

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Leptospira interrogans* EN ROEDORES SINANTRÓPICOS DE LA ALDEA EL MILAGRO, MASAGUA, ESCUINTLA UTILIZANDO LA TÉCNICA DE PCR

RAÚL ALBERTO DÍAZ PORTILLO

Médico Veterinario

GUATEMALA, JULIO DE 2011

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Leptospira interrogans* EN ROEDORES SINANTRÓPICOS DE LA ALDEA EL MILAGRO, MASAGUA, ESCUINTLA UTILIZANDO LA TÉCNICA DE PCR.

TESIS

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

RAÚL ALBERTO DÍAZ PORTILLO

Al conferírsele el Grado Académico de

Médico Veterinario

GUATEMALA JULIO DE 2011

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO: Med. Vet. Leónidas Ávila Palma
SECRETARIO: Med.Vet. Marco Vinicio García Urbina
VOCAL I: Lic. Zoot. Sergio Amilcar Dávila Hidalgo
VOCAL II: Mag. Sc. Med, Vet. Dennis Sigfried Guerra Centeno
VOCAL III: Med. Vet. y Zoot. Mario Antonio Motta González
VOCAL IV: Br. Javier Enrique Baeza Chajón
VOCAL V: Br. Ana Lucia Molina Hernández

ASESORES:

Med. Vet. Blanca Josefina Zelaya De Romillo
Mag. Sc. Med. Vet. Dennis Guerra Centeno
Med.Vet. Virginia Bolaños de Corzo

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

**En cumplimiento con lo establecido por los estatutos de la
Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su
consideración el trabajo de tesis titulado:**

**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Leptospira
interrogans* EN ROEDORES SINANTRÓPICOS DE LA
ALDEA EL MILAGRO, MASAGUA, ESCUINTLA
UTILIZANDO LA TÉCNICA DE PCR.**

**Que fuera aprobado por la Honorable Junta Directiva de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

Como requisito previo a optar el título profesional de

MÉDICO VETERINARIO

TESIS QUE DEDICO

- A DIOS:** Por guiarme y haberme permitido llegar hasta esta etapa de mi vida.
- A MIS PADRES:** Raúl Antonio Díaz García y Rosa Arcelí Portillo Casasola
- A MIS HERMANAS:** Yesenia Aracelí, Claudia Lorena y Nancy Julissa.
- A MI FAMILIA:** Por apoyarme y estar siempre presentes.
- A MIS ASESORES:** Por guiarme en este proyecto
- A MIS AMIGOS:** David Isaac Sierra (Q.E.P.D), Juan José Chávez López, Maritza Yaquian, Rosa Marisol González, Samuel Mérida, Luis Emilio Escobar, Manuel Lepe, Leónidas Gómez por las experiencias y momentos compartidos. A mis compañeros de promoción que me acompañaron en la aventura de estudiar esta carrera.

AGRADEMICIENTOS

A DIOS

A MIS PADRES

A MI HERMANAS

A MI FAMILIA

A UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

A MIS ASESORES

A LA MED. VET. BLANCA ZELAYA DE ROMILLO, MED. VET. VIRGINIA DE CORZO, MAG. SC. M.V. DENNIS GUERRA, LICDA. LETICIA DEL CASTILLO, LICDA. MARIA LUISA DE LOPEZ, LIC. VALERO RAMIREZ.

AL INSTITUTO PEDRO KUORI, HABANA CUBA Y SUS PROFESIONALES LICDA. CARMEN FERNANDEZ Y LICDA. YARELYS ZAMORA.

A LA FACULTAD DE FARMACIA, A LA LICDA. SHIRLEY SIKAHALL Y LICDA. SARA GALINDO.

A LA COMUNIDAD DE LA ALDEA EL MILAGRO, MASAGUA, ESCUINTLA, A SUS LÍDERES COMUNITARIOS, A SU ALCALDE Y AL PERSONAL DEL CENTRO DE SALUD.

MUCHAS GRACIAS.

ÍNDICE

| | | |
|-------------|---|----|
| I. | INTRODUCCIÓN | 01 |
| II. | HIPÓTESIS | 02 |
| III. | OBJETIVOS | 03 |
| 3.1 | OBJETIVO GENERAL | 03 |
| 3.2 | OBJETIVO ESPECIFICO | 03 |
| IV. | REVISIÓN DE LITERATURA | 04 |
| 4.1 | Definición de <i>Leptospira</i> | 04 |
| 4.2 | Taxonomía de la <i>Leptospira interrogans</i> | 04 |
| 4.3 | Epidemiología | 05 |
| 4.4 | Factores de virulencia | 05 |
| 4.5 | Resistencia del agente | 06 |
| 4.6 | Diagnóstico bacteriológico | 06 |
| 4.7 | Métodos serológicos | 07 |
| 4.8 | Métodos bacteriológicos | 07 |
| 4.9 | Métodos biología molecular | 07 |
| 4.9.1 | Prueba de Reacción en Cadena (PCR) | 08 |
| 4.10 | Factores epidemiológicos relacionados con los roedores | 09 |
| 4.11 | Antecedentes de leptospirosis en roedores sinantrópicos | 10 |
| 4.12 | Generalidades de los roedores sinantrópicos | 11 |
| 4.12.1 | Rata de los tejados o rata negra (<i>R. rattus</i>) | 11 |
| 4.12.2 | Rata noruega (<i>R. norvegicus</i>) | 12 |
| 4.12.3 | Rata casera (<i>M. musculus</i>) | 13 |

| | | |
|-------------|---|----|
| V. | MATERIALES Y MÉTODOS | 14 |
| 5.1 | Recursos humanos | 14 |
| 5.2 | Materiales de laboratorio | 14 |
| 5.3 | Materiales de campo | 14 |
| 5.4 | Recursos para realizar la determinación de Especie roedor | 14 |
| 5.5 | Materiales de laboratorio | 15 |
| 5.5.1 | Extracción de ADN | 15 |
| 5.5.2 | Replicación de ADN | 16 |
| 5.6 | Área de estudio | 17 |
| 5.7 | Diseño del estudio | 17 |
| 5.8 | Determinación de especies de roedores | 18 |
| 5.9 | Estimación de los tamaños de población de roedores | 18 |
| 5.10 | Estimación sobre la presencia de <i>Leptospira interrogans</i> en las muestras obtenidas por prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 18 |
| 5.11 | Análisis estadístico | 18 |
| VI. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 19 |
| VII. | CONCLUSIONES | 21 |
| VII. | RECOMENDACIONES | 22 |
| IX. | RESUMEN | 23 |
| X. | BIBLIOGRAFÍA | 24 |
| XI. | ANEXOS | 28 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|--------------|--|----|
| Cuadro No.1 | Caracterización de cebadores para PCR | 08 |
| Cuadro No.2. | Características morfológicas de roedores sinantrópicos | 11 |

ÍNDICE DE GRÁFICAS

| | | |
|---------------|---|----|
| Gráfica No. 1 | Presencia de <i>L. interrogans</i> por población de roedores por especie | 29 |
| Gráfica No. 2 | Presencia de <i>L. interrogans</i> por población de roedores por sexo en especie <i>R.rattus</i> | 30 |
| Gráfica No. 3 | Presencia de <i>L. interrogans</i> por población de roedores por sexo en especie <i>R. norvegicus</i> | 31 |
| Gráfica No. 4 | Presencia de <i>L. interrogans</i> por población de roedores por sexo en especie <i>M. musculus</i> | 32 |
| Gráfica No. 5 | Presencia de <i>L. interrogans</i> en roedores por grupo etario por especie <i>R. rattus</i> | 33 |
| Gráfica No. 6 | Presencia de <i>L. interrogans</i> en roedores por grupo etario por especie <i>R. norvegicus</i> | 34 |
| Gráfica No. 7 | Presencia de <i>L. interrogans</i> en roedores por grupo etario por especie <i>M. musculus</i> | 35 |

ÍNDICE DE FOTOS

| | | |
|-------------|--|----|
| Imagen No.1 | Trampa tipo Shermann | 36 |
| Imagen No.2 | Hoja de Registro | 36 |
| Imagen No.3 | Croquis Aldea "El Milagro", Masagua, Escuintla | 40 |

ÍNDICE DE APENDICES

| | | |
|---------------|--|----|
| Apéndice No.1 | Técnica para Reacción en Cadena de la Polimerasa | 37 |
|---------------|--|----|

I. INTRODUCCION

La leptospirosis es una enfermedad que afecta a los animales domésticos, silvestres y al hombre, ha sido poco estudiada en Guatemala y considerada una de las zoonosis más diseminadas y sub–diagnosticadas en el mundo, debido a la falta de recursos técnicos, económicos y humanos.

