

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

“DIAGNOSTICO DE PALUDISMO AVIAR EN POLLOS (*Gallus gallus*) A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE PCR CONVENCIONAL EN EL MUNICIPIO LA GOMERA, DEPARTAMENTO DE ESCUINTLA, GUATEMALA”



CLARA HAYDÉE QUEVEDO SALAZAR

Médica Veterinaria

GUATEMALA, FEBRERO DE 2012

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

“DIAGNÓSTICO DE PALUDISMO AVIAR EN POLLOS (GALLUS GALLUS) A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE PCR CONVENCIONAL EN EL MUNICIPIO LA GOMERA, DEPARTAMENTO DE ESCUINTLA, 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

CLARA HAYDÉE QUEVEDO SALAZAR

Al Conferírsele el Grado Académico de

Médica Veterinaria

GUATEMALA, FEBRERO DE 2012

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. 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 Lucía Molina Hernández

ASESORES

Med. Vet. MANUEL RODRÍGUEZ ZEA
Med. Vet. VIRGINIA DE CORZO
Med. Vet. CARLOS CAMEY
Med. Vet. BEATRIZ SANTIZO

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:

“DIAGNÓSTICO DE PALUDISMO AVIAR EN POLLOS (GALLUS GALLUS) A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE PCR CONVENCIONAL EN EL MUNICIPIO LA GOMERA, DEPARTAMENTO DE ESCUINTLA, GUATEMALA”

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:

MÉDICA VETERINARIA

TESIS QUE DEDICO

A mi madre, Enriqueta Salazar, por ser mi inspiración y modelo a seguir en la vida intelectual.

A mi padre, Carlos Quevedo, por mostrarme la mística en ayudar a los demás mediante la Medicina.

A todos los animales, que han fallecido para ahondar en el conocimiento de la Medicina Veterinaria.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser mi fuerza y haberme dado los dones necesarios para culminar mi licenciatura.

A mi padre y madre, por apoyarme siempre y no permitirme desfallecer en los difíciles momentos de mi carrera universitaria.

A mi familia, por ser ejemplo de vida, lucha y disciplina.

A mis amigas universitarias: Alejandra Cosenza, Andrea Mérida, Andrea Ramírez y Astrid Anzueto, por llenar estos años universitarios de risas y momentos únicos.

A mis asesores de tesis: Dra. Virginia de Corzo, Dr. Manuel Rodríguez, Dr. Carlos Camey y la Dra. Beatriz Santizo; por darme consejos oportunos y palabras de aliento durante la realización de mi experimento.

A la Dra. Carmen Fernández del Instituto “Pedro Kouri”, por guiarme para mejorar mi protocolo de laboratorio. Sin sus consejos, mi tesis no habría salido adelante.

Al Dr. Alberto García del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Médicas de la USAC, la Dra. Flora Arana y la Licda. Carolina Marroquín del Centro de Estudios del Mar y Acuicultura, por permitirme usar sus instalaciones y equipo para mejorar mi protocolo de laboratorio.

Al personal del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por su colaboración en la realización de este trabajo de investigación.

Al Dr. Ronald Griffith y Dra. Christine Petersen de Iowa State University. Las oportunidades que me brindaron me hicieron descubrir un nuevo mundo en Medicina Veterinaria: la investigación.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	HIPÓTESIS	2
III.	OBJETIVOS	3
3.1.	General	3
3.2.	Específicos	3
IV.	REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1.	Malaria Aviar	4
4.2.	<i>Plasmodium gallinaceum</i>	6
4.3.	Vectores de <i>Plasmodium gallinaceum</i>	9
4.3.1.	<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	10
4.3.2.	<i>Aedes aegypti</i>	11
4.4.	PCR (Polymerase Chain Reaction-Reacción en Cadena de Polimerasa)	12
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1.	Área de Estudio	15
5.2.	Materiales	
5.2.1.	Recursos humanos	15
5.2.2.	Recursos de campo	15
5.2.3.	Recursos de laboratorio	15
5.2.4.	Recursos biológicos	17
5.3.	Métodos	
5.3.1.	Toma de muestras en aldeas	17
5.3.2.	Toma de muestras sanguíneas	17
5.3.3.	Manejo de muestras	18
5.3.4.	Procesamiento de muestras	18
5.3.5.	Montaje de prueba	20
5.3.6.	Criterio de Interpretación	21
5.3.7.	Análisis Estadístico	21
VI.	RESULTADOS	23
VII.	CONCLUSIONES	24

