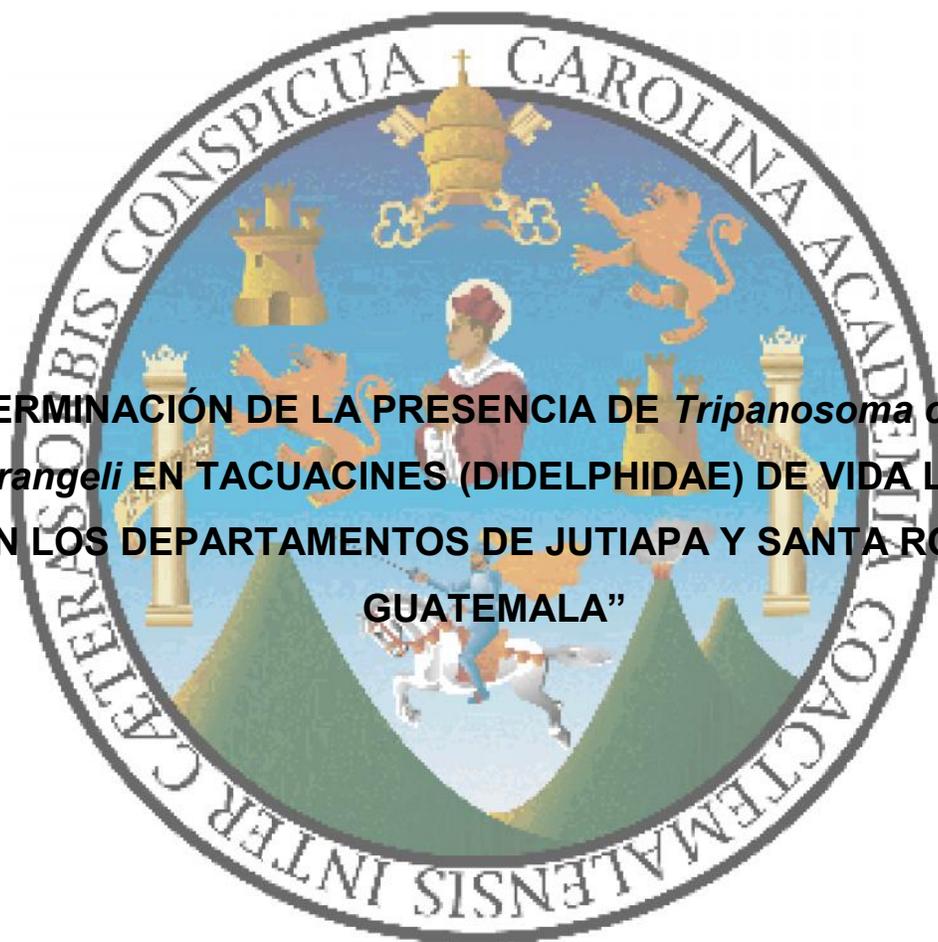


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

**“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Tripanosoma cruzi* Y
T. rangeli EN TACUACINES (DIDELPHIDAE) DE VIDA LIBRE
EN LOS DEPARTAMENTOS DE JUTIAPA Y SANTA ROSA,
GUATEMALA”**



MARIA FERNANDA ROSALES RIZZO

Médica Veterinaria

GUATEMALA, OCTUBRE DE 2011

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

**“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Tripanosoma cruzi* Y
T. rangeli EN TACUACINES (DIDELPHIDAE) DE VIDA LIBRE
EN LOS DEPARTAMENTOS DE JUTIAPA Y SANTA ROSA,
GUATEMALA”**

TESIS

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

POR

MARIA FERNANDA ROSALES RIZZO

Al Conferírsele el Grado Académico de

Médica Veterinaria

GUATEMALA, OCTUBRE DE 2011

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

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

ASESORES

M.Sc. Dennis Sigfried Guerra Centeno
M.V. Manuel Rodriguez Zea
M. Sc. Federico Villatoro

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

**En cumplimiento a 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 *Tripanosoma cruzi* Y
T. rangeli EN TACUACINES (DIDELPHIDAE) DE VIDA LIBRE
EN LOS DEPARTAMENTOS DE JUTIAPA Y SANTA ROSA,
GUATEMALA”**

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

Como requisito previo a optar al título profesional de:

MÉDICA VETERINARIA

TESIS QUE DEDICO

A DIOS

Por darme los dones necesarios para lograr alcanzar esta meta y por nunca soltar mi mano en el camino; sin Él no lo hubiera logrado.

A MIS PADRES

Nidia Rizzo y Byron Arana, por su amor incondicional, por todos sus esfuerzos y los sacrificios que han hecho y siguen haciendo. Por impulsarme a seguir mis sueños; por siempre apoyarme y creer en mí, ya que sin ellos no habría llegado hasta aquí.

A MI HERMANA

Silvita, por su gran amor, paciencia, compañía, compasión y alegría en mis mejores y peores momentos, por nunca defraudarme y ser mi modelo de la persona que quiero ser.

A MI ABUELITA

Tatita linda, por su amor, compañía y sus brazos siempre abiertos para acogerme en todo momento. Gracias por enseñarme a dar lo mejor y por siempre estar orgullosa de mi en cada paso que he dado.

A MIS TIOS Y PRIMOS

Lishu, Shenita, Charly, Karlita, Victor, Paola y Luisfer, por su tiempo, comprensión y amor. Por haber estado ahí siempre que lo necesité, por apoyarme y por creer en mí hasta cuando yo misma no lo hice.

A MIS SOBRINOS

Marce y Julián, por ser dos rayitos de amor y alegría en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

- A LA UVG** Por darme un lugar donde desarrollar y poner en práctica mis conocimientos.
- A NANCY CRUZ** Por su paciencia, enseñanzas y sobre todo por haberme dedicado su tiempo con el cariño que lo hizo.
- A MI EQUIPO** Del Proyecto de Zoonosis Bacterianas del Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala: Maria, Danilo, David, Ramón, Luis y las chicas del laboratorio, por confiar en mí, por aceptarme como compañera, hacerme sentir parte del equipo desde un principio y por darme la oportunidad de trabajar y aprender de cada uno de ellos.
- AL PECET** Mi eterno agradecimiento por la colaboración brindada para la estandarización del diagnóstico molecular, pero sobre todo por su apoyo y amistad. Los llevare siempre en mi corazón.
- A MI FAMILIA** Papa, abuelitos, tíos, primos y sobrinos Rosales por estar pendientes de mi durante mi carrera y por darme ánimo para seguir adelante cuando lo necesitaba.
- A MIS ASESORES** Por haber confiado en mí, en mi conocimiento y en mis habilidades, por su apoyo y consejos en la elaboración de este documento.

A MIS AMIGOS

Que siempre me han acompañado, sobre todo en estos 7 años: Pao A., Ale S., Silvana, Mariafer, Miriam, Ale P., Chepa, Pao H., Wicho, Fede, Willy, Canche y mis amigos del colegio de la A y B.

A LA ESCUELA

De Medicina Veterinaria por haberme formado como una profesional.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	HIPÓTESIS	3
III.	OBJETIVOS	4
IV.	REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1	Enfermedad de Chagas	5
4.1.1	Transmisión	5
4.1.2	Sintomatología	5
4.1.3	Agente Etiológico	6
4.1.4	Diagnóstico	7
4.1.5	Tratamiento	8
4.1.6	Control y Prevención	9
4.2	<i>Trypanosoma cruzi</i>	9
4.2.1	Taxonomía	9
4.2.2	Ciclo de Vida (Figura 1)	10
4.3	<i>Trypanosoma rangeli</i>	11
4.3.1	Taxonomía	11
4.3.2	Ciclo de vida (Figura 2)	13
4.3.3	Importancia	13
4.4.	Vectores	14
4.4.1.	<i>Rhodnius prolixus</i> (Figura 3)	14

4.4.2	<i>Triatoma dimidiata</i> (Figura 3)	15
4.5	Reservorio	16
4.5.1	Didelphidae	17
4.5.2	Identificación de tacuacines (Didelphidae)	18
4.5.3	Captura de tacuacines (Didelphidae)	19
4.5.4	Anestesia y toma de muestra en tacuacines (Didelphidae)	19
4.6	Enfermedad de Chagas en Guatemala	19
4.6.1	Epidemiología	20
4.6.2	Vectores	20
4.6.3	Reservorios	22
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1	Área de estudio	24
5.2	Recursos humanos	24
5.3	Material de Campo	25
5.4	Material de Laboratorio	25
5.5	Material de Escritorio	27
5.6	Tamaño de muestra:	27
5.7	Captura y toma de muestras	28
5.8	Detección de infección	30
5.9	Método estadístico	34
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
VII.	CONCLUSIONES	39
VIII.	RECOMENDACIÓN	40

IX.	RESUMEN	41
X.	BIBLIOGRAFÍA	42
XI.	ANEXOS	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Clasificación taxonómica de <i>T. cruzi</i>	10
Tabla 2:	Clasificación taxonómica de <i>T. rangeli</i>	12
Tablas 3 y 4:	Clasificación taxonómica de <i>D. virginiana</i> , <i>D. marsupialis</i> y <i>P. opossum</i>	18
Tabla 5:	Distribución de <i>T. dimidiata</i> y <i>R. prolixus</i> según departamento	21
Tabla 6:	Condiciones de PCR para un volumen final de 25ul.	33
Tabla 7:	Número y porcentaje de animales capturados por departamento y por especie en el período de enero y agosto de 2010	35
Tabla 8:	Distribución de frecuencias de cada una de las especies de tacuacines capturados, por sexo y por departamento, Guatemala 2011	35
Tabla 9:	Distribución de frecuencias de infección por <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i> según especie de tacuacín, Guatemala 2011	36
Tabla 10:	Número de tacuacines por especie y por departamento, infectados por <i>T. cruzi</i> o <i>T. rangeli</i> , Guatemala 2011	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TDR, 2004)	67
Figura 2:	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma rangeli</i> (García et al., 2009)	67
Figura 3:	Especímenes de <i>Triatoma dimidiata</i> y <i>Rhodnius prolixus</i> (Universidad de Panamá, 2005)	68
Figura 4:	<i>Didelphis virginiana</i> (Elizondo, 1999)	68
Figura 5:	<i>Didelphis marsupialis</i> (Elizondo, 1999)	69
Figura 6:	<i>Philander opossum</i>	69

I. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas es una enfermedad zoonótica, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*. En América Latina se estima que alrededor de 16-18 millones de personas están infectadas con *T. cruzi*, y de éstas, aproximadamente 50,000 mueren cada año (CDC, 1999).