El estudio de la epidemiología de la enfermedad es complejo debido al gran número de factores que influyen en su presentación, dificultando la extrapolación entre las diferentes regiones geográficas y obligando el conocimiento individualizado de cada continente, país, región o zona.

Las distintas cepas patógenas de *Leptospira interrogans* pueden afectar potencialmente a los mamíferos. Los roedores actuarán como hospederos de mantenimiento o accidentales, en función del serovar considerado.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) remarca su prevalencia en ecosistemas con factores apropiados para la sobrevivencia de *Leptospira interrogans* representando un problema de salud pública en los países en vías de desarrollo.

Los roedores sinantrópicos merecen especial atención dentro de la salud pública y animal como reservorios de la enfermedad debido a su relación con la vivienda, almacenes de alimentos, mercados y explotaciones animales.

En el siguiente estudio capturé 100 roedores en la aldea “El Milagro”, Masagua, Escuintla. Determiné la presencia de leptospirosis, por PCR, así como influencia de la especie, grupo etario, sexo y procedencia.

II. HIPÓTESIS

- ❖ No existe influencia de la especie, grupo etario, o sexo de los roedores sobre la prevalencia de *L. interrogans*.

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir con el conocimiento de la epidemiología de la Leptospirosis en la población de roedores de la Aldea El Milagro, Masagua, Escuintla.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la prevalencia de *Leptospira interrogans* en roedores del sitio de estudio.
2. Describir estadísticamente la distribución de las poblaciones de roedores sinantrópicos según sexo, grupo etario y especie.
3. Determinar las especies sinantrópicas de roedores presentes en la aldea El Milagro, Masagua, Escuintla.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 DEFINICIÓN DE LEPTOSPIROSIS

La leptospirosis es una enfermedad infectocontagiosa de distribución mundial, que afectan animales domésticos, silvestres y al hombre. Recientemente la aparición y reaparición de epidemias urbanas emerge como un problema de salud pública en países en desarrollo, en los que varias especies animales (principalmente roedores) actúan como reservorios de muchos serovares, siendo el hombre y los animales domésticos hospederos accidentales. (García 2007, Rosa 2007)

4.2 TAXONOMÍA DE LA *Leptospira interrogans*, *sensu lato*

Phylum: Protofita

Clase: Schizomycetes.

Orden: Spirochaetales.

Familia: Treponemataceas.

Género: *Leptospira*.

Especie: *Interrogans*. (Carter 1989)

Las leptospirosis son espiroquetas gram negativas, aerobias obligadas o microaerofílicas, flexibles, muy finas, de disposición helicoidal y de gran motilidad, con ambos extremos semicirculares con forma de gancho. Están compuestas por un cilindro protoplasmático enredado en un filamento axial central recto. El nombre “*Leptospira*” procede del griego “*leptos*” (fino) y del latín “*spira*” (espiral). (Alfaro 2004, Greene 1998)

4.3 EPIDEMIOLOGÍA

La leptospirosis es considerada antrozooponosis de gran distribución mundial. El estudio de la epidemiología es complejo, debido al gran número de factores que influyen en su presentación, lo cual dificulta la extrapolación entre diferentes regiones geográficas y obliga el conocimiento individualizado de cada continente, país, región o zona. Se pueden llegar a alcanzar valores elevados en tiempos de inundaciones. (Polo 2007)

La transmisión tiene lugar por contacto directo con la orina que contenga leptospiras o con agua, tierra o materiales que estén contaminados. Se conoce también la transmisión de infecciones durante la copula. (Vides 2005).

4.4 FACTORES DE VIRULENCIA

Las leptospiras son virulentas por varios factores que les hacen ser muy invasivas, principalmente por la producción de enzimas, hemolisinas y lipasas fuera de su cubierta externa, proteínas de superficie que les permiten adherirse a la fibronectina y colágeno del huésped. Los factores mecánicos como la motilidad por excavación y su tropismo orgánico, son causas que se han sugerido como mecanismos por lo que alcanzan sitios normalmente protegidos por el organismo, como el líquido cefalorraquídeo y el ojo. (Polo 2007)

Estos mecanismos permiten la invasión a través de las membranas mucosas o piel húmeda o ablandada. Se mencionan otros factores adicionales que incluyen la actividad endotoxina entre ellos la catalasa, hialuronidasa, lipooligosacaridos y su acción sobre monocitos, liberación de linfocinas, desencadenando la reacción de coagulación intravascular diseminada (CID), incluyendo hemorragias y sangrados anormales, trombocitopenia y agregación plaquetaria. (Polo 2007).

4.5 RESISTENCIA DEL AGENTE ETIOLÓGICO

Las leptospiras son muy sensibles a la desecación, luz solar directa, pH ácido y alcalino, ya que un pH menor de seis o mayor de ocho tiene carácter inhibitorio sobre el microorganismo. Temperaturas menores a 13 °C o mayores a 35 °C provocan la muerte rápidamente. La solución hipertónica de sal común (2,8%), bilis, putrefacción y la mayoría de los antibióticos *in vitro* o *in vivo* como la penicilina, estreptomicina, aureomicina y los grupos macrólidos inhiben el crecimiento de la bacteria (Sandow 2005).

Las leptospiras viven en orina débilmente básica como la del cerdo, vaca y equino durante períodos variables, sin embargo, en orina ácida (carnívoros) mueren rápidamente, por lo que la orina humana no disemina la infección, ni la orina de ratas mientras no sea diluida. (Sandow 2005)

Para la supervivencia en el medio ambiente necesita una humedad alta del suelo, una temperatura de 25 °C, con agua de un pH neutro o ligeramente alcalino y la presencia de materia orgánica; pudiendo vivir hasta 183 días en estas condiciones, y 30 minutos en suelo seco. En agua estéril pueden vivir hasta 3 meses o más, varias semanas en aguas alcalinas y lagunas, en orina alcalina más de 16 días y en nitrógeno líquido 32 meses. Pueden sobrevivir: 9 días en músculo, 13 días en los riñones, 12 días en el hígado y 8 días en el bazo luego de la muerte del animal. (Sandow 2005)

4.6 DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

Los métodos se pueden dividir en: técnicas indirectas, que detectan anticuerpos frente a las leptospiras, y técnicas directas, encaminadas a la detección de leptospiras, sus antígenos o ácidos nucleídos en los tejidos y fluidos corporales. (Sandow 2005)

De los animales vivos, la muestra a referir será sangre en fase aguda y orina en crónica. En animales muertos, las muestras son: cerebro, médula espinal, líquido cefalorraquídeo, ojo cuando hay síntomas nerviosos, y la mayoría de los órganos

parenquimatosos: hígado, riñón, bazo, vejiga y su contenido. (Jiménez 2001)

4.7 MÉTODOS SEROLÓGICOS

Los métodos serológicos brindan un diagnóstico en corto tiempo y son capaces de detectar anticuerpos antileptospirales, que pueden ser IgM e IgG, los que contribuyen las técnicas de elección. Además, son las pruebas de laboratorio mas utilizadas en el diagnóstico de la leptospirosis, al igual que para la realización de estudios epidemiológicos. (Polo 2007)

Dentro del grupo de métodos serológicos se encuentran:

- Microaglutinación de serogrupos
- ELISA
- HA
- Aglutinación macroscópica

4.8 METODOS BACTERIOLÓGICOS

Dentro del grupo de métodos serológicos se encuentran:

- Cultivo
- Inoculación en animales
- Examen directo en campo oscuro
- Impregnación argéntica de Warthin- Starry
- Inmunofluorescencia Directa
- Inmunoperoxidasa

4.9 MÉTODOS BIOLOGÍA MOLECULAR

La demostración de la presencia de leptospiras, o sus componentes en la sangre, tejidos y/o leche de animales y humanos con signos clínicos es de gran valor diagnóstico. (Sandow 2005)

4.9.1 Prueba de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis. Consiste en una cadena de ciclos respectivos de replicación apoyada por el uso de la enzima ADN polimerasa para hacer millones de copias de una secuencia molde. El aspecto más significativo es que son necesarias cantidades extremadamente pequeñas de material biológico de partida para llevar a cabo la amplificación. (Cepero 2004)

La técnica se basa en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la DNA polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de DNA en el sentido 5`a 3` usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región doble cadena se usan los denominados iniciadores (primers). Son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3` del fragmento de DNA que se desea amplificar. (Ramírez 2007). Ver cuadro No.1

| Cebadores | Secuencia | Talla del segmento amplificado |
|--|--|--------------------------------|
| Cebadores del gen de ARN ribosomal-16S (L1-L2) | 5' CGC TGG CGG CGC GTC TTA AA 3' 5' TTC ACC GCT ACA CCT GGA A 3' | 631 pb |
| G1-G2 (<i>L. interrogans</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> y <i>L. meyeri</i>) | 5' CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT 3' 5' GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG 3' | 286 pb |
| B64I- B64II <i>L. kirschneri</i> | 5' CTG AAT TCT CAT CTC AAC TC 3' 5' GCA GAA ATC AGA TGG ACG AT 3' | 563pb |
| LipL 32-270F LipL 32-69R | 5' CGC TGA AAT GGGAGT TCG TAT GAT T 3' 5' CCA ACA GAT GCA ACG AAA GAT CCT TT 3' | 423 pb |