VIII. RECOMENDACIONES	25
IX. RESUMEN	26
X. BIBLIOGRAFÍA	27
XI. ANEXOS	31

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Lectura concentración proteica, muestras de ADN aviar. La Gomera, Escuintla, 2009-2010.....	32
TABLA 2: Características de aves muestreadas en La Gomera, Escuintla, 2009-2010	33
TABLA 3: Aves catalogadas según edad (meses). La Gomera, Escuintla, 2009-2010	35
TABLA 4: Promedio de edad (meses) de aves muestreadas en La Gomera, Escuintla, 2009-2010	35
TABLA 5: Aves catalogadas según peso (lbs). La Gomera, Escuintla, 2009-2010	35
TABLA 6: Promedio de peso (lbs) de aves muestreadas en La Gomera, Escuintla, 2009-2010	36
TABLA 7: Aves catalogadas según sexo. La Gomera, Escuintla, 2009-2010	36
TABLA 8: Aves catalogadas según propósito de explotación. La Gomera, Escuintla,2009-2010	36
TABLA 9: Aves catalogadas según aldea de La Gomera, Escuintla, 2009-2010	37

I. INTRODUCCIÓN

La Malaria o Paludismo Aviar es causada por *Plasmodium gallinaceum*, un protozoo sanguíneo que sólo infecta pollos (*Gallus gallus*). Este hemoparásito se transmite por dos vectores, *Aedes aegypti* y *Anopheles quadrimaculatus*. Esta enfermedad puede ser inaparente y causar mortalidad de hasta un 90% en la parvada. Actualmente, no existen datos acerca de la presencia de esta enfermedad a nivel nacional.

La búsqueda de Malaria Aviar en pollos de traspatio en aldeas de La Gomera, Escuintla se basa en que la ecología del lugar cuenta con las características necesarias para el desarrollo de los vectores. Además, los pollos de traspatio son más susceptibles a ser infectados ya que están expuestos al piquete de mosquitos al vivir a la intemperie.

PCR (Polymerase Chain Reaction) Convencional se ha usado en el diagnóstico de Malaria Aviar con buenos resultados.

Con este estudio pretendo determinar la presencia de Malaria Aviar en el municipio de La Gomera, Escuintla.

II. HIPÓTESIS

El municipio La Gomera, departamento de Escuintla, Guatemala es un área que alberga pollos (*Gallus gallus*) con paludismo aviar.

III. OBJETIVOS

3.1. General

“Determinar la presencia de Paludismo aviar en pollos (*Gallus gallus*) de traspatio en regiones endémicas de Malaria humana en el Municipio La Gomera, departamento de Escuintla, Guatemala, mediante la técnica de PCR convencional.”

3.2. Específicos

1. Establecer la presencia de *Plasmodium gallinaceum* en La Gomera, Escuintla, Guatemala.
2. Diagnosticar Paludismo aviar en pollos (*Gallus gallus*) de traspatio en el municipio La Gomera, departamento de Escuintla, Guatemala usando la técnica de PCR convencional.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Malaria Aviar

La Malaria Aviar, también conocida como Paludismo Aviar, es un parasitismo que afecta las aves domésticas. En pollos los agentes etiológicos son del género *Plasmodium*: *Plasmodium gallinaceum* y *P. juxtannucleare* (Jordan 1998); *Haemoproteus* y *Leucocytozoon* (Cordero 1999) cuyo vector es *Anopheles quadrimaculatus* y *Aedes aegypti* (Ghosh et al 2000). La esporogonia se da en el huésped vector (Jordan 1998).

La plasmidiosis es propia de países tropicales y subtropicales, pero también se halla en los mediterráneos, incluyendo la Península Ibérica (Cordero 1999).

