

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**Prevalencia de la enfermedad de Chagas en perros domésticos, como
reservorio de importancia epidemiológica, por un método indirecto y un
método directo**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTADO POR

Gabriela Anaité Rodas Enríquez

**Para optar al título de
QUÍMICA BIÓLOGA**

Guatemala, Septiembre de 2016

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A.	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

ÍNDICE

Tabla de contenido

I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN.....	1
II. RESUMEN.....	2
III. ANTECEDENTES	4
A. La enfermedad de Chagas	4
1. Generalidades	4
2. Fisiopatología	4
3. Situación de la Enfermedad en Guatemala.....	6
B. <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
1. Generalidades	7
2. Ciclo de transmisión.....	8
C. Vectores Biológicos.....	9
1. Vectores biológicos de importancia médica en Guatemala.....	9
2. Control vectorial.....	10
3. Fuentes Alimenticias	11
D. Estudios previos con reservorios de <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
1. Reservorios silvestres	12
2. Reservorios domésticos	13
E. Métodos diagnósticos	14
1. Diagnóstico serológico	14
2. Diagnóstico molecular.....	15
IV. JUSTIFICACIÓN	17
V. OBJETIVOS	19
VI. HIPÓTESIS	20
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	21
A. Universo y Muestra	21
B. Medios y recursos.....	21
1. Recursos.....	21

2. Materiales	21
C. Procedimiento	24
1. Toma de muestra	24
2. Extracción de ADN	25
3. Método directo: Reacción en cadena de la polimerasa.....	25
4. Métodos serológicos: Hemaglutinación indirecta	27
D. Diseño de la investigación.....	27
XIV. ANEXOS	42
XV. BIBLIOGRAFÍA.....	49

DEDICATORIA

A Dios por permitirme alcanzar esta meta tan soñada en su tiempo, que a la vez concluye una etapa de muchas decepciones, alegrías, tristezas y satisfacciones pero sobre todo de mucho mucho mucho aprendizaje por el que estaré agradecida toda la vida.

A mis queridos abuelitos “Papaito y Mamaita”, quienes sembraron tantos anhelos y sueños en mi corazón, me acompañaron y se gozaron con la realización de mis metas académicas y artísticas, aunque ya no estén acá para compartir este momento quiero decirles que esta meta es tan mía como suya, se las dedico, este sueño de ser Química Bióloga ustedes lo vieron nacer... los amo y los llevo conmigo a donde voy.

A mi mami que desde mis primeros años de vida ha alimentado cada uno de mis sueños con su apoyo, compañía y amor.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Buena Madre por fortalecerme, acompañarme y poner ángeles en mi camino.

A mi Mami y a Tatito por estar siempre a mi lado alegrarse de mis alegrías y consolarme en los tantos tropiezos por confiar en mí en cada momento, ¡los amo! A mis tíos, tías (Padrino, tío Edgardo, Papamilton, Madrina y tía Waleska) y primos que llenan mis días con sus consejos sonrisas y ejemplos. A mi papa por ser un ejemplo y por animarme a seguir adelante en mi vida profesional.

A mi asesora Licda. Carla Alvarado por haberme abierto las puertas a este mundo de posibilidades y de investigación. Gracias por la confianza y por el tiempo invertido.

A mis amigos que han estado en varias etapas de este camino y que me honran con su amistad Margarita, Sindy, Majito, Karencilla, Heinrich, Allan por ser mis amigos y hermanos, a mis amigas Eli, Karencilla y Xochilt, Isa y Crissty por ser una fuente inagotable de luz y apoyo, las quiero. A Luisfer por su comprensión y apoyo en el cierre de esta etapa.

A la Universidad San Carlos de Guatemala, al equipo de LENAP y del LABOCLIP. A la Dra. Carlota Monroy y a la Licda. Antonieta Rodas por ser mis mentoras. Al proyecto de National Science Foundation (NSF) y al equipo de la Universidad de Vermont y de Loyola en especial a la Dra. Lori Stevens, Dra. Patricia Dorn, Lucia Orantes y John Hanley. Al equipo de estudiantes de veterinaria. A la Escuela de Química Biológica y a todo su personal, a la Licda. María del Carmen Bran por sus consejos y por su apoyo, a Shený, Any y Karlita. Al equipo de estudiantes de veterinaria que nos apoyaron en las giras de campo.

I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

El proyecto macro de investigación está centrado en la identificación y tipificación de cepas circulantes de *Trypanosoma cruzi* en perros domésticos, como indicador de zoonosis de la enfermedad de Chagas en Guatemala en zonas de alta y baja endemia. Los objetivos del mismo que engloban a este proyecto de investigación son complementar estudios de prevalencia de asociación entre las variables y de variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi*, utilizando técnicas moleculares e inmunológicas, en sangre proveniente de perros domésticos y comparar con estudios similares realizados en Latinoamérica. El proyecto macro de investigación está siendo desarrollado en el Laboratorio de Parasitología Molecular de la Universidad de Granada, España y el Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología de la Universidad de San Carlos de Guatemala

La ubicación de esta investigación dentro del proyecto macro es parte de la primera fase del mismo, que consistió en la evaluación de la presencia de *Trypanosoma cruzi* y de la enfermedad de Chagas en una aldea de alta endemia de Guatemala. Esto se realizó a través de un método directo para detección del parásito, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y uno indirecto para detección de anticuerpos, hemaglutinación indirecta (HAI). El tipo de muestra utilizada fue suero para HAI y sangre completa preservada con guanidina para el PCR. Los resultados obtenidos se contrastaron con aspectos epidemiológicos del lugar y del perro. Este proyecto proveerá al proyecto macro parte de la evaluación de la presencia del parásito, para posterior aislamiento y tipificación de las cepas encontradas en el lugar de muestreo.

II. RESUMEN

La enfermedad de Chagas sigue siendo una de las primeras dentro del listado de las enfermedades tropicales desatendidas y es uno de los tópicos más importantes en salud, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) sigue afectando a miles de personas y otros miles más se infectan cada año en América Latina. En Guatemala, se ha logrado un gran avance desde la eliminación de *Rhodnius prolixus*, uno de los vectores más eficaces, ya que se interrumpió la transmisión por el mismo. Pero aún hay muchos casos sin diagnosticar y muertes relacionadas con la infección. Por esta razón se necesita tener una vigilancia activa para poder disminuir la transmisión, infección y posterior a esto dirigir medidas de control enfocadas a la causa.

Por ser una enfermedad transmitida por vectores debe ser controlada mediante un enfoque integral con un impacto que intervenga en el ciclo desde el parásito hasta los reservorios animales y humanos. Una de las partes importantes en la transmisión y epidemiología son los reservorios, se ha detectado a *Trypanosoma cruzi* en reservorios silvestres y domésticos. Los que implican mayor riesgo para la salud son los domésticos, ya que están en contacto con el ambiente domiciliar y los humanos. Entre ellos el perro ha sido muy estudiado ya que desarrolla la enfermedad de la misma forma que el humano y por morder o comer los vectores puede infectarse más fácilmente. Por esta razón, detectar la prevalencia de la infección por *T. cruzi* en los mismos sirve como un dato de vigilancia y como un indicador de la movilidad del parásito, de los vectores y de la efectividad de las intervenciones realizadas por el Ministerio de Salud y universidades para controlar y disminuir la incidencia de casos.

Para poder conformar esfuerzos en el ámbito eco-bio social para la eliminación de la transmisión de la Enfermedad de Chagas, se han realizado estudios de prevalencia de la infección por *T. cruzi* en perros domésticos concluyendo que tienen un rol muy importante en la transmisión.

Las mediciones para la detección del parásito han sido por métodos directos e indirectos. Entre los métodos directos utilizados están PCR convencional y PCR tiempo real, y entre los métodos indirectos pruebas serológicas como el ELISA (Inmunoensayo enzimático), HAI

(Hemaglutinación indirecta), IFI (Inmunofluorescencia indirecta) y pruebas inmunocromatográficas.

El objetivo principal de este estudio fue la determinación de la prevalencia de la enfermedad de Chagas en muestras de perros domésticos de una aldea endémica de Jutiapa, Guatemala. Se estimó la prevalencia de la infección por *T. cruzi* utilizando las técnicas HAI para detección de anticuerpos y PCR convencional para la detección del parásito. Se extrajo ADN (Ácido Desoxirribonucleico) a partir de las muestras de sangre completa para la detección del parásito con el cebador 121-122 a través de PCR convencional (reacción en cadena de la polimerasa), y se detectó anticuerpos IgG en suero a través del método serológico de Hemaglutinación indirecta (HAI). Los resultados obtenidos mostraron una frecuencia de enfermedad de Chagas de (9/96) con un porcentaje de 9.38% por la detección de anticuerpos. Y además se detectó al parásito en un 2% (2/96) según el análisis realizado por PCR. Los resultados positivos para detección de anticuerpos fueron confirmados por la prueba inmunoenzimática ELISA.

Inicialmente se esperaba una prevalencia aproximada de 10% según cálculos de prevalencias en estudios de Costa Rica, México y Panamá. Coincidentemente en este estudio se obtuvo un porcentaje levemente menor al esperado (9.38%). Sin embargo, no se encontró asociación entre la positividad para la enfermedad de Chagas y la presencia del parásito con los aspectos socioculturales, demográficos, condición de vivienda de la población, así como con los aspectos generales y epidemiológicos del perro. Se observó que el perro doméstico es un reservorio y un agente de vigilancia importante para la enfermedad de Chagas debido a su presencia dentro de estas áreas endémicas.

III. ANTECEDENTES

A. La enfermedad de Chagas

1. Generalidades

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es una enfermedad infecciosa zoonótica, causada por el parásito sanguíneo *Trypanosoma cruzi*, que posee un ciclo biológico complejo que involucra un vector invertebrado y un reservorio vertebrado. Se encuentra sobre todo en zonas endémicas de 21 países de América Latina, donde es transmitida por un vector invertebrado de la familia Triatomidae (Eloy & Lucheis, 2009; Rassi, Rassi, & Marcondes 2012).

El huésped humano puede infectarse por varios mecanismos en los que se incluye: la vía transfusional, la forma congénita de madre a hijo y la más importante epidemiológicamente es la transmisión por contacto con deyecciones de triatominos parasitados, esto puede ser al momento de que el triatomino se alimenta del humano o por contacto con las mucosas, y en algunos casos por alimentos contaminados con heces del insecto. En el ser humano la infección afecta diversos órganos y sistemas especialmente el corazón y el sistema digestivo (Rassi et al. 2012; Zulantay, 2005).

2. Fisiopatología

a) *Período de incubación*

El período de incubación tarda usualmente de 5 a 14 días después de la exposición con heces de triatomino, y de 20 a 40 días luego de una transfusión sanguínea. Muchas personas no se vuelven sintomáticas hasta la etapa crónica que puede ocurrir de 5 a 40 años luego de la infección. La sintomatología de la enfermedad de Chagas presenta tres fases: una aguda, una indeterminada y una crónica. (Márquez, 2003)

b) Fase aguda

La etapa aguda es el período en el que los parásitos pueden ser encontrados fácilmente en sangre y generalmente los pacientes adultos se encuentran asintomáticos. Los síntomas pueden ser variables desde fiebre, dolor de cabeza, anorexia, dolor de cuerpo, hasta diarrea, vómitos, hepatomegalia, esplenomegalia, y linfadenopatía generalizada o localizada. La hepatoesplenomegalia puede ocurrir en 30 a 40% de los casos con repercusiones clínicas leves. En algunos casos se puede observar una induración no dolorosa con edema en el área por donde ingreso el parásito en la piel, que se le llama “chagoma”. Otro de los signos que aparece ocasionalmente en personas que han sido infectadas por el parásito, es el signo de Romaña, que se observa cuando el parásito ha ingresado por la mucosa ocular, y provoca edema en uno o en los dos ojos, acompañado de linfadenopatía localizada y conjuntivitis. Estos signos y síntomas pueden durar de semanas a meses y desaparecer sin tratamiento alguno, sin embargo, hay casos agudos que pueden ser fatales. Las muertes ocurren frecuentemente en lactantes y en pacientes que están inmunosuprimidos, que pueden desarrollar miocarditis aguda o meningoencefalitis. (Flores- Chavez, de Fuentes, Garate, & Cañavate, 2007; Márquez, 2003; Zulantay, 2005)

c) Fase indeterminada

Luego de la fase aguda, se sigue un período donde el parásito no puede ser encontrado en sangre y del 70 al 90% de pacientes siguen asintomáticos. En esta fase desaparece la sintomatología, sin embargo, la serología es positiva y si se realizan estudios electrocardiográficos y ecocardiográficos se pueden observar datos sugestivos de miocarditis, según sea el caso. Esta fase indeterminada puede durar de 5 a 15 años antes de pasar a ser crónica. (Márquez, 2003; Flores-Chávez et al., 2007)

d) Fase crónica

Se manifiesta de 20 a 50 años después de haber pasado la fase aguda, y algunos pacientes pueden estar asintomáticos. Durante la fase crónica los parásitos permanecen en el músculo cardíaco o digestivo. La fase crónica empieza con alteraciones en el órgano blanco para el parásito, que puede ser diferente según la clasificación del parásito que a su vez corresponde a diferentes regiones de localización del mismo. En Centro América el daño causado por el parásito es en el músculo cardíaco, no obstante, en Suramérica se presentan más casos de

alteraciones digestivas (megacolon y mega esófago) además de cardiopatías. Con el paso de los años, la miocardiopatía crónica chagásica puede causar muerte súbita o insuficiencia cardíaca por la destrucción progresiva del músculo cardíaco. (Márquez, 2003)

Según la distribución del parásito se ha observado variabilidad en el tipo de afección y órgano blanco afectado. En Sudamérica se ha reportado más casos clínicos con fase crónica que afecta al tracto digestivo, esófago y colon. En Guatemala y Centroamérica la enfermedad crónica muestra daños en los tejidos del corazón, causando cardiomegalia (Tabaru, Monroy, Rodas, Mejía & Rosales, 1999; Monroy, Rodas, Mejía, Rosales, & Tabaru, 2003; Zulantay, 2005; Zingales, et al 2012).