Cuadro No.1 Caracterización de cebadores para PCR (Fuente: IPK)

Partiendo de este principio, la reacción en cadena de la polimerasa se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

1. En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ellos se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C). La re-naturalización se producirá cuando la temperatura disminuya. (Fernández 2007)
2. En el segundo paso (hibridación) los cebadores se unen a las zonas 3` complementarias que flanquean que queremos amplificar. Se realiza gracias a la bajada de la temperatura (50-65°C). (Fernández 2007)
3. En la tercera etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena sencilla produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad en la dirección 5` a 3` mediante la enzima DNA polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde. (Fernández 2007)

4.10 FACTORES EPIDEMIOLÓGICOS RELACIONADOS CON LOS ROEDORES

Los roedores representan una fuente importante de infección. Albergan con frecuencia las leptospiras y las eliminan. Estos animales forman un ciclo de contagio entre sí y con otras especies silvestres, de una manera directa a través de la orina e indirectamente por el medio contaminado agua o suelo. (Vides 2005)

En los roedores esta enfermedad no manifiesta ningún síntoma clínico, pero pueden eliminar a las leptospiras por años como portadores sub-clínicos. (Luna-Álvarez 2002)

Los roedores son susceptibles a un gran número de serovariedades, el período de incubación de la enfermedad varía de 1 a 2 semanas, aunque existen casos en que la incubación es de solo 2 días. (Vides 2005)

4.11 ANTECEDENTES EN ROEDORES SILVESTRES

En un muestreo al azar realizado en Corrientes, Argentina se capturaron 101 roedores. Un solo animal perteneció a la especie *M. musculus* y se trató de un macho que resultó positivo a leptospira. Los otros 100 especímenes fueron *R. rattus* de los cuales 72 fueron positivos (45 de machos positivos) y 28 fueron hembras (13 hembras positivas). La prevalencia a leptospirosis en roedores fue de 58.4%. (Marder 2008)

En un estudio de roedores silvestres en la ciudad de Detroit Michigan EUA se encontró que el 77% de las ratas noruegas en Detroit son portadoras de leptospirosis y que los trabajadores que erradican roedores presentan títulos séricos antileptospira relativamente mayores que los grupos control. (Vanasco 2001)

En la ciudad de Corrientes, Buenos Aires se realizó la captura de 90 ratas. El 53,3% de ellas estaban infectadas con leptospirosis, El resultado supera marcadamente el del estudio realizado en 2006, cuando alcanzaba al 30,1 por ciento. (Vanasco 2001)

De acuerdo al diagnóstico efectuado por serología con el método de aglutinación microscópica, la serovariedad más frecuente es la Pomona, seguido en orden descendente por Canicola, Hardjo, Javanica Icterohemorrhagiae, Tarassovi. (Vanasco 2001)

En general los hospederos de mantenimiento principales son:

- En ratas, el serovar Icterohaemorrhagiae y Ballum.
- En cerdos, el serovar Pomona, Tarassovi y Bratislava.
- En perros, el serovar Canicola (Polo 2007).

4.12 GENERALIDADES DE ROEDORES SINANTRÓPICOS

El vocablo “sinantrópico”, proveniente del griego *sin-*, “junto con” + *anthro*, “hombre, el término propuesto hace referencia a aquellos roedores adaptados a una relación directa con el género humano (Steinmann 2007). Las características de estas especies se citan a continuación en el cuadro No.2.

| ESPECIES SINANTRÓPICAS | | | |
|------------------------|--|--|---|
| Características | <i>Mus musculus</i> | <i>Rattus rattus</i> | <i>Rattus norvegicus</i> |
| Peso | 7-15 g. | 85-165 g. | 195-485 g. |
| Largo Cabeza-Cola | 66-91 mm | 158-196 mm | 186-240 mm |
| Largo Cola | 69-93 mm | 154-244 mm | 122-215 mm |
| Largo Orejas | 12-16 mm | 22-24 mm | 15-20 mm |
| Largo pies | 16-19 mm | 34-39 mm | 30-45 mm |
| Color | Oscuro, pardo variable. Variedad albina y negra melánica | <i>R.rattus</i> : negro; <i>R.r.alexandrinus</i> : vientre blanco gris; <i>R.r.frugivorus</i> : vientre blanco | Pardo-grisáceo, más claro por flancos y vientre |
| Madurez Sexual | 45 días | 3 meses | 3 meses |
| Longevidad | menos de 2 años | 2 a 4 años | 2 a 4 años |
| Gestación | 19 días | 22 días | 21 días |
| No. Crías | 5-10 | 4-10 | 6-12 |
| Deposiciones | Negras, 2-5mm de longitud | Oscuras de 1-3mm de diámetro | Oscuras de 2-5mm de diámetro |

Cuadro No.2. Características morfológicas de roedores sinantrópicos Fuente: F. Reid (1997)

4.12.1 Rata de los tejados o rata negra (*Rattus rattus*)

Roedor de hábitos principalmente nocturnos, es una especie con habilidad para escalar y usualmente habita techos o entrepaños. La rata negra anida en árboles o techos y la rata noruega anida bajo tierra. Se alimenta de granos, semillas, frutas, basura. Los adultos anidan solos, a pesar que los jóvenes pudieran permanecer junto a su madre mucho tiempo después de la lactancia. Su período reproductivo es principalmente en la estación calurosa, pero pueden

reproducirse en cualquier época del año. La camada es de cuatro a 10 crías, normalmente ocho. Su hábitat lo conforman edificios en ciudades y aéreas rurales, cabañas y plantaciones. Usualmente son sinantrópicos, pero también se les puede ver en bosques lejos de las viviendas. (Reid 1997)

Esta especie se encuentra en el mundo entero, distribuida a lo largo del continente americano, principalmente en áreas menores a los 3000 msnm, convirtiéndose en una especie de estado común hasta abundante. Estos roedores transmiten plagas y la fiebre tifoidea. (Reid 1997)

4.12.2 Rata noruega (*Rattus norvegicus*)

Es una especie principalmente nocturna, pero se puede ver durante el día. Esta es la rata urbana que normalmente se ve en comederos de aves o en sistemas subterráneos. Es terrestre, pero escala y nada muy bien. Se alimenta de granos, fruta, basura y cualquier alimento disponible. Es más carnívora que la rata negra y suele matar aves de corral. Viven en colonias (un macho, muchas hembras y sus crías) en un complejo sistema de cuevas. Se reproduce durante todo el año; la camada puede ser de 2 a 22 crías. Vive en ciudades, cultivos y estanques. Prefieren áreas húmedas. (Reid 1997)

Esta especie ha sido introducida al mundo entero y es originaria de Siberia y China. Su estado es abundante en muchas áreas. La especie ha tomado los nidos de la rata de los tejados y la ha desplazado. Se considera como el mamífero más perjudicial, causando grandes pérdidas en graneros, diseminando enfermedades y dañando estructuras. Por el otro lado, la rata noruega ha sido criada en laboratorios y ha jugado un papel importante en los avances de la medicina y la ciencia. (Reid, 1997)

4.12.3 Ratón casero (*Mus musculus*)

Especie de hábitos nocturnos, terrestres, aunque es buena escaladora. Se alimenta de granos, semillas, insectos, basura, jabón y otros objetos. Anida bajo tierra en cuevas en los campos, pero muchas prefieren habitar dentro de las construcciones. Puede reproducirse durante todo el año, y el tamaño de la camada es de tres a 11, normalmente seis crías. Su hábitat lo conforman áreas agrícolas y urbanas. (Reid 1997)

Es una especie introducida mundialmente, se puede encontrar en toda América. Originarias de Asia. Su estado es común y está ampliamente distribuida. En los campos de siembra se comen las semillas más que el fruto, pero dañan y se alimentan más de grano almacenado. De esta especie, se originó el ratón blanco utilizado en investigación de laboratorio. (Reid 1997)

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

5.1.1 RECURSOS HUMANOS

- Asesores
- Tesista
- Población colaboradora de la aldea
- Técnicos de Laboratorio de Microbiología de FMVZ y Laboratorio Nacional de Diagnóstico.

5.1.2 RECURSO BIOLÓGICO

- 100 muestras tisulares de riñón de roedores capturados en la Aldea Masagua, Escuintla, Guatemala.

5.1.3 MATERIALES DE CAMPO

- Trampas tipo Shermann
- Cloroformo o Pentobarbital
- Algodón.
- Alcohol.
- Hoja de Bisturí
- Hielera.
- Hielo.