Los signos clínicos son depresión, debilidad, anemia y ocasionalmente, ataxia y falta de coordinación. La enfermedad puede ser inaparente o causar una mortalidad del 90% de la parvada. Las lesiones observadas son: anemia, esplenomegalia, nefritis, edema pulmonar e hidropericardio (Jordan 1998). La muerte es provocada por una anemia severa o bloqueo de capilares cerebrales u otros órganos vitales gracias a merontes eritrocíticas extracelulares en las células endoteliales (The Merck Veterinary Manual 2005).

En la infección experimental de pollos domésticos, la parasitemia alcanzó su punto más alto a los 6 días post-infección. Las aves muestran fiebre y anemia (hematocrito <24%). Ocho días post-infección, hay disproteinemia caracterizada por hipalbuminemia y baja concentración de α -2 globulina, pero alta concentración de γ -1 y γ -2 globulina. Los perfiles bioquímicos revelan actividades séricas elevadas de aspartato aminotransferasa, glutamato deshidrogenasa y γ -glutamilttransferasa, con baja concentración de creatinina (Jennings).

Se pueden hallar parásitos pigmentados, incluyendo esquizonte, en glóbulos rojos maduros e inmaduros. Al examinar frotos sanguíneos con la tinción de Wright, se pueden detectar trofozoítos, esquizontes o gametocitos dentro de los eritrocitos. Los esquizontes se observan como inclusiones ovales o redondas en las células que contengan merozoítos teñidos de color oscuro. Infrecuentemente los parásitos se observan en trombocitos y glóbulos blancos (Jennings). En aves que mueren repentinamente, los parásitos pueden estar ausentes o ser muy escasos en la sangre, pero los merontes pueden hallarse en capilares mediante improntas de cerebro, pulmón, hígado y bazo. La serología puede usarse cuando la carga parasitaria es demasiado baja como para ser vistos en frotos sanguíneos (The Merck Veterinary Manual 2005).

- Los gametocitos intraeritrocíticos de *Plasmodium* pueden confundirse fácilmente con *Haemoproteus* ya que ambos tienen gránulos amarillos o cafés. Para diferenciar entre ambas infecciones, se observa lo siguiente:
- Los gametocitos de *Plasmodium* son más pequeños que los de *Haemoproteus*, ocupando menos de la mitad del citoplasma de la célula.
- Los gametocitos de *Plasmodium* desplazan el núcleo de los glóbulos rojos, mientras que los de *Haemoproteus*, no.
- *Plasmodium* puede sufrir esquizogonia en la sangre periférica.
- *Plasmodium* puede hallarse en otras células que no sean eritrocitos, tales como trombocitos, leucocitos y células endoteliales (Jennings).

La cloroquina en dosis de 5 a 10 mg/kg, junto a la primaquina (0.3 mg/kg), o la cloroquina en agua de bebida (250 mg/120 mL), puede usarse como quimioterapia. Otros fármacos como la quinacrina a dosis de 1.6 mg/kg/día por 5 días fue exitosa como tratamiento en un pavo real. La sulfamonometoxina y sulfacloropiridazina combinadas también son efectivas. La halofuginona puede

ser usada como profilaxis en áreas endémicas (The Merck Veterinary Manual 2005).

La parasitemia puede persistir durante o después del tratamiento, al igual que existir una recidiva. Los tratamientos deben ser evaluados según prevención de la mortalidad y mejora en la enfermedad clínica. Las aves que sobreviven una infección inicial son resistentes a infecciones futuras. También es recomendable prevenir la exposición a mosquitos. El desarrollo de los parásitos se ve reducido en mosquitos previamente infectados con *Bacillus thuringiensis israelensis* (The Merck Veterinary Manual 2005).

4.2. *Plasmodium gallinaceum*

El ciclo de *Plasmodium spp* se caracteriza por necesitar un hospedador vertebrado para la esquizogonia en dos fases. La primera se realiza repetidamente en las células del sistema retículoendotelial (endotelios y células hematopoyéticas, esquizogonia exoeritrocítica), con varias generaciones de esquizontes que forman merozoítos repetidores del ciclo (criptomerozoítos), hasta que aparecen otros merozoítos (metamerozoítos) que invaden los glóbulos rojos para formar esquizontes. Los esquizontes forman merozoítos que invaden otros glóbulos rojos, produciendo un pigmento derivado de la hemoglobina. Algunos merozoítos luego pueden invadir elementos histiocitarios para seguir el ciclo exoeritrocítico. Finalmente se forman los gamontes, que son adquiridos por mosquitos del género *Aedes* y *Anopheles spp.*, en donde maduran y hay singamia para formar cigotos móviles, llamados ooquistos y que carecen de envoltura quística. Los ooquistos inician la esporogonia con formación de esporozoítos, inoculados con la saliva cuando el mosquito se alimenta ave sobre ave (Cordero 1999).