3. Situación de la Enfermedad en Guatemala

La enfermedad de Chagas ha sido reportada como endémica en varios departamentos de Guatemala siendo asociada a los niveles de pobreza. Desde hace muchos años se ha estudiado la enfermedad en todo el país encontrando algunos casos agudos en menor cantidad y crónicos en la mayoría de los reportes de donadores de sangre. Debido al difícil acceso a la salud en todo el país especialmente en los lugares alejados de perímetro de las ciudades muchos casos pasan desapercibidos.

Según el Ministerio de Salud Pública Asistencia Social en Guatemala se estima que 4 millones están en riesgo de adquirir la enfermedad; 730,000 están infectados y aproximadamente 30,000 se infectan cada año. El principal vector de la enfermedad es *Triatoma dimidiata*, luego de que *Rhodnius prolixus* fuera eliminado en 2008 (MSPAS, 2011).

Los departamentos de Jutiapa y Chiquimula son los que han tenido más relevancia en cuanto a zonas de alta endemia. En Chiquimula antes del 2008 se observaban altos índices de infestación y la encuesta serológica mostraba que había mucho parásito circulante (Tabaru et al., 1999).

A partir de las primeras intervenciones realizadas por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social para la eliminación de *Rhodnius prolixus* y el control de *Triatoma dimidiata*, se ha observado cambios ya que Chiquimula ha dejado de estar entre las zonas de alto riesgo y Jutiapa sigue siendo uno de los departamentos más afectados por altos índices de infestación aunque estos hayan disminuido en comparación con el 2009 según la información presentada por el Ministerio de Salud pública y Asistencia Social en el 2011 (Anexo No. 1) .

Se concluyó que en Jutiapa los índices no disminuían tan fácilmente debido a los altos niveles de pobreza aunados a la presencia de viviendas con paredes agrietadas, perros, ratones y gallinas, relacionadas con la re-infestación de *Triatoma dimidiata*, esto gracias a las investigaciones realizadas por la Universidad de San Carlos y la Universidad del Valle para evaluar las causas de la re-infestación. Actualmente se implementa y promueve la mejora de vivienda, el rociamiento y sacar a los animales del intradomicilio como una de las intervenciones para el control de *T. dimidiata* (Hashimoto, 2015).

B. *Trypanosoma cruzi*

1. Generalidades

Trypanosoma cruzi es un parásito protozoo hemoflagelado que pertenece al orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae en cuyo ciclo biológico intervienen mamíferos e insectos vectores reduvídeos de la familia Triatomidae. Los parásitos son transmitidos a través de las deposiciones infectadas que el vector elimina en el momento de alimentarse. Los hospedero mamíferos pueden ser el hombre y algunos animales domésticos (caninos, felinos, caprinos, bovinos, equinos, ovinos y conejos) o silvestres (roedores, primates, marsupiales y edentados). (Márquez, 2003; Zulantay, 2005)

2. Ciclo de transmisión

Trypanosoma cruzi necesita un hospedero vertebrado y un triatomino para completar su ciclo. Algunos mamíferos, incluyendo al humano, desarrollan la enfermedad mientras que otros únicamente fungen como reservorios asintomáticos. El ciclo de vida de *T. cruzi* se divide en dos partes, la que ocurre en los seres humanos y otros mamíferos y la que únicamente ocurre en el triatomino. En el reservorio doméstico el humano se infecta después de la picadura del triatomino debido a que éste después de alimentarse defeca cerca de la herida. Debido a la gran carga parasitaria presente en su intestino, cuando las personas se rascan como resultado de la picadura pueden inocularse el parásito por la herida recién hecha por el insecto penetrando así en el torrente sanguíneo, a esta fase infectante es denominada “tripomastigote metacíclico”. En la sangre el parásito se observa como un tripomastigote fusiforme, en forma de “C” o de “S”. Durante esta etapa el parásito no se multiplica en la sangre del hospedero. Cuando el parásito infecta las fibras del músculo cardíaco estriado o a los fagocitos, se acorta el flagelo y se transforma en amastigote, éste se multiplica por medio de fisión binaria formando "racimos" o "nidios" que se acumulan en la célula huésped hasta que esta se rompe.

Los parásitos liberados de la célula se convierten en promastigotes y tripomastigotes que son liberados en la sangre circulante. Estos tripomastigotes pueden infectar otras células, pero no son capaces de multiplicarse en la sangre ya que la única forma replicativa en el vertebrado es la forma de amastigote intracelular, así que invaden otras células, para repetir esta parte del ciclo. (Anexo No. 2)

Los triatominos que constituyen el vector biológico nacen libres de la infección, pero adquieren el parásito al alimentarse del hombre o de los animales domésticos o silvestres infectados. El vector ingiere tripomastigotes presentes en la sangre, que migran al intestino medio del insecto- vector donde se transforman en epimastigotes y ahí se dividen un gran número de veces. A partir de aquí los triatominos *Triatoma dimidiata* quedan infectados de por vida. Los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos y migran al intestino posterior de donde son excretados con las heces en el momento de la picadura. El humano al rascarse se

inocula el parásito contaminándose la herida con las heces del triatomino, cerrando de esta manera el ciclo. (Marquéz, 2003; Rassi et al. 2012)

C. Vectores Biológicos

Los vectores biológicos más conocidos en las zonas endémicas para la enfermedad son de los géneros: *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*. Por lo general el hábitat natural de estos es en el ambiente selvático, debido a la deforestación y ubicación del humano en estos ambientes los hábitos de colonización y alimentación de estas especies han cambiado. De ahí que para fines epidemiológicos sabemos que infestan tanto el peridomicilio como el intradomicilio de las poblaciones humanas establecidas, colonizando los hogares al vivir en las grietas de las paredes de adobe, bajareque o material vegetal en mal estado en zonas rurales y suburbanas. Normalmente permanecen ocultos durante el día y por la noche entran en actividad al alimentarse de sangre humana y/o animal. En general, pican en una zona expuesta de la piel, como la cara, defecando cerca de la picadura. Los parásitos penetran en el organismo de los animales cuando estos ingieren a los vectores, y en el caso de los humanos cuando la persona picada se frota instintivamente y empuja las heces hacia la picadura, los ojos, la boca o alguna lesión cutánea abierta. (Monroy et al., 2003; Monroy et al., 2012; Hashimoto et al., 2012)

1. Vectores biológicos de importancia médica en Guatemala

El vector autóctono de Guatemala es *Triatoma dimidiata*, sin embargo, *Rhodnius prolixus*, un vector que fue introducido accidentalmente a nuestro ecosistema, por sus hábitos de vida fue un vector muy eficaz para el ciclo de transmisión, hasta que en el 2008 fue eliminado. Actualmente, *Triatoma nítida* una especie que antes se encontraba solo en gallineros está cobrando interés debido a que el parásito se replica muy bien dentro del mismo (Monroy, Bustamante, Rodas, Rosales, Mejía et al. 2003)

2. Control vectorial

Los esfuerzos por disminuir la infección por el parásito se han enfocado en el control del vector biológico y el mejoramiento de la higiene y limpieza en las viviendas, entre ellos, la separación de los animales domésticos del ambiente intradomiciliario por la creación de corrales y cochiqueras. El método tradicional de eliminación del vector se ha limitado al rociamiento de insecticida residual en la zona infestada. Se han realizado estudios para garantizar la efectividad a largo plazo del rociamiento en el intradomicilio, obteniendo mejores resultados con múltiples aplicaciones de insecticida. En vectores no autóctonos como *Rhodnius prolixus*, el rociamiento es el método más eficaz para lograr la eliminación. Pero en vectores autóctonos no funciona de la misma manera, ya que estos se han adaptado a los diferentes ambientes. (Hashimoto, Cordon-Rosales, Trampe & Kawabata, 2006; Hashimoto et al., 2012)

El hecho de que *Triatoma dimidiata* sea un vector silvestre, hace muy difícil el control biológico del mismo. Tomando en cuenta lo anterior, la invasión a su hábitat mediante la deforestación y el establecimiento de viviendas por parte del humano, hace que este entre y salga de las mismas hacia su espacio natural, y de esta manera cambie sus hábitos alimenticios de silvestres a domésticos y humanos. Por esta razón, solo el rociamiento no logra su control, ya que si encuentra condiciones adecuadas vuelve a infestar y colonizar las viviendas.

Sin embargo, el rociamiento como control del vector *Triatoma dimidiata*, ha sido una de las formas de prevención continuas aplicadas por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, antes y después de la eliminación de *Rhodnius prolixus*. Pues se ha observado en estudios realizados en Yucatán, México por Dumonteil et al, 2004 que el rociamiento no es un método muy efectivo para el control del vector, ya que se observó que después de 4 meses luego del rociamiento las viviendas volvían a estar infestadas por triatominos adultos, por lo que era necesario realizar por lo menos tres rociamientos al año. Lamentablemente realizar tres rociamientos al año en áreas endémicas y no endémicas en riesgo, implica un gasto enorme e insostenible para el Ministerio de Salud, ya que es un insumo caro y por tanto no hay abastecimiento para su uso adecuado. Además se prevé que en un futuro no muy lejano, tengamos resistencia a estos insecticidas, por lo que es preferible no sobrepasar el límite.

a) Nuevas perspectivas

Según los enfoques definidos por Monroy, Castro, Bustamante, Pineda, Rodas, Moguel, Ayala, & Quiñonez, (2012) es imposible mejorar el control de la enfermedad de Chagas sin involucrar a las personas en el manejo del ambiente. Y debido a los pobres avances obtenidos con el rociamiento para el control del vector biológico de la enfermedad se continuó realizando estudios de factibilidad económica. Para obtener mejores resultados se decide aplicar un enfoque holístico de los aspectos sociales con un buen manejo ambiental. Entre estos destaca el estudio realizado por LENAP- USAC en Jutiapa, donde se propuso una intervención que incluyó el mejoramiento de las viviendas (paredes y piso), rociamiento intradomiciliar y la creación de gallineros en el peridomicilio como medidas para evitar la re-infestación. El mejoramiento de vivienda propuesto por el estudio además utilizó materiales locales para la preparación de la mezcla aplicada en el repello de las paredes y la subsiguiente aplicación de cal sobre las mismas, esto para evitar la proliferación y mantenimiento de otros insectos dentro del domicilio. Se realizó también mejoras en los pisos de las viviendas, siempre con la utilización de materiales locales económicos, esto para contribuir a la prevención de infecciones por geohelminths. En este estudio se observó grandes avances para la erradicación de este vector, así como el mejoramiento de la salud e higiene, evitando así otro tipo de enfermedades (Monroy et al. 2009).

3. Fuentes Alimenticias

El vector por su parte, una vez se encuentra en el ambiente doméstico, se ve obligado a cambiar sus hábitos alimenticios. En este nuevo ambiente hay muchos reservorios como cerdos, gallinas, ratas, ratones, perros y gatos. No todas las fuentes de las que se alimenta el vector son reservorios, ni todas son susceptibles a desarrollar la enfermedad, la excepción son las aves. Se han realizado estudios para determinar cuál de estas fuentes es la preferida por el vector y qué implicaciones tiene esto para el humano (Gürtler et al., 2009).

Las aves, como las gallinas, no son reservorios del parásito ni desarrollan la enfermedad, sin embargo, son una fuente de alimento importante para el vector. En otros estudios realizados en

Jutiapa, con el mismo objetivo de los anteriores, se demostró mediante técnicas moleculares de ADN forense, que una de las fuentes de alimento predilectas de *Triatoma dimidiata* es el perro, además de las aves, rata y ratón. Luego de este estudio se realizó otro similar en cinco aldeas del municipio de Olopa, Chiquimula, replicando las técnicas del enfoque de Ecosalud. En este estudio se obtuvo como resultado para fuentes alimenticias que aves y perro son las fuentes preferidas por el vector en este departamento (Pizarro & Stevens, 2008; Pellecer, Dorn, Bustamante, Rodas & Monroy, 2013).