5.1.4 RECURSOS PARA REALIZAR LA DETERMINACION DE ESPECIE

- Guía de Campo para mamíferos de Centro América. (Reid, F. 1997)
- Cinta métrica
- Pesa.
- Hoja de registros.
- Cámara fotográfica

5.2 MATERIALES DE LABORATORIO

5.2.1 EXTRACCION DE ADN

5.2.1.1 Descartables

- Guantes estériles sin polvo
- Tubos Eppendorf 2ml
- Tubos Eppendorf 1.5ml
- Puntas con filtro 0-50 μ L
- Puntas con filtro 0-200 μ L

5.2.1.2 Reactivos

- Medio EMJH
- Proteinaza K (10mg/mL)
- SDS 10%
- NaCl 3M
- Buffer de TE 10x
- Fenol-Cloroformo
- Etanol absoluto y al 70%.
- Agua bidestilada o de grado molecular

5.2.1.3 Instrumental

- Mortero y pistilo
- Micropipetas
- Centrifuga
- Refrigeradora 4°C
- Vortex
- Incubadora de baño de María

5.2.2 REPLICACION DE ADN

5.2.2.1 Descartables

- Guantes estériles sin polvo
- Tubos Eppendorf 1.5ml
- Tubos Eppendorf 0.5ml
- Puntas con filtro 0-50 μ L
- Puntas con filtro 200-1000 μ L

5.2.2.2 Instrumental

- Centrifuga
- Micropipetas
- Agua bidestilada o de grado molecular
- Refrigeradora 4°C
- Vortex
- Termociclador
- Cámara de electroforesis
- Transluminador

5.2.2.3 Reactivos

- Agua bidestilada
- Buffer
- MgCl₂ 1.5mM
- DNTPs 20mM
- Taq polimerasa 5 U/ μ L
- Primer G1 5' CGC TGG CGG CGC GTC TTA AA 3'
- Primer G2 5' TTC ACC GCT ACA CCT GGA A 3'
- Colorante: Naranja de acridina
- Escalera 100bp
- Bromuro de etidio
- Agarrosa

5.3 Área de estudio

La Aldea El Milagro, se encuentra ubicada al norte del municipio de Masagua, Escuintla. Por su zona de vida Holdridge se clasifica como Bosque húmedo subtropical cálido, con una temperatura anual promedio de 25.5°C, con variación mínima de 3.8°. (Infopress 2007).

La precipitación pluvial oscila entre 703 a 2063 mm anuales, siendo los meses lluviosos de abril a octubre. La humedad relativa, puede llegar hasta 90%. (Infopress 2007)

Su extensión territorial es de 448 Kms² y está habitado por 32,245 personas, para una densidad poblacional de 72 hab/Km², inferior a la media nacional que se ubica en 117 hab/Km², para 2004. (Infopress 2007)

Los ríos Achiguate y Guacalate son los más caudalosos. El Achiguate es conocido por su caudal, ocasiona daños anualmente al salirse de su cauce, (Infopress 2007)

5.4 Diseño del estudio

Capturé los roedores con trampas tipo Shermann de 0,30 × 0,14 × 0,14 cm. (ver IMAGEN No. 1). Utilicé como cebo galletas de mantequilla de maní con chocolate.

Distribuí 25 trampas aleatoriamente en las casas y las verifiqué diariamente del 27 de noviembre al 20 de diciembre del 2008 hasta coleccionar 100 en total. Identifiqué los especímenes según sexo, especie, grupo etario y lugar de procedencia.

Utilicé cloroformo al 1% para sacrificar los especímenes y luego practique la necropsia. Tomé una muestra de riñón por roedor. Flameé los riñones y los conservé en solución salina isotónica, a 4°C y protegidos de la luz solar.

5.5 Determinación de las especies de roedores

Identifiqué los especímenes utilizando la guía de campo para mamíferos de Centro América (Reid, 1997)

5.6 Estimación de los tamaños de población de roedores

No pude estimar el tamaño de la población de roedores, ya que no se cumplieron los supuestos del método de Moran- Zippin.

5.7 Determinación de la presencia de *Leptospira interrogans* en las muestras mediante PCR

Realicé la extracción del ADN según el protocolo descrito por Ramírez, V (2006). Determiné la presencia de *Leptospira interrogans* por medio de la prueba de PCR siguiendo los criterios de Hookey (1992).

Las modificaciones al protocolo de extracción de Ramírez, V (2006) fueron en base a la técnica utilizada por Zamora, Y. (2008).

5.8 ANALISIS ESTADISTICO

5.8.1 Describí la relación leptospira-roedor por medio de estadística descriptiva, (Sokal y Rholf 1995).

5.8.2 Determiné si la prevalencia de *Leptospira* depende de la especie, grupo etario, sexo o procedencia de los roedores, utilizando la prueba de independencia G. (software R®, GNU projects)

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capturé 100 roedores (cinco *M. musculus*, 42 *R. norvergicus* y 53 *R. rattus*). Procesé las muestras según el método de Hookey para la amplificación del segmento 16S ribosomal por PCR. La prevalencia general de leptospirosis fue de 73%, siendo de 60% (3/5), 78% (33/42) y 69% (37/53) para las especies mencionadas respectivamente, indicando una elevada tasa de exposición a la presencia de ADN de *L. interrogans*. (ver GRAFICA No. 1)

Con una confianza del 95% en la prueba de G, no encontré influencias de las propiedades del huésped sobre las prevalencias determinadas, según especie ($G=1.36$, $P>0.05$), grupo etario (*R. rattus* $G=2.55473152$, $P>0.05$ *R. norvergicus* $G=0.00425791$, $P>0.05$ y *M. musculus* $G=0.02409991$, $P>0.05$) o sexo (*R. rattus* $G=0.07577288$, $P>0.05$, *R. norvergicus* $G=1.06409754$ y *M. musculus* $G=0.02409991$, $P>0.05$).

La captura de *R. norvergicus* pudo ser sesgada por las dimensiones de la jaula, ya que se registraron muy pocos adultos (9%). La población de roedores pequeños pudo ser excluida por la población de roedores grandes (5% fueron *M. musculus*).

No encontré influencia de la especie sobre la enfermedad. Aunque no se cumplieron los supuestos del método de Moran-Zippin, pude percibir que la población de roedores es numerosa. La especie *R. rattus* (53%) es la más significativa en cuanto a presencia de *L. interrogans* (37%). Esta especie mantiene mayor relación con el hombre y se convierte en un reservorio potencialmente alto para la transmisión del agente.

No hay influencia del sexo sobre la prevalencia de *L. interrogans*, concluyendo que ambos sexos se comportan de igual manera como reservorios de esta enfermedad (ver GRAFICA No. 2,3,4). Aún así, por el mayor comportamiento exploratorio de los machos,

capturé un mayor número de estos, lo que supone que son más importantes en la dispersión de la enfermedad (Steinmann 2004).

No encontré influencia del grupo etario sobre las prevalencias de la enfermedad, aunque hay que resaltar los medios de transmisión del agente a través de vías transplacentarias y por contacto sexual (ver GRAFICA No. 5,6,7). En los roedores cabe recalcar la perennidad del agente sin presentar sintomatología y su constante reproducción. (Dollinger 1999).

Debido a que durante el planteamiento del estudio, se estimó un tamaño promedio de los especímenes a capturar, las trampas utilizadas no fueron eficaces al activar los mecanismos de captura o sus dimensiones eran reducidas para algunas especies. Por lo tanto, los resultados de *M. musculus* deben tratarse con reserva al ser un número reducido de individuos colectados para el análisis, asimismo el número de adultos de *R. norvegicus*, al ser solo nueve individuos (entre machos y hembras) colectados.

La presencia significativa de ADN de *L. interrogans* en la muestra capturada, implica a los roedores como una importante fuente de infección en la aldea el Milagro, Escuintla. Estos resultados implican un serio problema de salud pública, debido a la presencia de reservorios de leptospirosis conviviendo con el humano y animales domésticos.

Este estudio alerta sobre la necesidad de la Aldea El Milagro, Masagua, Escuintla de aplicar programas de promoción de la salud, prevención de la leptospirosis y control de roedores.

VII. CONCLUSIONES

1. No existe asociación entre el grupo etario, sexo, especie con la presencia de *L. interrogans*.
2. Los resultados obtenidos tienen especial relevancia en el área de estudio, donde la transmisión es mas viable por la estrecha asociación existente entre el ser humano, animales peri-domésticos, pasos fluviales y los roedores.
3. Los roedores sinantrópicos de la aldea “El Milagro”, Escuintla, son un reservorio importante a considerar en cualquier sistema de vigilancia o monitoreo de leptospirosis, debido a la presencia de *L. interrogans* encontrada (73%).