Según Ghosh *et al* (2000), los parásitos de *Plasmodium* sufren un desarrollo complejo dentro del vector, incluyendo la diferenciación del organismo,

fertilización, penetración de la matriz peritrófica extracelular y la penetración del intestino medio y glándula salivar.

El desarrollo exitoso de *Plasmodium* en el mosquito depende de la diferenciación de las formas sexuales en el hospedador vertebrado. Es aquí donde los parásitos se dividen asexualmente en la sangre periférica y al mismo tiempo, pocos parásitos finalmente desarrollan de merozoítos a gametocitos. *Plasmodium* ingresa en el mosquito tras la ingestión de gametocitos en la sangre de un hospedador infectado. Luego de penetrar el intestino, se diferencian de gametocitos a gametos. Cada gametocito macho genera ocho gametos haploides móviles mediante la exflagelación (Ghosh *et al* 2000).

Luego de la fertilización, los cigotos se transforman en ooquistos móviles. Es importante hacer notar que sólo una pequeña proporción de parásitos logran terminar el desarrollo de gametocito a ooquisto. Tras aproximadamente 24 horas, el ooquisto debe cruzar la matriz peritrófica¹ (MP) y el epitelio del intestino medio. Los ooquistos alcanzan la MP un día luego de la ingesta de sangre y el grosor de la MP está relacionado con las dimensiones del ooquisto. Para cruzar esta barrera el ooquisto secreta una pro-quitinasa, lo que daña físicamente la MP (Ghosh *et al* 2000).

Luego de pasar la MP, los parásitos deben traspasar el epitelio del intestino medio. Basado en información del proceso entre *P. gallinaceum* y *Aedes aegypti*, este proceso se inicia con la adhesión del ooquisto a la microvellosidad epitelial. Además, se ha visto que el ooquisto preferentemente invade un tipo celular epitelial específico del intestino, la célula Ross, que tiene menos microvellosidades, se tiñe pálidamente con azul de toluidina y es rica en ATPasa vesicular. Los ooquistos de *P. gallinaceum* generalmente están lisados al

¹ Matriz peritrófica: envoltura que cubre al bolo sanguíneo formado en el intestino medio abdominal luego de la ingesta sanguínea. Está constituida por glicoproteínas, proteínas y fibrillas de quitina que forman una barrera protectora para las células epiteliales del intestino medio abdominal del insecto, contra abrasiones de partículas provenientes del alimento y contra microbios. También permite la compartimentización de las enzimas digestivas, facilitando el proceso de digestión sanguínea (Nieves, E; Rondón, M. 2007).

atravesar el epitelio del intestino medio de *Anopheles gambiae* (Ghosh *et al* 2000).

Luego de atravesar el epitelio del intestino medio, el ooquineto alcanza el espacio extracelular entre este epitelio y la lámina basal, donde se transforma en oocisto. Este desarrollo difiere significativamente dependiendo de la combinación mosquito-parásito. Estas diferencias pueden ser el resultado de factores inmunológicos en el mosquito o la habilidad del parásito para cruzar la MP y/o el epitelio intestinal (Ghosh *et al* 2000).

El oocisto desarrolla y tras 10-24 días, dependiendo de la especie, culmina con la liberación de miles de esporozoítos al hemocele. Al desarrollar el oocisto, núcleos se dividen en un citoplasma común para dar lugar a miles de esporozoítos. Usando el microscopio electrónico de transmisión, se observó que la lámina basal todavía cubre los oocistos durante sus últimas fases de diferenciación. Al madurar, esta cápsula se rompe y los esporozoítos liberados deben cruzar la lámina basal para alcanzar el hemocele (Ghosh *et al* 2000).