D. Estudios previos con reservorios de *Trypanosoma cruzi*

Se ha estudiado una gran gama de reservorios para *T. cruzi*, desde el ambiente silvestre hasta el ambiente doméstico. Encontrándose evidencias del parásito en especies silvestres como tacuacines, murciélagos, armadillos, diversos primates y roedores, así también en animales domésticos como aves, cerdos, cabras, gatos, perros, entre otros. Siendo los reservorios mamíferos los más competentes donde se ha observado un aumento en la población. El hecho de que los ambientes sean tan cambiantes hace que los subtipos del parásito sean igualmente variables geográficamente, incidiendo en su epidemiología significando un gran riesgo para adquirir la enfermedad (Noireau, Diosque & Jansen, 2009).

1. Reservorios silvestres

Chagas es una enfermedad difícil de erradicar a causa del gran número de animales silvestres que sirven de reservorio del parásito en América. Los reservorios estudiados en Guatemala son ratas, ratones, mapaches, tacuacines y perros. Se han estudiado reservorios silvestres de tacuazín en los departamentos de Jutiapa y Santa Rosa, encontrando *T. cruzi* en más ocasiones que *Trypanosoma rangeli* en las hembras de las especies *Didelphis marsupialis*, *Philander opossum* y *Didelphis virginiana*, lo que nos indica que dentro del hábitat silvestre hay fuentes donde el vector puede adquirir el parásito para luego movilizarlo al hábitat doméstico (Noireau et al., 2009; Rosales- Rizzo, 2011)

2. Reservorios domésticos

En los últimos 10 años se han realizado muchos estudios en Argentina para evaluar la presencia tanto del parásito como de anticuerpos contra el mismo, en animales domésticos como perros y gatos, obteniendo en las investigaciones resultados reveladores en cuanto a la dinámica de infección en las especies estudiadas y la transmisión- infección en relación al vector (Gürtler et al, 2006; Enríquez et al., 2013).

En el estudio de Gürtler (1986) se demostró por primera vez que además de desarrollar la enfermedad, los perros son muy importantes epidemiológicamente ya que la probabilidad de que un vector se infecte de *T. cruzi* es 100 veces mayor que si lo hiciera de un humano. Se han realizado estudios experimentales de seguimiento en perros con enfermedad crónica que han demostrado que estos desarrollan la enfermedad de Chagas de una manera similar al ser humano, presentando la misma respuesta inmunológica y cambios patológicos. Además otros estudios han demostrado que el perro es una de las fuentes alimenticias predilectas del vector (Gürtler, Lauricella, Solarz, Bujas & Wisnivesky – Colli, 1986; Araujo et al., 2002; Eloy et al., 2009).

En Colombia, se evaluó, la frecuencia de ocurrencia de infección por *T. cruzi* en una muestra aleatoria de perros, factores de riesgo ambientales y de la vivienda, posibles asociaciones correlacionadas con la prevalencia de la infección en humanos y condiciones del hábitat que podrían favorecer la enfermedad de Chagas en una zona endémica. Se obtuvo una prevalencia general del 15% de infección por *T. cruzi* en los perros. Además se encontró un riesgo tres veces mayor de que ocurra la infección en perros, en los hogares donde residen mujeres gestantes seropositivas. Así también la asociación entre la infestación por pulgas y garrapatas en el animal sumado a que habite cerca de la vivienda, relacionadas con mayor seropositividad en el can. La raza, el sexo, la presencia de aves en la casa y el examen clínico general son considerados como factores pronósticos en la infección por *T. cruzi* en los perros. Y se identificó como factores protectores se la desparasitación y vacunación de los animales. Las zonas no endémicas demuestran tener una prevalencia baja de anticuerpos contra *T. cruzi* en los

perros domésticos, invirtiéndose esto en las zonas de alta endemia (Manrique et al., 2012; Gürtler et al., 1996).

En México, se observó en diversos estudios serológicos realizados en perros de las regiones de, Puente Pantitlán, Morelos y Tejupilco, que hay relación entre la seropositividad de los perros y sus dueños y que otro de los factores importantes es la presencia de vectores en la vivienda y la detección de parásitos en estos, este es un indicador importante para la vigilancia epidemiológica de la infección por *T. cruzi*. Además se ha observado que en áreas endémicas y no endémicas los perros callejeros tienen mayor riesgo (IgM 12%) de estar infectados y que las prevalencias observadas son mayores en perros que en humanos. (Portugal- García et al., 2001; Reyes, Silesky, Cerdas, Chinchilla, & Guerrero, 2002; Estrada- Franco et al., 2006).

E. Métodos diagnósticos

1. Diagnóstico serológico

El diagnóstico serológico en humanos se basa en la determinación de inmunoglobulinas IgG totales anti-*T. cruzi*. Por cuestiones prácticas, se denomina convencional cuando se emplea como antígeno todo el parásito (inmunofluorescencia indirecta [IFI]) o una mezcla compleja de antígenos del parásito (hemoaglutinación indirecta [HAI], ensayos inmunoenzimáticos [ELISA]). El diagnóstico serológico es no convencional cuando los antígenos son purificados, recombinantes o péptidos sintéticos. Dentro de este último grupo destacan las pruebas rápidas en formato de tiras inmunocromatográficas y la aglutinación en tarjeta; con este tipo de ensayos se requieren de 10 a 15 minutos para obtener un resultado. A pesar de los avances tecnológicos, ningún ensayo serológico alcanza el 100% de sensibilidad y especificidad (Flores- Chavez et al., 2007).

En perros de igual manera el diagnóstico serológico es el más confiable, se ha utilizado también otras técnicas de diagnóstico como el xenodiagnóstico, el IFI y HAI para evaluar infección en perros, no se ha obtenido concordancia completa entre un método y otro, sin embargo, los que han resultado más prometedores son el ELISA e IFI, tomando siempre en cuenta las reacciones

cruzadas con otros parásitos sanguíneos. Las pruebas rápidas de principio inmunocromatográfico y de TESA- blot (Trypomastigote excreted secreted antigen) han sido de gran utilidad para un sondeo rápido y certero de infección en perros. Se han utilizado en algunos estudios, siendo estas pruebas una técnica eficaz, que no presenta problemas de identificación cruzada con *Leishmania sp.* y otros parásitos para la detección de la enfermedad en perros de Nueva Orleans y de áreas endémicas de Brasil, en lo que se puede observar la alta capacidad para detectar diferentes líneas del parásito según su distribución geográfica (Nieto et al., 2009; Umezawa et al., 2009).

2. Diagnóstico molecular

El análisis del ADN para la detección del *T. cruzi* a partir de muestras de sangre en humanos, se empezó a utilizar como una técnica de diagnóstico rápido. Tal fue el caso del estudio propuesto por Ribeiro-Dos-Santos, Nishiya, Sabino, Chamone & Saénz- Alquézar, (1999) donde por primera vez se propuso esta técnica diagnóstica en humanos con el mismo cebador de este estudio. Posteriormente, se empezó a utilizar para diagnosticar y monitorear la enfermedad congénita de Chagas en madres e hijos con el fin de evaluar el tratamiento y su efectividad. En la actualidad también se utiliza con este mismo fin en pacientes chagásicos crónicos (Schijman, et al., 2003; Zulantay, 2005).

La técnica utilizada para el diagnóstico molecular consiste en la detección de fragmentos complementarios específicos de ADN del parásito en el ADN extraído del paciente, mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Se han utilizado para este fin regularmente cebadores dirigidos al kinetoplasto, y a ADN satélites como S35 y S36, TCZ1-TCZ2 y 121-122 encontrándose concordancia entre los resultados, sin embargo, la sensibilidad de las detecciones fue deficiente y por esta razón no son recomendables para detección en fase aguda (Zulantay, 2005; Trejo, 2006; Flores-Chávez et al., 2007).

En Guatemala se han realizado estudios con la técnica de PCR para la detección de *T. cruzi* en humanos utilizando el cebador (primer) del fragmento minicírculo de 330 pb del kinetoplasto del parásito, obteniendo muy buenos resultados de concordancia con métodos serológicos.

Además se observó que con este método se puede detectar aún los casos que no se han podido detectar mediante serología (Machuca- Hernández, 2000; Vargas-Gudiel, 2000).

En perros ha sido muy utilizado el diagnóstico molecular para la detección del parásito, empleando los mismos cebadores que han sido eficaces para la detección en humanos. La mayoría de estudios se han enfocado en la región minicírculo del kinetoplasto de *T. cruzi*, probándose los cebadores S 35, TCV, TC1-TC2 y 121-122. El cebador TCZ1- TCZ2 también ha estado en estudio por ser de un fragmento repetitivo de ADN y entre sus usos directos cabe mencionar la detección de fuentes alimenticias en vectores de la Enfermedad de Chagas. Sin embargo, los cebadores 121- 122 han ofrecido mejores resultados para la detección en humanos y en perros en estudios de otros países tanto en muestras positivas y negativas por métodos serológicos, así como en el seguimiento de pacientes crónicos y como evaluadores de la efectividad del tratamiento esto debido a su alta especificidad (Bradley, Bergman, Woods, Crutcher & Kirchhoff, 2000; Walker et.al., 2004; Kjos, Snowden & Olson, 2009; Duffy et al., 2009; Enríquez et al., 2013).

IV. JUSTIFICACIÓN

Según reporte de la OMS de marzo de 2013, se calcula que en el mundo hay entre 7 y 8 millones de personas infectadas por *T. cruzi*, la mayoría de ellas en América Latina, donde la enfermedad de Chagas es endémica. Inicialmente, la fase aguda dura unos dos meses después de contraerse la infección. Durante esta fase aguda circulan por el torrente sanguíneo una gran cantidad de parásitos. En la mayoría de los casos no hay síntomas o éstos son leves. Puede haber fiebre, dolor de cabeza, agrandamiento de ganglios linfáticos, palidez, dolores musculares, dificultad para respirar, hinchazón y dolor abdominal o torácico. En menos del 50% de las personas picadas por un triatomino, un signo inicial característico puede ser una lesión cutánea o una hinchazón amoratada de un párpado.

Guatemala no es la excepción, ya que es un país endémico para la enfermedad, donde se estima que 4 millones de personas están en riesgo de adquirir la enfermedad, 730,000 personas están infectadas y aproximadamente 30,000 se infectan cada año con *T. cruzi*, agente causal de la enfermedad (MSPAS, 2011).

El parásito *T. cruzi* posee un ciclo biológico complejo, donde intervienen de forma natural un hospedador vertebrado y un insecto vector. Posee estadios estructural y funcionalmente diferentes, con determinantes antigénicos específicos (Palau, 2000; Lucheis et al., 2009). La enfermedad de Chagas afecta a los mamíferos, entre ellos se encuentra el perro, que desempeña un papel importante como reservorio doméstico o peri-doméstico del parásito, ya que es el principal mamífero que vive en estrecha proximidad a los seres humanos y está dentro de los ciclos de transmisión y mantenimiento de estos parásitos (Gürtler 1986; Montenegro, Jiménez, Pinto-Dias & Zeledón, 2002; Crisante, Rojas, Texeira & Añez, 2006; Pineda et al., 2011)

No se han registrado muchos casos de enfermedad aguda debido a sus síntomas inespecíficos, y a la pobreza y poco acceso a salud que aquejan en las regiones rurales y/o suburbanas del país en donde esta enfermedad es endémica. Los intentos por erradicar al vector han estado centrados en el rociamiento con insecticidas pero se ha demostrado que no es suficiente. (Dumonteil, 2004) Tratando de encontrar nuevas opciones, amigables con el medio ambiente, sostenibles y a la vez

integrales para el favorecimiento de la salud, se han realizado algunas intervenciones en Ecosalud que implican la mejora de viviendas, orden y limpieza en casas que incluye sacar animales domésticos, como las aves hacia un corral en el peridomicilio siempre aunado con el rociamiento en paredes de la vivienda.

Además, se han realizado estudios en los insectos vectores para identificar las fuentes alimenticias predilectas y así determinar el nivel de riesgo en los hogares, siendo las aves y el perro los más frecuentes, sin embargo, no se ha estudiado la prevalencia de la infección en perros, que puede representar un dato importante para el estudio macro de esta investigación sobre la implicación como animal doméstico en estrecho contacto con el humano en esta dinámica de la infección por *T. cruzi* y la enfermedad misma. Por esta razón, se decidió realizar este estudio para contribuir al enfoque de todas estas alternativas para el control del vector y de la enfermedad de Chagas en Guatemala. De esta manera si se confirma la infección en perros de casas en las que se encontró chinches o en las que hay seropositividad en humanos, esto podría implicar otro factor de riesgo para el mantenimiento del parásito dentro del ciclo, al actuar el perro como un reservorio del mismo.

V. OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar la prevalencia de la Enfermedad de Chagas en muestras de perros domésticos originarios de una aldea endémica de Guatemala, utilizando un método de detección directo y uno indirecto.