VIII. RECOMENDACIONES

1. Utilizar kits de extracción para la prueba de PCR, debido a la sensibilidad de la prueba, ya que cualquier variación en el proceso, puede ocasionar falsos resultados.
2. Determinar las prevalencias de leptospira por especie en diferentes épocas del año, y asociarlas al ámbito de hogar de los roedores.
3. Elaborar un plan de monitoreo y vigilancia de leptospirosis en roedores, tanto del área estudiada así como de áreas aledañas.
4. Realizar estudios similares en otras áreas con la misma zona de vida de Holdridge, para determinar si la presencia depende de factores antropogénicos.
5. Hacer estudios similares en distintas zonas de vida, para correlacionar variables ambientales y/o de las comunidades con las frecuencias y prevalencias de leptospirosis.
6. Identificar genéticamente si las leptospiras que afectan roedores son las mismas que a las poblaciones humanas y de animales domésticos.

IX. RESUMEN

Con el objeto de investigar la presencia de *Leptospira interrogans* en roedores de la aldea El Milagro (Masagua, Escuintla, Guatemala), capturé 100 especímenes de tres especies (*Mus musculus*, *Rattus rattus* y *Rattus norvegicus*). Evalué también si la presencia de leptospirosis dependía de la especie, sexo o edad de los roedores. Identifiqué la presencia de *L. interrogans* mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La prevalencia fue de 73%, sin mostrar influencia por especie, sexo o grupo etario.

Se concluye que la alta prevalencia de leptospirosis en roedores del área en estudio constituye un importante factor de riesgo para animales domésticos y seres humanos. La información generada podrá ser utilizada por las autoridades de salud, para la prevención de brotes y para realizar nuevos estudios sobre la dinámica de éste patógeno en los roedores sinantrópicos de la aldea estudiada.

Palabras clave: *Leptospira interrogans*, roedores, *Mus musculus*, *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus*, PCR, prevalencia.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Aideorevich, L; Tovar, C. 2003. Muestras a tomar en caso de sospecha de leptospirosis e interpretación de resultados en animales (en línea). Consultado 05 oct. 2007. Disponible en <http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasTecnicas/ceniaphoy/articulos/n3/texto/laidorevich.htm>
2. Alfaro, C; Aranguren Y; Clavijo, A. 2004. Epidemiología y diagnóstico de la leptospirosis como fundamentos para el diseño de estrategias de control (en línea). Consultado 09 oct. 2007. Disponible en www.sapuvetnet.org/PdfFiles/Monografia_leptospira.pdf
3. Biberstein, EL; Yuan Chung, Z. 2000. Tratado de microbiología veterinaria. Zaragoza, España, Acribia. P. 267-273.
4. Carter, GR. 1989. Fundamentos de bacteriología y micología veterinaria. Trad. Por Manuel Ramis Vergés. Zaragoza, ES, Acribia. P. 238-241.
5. Cepero, OV; Castillo, J.C; Rodríguez, E. 2004. *Leptospira interrogans* (en línea). Consultado 25 oct. 2007. Disponible en <http://www.monografias.com/trabajos19/leptospira-interrogans/leptospira-interrogans.shtml>
6. Cervantes, FA; Castro-Campillo, A; Ramírez-Pulido, J. 2003. Mamíferos terrestres nativos de México. México, Unam. p. 6
7. Christoph, H. 1981. Clínica de las enfermedades del perro; Trad. J Romero Muñoz. España, Acribia. v. 2. p. 529, 771- 780.
8. Congreso Argentino de zoonosis (3, 2001, Buenos Aires, AR). 2001. Comparación de cinco técnicas de diagnóstico de leptospira en roedores. Ed. T Vides. 4 p.

9. Dollinger, P. 1999. Patologías de roedores y lagomorfos en zoológicos de Suiza. Consultado 09 oct. 2007. Disponible en http://www.bvetadmin.ch/artenschutz/e/berichte_publicationen/roedentia_wien99.pdf
10. Ettinger, S.J; Feldman, E.C. 2002. Tratado de medicina veterinaria. Trad. RA. Taibo, Col. V.1, 2. 2274 p.
11. Fernandez, C. 2006. International course on laboratory methods for diagnosis “Leptospirosis Habana 2006”. Instituto Pedro Kouri. Habana, Cuba. 109p.
12. García A. s.f. Enfermedades infecciosas, leptospirosis canina: Vision general (en línea) Consultado 5 oct. 2007. Disponible en www.dover.com.co/pdf/leptospirosis-canina.pdf.
13. Greene, G. 1998. Enfermedades infecciosas en perros y gatos; 2 ed. México, Interamericana. 1014 p.
14. Inforpress, 2007. Masagua, Escuintla. Servicios de Información Municipal. Consultado 07 oct. 2007. Disponible en <http://www.inforpressca.com/masagua/ubicacion.php>
15. Instituto Nacional de Biodiversidad. 2003. Roedores. Costa Rica, Inbio. 2p. Consultado 28 oct. 2007. Disponible en <http://www.inbio.ac.cr>
16. Jiménez, R.; Chávez, C. 2001. Leptospirosis humana y animal, consideraciones epidemiológicas y de laboratorio (en línea). Consultado 05 oct. 2006. Disponible en <http://www.iaca.com.ar/leptospirosis%20humana.htm>
17. Luna-Álvarez, MA. 2002. Investigación serológica de leptospirosis en fauna silvestre en cautiverio en el zoológico de Chapultepec de la Ciudad de México, D. F. s.n.t. 5 p.

18. Marder, G. 2008. Prevalencia de leptospirosis en roedores de la ciudad de Corrientes, Argentina. Periodo mayo 2005- junio 2008. Facultad de Medicina veterinaria UNNE. Corrientes, Argentina. 4p.
19. McDonough, P. 2001. Leptospirosis en caninos- Estado actual (en línea). Consultado 05 oct. 2007. Disponible en www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/mcdonough_es/IVIS.pdf
20. Ministerio de Salud Pública. 1998. Programa nacional de prevención y control de la leptospirosis. 2 ed. La Habana, Cuba, El Ministerio. p. 1-46.
21. Muñoz, M; Araya, L. N.; Bonilla, R. 1999. Análisis de los resultados serológicos para la leptospirosis (MAT) obtenidos en Costa Rica en los años 1996 – 1997. *Ciencia Veterinarias (Costa Rica)* 22(2): 29-39.
22. Polo, OD. 2007. Determinación de la presencia de anticuerpos de *Leptospira interrogans* en perros no vacunados; por la prueba de microaglutinación (MAT) en clínicas veterinarias ubicadas en la zona 18 de la capital de Guatemala. Tesis Med. Vet. Universidad de San Carlos de Guatemala.
23. Ramírez, V. 2006. Informe final de práctica profesional supervisada: Técnicas generales de manipulación de ácidos nucleídos, Laboratorio de Biología molecular, perteneciente al Instituto de Biotecnología de la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo león, Monterrey, México. Universidad de San Carlos de Guatemala. CEMA.
24. Reid, F. 1997. A field Guide to the Mammals of Central America and southeast Mexico. US, Oxford University. 334p.
25. Rosa, R; Murillo, N. 2002. Guía de control y manejo de leptospirosis (en línea) Consultado 09 oct. 2007. Disponible en www.bvsops.org.uy/pdf/leptos.pdf

26. Sandow, K; Ramírez, W. 2005. Leptospirosis (en línea). Consultado 08 oct. 2007. Disponible en www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060605/060501.pdf
27. Steinmann, AA. 2004. Métodos de censo de las poblaciones de roedores. (en línea). Consultado en 12 ene. 2010. Disponible en <http://www.mundosano.org/documentos/monografias/Monografia%20-%20Modulo2.pdf>
28. Vides, T. 2005. Determinación de la presencia de *Leptospira* sp. en la especie *Cotuja* (*Dasyprocta punctata*) en un zoológico privado de la ciudad de Guatemala. Tesis Med. Vet. Universidad de San Carlos de Guatemala.
29. Vitale, M.; Vitale, F; Di Marco, V. 2005. Polymerase chain reaction method for leptospirosis, analysis on samples from an autochthon swine population in Sicily, Italy. (en línea). Consultado en 28 oct. 2007. Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S037507602005000100004&script=sci_arttext&tlng=en
30. Zamora, J.; Riedemann, S. 1999. Animales silvestres como reservorios de leptospirosis en Chile. Una revisión de los estudios efectuados en el país. *Archivos de medicina Veterinaria (Chile)* 31 (2): 1-9.