Estudios realizados en Guatemala demuestran que esta enfermedad es endémica en los departamentos de Chiquimula, Jalapa, Zacapa, Jutiapa y Santa Rosa. Diversos estudios realizados en el ser humano y en los vectores (Triatomíneos) han permitido tener un mejor conocimiento respecto a la epidemiología de esta enfermedad en Guatemala. (Rizzo *et al.*, 2003)

Probablemente, estudios sobre los reservorios de esta enfermedad son escasos debido a que no se ha percibido su importancia.

La estrategia para el control de la enfermedad de Chagas se basa en la interrupción de la transmisión vectorial, el tamizaje de los donadores de sangre, la detección temprana y tratamiento de la transmisión congénita y en la administración de tratamiento personas con casos agudos y a los niños. Estas medidas han contribuido a la interrupción de la transmisión en varios países y consecuentemente a la disminución del número de casos en toda Latinoamérica. Otros temas que también han sido identificados como prioritarios por el grupo de expertos en la Enfermedad de Chagas de la OMS (WHO, 2007), tales como el papel que juega el ciclo de transmisión selvático en el mantenimiento de las infecciones por *T. cruzi* en las poblaciones, no han sido abordados con el mismo entusiasmo por la comunidad científica y/o los programas nacionales de control de la enfermedad.

T. cruzi, y *T. rangeli*, circulan tanto en ciclos peridomésticos como en ciclos selváticos, por lo que tienen el potencial de infectar a varias especies de mamíferos. Las especies de *Didelphis*, que son simpátricas tanto en Guatemala como en México, son considerados los reservorios silvestres más importantes para *T. cruzi* debido a su amplia distribución geográfica, su capacidad de adaptación y el hecho de vivir muy cerca de las viviendas humanas (OMS, 1991).

T. rangeli es otro tripanosoma que usualmente se puede aislar también de tatuacines, sin embargo, éste no es patógeno para el humano. Morfológicamente, ambos tripanosomas (*T. cruzi* y *T. rangeli*) son muy parecidos y las pruebas serológicas convencionales pueden dar una reacción cruzada entre ambos parásitos. Consecuentemente, para poder estimar la prevalencia de *T. cruzi* en los reservorios y su importancia en el ciclo de transmisión de la enfermedad de Chagas, es importante poder diferenciar entre infecciones de *T. cruzi* y *T. rangeli*, usando para ello pruebas moleculares las cuales son más sensibles y específicas que las convencionales. Esto nos permitirá determinar de mejor manera el papel que las poblaciones de *Didelphis* juegan como reservorios de la Enfermedad de Chagas en Guatemala y consecuentemente contribuir al conocimiento de los ciclos silvestres de estos parásitos en Jutiapa y Santa Rosa, Guatemala.

II. HIPÓTESIS

- La prevalencia de tripanosomiasis en los tacuacines muestreados es de 50%.
- La proporción de infestación por *T. cruzi* y *T. rangeli* en tacuacines (Didelphidae) es de 1 a 1.
- La infestación por *T. cruzi* y *T. rangeli* en los tacuacines (Didelphidae) no es dependiente del sexo del reservorio.
- La infestación de los tacuacines (Didelphidae) no es dependiente de la especie de *Trypanosoma*.

III. OBJETIVOS

1.1 General

- Contribuir al conocimiento del ciclo silvestre de *T. cruzi* en tatuacines (Didelphidae) de vida libre en los departamentos de Jutiapa y Santa Rosa en Guatemala.

1.2 Específicos

- Identificar a *T. cruzi* y *T. rangeli* utilizando la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en muestras de tatuacines (Didelphidae) procedentes de Jutiapa y Santa Rosa.
- Determinar la proporción de infestación por *T. cruzi* y *T. rangeli* en los tatuacines (Didelphidae) muestreados.
- Determinar si las tasas de infestación por *T. cruzi* o *T. rangeli* en los tatuacines (Didelphidae) muestreados son dependientes del sexo del reservorio.
- Determinar si la infestación de los tatuacines (Didelphidae) muestreados es dependiente de la especie de *Trypanosoma*.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es una zoonosis causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (CDC, 2007). El parásito es transmitido a hospederos vertebrados por insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae (Schmunis, 1994).

4.1.1 Transmisión

La forma más común para contraer la infección de *T. cruzi* es a través del contacto de la sangre con las heces de insectos triatominos. La infección, sin embargo, también puede ser adquirida por transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos o pasada de madre a hijo de forma congénita (CDC, 2007).

El “Centro para el Control y Prevención de Enfermedades” (CDC) estima que en el continente Americano existen de 16 a 18 millones de personas que están afectadas por la enfermedad de Chagas, y de estos aproximadamente 50,000 mueren cada año (CDC, 2003). Además de las condiciones biológicas, las condiciones de pobreza en las que vive la mayoría de la población rural en América Latina favorecen el establecimiento de la enfermedad, ya que las viviendas rurales fabricadas con paredes de bajareque o adobe y techos de paja son el hábitat preferido de los triatominos (Schmunis, 1994).

4.1.2 Sintomatología

La enfermedad de Chagas tiene una fase aguda y una fase crónica. La fase aguda ocurre inmediatamente después de la infección, puede durar varias semanas

o meses. Durante este período establecer el diagnóstico parasitológico es relativamente sencillo, ya que se pueden encontrar los parásitos en la sangre circulante. La fase aguda se caracteriza por fiebre, inflamación alrededor del lugar donde el parásito penetró la piel o la membrana mucosa, así como hepatomegalia y esplenomegalia. En raras ocasiones se ha observado que la inflamación aguda puede dar lugar a una fuerte inflamación del músculo cardíaco o del cerebro y sus meninges (CDC, 2007; Bravo, 2004.).

La fase crónica ocurre después de la aguda. Es una etapa prolongada y usualmente asintomática, durante la cual se encuentran muy pocos parásitos, o ninguno, en la sangre, por lo que establecer el diagnóstico es más difícil. La mayoría de las personas pueden no presentar síntomas durante toda la vida y fallecer por cualquier otra razón; sin embargo, aproximadamente un 30% de los pacientes infectados pueden, después de varios años de estar asintomáticos, presentar problemas médicos debilitantes y potencialmente mortales tales como arritmias, cardiomegalia y dilatación del esófago y del colon (CDC, 2007; Bravo, 2004.).

En perros se puede observar miocarditis aguda (caracterizada por fiebre, debilitamiento, colapso súbito, taquiarritmias mortales); miocardiopatía crónica (después de 1-3 años: insuficiencia cardíaca, ascitis, derrame pleural, edema); linfadenopatías, esplenomegalia, o meningoencefalitis (Birchard, 2002).

4.1.3 Agente Etiológico

Trypanosoma cruzi, es un parásito digenético que alterna durante su ciclo de vida natural entre un huésped vertebrado y otro invertebrado. (Ayau, 1998). Se caracteriza por la presencia de un flagelo y una mitocondria donde se encuentra el kinetoplasto, que es el organelo especializado que contiene el ADN (Brener *et al.*, 2004).

El parásito *T. cruzi* se puede identificar por sus características morfológicas y biológicas; sin embargo, éste puede confundirse con *T. rangeli*, el cual es otro parásito flagelado que también se puede encontrar en los triatomíneos, sin embargo, aún cuando éste puede infectar al ser humano, el mismo no causa ninguna enfermedad (Brener *et al.*, 2004). A diferencia de otros tripanosomas que se transmiten por la saliva, *T. cruzi* es el único tripanosoma patógeno para los humanos, que se transmite por las heces del vector invertebrado. (Kirchoff, 2003).

4.1.4 Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas se puede realizar por medio de la observación microscópica del parásito en frotis sanguíneos teñidos con Giemsa, esta técnica sin embargo, es útil únicamente en la fase aguda de la enfermedad cuando los parásitos circulantes en la sangre son abundantes (CDC, 2008).

También se puede realizar el diagnóstico en cortes histológicos de tejido teñidos con Hematoxilina-eosina, donde se pueden observar los amastigotes (Bravo, 2004).

El diagnóstico de la enfermedad en fase crónica se realiza usualmente mediante pruebas serológicas (CDC, 2008). Las pruebas más utilizadas son la hemoaglutinación indirecta (HI), inmunofluorescencia indirecta y ELISA. Estas pruebas aún cuando suelen tener altos niveles de sensibilidad y especificidad, siempre tienen la posibilidad de dar falsos positivos o reacción cruzada con infecciones debidas a otros parásitos tales como *Leishmania spp.* y *Trypanosoma rangeli* (Bravo, 2004).

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas en perros se realiza identificando a los microorganismos en la sangre (frotis cubierto tamponado o directo) o en los aspirados de los ganglios linfáticos. Además puede realizarse pruebas de tipo serológico como las descritas para el caso de las infecciones en humanos (Birchard, 2002).

4.1.5 Tratamiento

De acuerdo a las normas de la OMS, los pacientes con la enfermedad de Chagas se deben tratar cuando se diagnostican en la fase aguda o en casos de reactivaciones y en casos de enfermedad de Chagas congénita (WHO, 2007).

El tratamiento durante la fase crónica de la enfermedad se recomienda tanto para niños como para adultos. Únicamente existen dos fármacos que han sido aprobados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas: benznidazol y nifurtimox. La utilización de ambos fármacos va acompañada a menudo de varios tipos de efectos secundarios, algunos de los cuales pueden inclusive empeorar el estado de salud de las personas, especialmente en los adultos mayores (WHO, 2007).

No existe un tratamiento específico para los signos y síntomas asociados a los problemas cardiacos o gastrointestinales producidos por la enfermedad de Chagas, por lo que solo se recomienda el tratamiento sintomático (Bravo, 2004.).

En el caso de los perros, el tratamiento recomendado es Nifurtimox (2-7mg/kg, VO cada 6 horas durante 3-5 meses) o Benznidazol (5mg/kg, VO cada 24 horas durante más de 2 meses) (Birchard, 2002).

4.1.6 Control y Prevención

En áreas endémicas como Guatemala, se ha demostrado que la eliminación de vectores de los hogares mediante el rociamiento con insecticidas es efectivo, ayudando de esa manera a disminuir la transmisión de la enfermedad. Además, el control en los bancos de sangre, así como la detección temprana de infecciones (incluyendo infecciones congénitas) son herramientas importantes en la prevención de la transmisión (CDC, 2008).

4.2 Trypanosoma cruzi

4.2.1 Taxonomía

En la sangre, el parásito *T cruzi* es monomórfico, mide 16-20 μ m de longitud y presenta forma de luna cuarto creciente con un extremo posterior puntiagudo. El kinetoplasto es grande y subterminal, ocupando la totalidad de esta porción del cuerpo. El núcleo es central, con membrana ondulante moderadamente desarrollada y flagelo libre (Soulsby, 1987).

Las divisiones ocurren en la fase de amastigote y no en la de trypomastigote. Estas formas en división aparecen como cuerpos de 1.5-4 μ m de diámetro en músculo y otras células, especialmente en las del músculo cardíaco (Soulsby, 1987).