Objetivos específicos

- Caracterizar la población en estudio.
- Determinar la frecuencia de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* en las muestras de los perros evaluados.
- Determinar la presencia de parasitemia en la muestra de estudio por medio de PCR.
- Relacionar aspectos socioculturales, demográficos y condición de vivienda y del perro con la presencia de la enfermedad de Chagas en perros domésticos.

VI. HIPÓTESIS

La prevalencia de la Enfermedad de Chagas en perros domésticos de la aldea El Chaperno, Jutiapa es de 10%.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo y Muestra

- Universo: Perros de la aldea El Chaperno, Jutiapa Guatemala.
- Muestra: 96 muestras de sangre de perros

B. Medios y recursos

1. Recursos

a) *Humanos*

- Autor: Gabriela Anaité Rodas Enríquez
- Asesor: Licda. Carla Alvarado
- Colaboradores: Licda. Antonieta Rodas
PhD. Carlota Monroy

b) *Institucionales*

- Laboratorio Clínico Popular (LABOCLIP)
- Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP). Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

2. Materiales

a) *Equipos*

(i) Extracción de ADN:

- Microcentrífuga
- Autoclave
- Vortex
- Baño de María
- Baño seco
- Congelador -20°C
- Pipetas automáticas 10, 100 y 1000 uL

(ii) Amplificación y electroforesis:

- Campana de flujo laminar
- Termociclador
- Cámaras de electroforesis
- Estufa
- Microcentrífuga
- Revelador con luz UV
- Congelador -20°C
- Pipetas automáticas de 10, 100, 1000 uL

(iii) Hemaglutinación indirecta (HAI)

- Agitador automático
- Incubadora
- Vortex
- Pipetas automáticas 10, 50, 100 y 1000uL

(iv) ELISA:

- Pipetas automáticas 2.5, 10, 100 1000 uL
- Vortex
- Incubadora 37°C
- Lector de ELISA

b) Reactivos y Materiales

(i) Extracción de sangre en perros:

- 120 tubos de 10 mL con guanidina y EDTA
- 120 tubos de 5 mL para suero
- 100 jeringas de 5mL aguja 21
- 20 jeringas de 5 mL aguja 22
- 150 papel filtro en cuadrados de 2 cm²
- 5 frascos de agua oxigenada

- 100 almohadillas con yodo
- 5 bozales
- Tubos eppendorf 1.5 mL
- Pipetas pasteur plásticas

(ii) Extracción de ADN:

- Kit de extracción de ADN a partir de sangre y tejidos “DNAeasy Blood and Tissue” marca QIAGEN®
- Tubos de 1.5 mL Neptune®
- Alcohol absoluto
- Gradillas
- Puntas con filtro 10-100ul
- Puntas con filtro 100-1000uL

(iii) Amplificación y Electroforesis:

- Green taq ECONOTAQ de Lucigen®
- Cebadores de perro:
 - F 5'AGGGCGCCATCCTGGAGAC 3'
 - R 5' AGACACAGGCAGAGGGAGAA 3'
- Cebadores kDNA minicircle 121-122 de *Trypanosoma cruzi*
 - 121 (5'-AAATAATGTACGGG(T/G) GAGATGCATGA-3')
 - 122 (5'-GGTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3')
- Agua grado molecular
- Agarosa APEX
- Buffer TBE
- Marcador molecular Track it 50bp Invitrogen®
- Puntas con filtro 1-10 ul
- Puntas con filtro de 10- 100 ul
- Puntas con filtro 100-1000 ul

(iv) Hemaglutinación indirecta (HAI)

- Kit de HAI Wiener lab®
- Tubos de reacción 5 mL
- Placas de reacción 96 pozos
- Puntas 10-100 ul
- Puntas 100-1000 ul
- Control positivo suero perro (donado por el Instituto Gorgas, Panamá)
- Control negativo suero perro

(v) ELISA:

- Kit de ELISA lisado Chagatest de Wiener lab®
- Conjugado IgG de perro (molécula completa) –peroxidasa anticuerpo producido en conejo de SIGMA ALDRICH®
- Puntas de 10 -100 ul
- Puntas de 100 – 1000 ul
- Lector de ELISA
- Control positivo suero de perro
- Control negativo suero de perro

C. Procedimiento

1. Toma de muestra

Se extrajo una muestra de sangre de 5 a 6 ml por cada perro enrolado en el estudio, estos se distribuyeron en dos tubos de muestra y una porción de papel filtro. Se preparó una solución de Guanidina 6M y EDTA 0.2M con un pH de 8.0. El tubo destinado para el análisis de PCR contenía de 2 a 3 ml guanidina-EDTA para ser mezclados con un volumen igual de sangre completa. El resto de la sangre se colocó en un tubo sin aditivo para separar suero y dos gotas en un cuadrado de papel filtro. Se pidió la autorización de los dueños mediante un consentimiento informado donde explicaba el objetivo del estudio y se llenó una ficha con datos generales y epidemiológicos por cada muestra, que contenía información tanto del perro como de la

vivienda a la que pertenecía. En esta ficha se evaluaron datos como edad, sexo, presencia de ectoparásitos, desparasitación y vacunación. (Anexo No. 3 y 4)

2. Extracción de ADN

a) Muestra

Se realizó la extracción de ADN a partir de 100 uL de muestra de sangre de perro preservada con guanidina-EDTA. Se extrajo únicamente las muestras que tenían una relación adecuada de sangre y preservante, es decir una relación de volumen 1:1, y que no estuvieran coaguladas.

b) Extracción de ADN

Se utilizó el método de extracción en fase sólida mediante columnas de silica del kit comercial DNeasy Blood & Tissue de QIAGEN®. Se preparó una solución buffer de fosfatos (PBS) para el paso de lisis con fosfato de potasio y cloruro de sodio a un pH de 7.2. El método de extracción consistió en cuatro pasos: lisis, unión, lavado y elución. Se utilizó proteinasa K bajo condiciones desnaturizantes para la lisis de las células, luego se realizó la unión con el uso de buffers y luego una serie de lavados para concentrar el ADN en la matriz de silica, y por último mediante el paso de elución se re- obtuvo el ADN extraído en dos alícuotas de 50 uL cada una (Anexo No. 5).

3. Método directo: Reacción en cadena de la polimerasa

a) Evaluación de calidad del ADN

Para evaluar la calidad del ADN extraído, se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1%. Posteriormente con el objetivo de evaluar la pureza del ADN extraído se realizó una amplificación con cebador de perro. Este paso constituyó un control interno para evaluar la pureza del mismo y si hubo contaminación con otro ADN durante la extracción.

b) *Detección de Trypanosoma cruzi en perros*

(1) Preparación de la mezcla maestra para amplificación

Se preparó una mezcla maestra compuesta por Green Taq de Lucigen, Agua de grado molecular y los cebadores de kDNA 121 y 122 del kinetoplasto de *T. cruzi*. La ADN polimerasa utilizada es una mezcla que contiene la cantidad determinada de desoxinucleótidos, Mg^{+2} y polimerasa. Se agregó 6ul de Green Taq, 4 ul de agua grado molecular, 0.5ul de cada uno de los cebadores y 1 ul de ADN para ajustar un volumen final de 12ul por tubo de reacción. Se homogenizó cada una de los tubos de reacción en microcentrífuga.

(2) Amplificación

Se realizaron amplificaciones para cada muestra de ADN extraída mediante un PCR de punto final, con los cebadores 121 y 122 de la porción del minicírculo de kinetoplasto de *T. cruzi*, con estos se evaluará la presencia/ ausencia del parásito. Se realizó la amplificación con las siguientes condiciones de tiempos y temperaturas. Se inició la amplificación con el paso de desnaturalización a 94° C por dos minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 55°C por 10 segundos y 72°C por 30 segundos con una extensión final de 72°C por 7 minutos y una temperatura de mantenimiento final de 4°C en el termociclador Thermal Cycler de Bio Rad®.

c) *Electroforesis*

Se utilizó la electroforesis para evidenciar los productos obtenidos en el PCR, se prepararon varios geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio, a 100 V en TBE 1X (Tris-boric acid-EDTA) y se visualizaron bajo luz UV para evaluar la presencia/ausencia de bandas del peso esperado de cada uno de los cebadores a probar. En los cebadores 121 y 122 las bandas esperadas eran de 330 pb. Se utilizó el marcador molecular Track it de 50 bp marca Invitrogen® en el pozo correspondiente al décimo espacio de cada fila de pozos. Se utilizó controles positivos obtenidos a partir de la cepa de *T. cruzi* reportada por Sylvio X10. Se fotografió y se registró cada uno de los hallazgos siendo los positivos quienes poseían una banda visible de 330pb.

4. Métodos serológicos: Hemaglutinación indirecta

a) Preparación de sueros

Los sueros fueron identificados, separados y congelados hasta su análisis. Se transfirió el suero a tubos estériles de 2.0 ml y se identificó a cada uno con su número de origen. Se prefirió utilizar los sueros menos hemolizados en el caso de que se pudiera escoger. Se conservó los sueros separados en congelador a -10°C. Se realizó una mezcla de sueros negativos pertenecientes a perros del área urbana, y de esta manera se obtuvo el control negativo para el análisis. El control positivo utilizado se obtuvo a partir de un perro experimentalmente infectado por *T. cruzi* en cultivo donado por el Instituto Gorgas de Panamá.

b) Análisis por Hemaglutinación indirecta

Se utilizó el kit comercial de Hemaglutinación indirecta de Wiener Lab® Argentina. El protocolo consiste en dos fases: tamizaje y confirmatoria. Todas las muestras positivas para la primera fase fueron confirmadas mediante la eliminación de anticuerpos heterófilos por métodos químicos y físicos. Se realizaron diluciones desde 1:2 hasta 1:32 para cada una de las muestras. Se tomó un resultado como positivo cuando la muestra presentara una película o manto cubriendo el 50% del pocillo desde la dilución 1:16. Y finalmente los resultados positivos fueron confirmados mediante un ELISA modificado. Para este procedimiento se utilizó el kit comercial Chagatest lisado de Wiener lab® y un conjugado de IgG de perro Sigma- Aldrich®.

D. Diseño de la investigación

El muestreo se planificó inicialmente como aleatorio. Para el cálculo de número de muestra se utilizó el paquete estadístico Open Epi versión 3 con un intervalo de confianza al 95% obteniendo un valor mínimo de 94, esto a partir de los datos de población canina de la encuesta basal realizada en julio de 2012 por el grupo de investigación de LENAP- USAC para el proyecto “**Modeling disease transmission using spatial mapping of vector-parasite genetics and vector feeding patterns**” de National Science Foundation (NSF).

Para la toma de muestras se contó con cuatro grupos de trabajo a los cuales se les asignó 25 casas seleccionadas al azar de una región del mapa de la aldea El Chaperno, en las que se había reportado presencia de perros. Sin embargo, se tuvo el inconveniente de encontrar casas deshabitadas o sin perros por lo que se continuo el muestreo en casas aledañas.

Para evaluar asociación con la enfermedad de Chagas se utilizó la ficha de datos generales adjunta en anexos, y los datos de tipo de vivienda y presencia de vectores por vivienda extraídos de la encuesta basal del proyecto mencionado anteriormente. Es de mencionar, que el dato de tipo de vivienda mide el nivel de riesgo de la misma, clasificado en tres categorías, A, B y C basadas en puntajes relacionados con el estado general de la vivienda, donde se evalúan factores como el tipo de construcción, mantenimiento, y condiciones sanitarias. (Anexo No. 7)

X. RESULTADOS

Caracterización de la población

Se caracterizó a la muestra en estudio utilizando una ficha de datos generales. Se observó que de los 96 perros evaluados 53 eran machos y 43 hembras, 7 de los machos (13.21%) y 2 hembras (4.65%) dieron positivo en los análisis. La distribución de los rangos de edad mostró que la media fue de 1 a 3 años (51.04%), seguida por menores de un año (22.92%), de 4 a 6 años (14.58%) y por último mayores de 6 años (8.33%), siendo el rango más afectado el de 1 a 3 años (8.89%). Se encontró ectoparásitos en la mayoría de perros evaluados (81.25%) además se obtuvo según la misma ficha que la mayoría de los perros habían sido vacunados y desparasitados sin embargo, este dato no fue tomado para análisis ya que no se contaba con el carné de vacunación en ninguno de los casos. Respecto al lugar donde duermen los perros se observó que el 53.12% duermen adentro de la vivienda y el 46.86% duermen afuera. Para el tipo de casa se obtuvo que el 72.92% de perros pertenecen a viviendas tipo C, es decir, viviendas en riesgo de infestación y por ende de transmisión e infección, mientras que el 27.08% pertenece a viviendas de riesgo medio y bajo. Se observó que el 43.75% de viviendas tuvo presencia de insectos vectores (chinchas) según la encuesta basal del proyecto NSF.

Para caracterizar a la población en estudio se utilizó la encuesta del proyecto mencionado anteriormente y la encuesta de datos generales de perros, evaluada a la par de la toma de muestra. Y para el análisis estadístico se creó una base de datos en Excel compilando los datos de interés de ambas encuestas para su posterior análisis en los software Open epi versión 3 y Epi info 7.