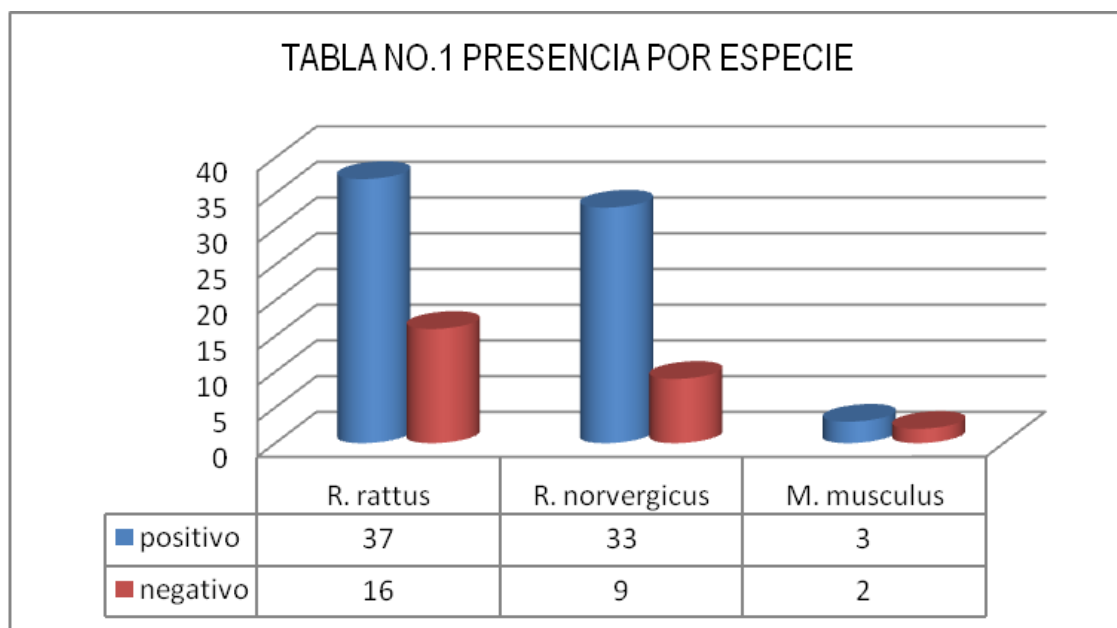
XI. ANEXOS

GRAFICOS Y TABLAS

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Leptospira interrogans* EN ROEDORES SINANTRÓPICOS DE LA ALDEA EL MILAGRO, MASAGUA, ESCUINTLA UTILIZANDO LA TECNICA DE PCR.

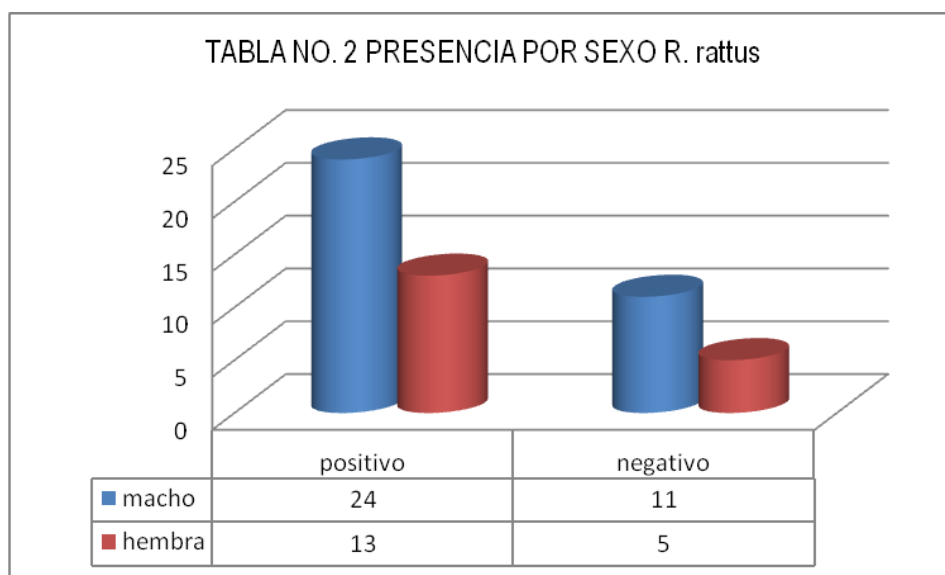
Grafica No. 1

Presencia de *L. interrogans* por población de roedores por especie.



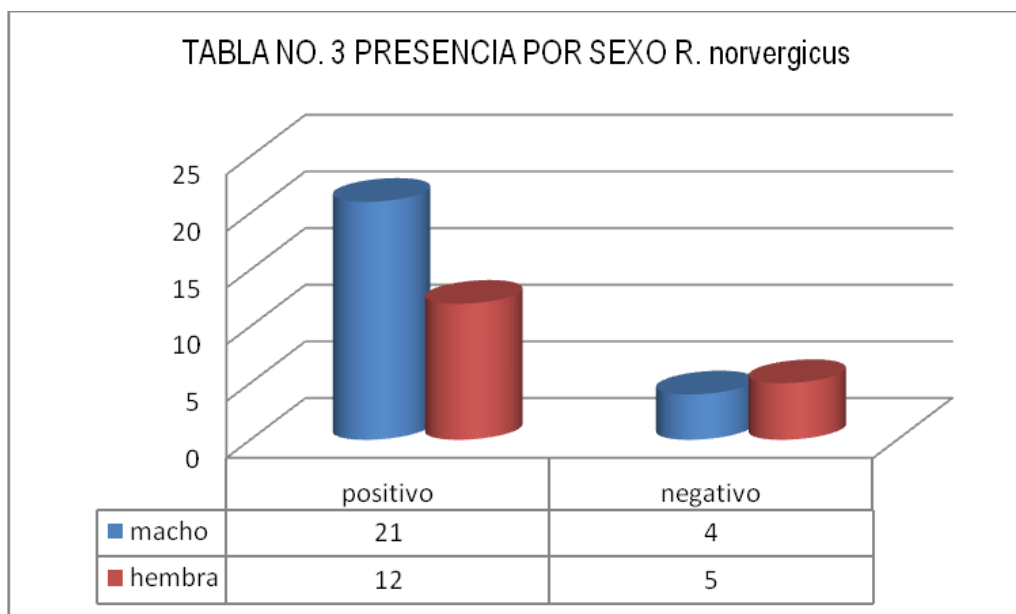
Grafica No. 2

Presencia de *L. interrogans* por población de roedores por sexo en especie *R. rattus*



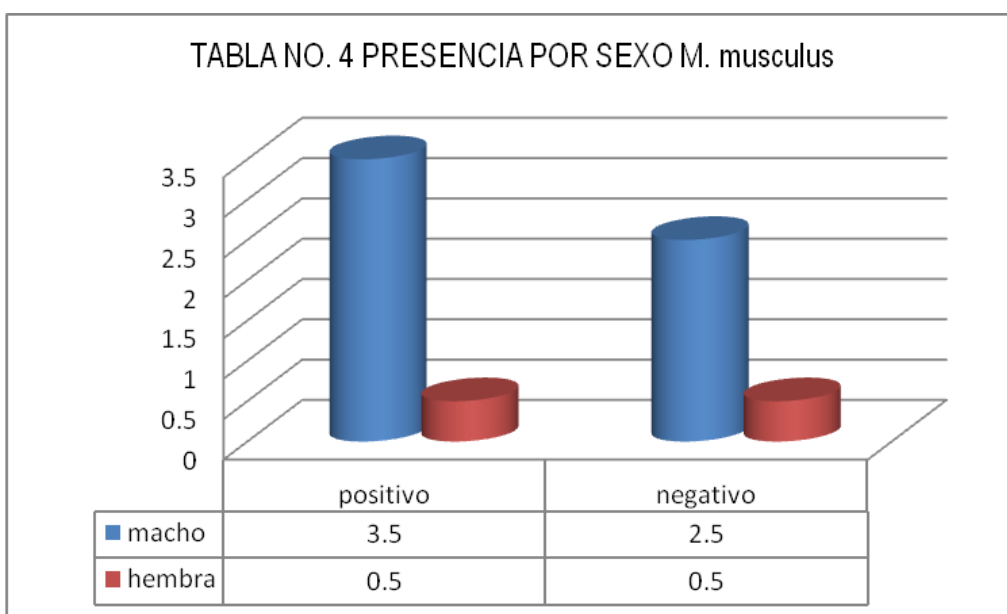
Grafica No. 3

Presencia de *L. interrogans* por población de roedores por sexo en especie *R. norvegicus*