Tabla 1: Clasificación taxonómica de *T. cruzi*

Dominio	Eucarya
Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Filo	Sarcomastigophora
Subfilo	Mastigophora
Clase	Zoomastigophorea
Orden	Kinetoplastida
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Trypanosoma</i>
Subgénero	<i>Schizotrypanum</i>
Especie	<i>T. cruzi</i>

(Bischoff *et al.*, 2003 ; Soulsby, 1987; WHO, 2002)

4.2.2 Ciclo de Vida (Figura 1)

T. cruzi tiene un ciclo de transmisión intradomiciliario afectando a los perros y los gatos domésticos (reservorios). El vector es un triatomo intradomiciliario. Existen otros dos ciclos de transmisión: El peridomiciliario y el selvático. Los armadillos (*Dasypus novemcinctus*) y los tacuacines (*Didelphis*) son los reservorios principales de *T. cruzi* (Bravo, 2004.)

T. cruzi se transmite al hospedero vertebrado principalmente por medio de los triatomos hematófagos. La transmisión ocurre al momento en que los triatomos se alimentan del huésped, ya que al momento en que se alimentan también defecan, liberando en las excretas el tripomastigote metacíclico. El tripomastigote penetra por la herida que deja el insecto, y cuando el hospedero se rasca, introduce el material fecal infectado dentro de la herida. El parásito también puede penetrar a través de las membranas mucosas y los folículos pilosos. Una

vez adentro del huésped, el tripomastigote invade las células del tejido y se transforma en amastigote. Los amastigotes se reproducen por fisión binaria dentro del citoplasma de la célula hospedera, hasta que la misma se satura (Wiser, 1999; CDC, 2009).

Luego de varias divisiones, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes y se liberan de la célula infectada. Los tripomastigotes liberados y circulando invaden otras células o pasan al sistema circulatorio. Los tripomastigotes que invaden las células hospederas se transforman en amastigotes y se repite el proceso de replicación. El ciclo intracelular dura un promedio de 4 días (Wiser, 1999; CDC, 2009).

En el sistema circulatorio, los tripomastigotes no se replican y pueden ser ingeridos por otro triatomino al momento en que se están alimentando (Wiser, 1999; CDC, 2009).

Dentro del tracto digestivo del vector triatomino, los tripomastigotes se transforman en epimastigotes. El epimastigote se replica varias veces por fisión binaria y pasa por el tracto digestivo del insecto para unirse al epitelio de la glándula rectal, donde maduran a la forma infectiva, llamada tripomastigotes metacíclicos, los cuales se desprenden de las células epiteliales y esperan en el lumen del recto a ser excretados al momento de la ingesta. (Wiser, 1999; CDC, 2009).

4.3 *Trypanosoma rangeli*

4.3.1 Taxonomía

T. rangeli fue descrito por primera vez como una forma de epimastigote en el vector *Rhodnius prolixus*. Luego fue observado en sangre de humanos, perros,

gatos, tacuacines y monos. Se considera un tripanosoma frecuentemente mezclado con infecciones producidas por *T. cruzi* (Soulsby, 1987). Según García *et al.* (2009), solamente el género *Rhodnius* presenta las formas infectivas de *T. rangeli* en sus glándulas salivales.

Las formas sanguíneas de *T. rangeli* miden 26-36 μ m; el núcleo es anterior y el kinetoplasto es pequeño y subterminal. La membrana ondulante es relativamente ancha y rasgada, con un corto flagelo. Se reproduce por fisión binaria longitudinal (Soulsby, 1987).

T. rangeli no es patógeno para los mamíferos; sin embargo, puede ser patógeno para el vector y su importancia radica en que frecuentemente se confunde con *T. cruzi* (Soulsby, 1987).

Tabla 2: Clasificación taxonómica de *T. rangeli*

Dominio	Eucarya
Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Filo	Sarcomastigophora
Subfilo	Mastigophora
Clase	Zoomastigophorea
Orden	Kinetoplastida
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Trypanosoma</i>
Subgénero	<i>Tejeraia</i>
Especie	<i>T. rangeli</i>

(Bischoff *et al.*, 2003; Soulsby, 1987; WHO, 2002)

4.3.2 Ciclo de vida (Figura 2)

La infección del vector se inicia cuando los parásitos tripanosmátidos son ingeridos en sus formas de trypomastigotes, los cuales subsecuentemente se transforman en epimastigotes en el intestino anterior y posterior del vector triatomino (flechas blancas). En este sitio ocurre la reproducción de los parásitos y en el proceso algunos epimastigotes invaden la hemolinfa del vector a través del epitelio, alcanzando el hemocele (flechas rojas). Los epimastigotes migran hacia las glándulas salivarias, invadiéndolas y completando su desarrollo hasta las formas infectivas (trypomastigotes). A diferencia de *T. cruzi*, donde la transmisión es por contaminación fecal, *T. rangeli* se transmite por medio de la saliva. (García *et al.*, 2009)

4.3.3 Importancia

T. cruzi y *T. rangeli* son parásitos simpátricos que infectan triatominos, humanos y una variedad de mamíferos domésticos y silvestres (Grisard *et al.*, 2008).

T. rangeli posee una importancia biológica y epidemiológica, debido a que comparte con *T. cruzi* hasta un 60% de su composición antigénica, lo cual causa reacciones cruzadas en las pruebas indirectas de diagnóstico para la enfermedad de Chagas (Grisard *et al.*, 2008).

El poder discriminar entre las infecciones causadas por uno y otro parásito es importante desde el punto de vista de salud pública, ya que nos permitirá conocer la prevalencia real de *T. cruzi* en los triatominos, mamíferos y humanos (Grisard *et al.*, 2008).

4.4. Vectores

Los triatominos, vectores de la enfermedad de Chagas, pertenecen a la Clase Insecta, Orden Hemiptera, Familia Reduviidae y Subfamilia Triatominae. Se conocen más de 130 especies y 16 géneros, de los cuales, 36 entran en contacto con el hombre aunque solamente 12 se consideran vectores de la enfermedad de Chagas (WHO, 2002).

Los triatominos son hematófagos obligados. Las hembras depositan de 150 a 300 huevos por oviposición. De cada huevo eclosiona una ninfa, la cual pasa por cinco estadios ninfales, necesitando en cada uno de estos estadios ingerir sangre para así llegar a la fase adulta (WHO, 2002)

Dependiendo de la especie y de las condiciones ambientales, el ciclo de vida dura de 4 a 24 meses. Los vectores más importantes para la enfermedad de Chagas, normalmente tienen 1 o 2 ciclos por año. Los adultos se diferencian de los estadios inmaduros (ninfas) por la presencia de alas y genitales desarrollados. Los adultos y estadios inmaduros comparten hábitats y poseen hábitos alimenticios similares (WHO, 1997).

4.4.1. *Rhodnius prolixus* (Figura 3)

Rhodnius prolixus es el principal vector doméstico de la enfermedad de Chagas en Colombia, Venezuela y algunas partes de Centro América, especialmente en Guatemala, Honduras y El Salvador (Schofield, 1994).

R. prolixus en América del Sur se ha reportado en palmas y nidos de mamíferos de donde puede colonizar las casas en los alrededores. Normalmente *R. prolixus* se puede capturar en los techos de las casas donde puede alcanzar

altas densidades (WHO, 2002). En centro América, *R. prolixus* parece tener casi exclusivamente un hábitat doméstico (Schofield, 1994).

Se cree que la humedad es un factor esencial en el desarrollo de *R. prolixus*, particularmente en el proceso de eclosión de los huevos (WHO, 2002). El ciclo de vida, desde huevo hasta adulto, es de 3-4 meses y puede alcanzar densidades poblacionales sumamente altas (Schofield, 1994).

4.4.2 *Triatoma dimidiata* (Figura 3)

T. dimidiata se caracteriza por ser una especie bastante grande y con un distintivo colorido (Schofield, 1994). Tiene una amplia distribución geográfica la cual va desde México hasta la parte norte de Sur América. Esta distribución geográfica coincide a menudo con la distribución de *R. prolixus* (Schofield, 1994).

Los ecotopos (microhábitats) naturales de *T. dimidiata* incluyen las madrigueras de tacuacines (los cuales son responsables de las altas tasas de infección con *T. cruzi*), troncos de madera y piedras. (WHO, 2002) Estos insectos también se esconden en las paredes y techos de las casas de adobe, desde donde salen para alimentarse de los habitantes de las casas y consecuentemente infectándolas con el parásito *T. cruzi* (PHAO, 2008).

T. dimidiata no parece tener una preferencia alimentaria para ningún animal de sangre caliente en particular. Por el contrario, se muestra como un insecto altamente ecléctico (Zeledón, 1981).

T. dimidiata se distingue de las demás triatomíneos debido a la frecuencia con la que coloniza áreas urbanas, y por su capacidad de transmitir *T. cruzi* a los humanos aún cuando ésta se encuentre en densidades muy bajas (WHO, 2002).

En Guatemala, *T. dimidiata* parece tener predilección por ambientes secos ya que se le encuentra primordialmente en los Departamentos del oriente del país, aunque también se le encuentra en zonas húmedas. Al contrario de *R. prolixus*, *T. dimidiata* se observa poco frecuentemente en regiones cálidas y usualmente prefiere los climas templados en alturas que van desde 200 a 300m hasta 1600m sobre el nivel del mar (Zeledón, 1981).

El ciclo de vida de *T. dimidiata* se estima que dura aproximadamente 1 año y medio. El huevo eclosiona en 24-30 días, luego pasa por 5 estadios ninfales hasta llegar a la fase adulta (Zeledón, 1981).

4.5 Reservorio

Se entiende como reservorio a cualquier ser humano, animal, artrópodo, planta, suelo o materia (o una combinación de éstos), en el que normalmente vive y se multiplica un agente infeccioso, del cual depende su supervivencia, y donde se reproduce de manera que puede ser transmitido a un huésped susceptible (Vargas, 2000).

La infección con *T. cruzi* es común entre los pequeños mamíferos y marsupiales en América, entre los cuales se han registrado más de 100 especies de mamíferos infectados naturalmente con el parásito. Las aves, anfibios y reptiles tienen una resistencia natural a la infección por *T. cruzi* (Kirchoff, 2003., Schofield, 1994., WHO, 2007.).

Muchos de los mamíferos presentan altas parasitemias de *T. cruzi* con pocas o ningunas señales clínicas de enfermedad. Es frecuente que los nidos de dichos mamíferos estén infestados con especies selváticas de triatominos por lo que la transmisión del parásito al mamífero puede ser debido a ingestión de las chinches

así como por la contaminación con las deyecciones de las chinches infectadas (Schofield, 1994).