Se calculó la medida de asociación chi cuadrado y la razón de riesgos (odds ratio) para las variables de sexo, edad, presencia de ectoparásitos, vacunación, desparasitación, lugar donde duermen los perros, tipo de casa a la que pertenecen y presencia de vectores en la casa, sin encontrarse significancia estadística en ninguno. (Tabla No 1)

Tabla No. 1 Aspectos epidemiológicos y su asociación con la enfermedad de Chagas en perros de El Chaperno, Jutiapa.

	Perros positivos n (%)	Perros negativos n (%)	Total (N= 96)	OR (IC 95%)	P value
Categorías					
Machos	7(13.21)	46 (86.79)	53		
Hembras	2 (4.65)	41(95.35)		3.0864 (0.6454 -22.73)	0.1526
			43		
Edad					
< 1 año	2 (8.33)	22 (91.67)	24		
1- 3 años	4 (8.89)	45 (91.84)	49		
4-6 años	1 (6.67)	14 (93.33)	15		
>6 años	2 (25.00)	6 (75.00)	8		
Edad agrupada					
0-6 años	7 (7.95)	81 (92.05)	88		
Mayores de 6	2 (25.00)	6 (75.00)	8	3.775 (0.452- 22.22)	0.1883
Ectoparásitos					
Si	8 (88.89)	70(89.74)	78		
No	1(11.11)	17 (94.44)	18	1.932 (0.2808- 45.88)	0.6068
Lugar donde duermen					
Adentro	4 (7.84)	47 (92.16)	51		
Afuera	5 (11.11)	40 (88.89)	45	0.6836 (0.1538 -2.875)	0.6047
Tipo de casa					
A y B	3 (11.54)	23 (88.46)	26		
C	6 (8.57)	64 (91.43)	70	0.7214 (0.1653-3.785)	0.6571
Presencia de chinches					
Si	5 (11.90)	37 (88.10)	42		
No	4 (7.41)	50 (92.59)	54	1.68 (0.3991- 7.474)	0.4783

Fuente: Datos experimentales

Evaluación de prevalencia

La población evaluada constó de 96 perros que fueron evaluados por hemaglutinación indirecta (HAI) y por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La frecuencia de seropositividad fue 9.38% en perros por el método de hemaglutinación indirecta y de 2.08% de detección del parásito por el método de reacción en cadena de la polimerasa. La prevalencia de la enfermedad de Chagas en perros de la aldea El Chaperno, Jutiapa fue de 9.38%.

Tabla No. 2. Detección de anticuerpos IgG y parasitemia de la enfermedad de Chagas en perros de la aldea El Chaperno, Jutiapa Guatemala

	Prueba serológica	Prueba molecular
	HAI	PCR
Positivos	9 (9.38%)	2 (2 %)
Negativos	87 (90.62%)	94 (98%)
TOTAL	96 (100%)	96 (100%)

Análisis serológico

Se detectó anticuerpos IgG a través del análisis de hemaglutinación indirecta (HAI) en 9 de los 96 muestras de suero de perros, dando como resultado una frecuencia para enfermedad de Chagas crónica de 9.38%. Estas muestras además fueron confirmadas a través de un ensayo inmunoenzimático modificado (ELISA).

El método HAI mostró resultados positivos en algunas muestras desde el primer tamizaje y en otras se realizó un pre tratamiento con diluciones para eliminar anticuerpos heterófilos. En la Figura No. 4-A se observan las muestras positivas 30, 64, 68, 174, 184, 185 evaluadas en el primer tamizaje. Y en la figura 4-B se puede observar diluciones de las muestras en el primer tamizaje, luego de ser tratadas para eliminar interferencia por anticuerpos heterófilos.

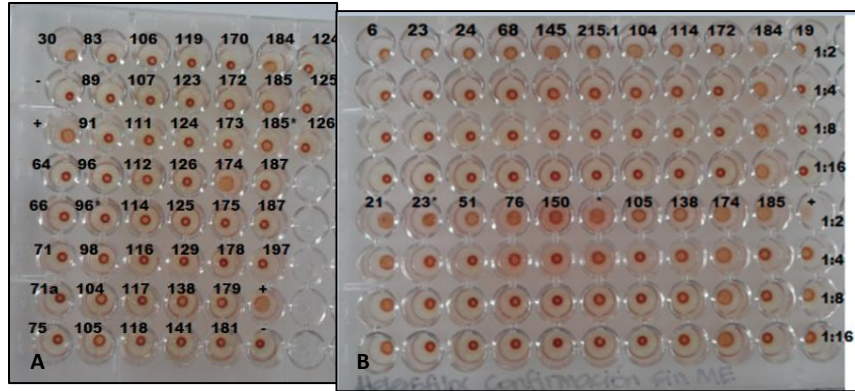


Figura No. 4A Prueba de Hemaglutinación indirecta tamizaje **Figura No. 4B** Prueba de heterofilia en muestras pre-tratadas para eliminación de anticuerpos heterófilos.

PCR

El análisis mediante la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permitió detectar como resultado dos perros positivos por detección del parásito en sangre completa, es decir una frecuencia de parasitemia o infección activa de 2.08% para enfermedad de Chagas. Cabe mencionar que los mismos individuos de esta frecuencia también fueron positivos por anticuerpos.

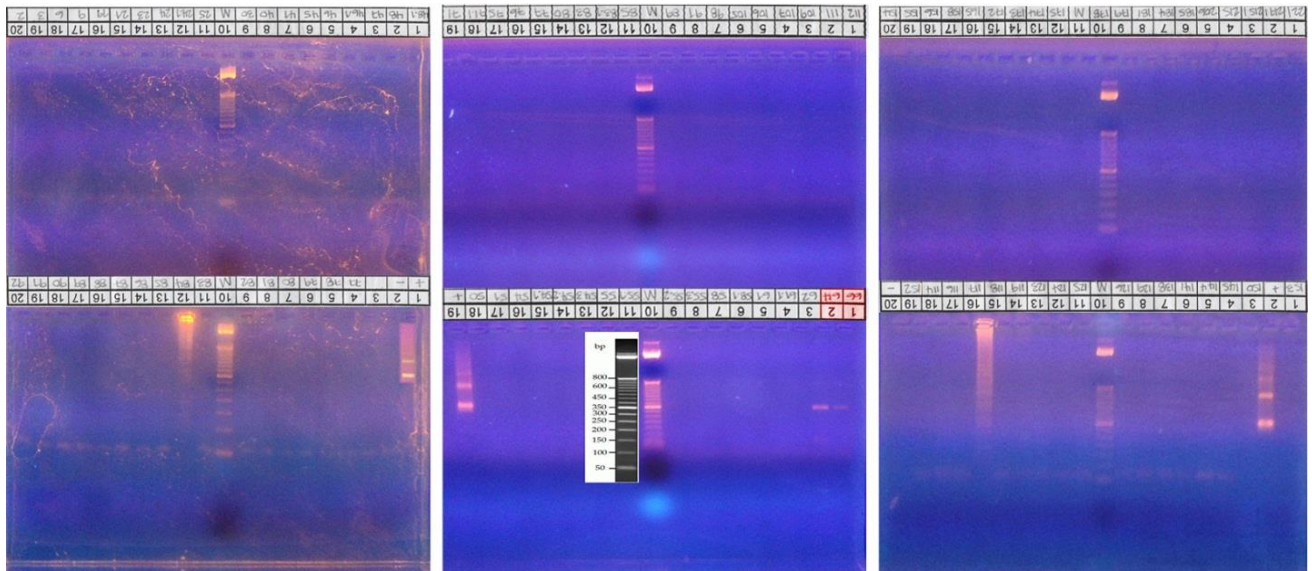


Figura No. 5. Geles de agarosa con los resultados de la amplificación de todas las muestras de la aldea El Chaperno.

Se detectó un fragmento de 330 pares de bases utilizando el cebador 121-122 que va dirigido al fragmento minicírculo del kinetoplasto en 2 (2.08%) de las muestras de ADN de perro evaluado. Como se puede observar en el segundo gel de la figura no. 5 donde las muestras 64 y 66 tienen la banda en referencia de la escalera molecular.

Tabla No. 3 Factores de riesgo evaluados en perros positivos

No. Mx	Tipo casa	Edad del perro (años)	Sexo	Presencia de Ectoparásitos	Lugar donde duermen	Presencia de vectores
21	C	>6	M	No	Afuera	No
30	B	1-3	M	Si	Afuera	No
48.1	A	<1	H	Si	Adentro	Si
64	C	<1	M	Si	Afuera	Si
66	C	1-3	M	Si	Afuera	No
174	C	>6	M	Si	Adentro	Si
184	B	1-3	M	Si	Adentro	Si
185	C	3-6	M	Si	Adentro	No
187	C	<1	H	Si	Afuera	Si

XI. DISCUSIÓN

El principal objetivo de este estudio, fue determinar la prevalencia de infección por *T. cruzi* en perros de la aldea El Chaperno Jutiapa, que es área endémica para el vector y la enfermedad, utilizando para la detección un método serológico y uno molecular. Los resultados muestran una prevalencia de 9.38% de la enfermedad de Chagas.

La importancia de la prevalencia de infección por *T. cruzi* en perros radica en el riesgo que implican para la transmisión doméstica y en la utilidad de los mismos como indicadores de la presencia del parásito en una comunidad. Así como se ha demostrado en los estudios de Gürtler et. al., 1996 donde se observó que el riesgo de infección para el vector es 50 veces más alto si este se alimenta de un perro infectado. Además se ha propuesto utilizar estos datos como centinelas de la transmisión e infección entre el espacio peridoméstico y doméstico, pero son de mayor utilidad si pueden ser contrastados con los datos de prevalencias en mujeres en edad fértil, embarazadas y niños aunados al registro de intervenciones y factores de riesgo de las viviendas. En este estudio se observó que la seroprevalencia en perros (9.38%) es un indicador de que en esta región se sigue transmitiendo el parásito, dato que correlaciona con estudios previos no publicados realizados por el MSPAS y la USAC donde se ha encontrado casos positivos en humanos agudos y crónicos. Catalá, S. S., Crocco, L. B., Muñoz, A., Morales, G., Paulone, I., Giraldez, E., & Ripol, C. (2004)

Por las recientes intervenciones de fumigación con piretroides se esperaba encontrar una baja prevalencia de positividad para perros lo que se explica en relación al cambio de vector de *Rhodnius prolixus* y re-adaptación de *Triatoma dimidiata*.

En la caracterización epidemiológica de la población de perros de la aldea El Chaperno se observó que de los 96 perros evaluados, 53 (55.21%) eran machos y 43 (44.79%) eran hembras de los cuales el 13.21% de los machos y el 4.65% de las hembras estaba infectados por *T. cruzi*. Un porcentaje más alto de perros machos estaba infectado que de hembras y según lo que se ha observado del comportamiento de los perros en las aldeas es que los perros machos acompañan a los jefes de familia a sus trabajos de siembra, cosecha y colecta de leña, y por esta razón tienen alta movilidad dentro del entorno domiciliar y peridomiciliar de las comunidades afectadas. Se cree que además la forma de contagio más prevalente y riesgosa puede ser el masticar o engullir

a los vectores entre sus mandíbulas donde directamente pueden entrar en contacto con las heces de los mismos por vía oral. El contacto por vía oral con las heces de los vectores es una de las formas más efectivas de contagio en perros, y esto se ha demostrado experimentalmente infectando con pequeñas dosis de heces parasitadas a los mismos (Manrique et al., 2012).

Es común encontrar perros desnutridos, infestados de ectoparásitos, enfermos con sarna y/o lesiones de piel en el área rural, ya que no cuentan con muchas atenciones en salud como vacunas y desparasitantes mucho menos con cuidados nutricionales. Con todas estas deficiencias y problemas el rango de vida media de un perro no sobrepasa los 4 años, siendo muy pocos los perros mayores. En este estudio se observó que más de la mitad de la muestra pertenecían al rango de 1-3 años de edad, seguido por el grupo de cachorros (<1 año), perros de 4 a 6 años y por último los perros mayores de 6 años. En estos últimos se esperaba encontrar una mayor prevalencia de anticuerpos anti *T. cruzi* debido al tiempo de exposición de los mismos en comparación con los perros cachorros y jóvenes. A pesar de que 25% (2/8) de los perros mayores de 6 años en la muestra evaluada estaban infectados, esto no se pudo verificar en el estudio ya que en la muestra trabajada este rango de edad correspondía al 8% (8/96). (Gürtler et al., 1986)

Uno de los factores de riesgo evaluados fue la presencia de ectoparásitos donde se observó que casi la totalidad de los perros evaluados y la mayoría de los perros infectados tenían este factor en común. Aunque no se pudo establecer una relación entre la positividad y la presencia de ectoparásitos, se ha sugerido según lo observado en estudios de Brasil y Argentina, que la presencia de ectoparásitos puede hacer que tengan desnutrición y problemas de la piel lo que puede contribuir a derribar las defensas de los perros y hacerles blanco fácil para el ataque de los vectores (Catalá, S. S., Crocco, L. B., Muñoz, A., Morales, G., Paulone, I., Giraldez, E., ... & Ripol, C. 2004; Manrique et al., 2012)

Se evaluó además dentro de los factores de riesgo la vacunación y desparasitación ya que se ha observado alguna tendencia en estudios anteriores a que estos se asocien a la infección como factores de riesgo y protectores en el caso de la vacunación. Sin embargo, cuando se cuestionó a los dueños en este estudio, la mayoría aseguraron vacunar a sus perros no así desparasitarlos en jornadas de vacunación realizadas por parte del Ministerio de Salud pero no contaban con registros acerca de los mismos. Por tanto, no se tomó en cuenta este dato como un factor

protector para los perros aunque los análisis estadísticos así lo demostrasen, por la falta de verificación de los mismos. (Manrique et al., 2012).