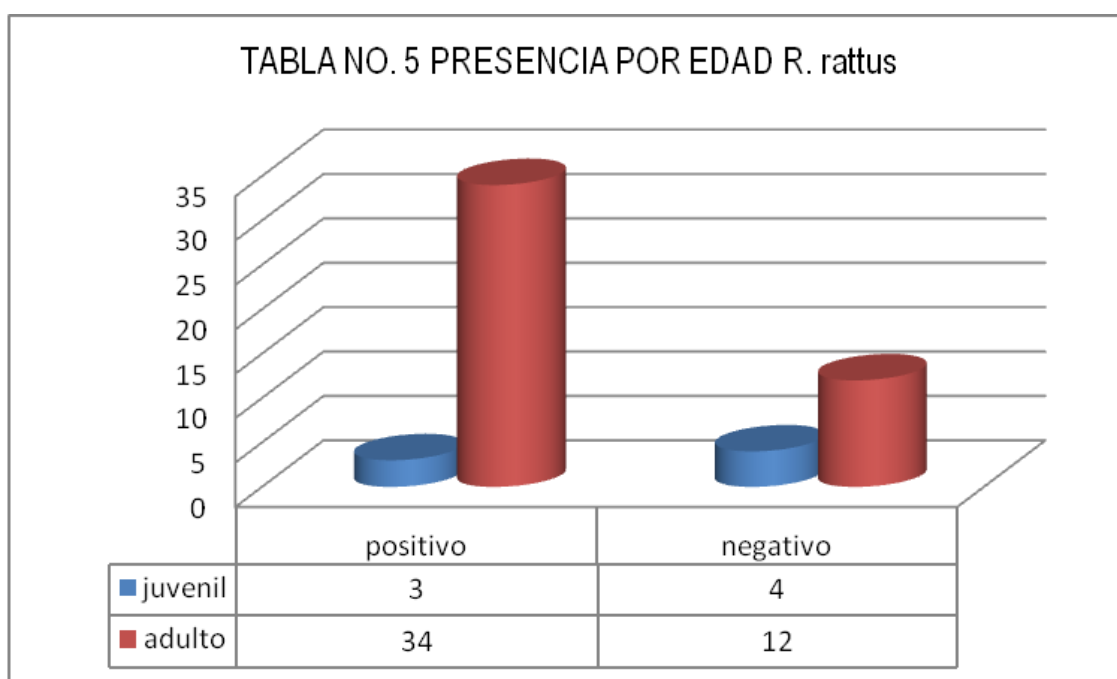
Grafica No. 4

Presencia de *L. interrogans* por población de roedores por sexo en especie *M. musculus*

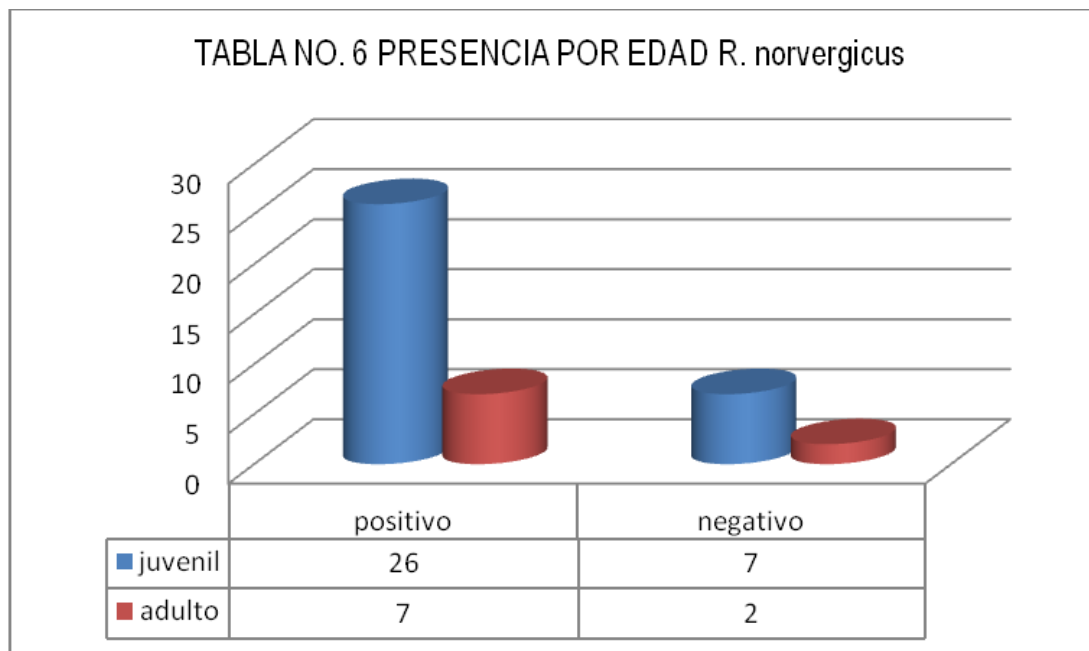


Grafica No. 5

Presencia de *L. interrogans* en roedores por grupo etario por especie *R. rattus*



Grafica No. 6
Presencia de *L. interrogans* en roedores por grupo etario especie
R. norvegicus



Grafica No. 7
Presencia de *L. interrogans* en roedores por grupo etario especie
M. musculus

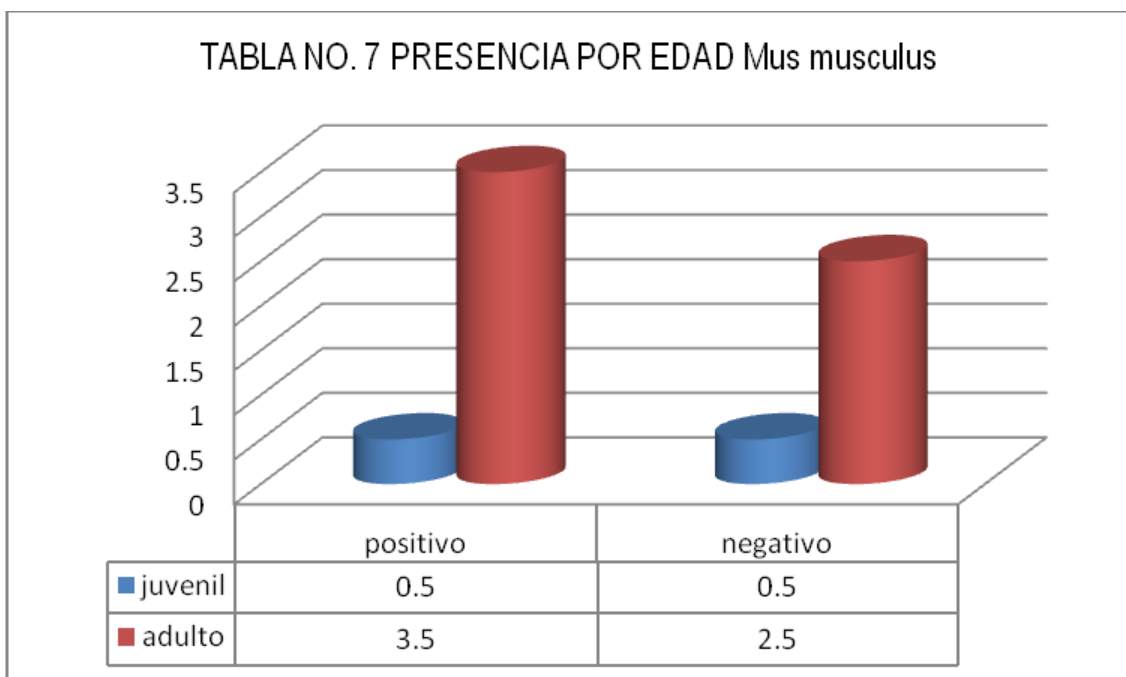




Imagen No.1 Trampa tipo Shermann.

Utilizada para captura roedores múridos y sigmodontos.

HOJA DE REGISTRO

| DATOS DEL PROPIETARIO | |
|------------------------------|--|
| Fecha: / / | No. de Registro: _____ |
| Nombre Propietario: _____ | |
| No. Cedula: _____ | No. Casa: _____ |
| Firma: _____ | |
| DATOS DEL ESPECIMEN | |
| Especie: _____ | Sexo: _____ |
| MEDIDAS CORPORALES: | |
| Largo total: _____ | Muestra: _____ |
| Cola: _____ | OBSERVACIONES: _____ _____ _____ _____ |
| Patas: _____ | |
| Oreja: _____ | |

Apéndice No. 1
TÉCNICA PARA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
(PCR)

METODO MACERACIÓN

1. Tomar 20mg de tejido
2. Adicionar 1ml de medio de cultivo EMJH
3. Macerar el tejido con el pistilo.
4. Luego centrifugar la muestra en tubos (eppendorf 2ml) a 12000 rpm / 2min
5. Tomar el sobrenadante y realizar la extracción.