Existen 3 especies y subespecies de reservorios que merecen mayor atención, debido a que son los más importantes: un marsupial, el tatuacín (*Didelphis* spp.), un edentado, el armadillo (*Dassypus* spp.) y un roedor, la cotuza (*Dasyprocta* spp.) (WHO, 2007).

4.5.1 Didelphidae

Los tatuacines son probablemente los reservorios más importantes de *T. cruzi* debido a que son omnívoros, sumamente prolíficos, ecológicamente adaptables, y tienen altas tasas de infección con *T. cruzi* las cuales son usualmente vistas con parasitemias altas y prolongadas, causando inclusive la eliminación de *T. cruzi* por la vía urinaria. Los tatuacines viven en contacto cercano con varios triatomíneos, situación que favorece el que casi siempre estén infectados con *T. cruzi* (WHO, 2007). Existen reportes describiendo que los tripanosomas pueden detectarse en las glándulas anales de los animales infectados (WHO, 2007).

Tablas 3 y 4: Clasificación taxonómica de *D. virginiana*, *D. marsupialis* y *P. oposum*

Reino	Animal
Filo	Chordata
Subfilo	Vertebrata
Clase	Mammalia
Subclase	Theria
Infraclase	Metatheria
Orden	Didelphiomorpha
Familia	Didelphidae
Subfamilia	Didelphinae
Género	<i>Didelphis</i>
Especies	<i>D. marsupialis</i> , <i>D. virginiana</i>

Reino	Animal
Filo	Chordata
Subfilo	Vertebrata
Clase	Mammalia
Subclase	Theria
Infraclase	Metatheria
Orden	Didelphiomorpha
Familia	Didelphidae
Subfamilia	Didelphinae
Género	<i>Philander</i>
Especies	<i>P. oposum</i>

(ITIS, 2009)

4.5.2 Identificación de tacuacines (Didelphidae)

Los tacuacines se identifican en base a sus características morfológicas. Especial atención hay que poner a la coloración del pelo, principalmente en la región de las mejillas y la región ventral del cuerpo. En el caso de *D. virginiana* (Figura No. 4) el pelo de las mejillas es de color blanco, mientras que en *D. marsupialis* (Figura No. 5) es amarillo pálido a naranja (Ruiz *et al.*, 2002). A diferencia de *D. marsupialis* y *D. virginiana* que poseen el dorso color negro-grisáceo, *Philander* (Figura No. 6) posee la parte dorsal de color café-grisáceo. Adicionalmente la parte ventral de *Philander* es de color crema o amarillo. La distinción más marcada de los *Philander* son las manchas de color crema sobre sus ojos (Elizondo, 1999).

El peso de los diferentes tatuacines también puede variar dependiendo de la especie. *D. virginiana* usualmente pesa entre 500-2,300g; mientras que *D. marsupialis* puede pesar de 565 - 1,610g; y *P. oposum* de 200 a 660g, siendo este último el menos pesado (Emmons, 1997).

4.5.3 Captura de tatuacines (Didelphidae)

El método de captura descrito por Ruiz *et al.*, (2002) consiste en capturar a los tatuacines con trampas Tomahawk (66x23x23cm), con una distancia de 250m entre cada una. En ese estudio se colocó piña y zapote como cebo por la tarde, para revisar las trampas la mañana siguiente. Los animales fueron marcados con una muesca de 2mm en la oreja. Se interrumpía el período de captura durante una semana para permitir la dispersión de los animales (Ruiz *et al.*, 2002).

4.5.4 Anestesia y toma de muestra en tatuacines (Didelphidae)

En el estudio realizado por Ruiz *et al.*, (2002) los animales capturados fueron anestesiados utilizando Clorhidrato de Xilacina y Clorhidrato de Ketamina en dosis de 0.25mg/kg y 25mg/kg respectivamente. La toma de muestra se realizó por medio de punción cardiaca, extrayendo 2-3ml de sangre (Ruiz *et al.*, 2002).

4.6 Enfermedad de Chagas en Guatemala

La historia de la enfermedad de Chagas en Guatemala empieza en 1932 cuando el Dr. Eduardo Reichenow reportó que el 40% de *T. dimidiata*, colectadas en Santa Rosa y Escuintla, estaban infectadas con *T. cruzi*. En ese mismo reporte, se describe que 3 de 90 perros muestreados estaban infectados con *T. cruzi* (Aguilar, 1993). Dr. De León (1942) reportó la presencia de *Trypanosoma sp* en monos saraguate provenientes del departamento de Alta Verapaz y en 1949 observó parásitos de *T. rangeli* en humanos (Aguilar 1993).

Los primeros casos clínicos de la enfermedad de Chagas reportados en seres humanos, fueron en 2 niños aparentemente sanos, quienes únicamente presentaban un aumento en el tamaño de los ganglios axilares e inguinales (Aguilar 1993).

Después de estos descubrimientos se realizaron varios estudios sobre el vector y los aspectos clínicos y epidemiológicos de la enfermedad. En cuanto al vector, se reportaron infecciones por *T. cruzi* en aproximadamente 80% de los *R. prolixus* y *T. dimidiata* capturados en Santa Rosa, Jutiapa, y Zacapa (Aguilar 1993)

4.6.1 Epidemiología

Se calcula que en Guatemala existen alrededor de 730,000 personas infectas por *T. cruzi* y que anualmente aparecen aproximadamente 30,000 casos nuevos de enfermedad de Chagas (Cordón, 2003). Datos obtenidos de un estudio serológico en niños de edad escolar, realizado en 1999 en cinco departamentos de Guatemala, muestran que las tasas de infección por *T. cruzi* en este grupo etario podría ser tan alta como 5.28%. Se realizó un estudio para determinar la seroprevalencia en niños de edad escolar y se encontraron aproximadamente 235 niños infectados (Rizzo *et al.* 2003).

4.6.2 Vectores

En Guatemala, la distribución geográfica del vector incluye el área sur oriental del país donde las condiciones climáticas y la pobreza favorecen la permanencia intra-domiciliar del vector (Cordón, 2003). Los vectores predominantes son *R. prolixus*, que se considera casi exclusivamente un vector doméstico, y *T. dimidiata*, que ocupa hábitats domésticos y selváticos (Dorn *et al.*, 1999).

Ambos vectores, son comúnmente conocidos en el área endémica como chinche picuda, talaje o telepate (Naomi *et al.*, 2002).

Según Monroy *et al.* (1994), la distribución de la especies de vectores en el área intradomiciliar depende del tipo de construcción y de las preferencias de cada especie. En un estudio realizado en 1994, se reportó la distribución de vectores por departamentos de la siguiente manera: (Monroy *et al.*, 1994).

Tabla 5: Distribución de *T. dimidiata* y *R. prolixus* según departamento

<i>Triatoma dimidiata</i>	<i>Rhodnius prolixus</i>
Guatemala	
Santa Rosa	
Jutiapa	
Jalapa	Santa Rosa
Chiquimula	Jutiapa
Progreso	Jalapa
Zacapa	Chiquimula
Escuintla	Progreso
Izabal	Zacapa
San Marcos	San Marcos
Baja Verapaz	
Huehuetenango	
Alta Verapaz	

(Fuente: Modificación de Monroy *et al.*, 1994)

Más recientemente, Monroy *et al.* (2003) reportaron que *T. dimidiata* fue encontrada en 16 de los 22 departamentos de Guatemala, mientras que *R. prolixus* solamente en 4 departamentos (Tabla No. 1). En el mismo estudio, no se encontraron vectores en los siguientes 6 departamentos: Petén, Izabal, Sacatepéquez, Huehuetenango, Sololá y Totonicapán.

La información anterior, sin embargo, contrasta con la reportada para el mismo año por el Programa Nacional de Control de Vectores de Chagas quienes reportan la presencia de *T. dimidiata* en 5 de los 6 departamentos en los cuales el estudio de Monroy *et al.* (2003) no los encontraron.

Las tasas de infección por *T. cruzi* en la misma especie de triatomino varían de departamento a departamento. *T. dimidiata* se encuentra más infectada por *T. cruzi* en los departamentos del este del país: Santa Rosa, Chiquimula y Jutiapa, mientras que las tasas de infección en los departamentos del oeste (Quetzaltenango, San Marcos) son más bajas (Monroy *et al.*, 2003).

4.6.3 Reservorios

La enfermedad de Chagas es una zoonosis originalmente restringida a animales silvestres pero que fue traída a la vivienda humana por insectos hematófagos (Mejía *et al.*, 1994).

Se cree que los reservorios, usualmente mamíferos, pueden infectarse comiendo vectores o comiendo carne de animales infectados, o bien, al momento en el cual el vector se alimenta del reservorio. Entre los mamíferos que han sido reportados como reservorios están: el perro, gato, ardilla, ratón, tacuacín, caballo, vaca, etc. El perro es uno de los más importantes por ser muy común encontrarlo en las casas. Las ratas domésticas y silvestres al igual que los marsupiales son de

mucha importancia como reservorios de la enfermedad de Chagas debido a su alta densidad de población y la facilidad de desplazamiento.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Área de estudio

El estudio se realizó en comunidades de los departamentos de Jutiapa y Santa Rosa, Guatemala, los cuales son parte del área endémica de la enfermedad. Estos departamentos fueron seleccionados debido a que se aprovechó la captura de estos mamíferos como parte de otro estudio.

El departamento de Jutiapa se encuentra al sur-oriente de Guatemala. Tiene una extensión territorial de 3,219 Km² y una altura de 1,233 MSM (INGUAT, 2008). Su clima es cálido a templado con temperaturas desde 15-28° C (eGuate.com, 2007).

El departamento de Santa Rosa se encuentra al sur-oriente de Guatemala. Posee una extensión territorial de 2,955 Km² y una altura de 1,330 MS. Su clima es de cálido a templado con temperaturas desde 15-28° C (eGuate.com, 2007).

5.2 Recursos humanos

- Estudiante tesista.
- Médicos Veterinarios asesores.
- Equipo de “Health and Burden of Rickettsial and Bartonella Zoonoses in Guatemala” (HBRBZG) del Centro de Estudios en Salud (CES) de la Universidad del Valle de Guatemala (UVG).
- Personal del Laboratorio de “Monitoreo y Evaluación Clínica” del CES de la UVG.