El lugar donde duermen los perros se cree es además otro factor importante en el contagio e infección. En las viviendas se han definido ambientes intradomiciliares y peridomiciliares, los ambientes intradomiciliares son todos aquellos que están bajo el techo de la casa y los peridomiciliares los que engloban el entorno, patio y alrededores de la casa. Según lo observado en estudios realizados en Argentina y en Colombia, los perros corren mayor riesgo de ser infectados si duermen en los corredores de la casa o adentro de la misma. Los vectores provenientes del peridomicilio pueden llegar al intradomicilio (corredores) atraídos por la luz, acarreados en la leña o por animales silvestres con los que los perros entran en contacto. De igual manera si una casa esta infestada por vectores en la noche los mismo al salir a buscar alimento, además de afectar a los humanos que habitan la vivienda los perros, gallinas y gatos que duermen en la misma son afectados. (Gürtler et al., 2006)

En este estudio se observó una dinámica diferente, ya que el número de perros infectados que duermen adentro (7.84%) no varía mucho de los que duermen afuera (11.11%). Una de las razones que podría hacer que el riesgo fuera más alto es el hecho de que los perros salen al peridomicilio para cazar y para acompañar a los dueños en sus jornadas laborales en áreas más alejadas y boscosas en las que el vector habita naturalmente.

A pesar de que se observaron diferentes tendencias en la caracterización de los perros, en los análisis estadísticos de *chi* cuadrado, no se encontró ninguna asociación entre los factores evaluados y la enfermedad de Chagas en la muestra, esto pudo haberse debido a que el número de individuos era muy pequeño para poder hacer una inferencia, por lo que los análisis estadísticos no fueron significativos. Se recomienda realizar estudios especializados.

En el análisis de las muestras se utilizó métodos indirectos para la detección de anticuerpos anti *T. cruzi*. Los métodos indirectos han sido los más utilizados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en humanos. Entre ellos los que detectan anticuerpos, de esta manera cuando se empezó a estudiar la implicación de los reservorios domésticos y silvestres se buscó adaptar estos mismos métodos para diagnosticarlos. Se han utilizado pruebas de diferente principio como Inmunofluorescencia indirecta (IFI), Ensayo inmunoenzimático (ELISA) y

Hemaglutinación indirecta (HAI) para este fin, siendo las dos últimas las más utilizadas. Sin embargo, para obtener mejores resultados se debe estandarizar las pruebas en cada país. En este estudio se utilizó HAI para la detección y ELISA para confirmar los resultados. Se concluyó que es muy importante el tratamiento previo de la muestras para eliminar anticuerpos heterófilos y evitar el análisis de muestras hemolizadas o lipémicas.

De los sueros analizados 9.38% (9/96) fueron positivos para la detección de anticuerpos por HAI estos resultados coincidieron en su mayoría con la presencia de vectores en la vivienda y con el nivel de riesgo de la misma en casi el 50% de los casos. Es interesante observar que en esta muestra de perros evaluada de la aldea El Chaperno es posible que la infección este en una fase crónica ya que en todos se detectó anticuerpos. Estos perros debieron haberse infectado varios años atrás, lo que indica que han estado expuestos en este tiempo al parásito ya sea por el ambiente en el que viven, porque sus casas estén infestadas por vectores que estén movilizando el parásito o por la ingesta de los mismos. Aunado a esto se pudo observar que las intervenciones de rociamiento no han sido efectivas, ya que según las encuestas se han encontrado frecuentemente vectores en las casas. El control vectorial de la enfermedad no es suficiente ya que si los reservorios domésticos, como lo es el perro están infectados y las viviendas donde residen están infestadas o tienen factores de riesgo el ciclo de transmisión continuará.

La detección de anticuerpos puede indicar una infección en fase crónica de la enfermedad. A pesar de la efectividad demostrada de estos métodos, solo los que detectan antígeno y los métodos moleculares nos pueden dar información de una infección activa y se corre el riesgo de tener reacciones cruzadas con otros tripasonómátidos como *Leishmania spp.*

Por esta razón se hizo necesario utilizar otra técnica que nos permitiera detectar aquellos perros que tuvieran una infección activa o en los que se detectara el parásito circulante. Las técnicas moleculares nos permiten obtener estos resultados, por ello en este estudio se utilizó la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *T. cruzi* Se seleccionó el cebador kDNA 121-122 para este análisis ya que ha sido uno de los más utilizados y eficaces para el diagnóstico y monitoreo de la transmisión de la enfermedad de Chagas en humanos y en reservorios en diferentes países. (Schijman, Altcheh, Burgos, Biancardi, Bisio, Levin, & Freilij, 2003; Duffy et al., 2009)

Se detectó en 2.08% (2/94) del ADN de los perros evaluados, la presencia de *T. cruzi* a través de la detección del cebador kDNA 121-122 (F 5'-AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA-3' y R (5'-GGTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-3') dirigido a un mini círculo del kinetoplasto con peso de 330 pares de bases. Esto indica que solo en dos de los perros evaluados se encontró parásito circulante. No se determinó el DTU de la cepa detectada pero por estudios anteriores con diferentes cebadores para *T. cruzi* se cree que la misma corresponde al Tc I o DTU (Discrete typing unit) I ya que el cebador utilizado detecta mayoritariamente esta cepa. Sin embargo este cebador tiene la limitante de no detectar la cepa Tc IV que también se ha detectado en algunos casos. (Ramos-Ligonio, A., Torres-Montero, J., López-Monteon, A., & Dumonteil, E., 2012)

Se ha evidenciado en estudios anteriores además la baja capacidad de (este cebador 121-122) para detectar en bajas concentraciones mayores a diluciones 1:10000, así como en algunas muestras con serología positiva. Por esta razón entre las recomendaciones se sugiere la confirmación de reactividad cruzada, además del uso de otro cebador para mejorar la detección en muestras positivas por serología (Eloy & Lucheis, 2009; Trejo, 2006; Schijman, Bisio, Orellana, Sued, Duffy, Mejia Jaramillo & Ladzins, 2011).

El PCR a pesar de ser un método directo recientemente muy utilizado, no es diagnóstico para la enfermedad y presenta el problema de reactividad cruzada con otras especies de tripanosomátidos como *Trypanosoma rangeli*. Se observó resultados positivos en dos de las muestras por ambos métodos de detección. Esto puede indicar que en estos perros además de encontrarse anticuerpos se encuentra el parásito circulante, por esta razón todos los casos podrían corresponder a una etapa crónica de la enfermedad de Chagas y la parasitemia de estas dos muestras puede corresponder a una reinfección o a la transición de etapa aguda a etapa crónica.

Se evidenció la necesidad de realizar nuevos estudios donde se evalúe la presencia de *T. rangeli* y/o *Leishmania sp.* en las muestras únicamente positivas por serología para descartar que estos resultados hayan sido positivos por reactividad cruzada.

Inicialmente se calculó una prevalencia esperada en base a artículos científicos de México, Costa Rica y Panamá para el número muestral seleccionado. Y posteriormente se obtuvo una prevalencia de 9.38% en los perros evaluados de la aldea El Chaperno, Guatemala, lo cual

coincidió mucho con la prevalencia esperada al iniciar el estudio. Siendo esta aldea perteneciente a una de las áreas endémicas de Guatemala como es Jutiapa, se esperaba una prevalencia alta pero se pudo observar que una de las dificultades es la edad promedio de los perros infectados la cual es muy corta por lo que no se puede captar a la totalidad de los casos.

Según los resultados obtenidos se observó que la distribución de las casas con perros enfermos coincide con la idea de focos infecciosos cercanos entre casas con riesgo y/o con presencia de vectores en una región de la aldea. (Anexo No. 8) Este dato gráfico además tiene una razón explicativa en la alta movilidad de los perros en su entorno intradomiciliar y peridomiciliar entre casas cercanas, como se ha definido en otros países existe una relación entre el flujo de los vectores entre las casas que además tienen factores de riesgo que le permiten colonizar.

Tanto los métodos serológicos como los moleculares son una buena herramienta para realizar una vigilancia epidemiológica en reservorios en regiones endémicas y post-intervención una vez se hayan estandarizado y definido las metodologías, ambos son necesarios.

Ante los resultados se debe proponer una solución o forma de tratamiento para estos perros que se detectaron positivos, ya que esto representa un riesgo elevado para los dueños habitantes de la aldea. Y el uso de collares tratados con deltametrina es indicado para el control y la prevención de la transmisión del parásito, este método ha sido probado para el control de Leishmaniasis y Tripanosomiasis en Argentina y en Brasil, ya que disminuye la frecuencia de alimentación del vector en los perros (Reithinger, Ceballos, Stariolo, Davies & Gürtler, 2005).

XII. CONCLUSIONES

1. Se observó que la vida media de los perros de la aldea no sobrepasa los 3 años (52.13%), por lo que no se pudo evaluar la asociación de la infección en perros mayores de 6 años
2. La seroprevalencia de la Enfermedad de Chagas en perros domésticos de la Aldea El Chaperno, Jutiapa fue de 9.38% IC 95% (3.09- 16.06).
3. La frecuencia de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* en los perros evaluados fue de 9/94 correspondiente a una proporción de 9.38%.
4. Se detectó por medio de la técnica de PCR un 2% (2/94) de *T. cruzi* en las muestras de ADN extraídas de los perros.
5. No se encontró asociación entre los factores demográficos y la condición de la vivienda y del perro con la presencia de la Enfermedad de Chagas.

XIII. RECOMENDACIONES

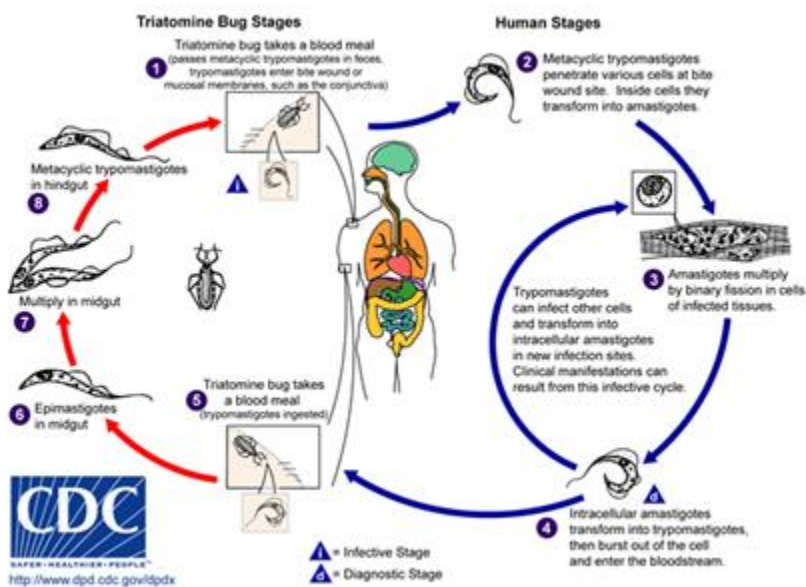
1. Realizar pruebas para evaluar presencia de *Trypanosoma rangeli* y *Leishmania sp.* en las muestras positivas del área, para descartar reactividad cruzada en la detección serológica.
2. Realizar pruebas con otro cebador diferente del kinetoplasto que tenga capacidad de detección en muestras positivas por serología para evaluar de esta forma la distribución del parásito en la región como para ampliar la detección.
3. Aumentar el tamaño de muestra para poder observar de mejor forma si existe significancia estadística.
4. Hacer pruebas en los dueños de los perros que resultaron ser positivos en la evaluación e incluso en las personas que habitan en las viviendas cercanas, dada la alta movilidad de los perros dentro de la aldea.

XIV. ANEXOS

Anexo No. 1 Índice de Infestación por departamento Años 2008-2010. MSPAS 2011

INDICE DE INFESTACION INTRADOMICILIAR POR DEPARTAMENTO AÑOS 2008-2010			
DAS	2008	2009	2010
Alta Verapaz	2.6	0.5	1.14
Baja Verapaz	2.3	2.6	2.1
Chiquimula	1.6	0.0	1.5
El Progreso	0.2	0.6	0.4
Huehuetenango	1.1	0.6	0.9
Jalapa	4.0	4.2	2.6
Jutiapa	8.0	17.7	9.4
Quiche	0.9	0.9	0.8
Santa Rosa	1.2	3.1	2.0
Zacapa	0.2	0.3	0.4
Total	2.2	1.6	1.9

Anexo No. 2 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* Disponible en la página web de consulta de CDC en español: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>.