METODO DE EXTRACCIÓN

1. Adicionar 600 µl de Buffer lisis TE 10X
2. Incubar 10 min a Temperatura Ambiente
3. Añadir 60 µl de SDS 10% + 13 µl de proteinasa K (10mg/mL), incubar a 65°C por 1 a 2 horas.
4. Inactivar la prot K a 95°C /10 min
5. Extraer con fenol- cloroformo vol/vol (600 µL), centrifugar 12 000 rpm/2min.
6. Recuperar la fase superior (teniendo cuidado de no tocar la interfase), pasar a otro tubo nuevo.
7. Extraer con cloroformo vol/vol, para eliminar los restos de fenol
8. Recuperar la fase superior (teniendo cuidado de no tocar la interfase), pasar a otro tubo nuevo.
9. Añadir 60 µL de NaCl 3M
 - Para preparar 100ml*1L/1000ml*3M NaCl/1L*58.44g/M= 17.53 grs.
10. Precipitar el ADN con 2 vol de etanol absoluto frio, incubar a -70°C por 1 hora.
11. Centrifugar a 12000 rpm/2min
12. Secar el pellet (el tubo boca abajo sobre el papel filtro a temp. Ambiente)
13. Resuspender en 300 µl de agua bidestilada esteril y colocar a -20°C.

Replicación de ADN

PROCESO

1. Preparar el master mix (40 µl mezcla)

| | |
|-------------------------|---------------------|
| Agua bidestilada | 30.5µl |
| Buffer | 5.0 µl |
| MgCl ₂ 1.5mM | 1.75µl |
| DNTPs 20mM | 0.5µl |
| Taq pol 5 U/µL | 0.25µl |
| Muestra DNA | 10µl |
| Primer G1 | 1.0µl |
| Primer G2 | <u>1.0µl</u> |
| <u>Total</u> | <u>50 µl mezcla</u> |

2. Introducir los 50 µl de la solución en el termociclador con el programa LEPTO32.

PROGRAMACION LEPTO32 (termociclador)

| | | | |
|---------|------|--------|-----------|
| Ciclo 1 | 95°C | 5 min | 1 ciclo |
| Ciclo 2 | 94°C | 40 seg | 32 ciclos |
| | 58°C | 17 seg | |
| | 72°C | 1 min | |
| Ciclo 3 | 72°C | 10 min | 1 ciclo |

Preparación agarosa

1. Lavar la cubeta y peines con agua bidestilada
2. Sellar con masking tape los bordes de la cubeta
3. En un beaker agregar 50ml de agua bidestilada.
4. Agregar 2grs de agarosa
5. Al recipiente con la agarosa agregar 5µl de bromuro de etidio.
6. Calentar hasta ebullición (5min aprox.)
7. Agregar la solución a la cubeta con el peine y dejar enfriar hasta que se forme la gelatina.

ELECTROFORESIS

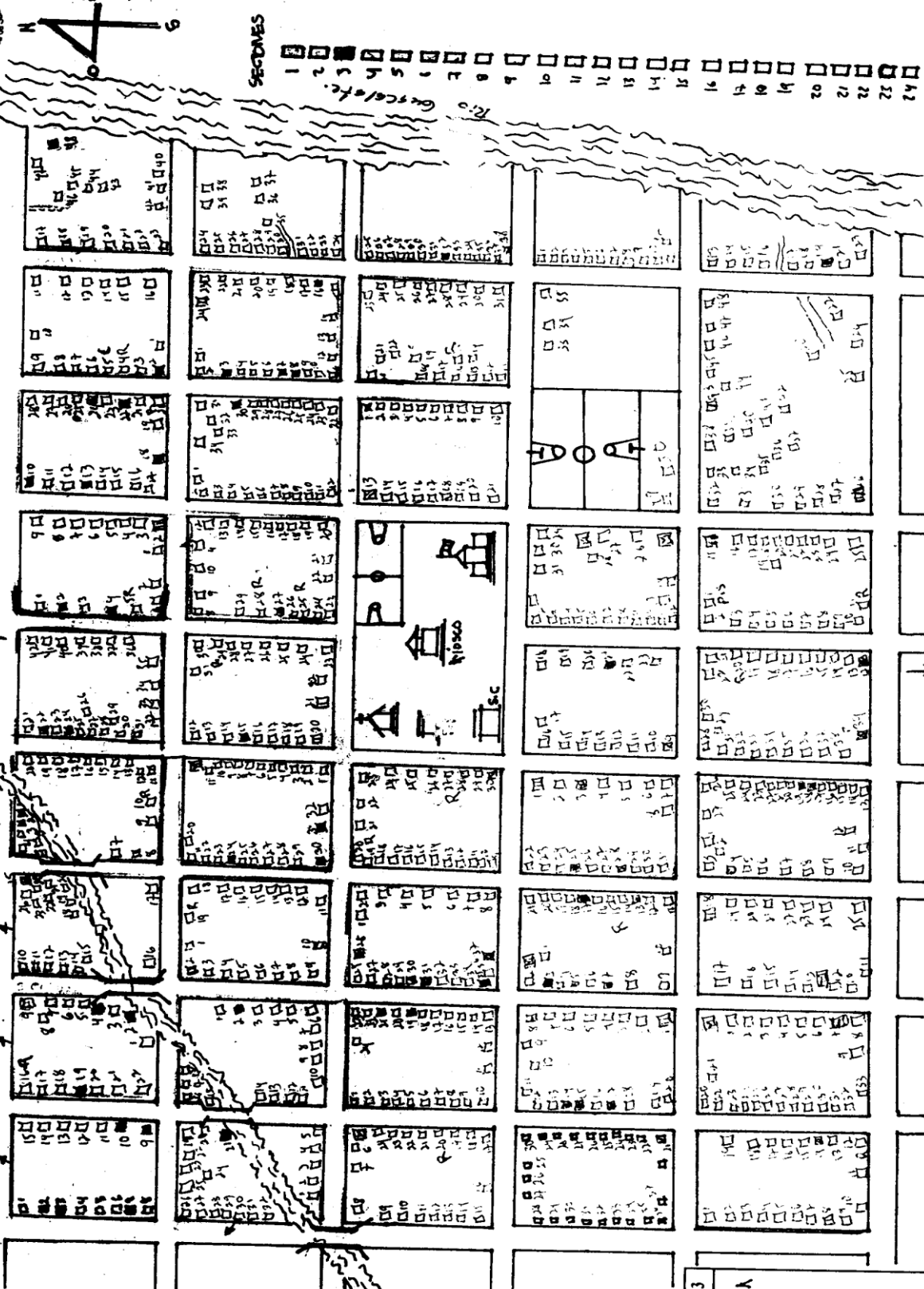
1. Tomar 8 μ l de muestra y ponerlo sobre el papel parafilm.
2. Agregar 2 μ l de Naranja de acridina y mezclar.
3. Llenar la cámara de electroforesis con solución Buffer.
4. Llenar cada pocito del agar con la mezcla.
5. Programar la cámara de electroforesis así:

| | |
|---------|----------|
| Voltaje | 120 volt |
| mA | 80 Amp |
| Tiempo | 30 min |

6. Al terminar la electroforesis, sacar el gel y colocarlo sobre un plástico transparente sobre el transluminador.
7. Tomar rápidamente la fotografía de la corrida (30-60min max).

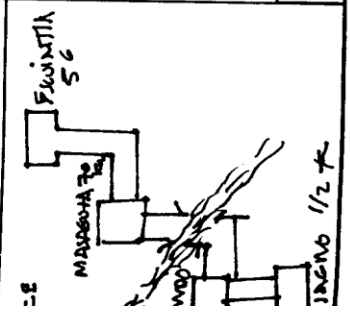
Reserva San Pedro

(parceamiento e (mitaño) Col. B. Deande



- 1] CASA HABITADA
- 2] CASA VENTA BITADA
- 3] G.B
- 4] IGLESIA EVANGELICA
- 5] IGLESIA CEBOLICA
- 6] TIENDA
- 7] DIO
- 8] CANTON DE MANORIAS
- 9] COMADRONA
- 10] ACADEMIA
- 11] P.S
- 12] SALON PARACUJIM
- 13] CANTINA BAJONET
- 14] SALON COMUNAL
- 15] RIESKO
- 16] ESCUELA
- 17] PUENTE

EMA DE LOCALIZACION Form. R-3



| | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----------|------------|---------|------------|--------|----------------|----|-----------------------------|----|-------------------------|-----|------------------|-----|
| Depto. | Escuintla | Municipio: | MASOCHA | Localidad: | Mitago | No. de Sector: | 24 | No. de Casas des-habitadas: | 49 | No. de Casas Habitadas: | 770 | No. de Familias: | 655 |
|--------|-----------|------------|---------|------------|--------|----------------|----|-----------------------------|----|-------------------------|-----|------------------|-----|

Col. Buena fe

Br. Raúl Alberto Díaz Portillo
Tesista

M.V. Blanca Zelaya De Romillo
Asesora principal

M.V. M.Sc. Dennis Guerra Centeno
Asesor

M.V. Virginia de Corzo
Asesora

IMPRIMASE: MED. VET. LEONIDAS ÁVILA PALMA
DECANO