5.3 Material de Campo

- Cebo (Comida para gato y banano)
- Xilacina 2%
- Ketamina 10%
- Alcohol
- Algodón
- Guantes de látex
- Jeringas de 3ml
- Tubos con anticoagulante
- Gradilla
- Hielera
- Refrigerantes
- Bolsa de descarte
- Bote para descarte de material punzocortante
- Trampas Tomahawk®
- Mesa de muestreo
- Tijeras

5.4 Material de Laboratorio

5.4.1 Reactivos

- EDTA
- SDS
- Cloro
- Acetato de amonio 10M

- Cebadores 121 (5'-AAA TAA TGT ACG GGT GAG ATG CAT GA-3') y 122 (5'-GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA-3')
- Taq ADN polimerasa (Roche)
- Solución amortiguadora de reacción 10x (100mM Tris HCl, 15mM MgCl₂, 500mM KCl, pH 8.3) (Roche)
- Cloruro de magnesio 25mM
- Agarosa 2%
- Solución amortiguadora de corrida TBE 10x (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8.3)
- Marcador de peso molecular (1kb Promega)
- TE (0.444 g Tris HCl, 0.265 g Tris Base, 0.185 g EDTA, Afore a 500 mL agua destilada)
- dNTP's (100mM cada uno: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

5.4.2 Consumibles

- Tubos Falcon de 15ml
- Tubos Eppendorf de 1.5ml
- Tubos de 0.5ml
- Tubos de 0.2ml
- Pipetas Transfer
- Pipetas serológicas
- Puntas
- Gradillas
- Guantes de látex
- Guantes de nitrilo

5.4.3 Equipo

- Termociclador (Icycler, Biorad, Hércules CA)
- Centrífuga refrigerada
- Vortex
- Agitador horizontal de inversión
- Micropipetas de 1ul, 5ul, 100ul, 200ul y 1000ul
- Cámara de electroforesis
- Fuente de poder
- Espectrofotómetro (GeneSpec)
- Cámara Bio Doc-It Imaging Sytem
- Incubadora

5.5 Material de Escritorio

- Libreta de apuntes.
- Cuaderno de laboratorio.
- Lápiz y lapiceros.
- Marcador permanente.
- Hojas de papel blancas tamaño carta, 80 gramos.
- Cámara digital.

5.6 Tamaño de muestra:

Determiné el tamaño de la muestra utilizando la fórmula de poblaciones infinitas mediante la siguiente ecuación:

$$n_0 = \frac{Z^2 pq}{e^2}$$

Donde:

n= Tamaño de la muestra

z= 1,96 para el 95% de confianza

p= Frecuencia esperada del factor a estudiar

q= 1-p

e= Precisión o error admitido

$$n_0 = \frac{1.96^2(0.5)(0.5)}{0.12^2}$$

$$n_0 = 66.69$$

Para el tamaño de muestra se utilizó la fórmula de poblaciones infinitas asumiendo una prevalencia de 50% y un error del 12% lo cual dio como resultado un tamaño de muestra de 66 animales

El tamaño mínimo de la muestra era de 67 individuos.

5.7 Captura y toma de muestras

Tres noches de captura al mes, alternando mes a mes, entre los sitios de colecta por departamento que fueron planificadas.

Las capturas se realizaron conjuntamente con personal del equipo de HBRBZG, utilizando Trampas Tomahawk®, las cuales fueron colocadas en peridomicilio, y campo abierto durante la tarde del primer día. La ubicación de las trampas se basó en las posibilidades de captura, condiciones del hábitat (vegetación, disponibilidad de alimento, poca o nula presencia humana, etc.) y evidencia de la presencia de tacuacines (huellas, heces, conocimiento local, etc.).

Las trampas permanecieron en el lugar de captura toda la noche y se revisaban a la mañana siguiente. Comida de gato o banano fue utilizado como cebo.

Todas las trampas, con o sin animales, eran revisadas cada mañana. Las trampas en las cuales se encontraban tatuacines eran separadas y mantenidas en la sombra hasta el momento en que terminaba la revisión de todas las trampas. Cualquier otro tipo de animal que hubiera caído en la trampa era liberado inmediatamente.

Para examinar y tomar una muestra de sangre de los tatuacines capturados, se procedió primero a restringirlo químicamente dentro de la jaula, con una dosis de Clorhidrato de Xilacina 2% de 1-4mg/kg de peso y 20-30mg/kg de peso de Clorhidrato de Ketamina 10%. Previamente se tararon las trampas para poder pesar a los animales.

El anestésico se administró por vía intramuscular, inmovilizando el animal tirándolo por la cola mientras aún se encontraba dentro de la jaula.

Una muestra de sangre de 2 ml, tomada de la vena coccígea fue obtenida de cada uno de los tatuacines, utilizando para ello una jeringa de 3ml y una aguja calibre 25.

La muestra de sangre fue colocada en tubos de 3ml de vidrio los cuales contenían ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante

Cada tubo fue rotulado con un número correlativo. En la hoja de registro (Anexo No. 1) se anotó la información correspondiente a cada muestra (número de animal, fecha, hora, especie, sexo y morfometría).

Todos los tacuacines fueron pesados utilizando una balanza y medidos de la punta de la cola a la punta de la nariz con una cinta métrica. La determinación del sexo se realizó mediante observación directa, tratando de identificar los genitales para diferenciar entre hembras y machos. La especie del tacuacín fue determinada según las características morfológicas (pelos, color, tamaño, etc.)

Como parte del estudio realizado por el equipo “Health and Burden of Rickettsial and Bartonella Zoonoses in Guatemala” del Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala, se tomó una biopsia de la oreja derecha de los tacuacines; marca que posteriormente fue utilizada para identificar a los animales y evitar tomar muestras en los animales recapturados.

Una vez terminado el proceso de muestreo, los animales capturados fueron liberados en el mismo sitio de captura.

Los tubos con sangre fueron mantenidos en hieleras con hielo a temperatura controlada de aproximadamente de 4 a 8° C. Al final del viaje, todas las muestras colectadas fueron transportadas al laboratorio de la UVG en la ciudad de Guatemala en donde se realizaron las pruebas moleculares.

5.8 Detección de infección

5.8.1 Extracción de ADN

Utilicé el procedimiento normado estándar para la extracción de ADN a partir de sangre fresca con EDTA utilizado en el Centro de Estudios en Salud de la UVG (Anexo 2), con algunas modificaciones:

1. La muestra de sangre colectada se almacenó un máximo de 14 días a 4°C.

2. Centrifugué la muestra por 15 minutos a 3000rpm. Mientras las muestras se centrifugaban rotulé 2 tubos cónicos de 15 ml y un tubo de 0.5ml por muestra.
3. Al tubo cónico le agregué 3.5ml de solución amortiguadora de lisis 1 frío.
4. De la muestra de sangre centrifugada, tomé el paquete celular incluyendo la capa de blancos y la agregué al tubo con solución amortiguadora de lisis 1.
5. Coloqué los tubos en posición horizontal en el agitador por 15 minutos para luego centrifugarlos 10 minutos a 3500rpm a 4°C.
6. Luego de centrifugada la muestra descarté el sobrenadante en cloro al 10% y quité la capa rosa restante con una pipeta.
7. Resuspendí el precipitado utilizando el vortex.
8. Repetí los pasos 2-6.
9. Agregué 2.5ml de solución amortiguadora de lisis 2 y homogenicé con una pipeta estéril.
10. En el caso de las muestras cuya solución era rosada, agregué 1ul de proteinasa K 10mg/ml a la muestra y la incubé a 55°C por 1-2 horas.
11. Agregué 1.5ml de acetato de amonio y lo agité en el vortex.
12. Centrifugué la muestra a 3900rpm por 25 minutos a 20°C.
13. Mientras la muestra se centrifugaba, agregué 2.5ml de isopropanol al otro tubo cónico de 15ml.
14. Luego de centrifugada la muestra, coloqué el sobrenadante en los tubos con isopropanol.
15. Coloqué los tubos en el agitador horizontal por 10 minutos.
16. Centrifugué las muestras a 3500rpm por 5 minutos.
17. Quité el sobrenadante con una pipeta pasteur estéril y agregué 1.5ml de etanol al 70%.
18. Resuspendí el precipitado utilizando el vortex y luego centrifugué a 3500rpm por 2 minutos.
19. Quité el sobrenadante y dejé evaporar por no más de una hora.
20. Resuspendí el precipitado con TE empezando con 15ul, dependiendo del tamaño del mismo y lo dejé disolver durante toda la noche a 4°C.

21. Al día siguiente, si no se había disuelto el precipitado de ADN agregué más TE.
22. Trasvasé el ADN resultante a tubos de 0.5ml y los guardé a --20°C.

5.8.2 Control de calidad de la extracción de ADN:

Para verificar la cantidad y la calidad del ADN realicé mediciones con un espectrofotómetro a 260nm y 280nm. Para la prueba con el espectrofotómetro se colocó 2ul de la muestra de ADN en la celda del lector y los resultados fueron obtenidos en el programa GeneSpec 1.

Además, a las muestras que tuvieran una concentración baja o de mala calidad, así como algunas al azar de buena calidad y alta concentración, se les realizó un PCR específico para el citocromo B, con el fin de evaluar la calidad de las muestras.

5.8.3 Amplificación de la región conservada del minicírculo del kinetoplasto por la reacción en cadena de la polimerasa

Analicé las muestras colectadas en campo y extraídas en el laboratorio utilizando los cebadores 121 (5'-AAA TAA TGT ACG GGT GAG ATG CAT GA-3') y 122 (5'-GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA-3') (Vallejo et al., 1999), los cuales amplifican las regiones conservadas de los minicírculos del kinetoplasto de los Trypanosomas.

El PCR se estandarizó y se corrió utilizando las siguientes condiciones: el volumen final de cada reacción fue de 25uL conteniendo 23ul de: solución amortiguadora de reacción 1x, 1.5mM de cloruro de magnesio, 0.5pmol/ul de cada cebador, 0.2mM de cada desoxiribonucleotidos trifosfato (dNTP's) y una unidad de Taq ADN polimerasa y 2ul de ADN de la muestra (Tabla No. 2). Incluí en todas las

reacciones un control positivo de *T. cruzi* y uno de *T. rangeli* así como un control negativo de reactivos.

Tabla 6: Condiciones de PCR para un volumen final de 25ul.

COMPONENTES	[INICIAL]	VOLUMEN INICIAL	[FINAL]
Solución amortiguadora	10x	2.5ul	1x
MgCl ₂	25mM	1.5ul	1.5mM
dNTP	5mM	1ul	0.2mM
Cebador 121	5pmol/ul	2.5ul	0.5pmol/ul
Cebador 122	5pmol/ul	2.5ul	0.5pmol/ul
Taq AND polimerasa	5U/ul	0.2ul	1U
Agua dd ultrapura		12.8ul	
ADN muestra	17.9/ug	2ul	
Servir 23ul de solución madre y 2ul de DNA			

Cada una de las reacciones se procesó en el termocilador utilizando el siguiente programa:

- Desnaturalización inicial de 94°C por 3 minutos
- 35 ciclos de:
 - 45 segundos a 94°C
 - 45 segundos a 63°C
 - 45 segundos a 72°C
- Extensión final de 7 minutos a 72°C

5.8.4 Análisis del producto de PCR:

Analicé los productos de PCR por electroforesis en agarosa al 2%. Coloqué en cada corrida el marcador de peso molecular, las muestras y los controles positivos y negativos. Las corridas se realizaron por 30 minutos 100V. Teñí los geles de agarosa con bromuro de etidio para la detección del producto de PCR. Tomé fotografías del gel en una cámara digital Bio Doc-It Imaging System. Los productos de PCR esperados eran de 330 pares de bases para *T. cruzi* y 450 y 760 pares de bases para *T. rangeli* (Vallejo *et al* 1999).

