con el tipo de ciclo del parásito, pero si podemos comentar los resultados, en este sentido, realizados en otros países, por ejemplo, en un estudio de epidemiología molecular realizado por Zingales (4) en el Brasil, basado en la

secuencia del RNA ribosomal, en el que los datos de la investigación muestran una fuerte asociación del Linaje 1 de *Trypanosoma cruzi* con el ciclo doméstico, mientras que el linaje 2 está preferentemente asociado con el ciclo selvático. En ambos casos, tanto en el ciclo doméstico como en el ciclo selvático, se encuentran presentes también los linajes 2 y 1 respectivamente.

Con los resultados del estudio, se puede afirmar que en nuestro país circulan ambos linajes, lo cual será de importancia tenerlo en cuenta para el diseño de la producción de reactivos de diagnóstico para la enfermedad de Chagas. Es necesario realizar posteriores investigaciones de epidemiología molecular que relacionen el tipo de cepa con manifestaciones clínicas y epidemiológicas de la enfermedad.

Referencias bibliográficas

1. Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol*. 1993 Nov;62(1):45-52
2. Miles MA, Lanham SM, Souza AA. Further enzymic character of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R. Soc Trop Med Hyg*. 1980; 74: 221-23
3. Souto R.P., Fernandez O., Macedo A., Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineales of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem*. 1996; *Parasitol* 83, 141-152.
4. Zingales B., Stolf B., Souto R., Fernandez O, Briones M. Epidemiology. Biochemistry and Evolution of *Trypanosoma cruzi* Lineales based on Ribosomal RNA sequences. *Memo. Inst. Oswaldo Cruz*1999; 94, Suppl. I: 159-164.