Anexo No. 3 Encuesta de Epidemiológica de perros

<i>Ficha Epidemiológica de Perros El Chapemo Jutiapa</i>		No. de casa:
Fecha:	Responsable:	No. total de perros por casa:
Marque con una X, la respuesta según corresponda		
EDAD:	Menor de 1 año	1-3 años
	4-6 años	Mayor de 6 años
SEXO	Macho	Hembra
ECTOPARÁSITOS:	SI	NO
VACUNACIÓN TODOS LOS AÑOS	SI	NO
DESPARASITADOS	SI	NO
Donde duermen los perros	Afuera	Adentro
Observación:		

Anexo. No. 4 Consentimiento informado

No.

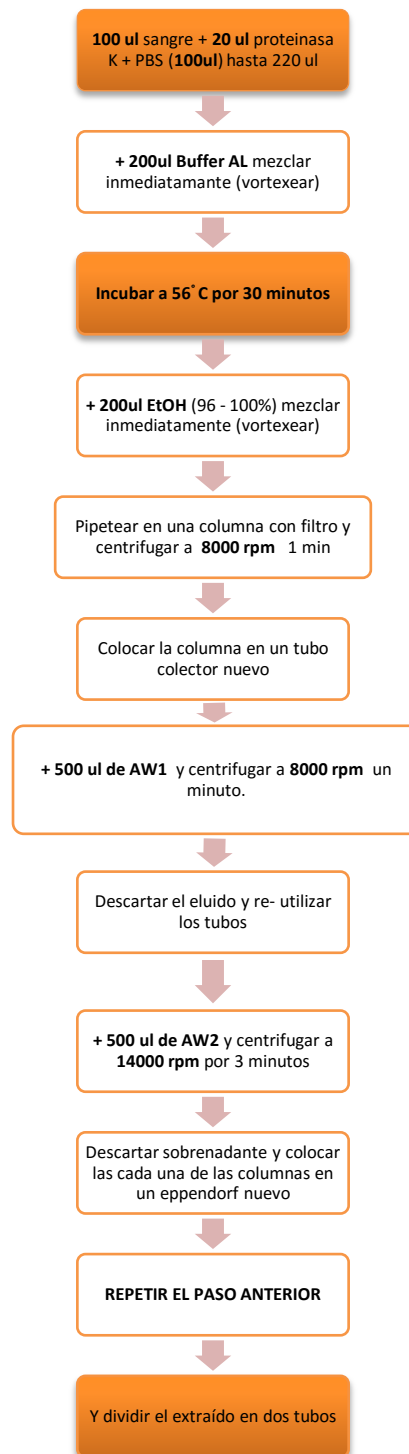
Guatemala ___de___ del 2013

Yo, _____ autorizo que sea utilizado una pequeña cantidad del suero de mi perro, para detectar la presencia de anticuerpos de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, como parte de la investigación: "Detección de *T. cruzi* en canes domésticos como reservorio de importancia epidemiológica, por un método indirecto (ELISA) y uno Directo (PCR)". Los resultados del análisis serán entregados personalmente. Acepto que se me brindo información acerca de la enfermedad.

Firma: _____

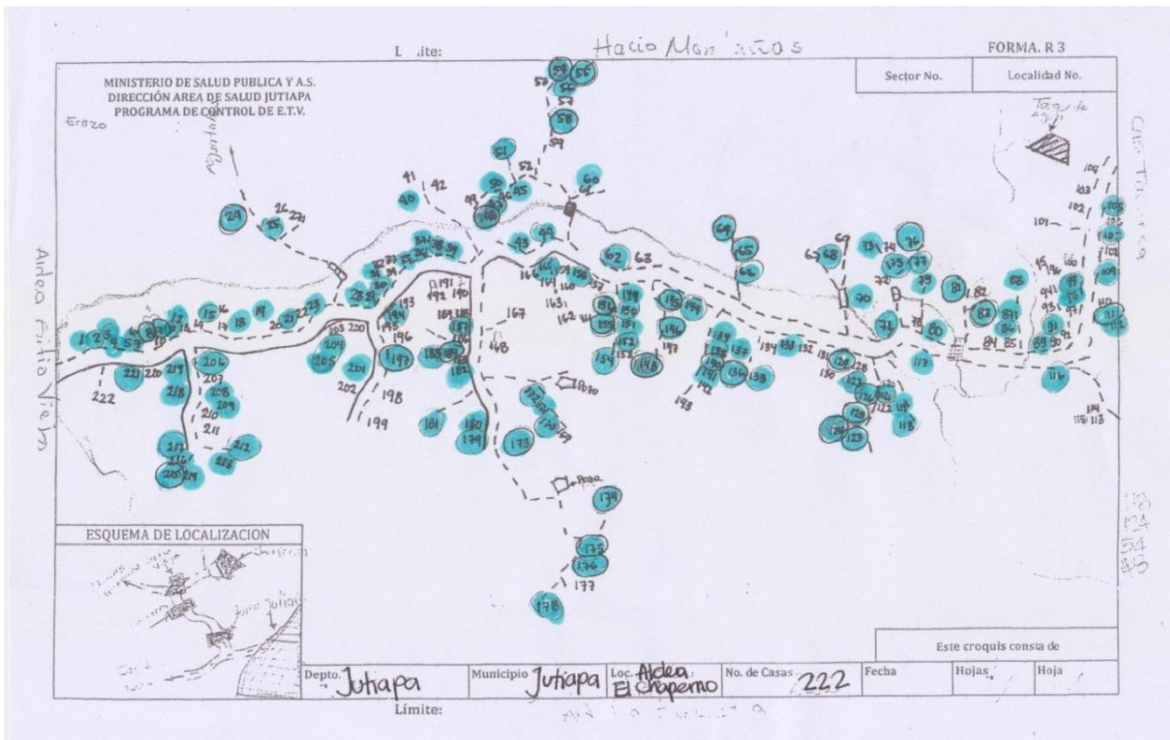
Teléfono _____

Anexo No. 5 Protocolo de Extracción de ADN a partir de sangre.



*Disponible en el manual del kit Blood & Tissue de QIAGEN. 201

Anexo No. 6 Mapa de casas con perro y casas muestreadas de la Aldea El Chaperno, Jutiapa



Anexo No. 7 Clasificación de tipo de vivienda

NIVEL DE RIESGO DE LA VIVIENDA: Si la casa tiene la condición que se está evaluando asignar el puntaje correspondiente. Con base en el TOTAL asignar la clasificación respectiva.

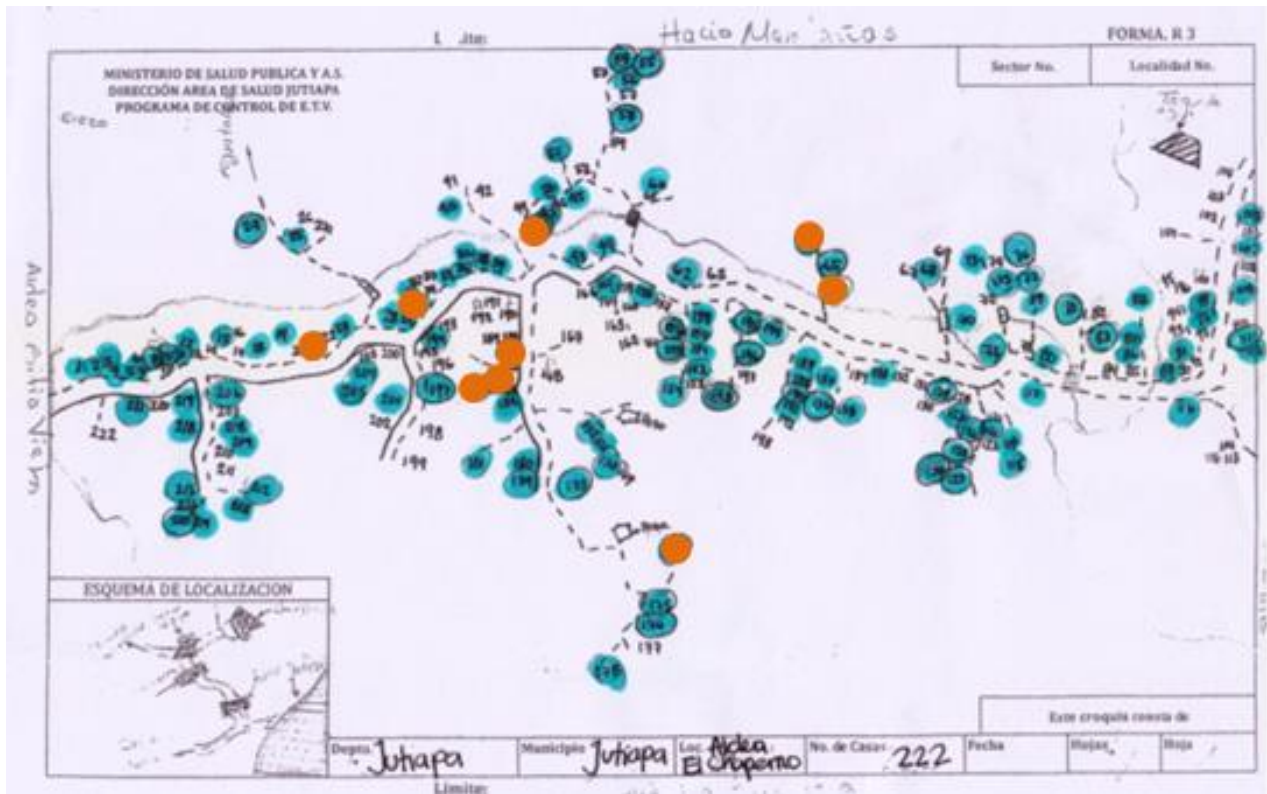
CONDICIÓN A EVALUAR	1 A 10	PUNTEO ASIGNADO
Paredes internas de bajareque o adobe agrietadas o deterioradas	4 puntos	
Presencia de animales domésticos dentro de la casa o rastros de que duermen dentro	1.5 puntos	
Gallinero pegado a la vivienda	1.5 puntos	
Leña dentro de la casa	1 punto	
Acúmulo de materiales de construcción como adobes, tejas, blocks... con más de 6 meses sin moverlos	1 punto	
Acúmulo de objetos, desorden y suciedad	0.5 puntos	
Piso de tierra suelto, sin barrer y sucio	0.5 puntos	
TOTAL	10 MÁXIMO VALOR	=

*Nota: 0.5 se aproxima al número superior

- A. Bajo riesgo: de 0 a 2 puntos
- B. Mediano riesgo: de 3 a 4 puntos
- C. Alto riesgo: de 5 a 10 puntos

*Tomado de la Encuesta Basal del proyecto “**Modeling disease transmission using spatial mapping of vector-parasite genetics and vector feeding patterns**” de National Science Foundation (NSF).

Anexo No. 8 Distribución de casos positivos en Aldea El Chaperno



XV. BIBLIOGRAFÍA

- Araújo, F. M. G., Bahia, M. T., Magalhães, N. M., Martins- Filho, O. A., Veloso, V. M., Carneiro, C. M., Tafuri, W. L., & Lana, M. (2002) Follow – up of experimental chronic Chagas disease in dogs : use of polymerase chain reaction (PCR) compared with parasitological and serological methods. *Acta Tropica*, 81, 21 -31.
- Beard, C. B., Pye, G., Steurer, F. J., Rodriguez, R., Campman, R., Townsend Peterson, A., Ramsey, J., Wirtz, R. A., & Robinson, L. E., (2003) Chagas Disease in a Domestic Transmission cycle in Southern Texas, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 9 (1) 103-105.
- Bradley, K., Bergman, D.K., Woods, P., Crutcher, J., & Kirchhoff, L. (2000) Prevalence of American Trypanosomiasis (Chagas disease) among dogs in Oklahoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217 (12) 1853- 1857.
- Bustamante, D. M., De Urioste-Stone, S. M., Juárez, J. G., & Pennington, P. M. (2014). Ecological, social and biological risk factors for continued *Trypanosoma cruzi* transmission by *Triatoma dimidiata* in Guatemala. *PLoS One*, 9(8), e104599.
- Catalá, S. S., Crocco, L. B., Muñoz, A., Morales, G., Paulone, I., Giraldez, E., ... & Ripol, C. (2004). Entomological aspects of Chagas' disease transmission in the domestic habitat, Argentina. *Revista de Saúde Pública*, 38(2), 216-222.
- Crisante, G., Rojas, A., Texeira, M. & Añez, N. (2006) Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. *Acta Tropica* 98, 247-254.
- Diosque, P., Padilla, A. M., Cimino, R. O., Cardozo, R. M., Negrette, O. S., Marco, J. D., & Basombrio, M. A. (2004). Chagas disease in rural areas of Chaco Province, Argentina:

epidemiologic survey in humans, reservoirs, and vectors. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 71(5), 590-593.