5.9 Método estadístico

Ingresé todos los datos colectados en el campo y laboratorio en una base de datos construida en Microsoft Excel.

Realicé análisis estadísticos básicos utilizando el programa R versión 2.12.2.

Trabajé con 95% de confianza para las pruebas de hipótesis. Categoricé los datos cualitativos y los presenté de manera descriptiva (Sokal y Rohlf, 2000).

Para determinar si la prevalencia de Tripanosomiasis depende del sexo de los tacuacines, utilicé una prueba de G de Heterogeneidad (Sokal y Rohlf, 2000).

Para determinar si la infestación de los tacuacines depende de la especie de *Trypanosoma*, utilicé una prueba de independencia de χ^2 (Sokal y Rohlf, 2000).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre enero y agosto del 2010, se realizaron 24 días de colecta divididos en cuatro visitas al departamento de Jutiapa y cuatro visitas al departamento Santa Rosa. Se obtuvieron muestras de sangre de 27 machos y 45 hembras. Todos los animales sobrevivieron al procedimiento y fueron liberados inmediatamente después.

Tabla 7: Número y porcentaje de animales capturados por departamento y por especie en el período de enero y agosto de 2010.

	Jutiapa	Santa Rosa	Total
<i>Didelphis marsupialis</i>	7 (21.88%)	15 (37.50%)	22 (30.55%)
<i>Didelphis virginiana</i>	19 (82.61%)	4 (17.39%)	23 (31.95%)
<i>Philander opossum</i>	7 (21.88%)	20 (50%)	27 (37.5%)
Total	32 (44.44%)	40 (55.56%)	72 (100%)

Tabla 8: Distribución de frecuencias de cada una de las especies de tatuacines capturados, por sexo y por departamento, Guatemala 2011.

	Jutiapa		Santa Rosa	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
<i>Didelphis marsupialis</i>	2 (18.18%)	5 (22.73%)	6 (37.50%)	9 (39.13%)
<i>Didelphis virginiana</i>	6 (54.55%)	13 (59.09%)	3 (18.75%)	1 (4.35%)
<i>Philander opossum</i>	3 (27.27%)	4 (18.18%)	7 (43.75%)	13 (56.52%)
Total	11 (100%)	22 (100%)	16 (100%)	23 (100%)

Para poder estimar la prevalencia de *T. cruzi* en los reservorios y su importancia en la transmisión de la enfermedad es importante poder diferenciar entre infecciones de *T. cruzi* y *T. rangeli*. Para esto se utilizó un PCR del Kinetoplasto, que permitió diferenciar a los animales infectados con *T. cruzi* de los infectados con *T. rangeli*.

El 59.72% (43/72) de los tatuacines capturados fueron positivos para Trypanosomas; de los animales positivos, 86.05% (37/43) fueron positivos para *T. cruzi* y 13.95% (6/43) positivos para *T. rangeli*. La razón es 43:7 (Tabla No. 5), es decir, por cada 43 tatuacines infestados con *T. cruzi* hay siete infestados con *T. rangeli*. Se puede observar una mayor infestación con *T. cruzi* que con *T. rangeli*. Esto puede deberse a que *T. rangeli* es transmitido por *Rhodnius prolixus*, vector que está siendo erradicado del país. Además, se considera que *R. prolixus* en Guatemala es únicamente intradomiciliar, lo que disminuye la probabilidad de que un tatuacín entre en contacto con el mismo y así se infeste con *T. rangeli*.

T. cruzi, y *T. rangeli*, circulan tanto en ciclos peridomésticos como en ciclos selváticos por lo que infectan a varias especies de mamíferos. Según la OMS (1991), los tatuacines del género *Didelphis* son considerados como los reservorios silvestres más importantes para *T. cruzi* debido a su amplia distribución, su capacidad de adaptación y el hecho de vivir muy cerca de las viviendas humanas (OMS, 1991).

De los tatuacines positivos a *T. cruzi* 40.54% (15/37) eran *D. marsupialis*, 27.03% (10/37) eran *D. virginiana* y 32.43% (12/37) *P. opossum*. En cuanto a los tatuacines positivos a *T. rangeli*, 16.67% (1/6) eran *D. marsupialis*, 33.33% (2/6) eran *D. virginiana* y 50% (3/6) *P. opossum* (Tabla 5).

Tabla 9: Distribución de frecuencias de infección por *T. cruzi* y *T. rangeli* según especie de tatuacín, Guatemala 2011.

	<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>	Total Positivos
<i>Didelphis marsupialis</i>	15 (40.54%)	1 (16.67%)	16/37
<i>Didelphis virginiana</i>	10 (20.03%)	2 (33.33%)	12/37
<i>Philander opossum</i>	12 (32.43%)	3 (50%)	15/37

Según el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (2009), Jutiapa y Santa Rosa son áreas de alto riesgo para contraer la enfermedad de Chagas. Esto se debe a la alta tasa de infestación vectorial y alta prevalencia de la enfermedad en humanos (Orozco, M., 2009). Mis resultados, sugieren que es muy probable que ese riesgo también se deba a la alta tasa de infestación de los reservorios principales, los tacuacines (Didelphidae), ya que estos son parte importante del ciclo de la enfermedad.

Según los hábitos ecológicos de las chinches (Triatominos), éstas se pueden encontrar en los nidos de los animales, hábito que podría aumentar el riesgo para las hembras de los tacuacines de infectarse con *T. cruzi* o *T. rangeli*; sin embargo, según los resultados de este estudio, la infestación de los tacuacines no es dependiente del sexo del reservorio en ninguna de las tres especies (*D. marsupialis* P= 0.24, *D. virginiana* P=0.28, *P. opossum* P= 0.30).

Por el contrario, la infestación de los tacuacines sí es dependiente de la especie de *Trypanosoma* (*D. marsupialis* P= 0.006, *D. virginiana* P= 0.083, *P. opossum* P=0.084), siendo *T. cruzi* la especie que más infesta a los tacuacines. Esto puede deberse, como se mencionó anteriormente, a que *T. rangeli* es principalmente transmitido por *R. prolixus*, vector en vías de eliminación del ciclo intradomiciliar de esta enfermedad (Monrroy, et. al, 2002); mientras que *T. cruzi* es transmitido tanto por *R. prolixus* como *T. dimidiata* y éste último sigue presente en el ciclo selvático.

Tabla 10: Número de tatuacines por especie y por departamento, infectados por *T. cruzi* o *T. rangeli*, Guatemala 2011.

	Jutiapa		Santa Rosa	
	<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>
<i>Didelphis marsupialis</i>	5 (25%)	1 (25%)	9 (56.25%)	0 (0%)
<i>Didelphis virginiana</i>	10 (50%)	2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Philander opossum</i>	5 (25%)	1 (25%)	7 (43.75%)	2 (100%)
Total	20 (100%)	4 (100%)	16 (100%)	2 (100%)

Tabla 11: Distribución de las infecciones por *T. cruzi* o *T. rangeli* dependiendo del sexo y especie del tatuacín, Guatemala, 2011.

	Machos		Hembras	
	<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>
<i>Didelphis marsupialis</i>	6 (46.15%)	0 (0%)	8 (34.78%)	1 (50%)
<i>Didelphis virginiana</i>	3 (23.08%)	2 (50%)	7 (30.44%)	0 (0%)
<i>Philander opossum</i>	4 (30.77%)	2 (50%)	8 (34.78%)	1 (50%)
Total	13 (100%)	4 (100%)	23 (100%)	2 (100%)

VII. CONCLUSIONES

1. *T. cruzi*, y *T. rangeli*, circulan tanto en ciclos peridomésticos como en ciclos selváticos, e infectan a tacuacines de las especies *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*, *Philander opossum* de Santa Rosa y Jutiapa.
2. La prevalencia de tripanosomiasis en los tacuacines muestreados fue 59.72%.
3. *T. cruzi* es la especie de *Trypanosoma* que infesta más tacuacines (Didelphidae).
4. La proporción de infestación por *T. cruzi* y *T. rangeli* en tacuacines es de 43:7.
5. La infestación por *T. cruzi* y *T. rangeli* en los tacuacines (Didelphidae) no es dependiente del sexo del reservorio.
6. La infestación de los tacuacines (Didelphidae) si es dependiente de la especie de *Trypanosoma*, siendo *T. cruzi* el que infesta a mas tacuacines.

VIII. RECOMENDACIÓN

1. Realizar un estudio en busca de otros reservorios silvestres de la enfermedad de Chagas en Guatemala para determinar cuál es la prevalencia de la enfermedad en otras especies y, así, determinar cuál es el reservorio principal de la enfermedad en el país.

IX. RESUMEN

Para determinar la presencia y proporción de *T. cruzi* y *T. rangeli* en los tatuacines y contribuir al conocimiento de los ciclos silvestres de estos parásitos en Jutiapa y Santa Rosa, Guatemala, entre enero y agosto del 2010, se realizaron 24 días de colecta divididos en cuatro visitas al departamento de Jutiapa y cuatro visitas al departamento Santa Rosa. Se obtuvieron muestras de sangre de 27 machos y 45 hembras.

Para estimar la prevalencia de *T. cruzi* en los reservorios se utilizó un PCR del Kinetoplasto, que permitió diferenciar a los animales infectados con *T. cruzi* de los infestados con *T. rangeli*.

El 59.72% (43/72) de los tatuacines capturados fueron positivos para Trypanosomas; de los animales positivos, 86.05% (37/43) fueron positivos para *T. cruzi* y 13.95% (6/43) positivos para *T. rangeli*. La razón es 43:7 (Tabla No. 5), es decir, por cada 43 tatuacines infestados con *T. cruzi* hay siete infestados con *T. rangeli*.

De los tatuacines positivos a *T. cruzi* 40.54% (15/37) eran *D. marsupialis*, 27.03% (10/37) eran *D. virginiana* y 32.43% (12/37) *P. opossum*. En cuanto a los tatuacines positivos a *T. rangeli*, 16.67% (1/6) eran *D. marsupialis*, 33.33% (2/6) eran *D. virginiana* y 50% (3/6) *P. opossum* (Tabla 5).

La infestación de los tatuacines no es dependiente del sexo del reservorio en ninguna de las tres especies (*D. marsupialis* $P= 0.24$, *D. virginiana* $P=0.28$, *P. opossum* $P= 0.30$).

Por el contrario, la infestación de los tatuacines sí es dependiente de la especie de *Trypanosoma* (*D. marsupialis* $P= 0.006$, *D. virginiana* $P= 0.083$, *P. opossum* $P=0.084$), siendo *T. cruzi* la especie que más infesta a los tatuacines.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar, F. 1993. Enfermedades Tropicales en Guatemala 93: Historia de la Enfermedad de Chagas en Guatemala: 1932-1990. Agencia de Cooperación Internacional del Japón. No.2:1-23.
2. Ayau, O. 1998. Enfermedad de Chagas. Guatemala, GT. LB Impresos Litográficos. 338p.
3. Birchard, S.; Sherding, R. 2002. Manual Clínico de Procedimientos en Pequeñas Especies. 2a ed. Madrid, Esp. Interamericana de España, S.A.U. 1901p.
4. Bischoff, J et al. 2003. *Trypanosoma cruzi*. (en línea). Maryland, US. National Center for Biothechnology Information. Consultado 12 jul. 2009. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5693>
5. Bravo, T. 2004. *Trypanosoma cruzi*: Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Revista Mexicana de Patología Clínica, C.A. Vol. 51 (4): 205-219. Consultado 18 sep. 2009. Disponible en <http://www.medigraphic.com/espanol/e-htms/e-patol/e-pt2004/e-pt04-4/em-pt044e.htm>
6. Brener, Z et al. 2004. *Trypanosoma cruzi*: Taxonomy, Morphology and Life Cycle. (en línea). Sao Paulo, Brasil. ISBT. Consultado 12 jul. 2009. Disponible en <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter3.html>
7. CDC (Center for Disease Control and Prevention, US). 1999. Fact Sheet: Chagas Disease. (en línea). Atlanta, US. Consultado 10 jul. 2009. Disponible en <http://www.medhelp.org/nihlib/GF-510.html>

8. _____. 2008. Enfermedad de chagas. (en línea). Atlanta, US. Consultado 22 jul. 2009. Disponible en <http://www.cdc.gov/chagas/sp/index.html>
9. _____. 2009. Trypanosomiasis, American. (en línea). Atlanta, US. Consultado 22 sep. 2009. Disponible en <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>
10. Cordon, C. 2003. Eco-epidemiology of Chagas disease in Guatemala. Guatemala. Local assessment and knowledge gaps. Presentación de Powerpoint.
11. Dorn, P et al. 1999. Utility of the Polymerase Chain Reaction in Detection of *Trypanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas' disease vectors. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 60 (5): 740-745.
12. eGuate.com. 2007. Jutiapa. (en línea). Guatemala, GT. Consultado 24 jul. 2009. Disponible en <http://www.eguate.com/default.asp?dep=Jutiapa>
13. Elizondo, L. 1999. Mamíferos de Costa Rica. (en línea). Consultado 24 jul. 2009. Disponible en <http://darnis.inbio.ac.cr/ubica/FMPPro?-DB=UBICA.fp3&-lay=WebAll&-error=norec.html&-Format=ubi.html&-Op=eq&id=1488&-Find>
14. Emmons, L. 1997. Neotropical Rainforest Mammals. 2 ed. Chigago, US. The University of Chigago Press. 307p.
15. García, E et al. 2009. *Trypanosoma rangeli*: a new perspective for studying the modulation of immune reactions of *Rhodnius prolixus*. Parasites and Vectors. Vol. 2 (33): 1-10.

16. Grisard, E et al. 2008. Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi*-infected patients sera. *Parasites and Vectors*. Vol. 1 (20): 1-10.
17. INGUAT (Instituto Guatemalteco de Turismo, GT). 2008. Destinos: Jutiapa. (en línea). Guatemala, GT. Consultado 29 jul. 2009. Disponible en http://www.visitguatemala.com/nuevo/destinos_departamento.asp?id=22
18. ITIS (Integrated Taxonomic Information System, US). 2009. Integrated Taxonomic Information System. (en línea). Consultado 19 dic. 2009. Disponible en <http://www.itis.gov/>
19. Kirchoff, L. 2008. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). (en línea). Medscape. Consultado 17 jul. 2009. Disponible en <http://www.emedicine.com/med/topic327.htm>
20. Lacunza, C et al. 2006. Artículo original use of the polymerase chain reaction (PCR) for early evaluation of etiological treatment in young adults, chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista de Patología Tropical*. No. 35: 227-232.
21. Mejía, M et al. 1994. Enfermedades Tropicales en Guatemala 94: Reservorios de la Enfermedad de Chagas. Agencia de Cooperación Internacional del Japón. No.3: 121-124.
22. Monroy, M; Mejía, M; Rodas, A. 1994. Enfermedades Tropicales en Guatemala 94: Ecología Intradomiciliar de *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma nitida*. Agencia de Cooperación Internacional del Japón. No.3: 104-111.

23. _____ et al. 2002. Pre-certificación de la erradicación de *Rhodnius prolixus* en Guatemala. Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología, Escuela de Biología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Informe 2003-021. 20 pág.
24. _____ et al. 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, Trypanosomatidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. Vol. 98 (3): 305-310.
25. Nonami, T et al. 2002. Manual para capacitadores sobre la enfermedad de Chagas. (en línea). Guatemala, GT. Consultado 13 sep. 2009. Disponible en <http://www.mex.ops-oms.org/documentos/chagas/dch-gut-manual.pdf>
26. Orozco, M. 2009. Situación de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. (en línea). Guatemala, GT. Consultado 25 mar. 2011. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Disponible en http://hinari-gw.who.int/whalecomextranet.who.int/whalecom0/hinari/en/browse_journal_titles.php?j_init=A
27. PHAO (Pan American Health Organization, US). 2008. *Triatoma dimidiata*, Main Vector for American Trypanosomiasis (Chagas Disease) in Central America. (en línea). Washington, US. Consultado 20 sep. 2009. Disponible en <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/dch-fotos-t-dimidiata.htm>
28. Rizzo, N et al. 2003. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection among school-age children in the endemic area of Guatemala. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 68 (6): 678-682.

29. Ruiz, H; Cruz, A. 2002. The Opossum *Didelphys virginiana* as a Synantropic Reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidziliche, Yucatán, Mexico. Mem Inst Oswaldo Cruz. Vol. 97(5): 613-620.
30. Schmunis, G. 1994. La Triponosomiasis Americana como Problema de Salud Pública: La Enfermedad de Chagas y el sistema nervioso. Washington, D.C., Organización Panamericana de la Salud. 394 p.
31. Schofield, C. 1994. Triatominae: Biología y Control. Trad. S Times, C Schofield. Surrey, UK., Eurocommunica Publications. 79p.
32. Soulsby, E. 1987. Parasitología y enfermedades Parasitarias en los animales domésticos. 7 ed. Trad. A Martínez, F Rojo. México, D.F., Nueva editorial interamericana. 823p.
33. TDR (Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases, CH). 2004. Life-cycle of *Trypanosoma cruzi*. (en línea). Consultado 26 sep. 2009. Disponible en <http://www.who.int/tdroid/diseases/chagas/lifecycle.htm>
34. Universidad de Panamá. 2005. Artrópodos Clase Insecta. (en línea). Club de Informática Médica y Telemedicina. Consultado 20 sep. 2009. Disponible en http://www.telmeds.org/AVIM/Apara/artropodos/clase_insecta/flia_Reduviidae/Reduviidae.htm
35. Vallejo, A et al. 1999. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. Acta Tropica. Vol. 72: 203-212.

36. Vargas, R. 2000. Términos de uso común en Epidemiología Veterinaria. (en línea). México, D.F., Plaza y Valdéz Editores. Consultado 20 oct. 2009. Disponible en http://books.google.com.gt/books?id=FACrBzAqAEUC&pg=PA141&lpg=PA141&dq=reservorio+en+epidemiologia+veterinaria&source=bl&ots=AxcsvMOc1P&sig=MpKk7VnmJMqUGvx5mN2v-xGJCo&hl=es&ei=lq3ISr_oD4rj8Qbl1aCIBw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=4&ved=0CBQQ6AEwAw#v=onepage&q=&f=false
37. WHO (World Health Organization, CH). 1997. Triatomine bugs: Vector of Chagas disease. (en línea). Consultado 22 jul. 2009. Disponible en http://www.who.int/water_sanitation_health/resources/en/vector210to222.pdf
38. _____. 2002. Control of Chagas Disease: second report of the WHO expert committee. Ginebra, CH., s.e. 109p.
39. _____. 2007. Reporte sobre la Enfermedad de Chagas. (en línea). Buenos Aires, AR. Consultado 20 jul. 2009. Disponible en http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/report-enfermedad-chagas/pdf/swg_chagas.pdf
40. Wiser, M. 1999. Kinetoplastids. (en línea). Tulane, US. Consultado 26 jul. 2009. Disponible en <http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/kinet.html>
41. Woo, P.; Soltys, M. 1970. Animals as Reservoir Hosts of Human Trypanosomes. *Journal of Wildlife Diseases*. Vol. 6: 313-322.
42. Zeledón, R. 1981. El *Triatoma dimidiata* y su relación con la enfermedad de chagas. San José, CR., Editorial Universidad Estatal a distancia. 146p.

XI. ANEXOS

11.1 Anexo No. 1: Hoja de registro de muestras

Animal No.	Fecha	Hora	Especie	Sexo	Cantidad de muestra
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					

11.2 Anexo No. 2: Extracción de ADN

<p>Instituto de Investigaciones Centro de Estudios en Salud</p> <p>MERTU-G</p> <p>Laboratorio de Leishmaniasis</p> 	<p>Procedimiento Normado de Operación</p>	<p>PNO: 15 Versión: 1 Fecha: 25/08/2003</p>
	<p>Extracción de ADN del paciente a partir de sangre fresca con EDTA</p>	<p>Páginas Totales: 5</p> <p>Autores: Preparado por: Flora Arana, Elvira Mendizábal, Nancy Cruz</p>

1. **Propósito:** Aislar el ADN de paciente con el fin de establecer su inmunogenética.

2. **Aplicación:** Mapeo, búsqueda de mutación puntual en genes que codifican para diferentes interleucinas.