Duffy, T., Bisio, M., Altcheh, J., Burgos, J. M., Diez, M., Levin, M. J., & Schijman, A. G. (2009). Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(4), e419

Dumonteil, E., Ruiz- Piña, H., Rodriguez- Felix, E., Barrera- Pérez, M., Ramírez- Sierra, MJ., et al. (2004). Re- Infestation of houses by *Triatoma dimidiata* after intra-domicile insecticide application in the Yucatán Península, Mexico. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99 (3), 253 -256.

Eloy, LJ., & Lucheis, SB. (2009). Canine Trypanosomiasis: Etiology of infection and implications for public health. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 15 (4), 589- 611.

Enríquez, G. Cardinal, M, Orozco M., Schijman, A. & Gürtler, R. (2013) Detection of *Trypanosoma cruzi* in naturally infected dogs and cats using serological, parasitological and molecular methods. *Acta Tropica*, 126, 211- 217.

Enríquez, G. F., Bua, J., Orozco, M. M., Wirth, S., Schijman, A. G., Gürtler, R. E., & Cardinal, M. V. (2014). High levels of *Trypanosoma cruzi* DNA determined by qPCR and infectiousness to *Triatoma infestans* support dogs and cats are major sources of parasites for domestic transmission. *Infection, Genetics and Evolution*, 25, 36-43.

Estrada- Franco, J. G., Bhatia, V., Diaz- Albiter, H., Ochoa- Garcia, L., Barbabosa, A., Vasquez- Chagoyan, J. C., Martinez- Perez, M., Guzman- Bracho, C., & Garg, N. (2006) Human *Trypanosoma cruzi* Infection and Seropositivity in Dogs , Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 12 (4) 624- 630.

- Flores- Chávez, M., de Fuentes, I., Garate, T., & Cañavate, C. (2007). Diagnóstico de Laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25 (3) 29- 37.
- Turriago- Gómez, B. C., Vallejo, G.A., & Guhl, F. (2008). Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* in dogs from two endemic areas of Colombia. *Revista Medica*, 16(1), 11-18.
- Gürtler, R. E., & Yadon, Z. E. (2015). Eco-bio-social research on community-based approaches for Chagas disease vector control in Latin America. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 109(2), 91-98.
- Gürtler, R. E., Cecere, M. C., Lauricella, M. A., Cardinal, M. V., Kitron, U., & Cohen, J. E. (2006) Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology*, 134, 69 – 82.
- Gürtler, R., Ceballos, L., Ordóñez- Krasnowski, P., Lanati, L., Stariolo, R., & Kitron, U. (2009) Strong Host-feeding preferences of the Vector *Triatoma infestans* Modified by vector density: Implications for the Epidemiology of Chagas Disease. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 3 (5) 1- 12.
- Gürtler, R., Lauricella, M., Solarz, N., Bujas, M. & Wisnivesky – Colli, C. (1986) Dynamics of *Trypanosoma cruzi* in a Rural Area of Argentina. I – The dog reservoir: an epidemiological profile. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 28 (1), 28 – 35.
- Gürtler, RE., Solard, N., Lauricella, MA., Haedo, AS., Pietrokovski, SM., et al. (1996). Dynamics of transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of Argentina. III Persistence of *T. cruzi* parasitemia among canine reservoirs in a two year follow up. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* , 28 (4), 213-219.

- Hashimoto, K. (2015) La lucha contra la enfermedad de Chagas en Centroamérica. Una perspectiva japonesa. (pp. 266 Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA), Honduras.
- Hashimoto, K., Alvarez, H., Nakagawa, J., Juarez, J., Monroy, C, Cordon- Rosales, C., Gil, E. (2012). Vector control intervention towards interruption of transmission of Chagas disease by *Rhodnius prolixus*, main vector in Guatemala. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*. 107 (7) 887- 887.
- Hashimoto, K., Cordon- Rosales, C., Trampe, R., & Kawabata, M. (2006). Impact of single and multiple residual spraying of pyrethroids insecticides againsts *Triatoma dimidiata* (Reduviidae: Triatominae), the principal vector of Chagas Disease in Jutiapa, Guatemala. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75 (2), 226- 230.
- Jimenez- Coello, M., Poot- Cob, M., Ortega- Pacheco, A., Guzman- Marin, E., Ramos –Ligonio, A., Sauri- Arceo, C. H. & Acosta- Viana, K. Y. (2008) American Trypanosomiasis in Dogs from an Urban and Rural Area of Yucatan, Mexico. *Vector- borne and Zoonotic Diseases*, 8, 6, 755- 561.
- Machuca- Hernández, J.EA. (2000) Detección de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre por medio de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) como un método específico en el diagnóstico rápido de la Enfermedad de Chagas. (Tesis de grado de Química Biológica).Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Manrique- Abril, D., Manrique – Abril, F., Lorca, M. & Ospina, J. (2012) Prevalencia de anticuerpos para *Trypanosoma cruzi* en caninos de dos municipios endémicos de Boyacá. *Revista MVZ Córdoba*, 17, 1, 2916- 2923.
- Márquez, I., (2003). Enfermedad de Chagas Revisión Bibliográfica. (Tesis de grado). Universidad Autónoma Veracruzana. México.

- Monroy C., Bustamante, DM., Pineda, S., Rodas, A., Castro, X., Ayala, V., Quiñonez, J., Moguel, B. (2009). House improvements and community participation in the control of *Triatoma dimidiata* re-infestation in Jutiapa, Guatemala. *Cadernos de Saúde Publica*. 25(1) 168- 178.
- Monroy, C., Bustamante, D.M., Rodas, A., Rosales, R., Mejía. M. et al. (2003) Geographic Distribution and Morphometric Differentiation of *Triatoma nítida* Usinger 1939 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Guatemala. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (1) 37 – 43.
- Monroy, C., Castro, X., Bustamante, DM., Pineda, SS., Rodas, A., Moguel, B., Ayala, V., & Quiñonez, J., (2012). *An ecosystem approach for the prevention of Chagas disease in Rural Guatemala*. En Charron, D. F. *Ecohealth research in practice* (pp. 255-271). Springer New York.
- Monroy, C., Rodas, A., Mejía, M., Rosales, R. & Tabaru, Y. (2003) Epidemiology of Chagas Disease in Guatemala: Infection rate of *Triatoma dimidiata*, *Triatoma nitida* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida, Tripanosomatidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (3) 305-310.
- Montenegro, V. M., Jiménez, M., Pinto Dias, JC. & Zeledón, R. (2002) Chagas Disease in Dogs from Endemic Areas of Costa Rica. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97 (4) 491-494.
- MSPAS (2011) Enfermedad de Chagas en Guatemala. Plan Nacional Estratégico para la prevención y control de la enfermedad de Chagas 2011- 2016. Disponible en http://www.jica.go.jp/project/guatemala/0700558/news/general/pdf/20110819_01_01.pdf

- Nieto, P. D., Boughton, R., Dorn, P. L., Steurer, F., Raychaudhuri, S., Esfandiari, J., Gonçalves, E., Diaz, J., & Malone, J. B. (2009) Comparison of two immunochromatographic assays and the indirect immunofluorescence antibody test for diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs in south central Louisiana. *Veterinary Parasitology* 2009, 241- 247.
- Noireau, F., Diosque, P., & Jansen, AM. (2009) *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its host. *Veterinary Research* 40: 26, 1-23.
- Orozco, M. (2009). Situación de la enfermedad de Chagas en Guatemala, enero-junio 2009. Centro nacional de epidemiología, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala.
- Pellecer, MJ., Dorn, PL., Bustamante, DM., Rodas, A. & Monroy, C. (2013) Vector blood meals are an early indicator of the effectiveness of the Ecohealth approach in Halting Chagas transmission in Guatemala. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 88 (4), 638- 644.
- Pineda, V., Saldaña, A., Monfante, I., Santamaría, A., Gottdenker, N. L., Yabsley, M. J., Rapoport, G., & Calzada, J. E. (2011) Prevalence of trypanosome infections in dogs from Chagas disease endemic regions in Panama, Central America. *Veterinary Parasitology* 178, 360 – 363.
- Pizarro, J.C., & Stevens. L., (2008) A New Method for Forensic DNA analysis of the Blood Meal in Chagas Disease Vectors demonstrated using *Triatoma infestans* from Chuquisaca, Bolivia. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 3 (10) 1- 8.
- Portugal- García, C., García- Vásquez, Z., Monteón- Padilla, V., Chavéz –López, V, Olamendi- Portugal, M. & Ramos, C. (2001) Anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en humanos y perros y presencia del parásito en *Meccus pallidipennis* en la localidad de Puente Pantitlán, Morelos, México. *Revista Biomédica*, 22 (3) 67 – 75.

- Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (2012). Manual Operativo de Vigilancia y Control Entomológico de la Enfermedad de Chagas.
- Ramos-Ligonio, A., Torres-Montero, J., López-Monteon, A., & Dumonteil, E. (2012). Extensive diversity of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units circulating in *Triatoma dimidiata* from central Veracruz, Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(7), 1341-1343.
- Rassi, A.J., Rassi, A. & Marcondes, J (2012) American Trypanosomiasis (Chagas disease). *Journal of Infectious Disease Clinics of North America*. 26, 275 -291. doi:10.1016/j.idc.2012.03.002
- Reithinger, R., Ceballos, L., Stariolo, R., Davies, C. R., & Gürtler, R. E. (2005). Chagas disease control: deltamethrin-treated collars reduce *Triatoma infestans* feeding success on dogs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99(7), 502-508.
- Reyes, L., Silesky, E., Cerdas, C., Chinchilla, M., & Guerrero, O. (2002) Presencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en perros de Costa Rica. *Parasitología Latinoamericana*, 57, 66-68.
- Ribeiro- Dos- Santos, G., Nishiya, A. S., Sabino, E. C., Chamone, D. F., & Saénz- Alquézar, A. (1999) A n improved, PCR – based strategy for the detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 93 (7) 689 – 694.
- Rosales- Rizzo, M. F., (2011) Determinación de la presencia de *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* en tucuacines (*Didelphidae*) de vida libre en los departamentos de Jutiapa y Santa Rosa, Guatemala. (Tesis de grado de Medicina Veterinaria). Universidad de San Carlos de Guatemala.

- Schijman, A. G., Altcheh, J., Burgos, J. M., Biancardi, M., Bisio, M., Levin, M. J., Freilij, H. (2003) Aetiological treatment of congenital Chagas disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 441-449.
- Schijman, A. G., Bisio, M., Orellana, L., Sued, M., Duffy, T., Mejia Jaramillo, A. M. & Ladzins, J. (2011). International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(1), e931.
- Tabaru, Y, Monroy, C., Rodas, A., Mejía, M. & Rosales, R. (1999). The geographical distribution of vectors of Chaga's disease and populations at risk of infection in Guatemala. *Medical Entomology & Zoology* 50 (1) 9-17.
- The Center for Food Security & Public Health (CFSPA), Iowa State University. (2009) American Trypanosomiasis (Chagas Disease). Retrieved from http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/trypanosomiasis_american.pdf.
- Trejo, S. (2006). Polymerase Chain Reaction (PCR) Evaluation of Three Primer Pairs for Detection of *Trypanosoma cruzi* (Chagas Disease) in Clinical Samples. *Saint Martin's University Biology Journal*, 1(May). Retrieved from http://homepages.stmartin.edu/fac_staff/molney/website/SMU Bio Journal/Trejo 2006.pdf
- Umezawa, E. S., Souza, A. I., Pinedo- Cancino, V., Marcondes, M., Marcili, A., Camargo, L. M.A., Camacho, A.A., Stolf, A. M. S., & Texeira, M.M. G. (2009) TESA- blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co- endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. *Acta Tropica* 111, 15 – 20.
- Vargas- Gudiel, A. M., (2000) Detección de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre completa por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando los cebadores

121 y 122 del ADN minicírculo del kinetoplasto. (Tesis de grado de Química Biológica).
Universidad de San Carlos de Guatemala.

Walker, J. A., Hughes, D. A., Hedges, D. J., Anders, B. A., Laborde, M. E., Shewale, J., Batzer, M. (2004). Quantitative PCR for DNA identification based on genome-specific interspersed repetitive elements. *Genomics*, 83(3), 518–527. <http://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.09.003>

Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M., & Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 240-253.

Zulantay, I. A. (2005). Enfermedad de Chagas Crónica. Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) aplicada al Diagnóstico y Evaluación Quimioterapéutica (Tesis de Doctorado). Universidad de Granada. España.

Br. Gabriela Anaité Rodas Enríquez

AUTORA

Licda. Carla Fabiola Alvarado Sánchez

ASESORA

Licda. María Eugenia Paredes, M.A.

REVISORA

MSc. Alba Marina Valdés de García

DIRECTORA DE ESCUELA

Ph.D. Rubén Dariel Velásquez Miranda

DECANO