3. **Referencias:**
 - 3.1 Pirmez, C., M. Yamamura, K. Uyemura., M. Paes-Oliveira, F. Conceicao-Silva, and R. Modlin. 1993. Cytokine Patterns in the Patogénesis of Human Leishmaniasis. *J.Clin. Invest.* 91:1390-1395

4. **Terminología y abreviaciones:**
 - 4.1 mL: mililitros
 - 4.2 min.: Minutos

- 4.3 rpm.: Revoluciones por Minuto
 - 4.4 seg.: Segundos
 - 4.5 ADN: Ácido desoxiribonucleico
 - 4.6 °C: Grados Centígrados
 - 4.7 EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
 - 4.8 SDS: Laurel sulfato de sodio
5. **Principio:** En un PCR modificado donde se utiliza un primer general del gen y el otro con la mutación puntal a temperatura de restricción muy cerca de T_M para evitar reacciones inespecíficas. Se corre cada alelo en pozo diferente.
6. **Documentos asociados:**
- 6.1 Procedimiento normado de operación 3: Extracción de ADN del paciente a partir de sangre fresca con EDTA
 - 6.2 Procedimiento normado de operación 16: Precipitación de ADN
 - 6.3 Procedimiento normado de operación 19: Amplificación del ADN del paciente para determinaciones inmunogenética por PCR
 - 6.4 Procedimiento normado de operación 25: Uso del autoclave
 - 6.5 Procedimiento normado de operación 26: Descarte de material infeccioso
 - 6.6 Procedimiento normado de operación 27: Descarte de soluciones orgánicas
7. **Seguridad:**
- 7.1 Lea el manual de la centrifuga antes de utilizarla
 - 7.2 Utilice guantes para evitar la contaminación de las muestras.

7.3 Utilice una balanza de doble brazo para asegurarse que la centrifuga este balanceada.

8. Equipos, materiales y reactivos:

- 8.1 Tubos cónicos de micro centrífuga de 1.5 mL estériles
- 8.2 Vortex
- 8.3 Centrífuga
- 8.4 Micro pipeta de 20 a 200 micro litros
- 8.5 Micro pipeta de 100 a 1000 micro litros
- 8.6 Puntas de 10 a 250 micro litros estériles
- 8.7 Puntas de 100 a 1000 micro litros estériles
- 8.8 Buffer de Lisis I (8.3 g cloruro de amonio, 1.0 g. carbonato mono potásico, 0.372 g EDTA, afore a 1 L con agua destilada. Mantenga a 4 C)
- 8.9 Buffer de Lisis II (9.3 g EDTA, 200 mL SDS 10% afore a 1 L con agua destilada)
- 8.10 Etanol al 70%
- 8.11 Acetona
- 8.12 TE (0.444 g Tris HCl, 0.265 g Tris Base, 0.185 g EDTA, Afore a 500 mL agua destilada, autoclaveé)
- 8.13 Muestras de sangre en EDTA
- 8.14 Pipetas de 10mL
- 8.15 Pipeteador automático
- 8.16 Pipetas descartables con bulbo
- 8.17 Acetato de amonio 10 M
- 8.18 Tubos de 15 mL de centrifuga con fondo cónico y de propileno.
- 8.19 Belly dancer
- 8.20 Descarte
- 8.21 Cloro
- 8.22 Proteinasa K 20 mg/mL

8.23 Baño María

8.24 Isopropanol

8.25 Rocker

9. Procedimiento:

- 9.1** A los 8 a 10 mL de sangre colectada en EDTA almacenadas por un máximo de 14 días a 4 °C se centrifugan
- 9.2** Tome con una pipeta de bulbo hasta 6 mL del paquete celular incluyendo la capa de blancos y agregue a 9 mL de buffer de lisis I frío en un tubo de fondo cónico de propileno.
- 9.3** Mezcle bien en belly dancer por 15 min.
- 9.4** Centrifugue a 1500 g por 10 min. a 4 °C sin freno
- 9.5** Descarte el sobrenadante en un contenedor con cloro, dejando el pellet en el fondo del tubo. Quite la capa rosada con pipeta para que solo quede el pellet de células blancas.
- 9.6** Asegurese de resuspender el pellet en el líquido residual utilizando un vortex.
- 9.7** Repita los pasos 2-5
- 9.8** Agregue 6 mL de buffer de lisis 2. Homogenice usando una pipeta de bulbo.
- 9.9** Verifique que la solución sea clara y no rosada, si es rosada agregue proteinasa K 1 micro litro de 20 mg/mL y déjelo a 55 °C de 1-2 horas hasta que los grumos se disuelvan
- 9.10** Agregue 3 mL de acetato de amonio y agite en vortex vigorosamente
- 9.11** Centrifugue a 2000 g por 25 min. a 20 °C sin freno
- 9.12** Ponga el sobrenadante en un tubo de 15 mL limpio conteniendo 6 mL de isopropanol.
- 9.13** Mezcle suavemente en el rocker por 5 a 10 min.
- 9.14** Centrifugue 5 min. a 1500 g con freno conectado

- 9.15 El ADN debe ser visible en forma de pellet. Quite el sobrenadante y agregue 3 mL de etanol 70%.
- 9.16 Mezcle vigorosamente para disolver el pellet en el etanol.
- 9.17 Centrifugue 2 min. a 1500 g
- 9.18 Quite todo el sobrenadante y deje evaporar todo el etanol
- 9.19 Resuspenda el ADN en 100 a 1000 micro litros de TE según el tamaño del pellet
- 9.20 Deje disolver el pellet durante la noche y alicuote a tubo pequeño. Si no este bien resuspendido agregue mas TE.

10. Control de calidad:

10.1 Puede verificar la presencia de ADN midiéndolo.

10.2 Política de resolución de conflictos

10.2.1 En caso las mediciones de ADN no den resultados adecuados (medición de ADN con una razón que no este entre 1.8 y 2.0) si la solución esta muy densa agregue TE o puede digerir con proteinasa K precipitar con acetato de amonio e isopropanol. Evalúe de nuevo.

11. Reporte de datos y documentos utilizados:

- 11.1 Las muestras se registran a su entrada al laboratorio en el cuaderno de ingreso. Cualquier tipo de manipulación y proceso debe de acarrear el número asignado en la toma de muestra, el de la ficha clínica de cada paciente.
- 11.2 Los procesos a los que se someten cada muestra deben ser registrados en el cuaderno de trabajo del analista.

- 12. Reporte:** Los resultados del presente procedimiento estándar se evalúan en base a los resultados de amplificación. Se observa banda de HGH de mayor tamaño que la banda del gen. La ausencia de banda para el gen indique que no tiene esa variable, es decir es homocigoto.

Modificado: Agosto 2003, Última revisión realizada por: N. Rizzo 281103

FIGURAS

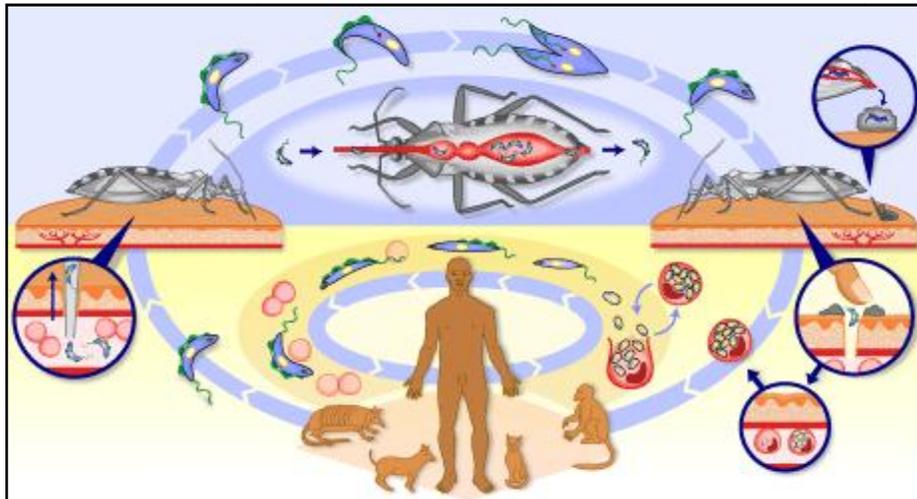


Figura 1: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (TDR, 2004)

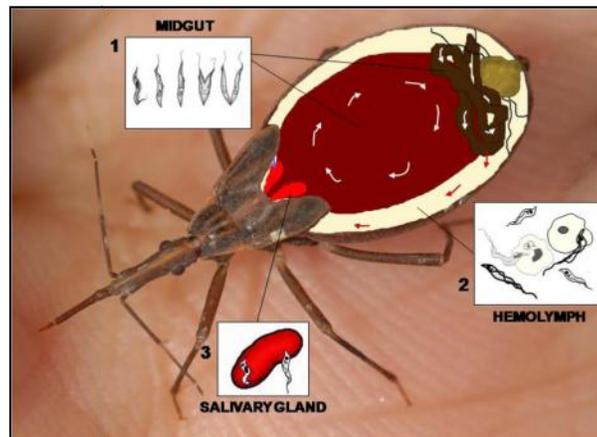


Figura 2: Ciclo de vida de *Trypanosoma rangeli* (García et al., 2009)

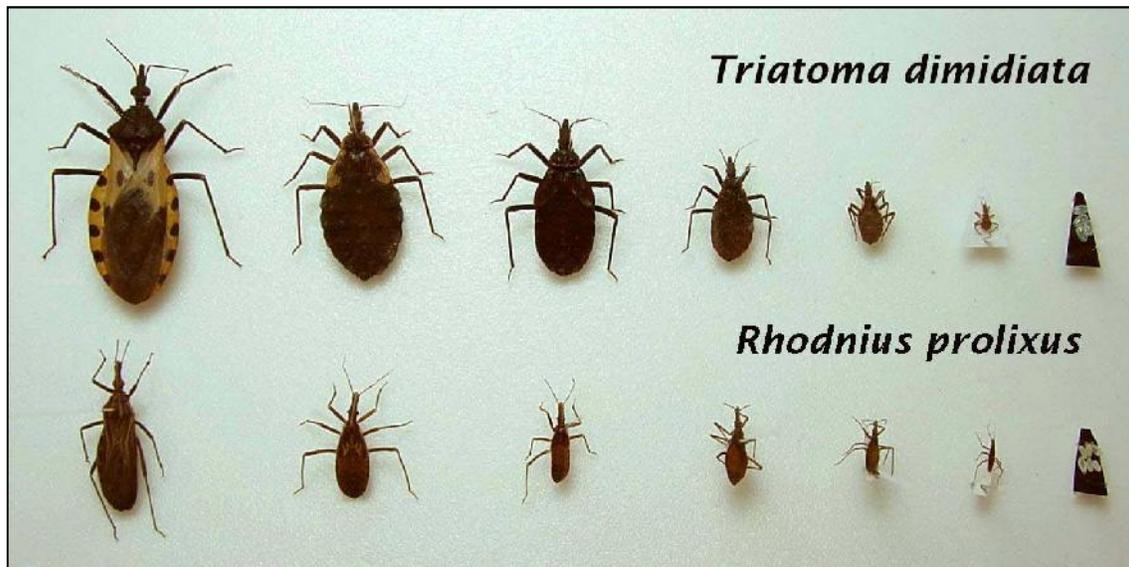


Figura 3: Especímenes de *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* (Universidad de Panamá, 2005)



Figura 4: *Didelphis virginiana* (Elizondo, 1999)



Figura 5: *Didelphis marsupialis* (Elizondo, 1999)



Figura 6: *Philander opossum*