Estando ya en el hemocele, los esporozoítos tienen acceso a una gran cantidad de órganos y tipos celulares; sin embargo, invaden únicamente células del epitelio de glándulas salivares. Comparado con otros órganos que están en contacto con la hemolinfa (grasa, músculos, etc.), el área superficial de la glándula salival es pequeño, sugiriendo que hay especificidad parásito-glándula salival. Esto se apoya en lo siguiente: (1) parásitos invaden sólo aquellas células localizadas en los lóbulos salivales distal-lateral y medial, (2) desarrollo de *P. knowlesi* en un hospedador innatural, *An. freeborni*, ocurre normalmente hasta la liberación de los esporozoítos al hemocele, pero son incapaces de invadir la gl. salival; sin embargo, sí fueron capaces de invadir gl. salivales de su hospedador natural, *An. dirus*, cuando fueron trasplantadas del abdomen de *An. freeborni*, y (3) ciertas lecitinas y anticuerpos que reconocen epitopos específicos en la

superficie superficie de la gl. salival interfieren con la invasión de los esporozoítos en ellas (Gosh *et al* 2000).

A nivel molecular, la invasión de la glándula salival tiene el siguiente mecanismo. A medida que *Plasmodium* madura, la síntesis de TRAP (thrombospondin-related anonymous protein) incrementa gradualmente. Esporozoítos con mutación en el gen que codifica TRAP no fueron capaces de invadir la lámina basal de la gl. salival. Además de TRAP, la proteína del circumesporozoíto (proteína superficial del esporozoíto) puede participar en el proceso de invasión de la gl. salival (Ghosh *et al* 2000).

Luego de la invasión de la glándula salival, los parásitos permanecen en el citoplasma temporalmente y pronto salen por el lado basal de la célula hacia la cavidad secretora. Los esporozoítos se organizan en paquetes y permanecen viables durante la vida del mosquito. En cada ciclo de alimentación pocos esporozoítos penetran el conducto secretor desde donde son expulsados hacia el hospedador vertebrado (Ghosh *et a*, 2000).

La importancia epidemiológica de los protozoos sanguíneos de los animales domésticos que habitan en climas cálidos es grande, ya que los vectores son capaces de sobrevivir y multiplicarse todo el año. Su impacto está ligado íntimamente a los protozoos sanguíneos del hombre, debiéndose señalar la malaria, ya que su prevalencia también depende de este factor (Gaafar *et al* 1985).

4.3. Vectores de *Plasmodium gallinaceum*

Los vectores de *Plasmodium gallinaceum* son *Anopheles quadrimaculatus* (Gaafar *et. al.* 1985), y *Aedes aegypti* (Ghosh *et al* 2000). *Anopheles gambiae* y *Anopheles stephensi* (Billingsley *et al.* 1997) sólo permiten que el parásito se desarrolle hasta la fase de ooquinetos. Sin embargo, la cepa G₃ de *A. gambiae*

permite que *Plasmodium gallinaceum* desarrolle hasta la fase de oocisto, por lo que estos dos últimos mosquitos sólo funcionan como reservorios.

4.3.1 *Anopheles quadrimaculatus*

Anopheles quadrimaculatus se cría principalmente en charcas permanentes de agua dulce, lagunas y pantanos que contienen vegetación acuática o flotadura. Donde más abunda es en las aguas poco profundas. En algunas zonas parece tener predilección por las aguas abiertas que reciben la luz del sol, y en otras zonas se encuentra en pantanos muy sombreados. Esta especie se inclina por las aguas tranquilas y claras, neutras al álcali y no suele encontrarse donde el pH es menor que 6. La reproducción rara vez ocurre en aguas estancadas, muy contaminadas con material vegetal o animal. Algunos de los hábitats comunes son las lagunas de cal, zangas de préstamo, cenagales, arroyos lentos, las orillas poco profundas y las zonas de retroceso de reservas y lagos. La producción es mayor en las aguas con poca vegetación acuática, ramas, troncos u hojas flotantes (Pratt 1973).

Las larvas de *A. quadrimaculatus* no completan su desarrollo a temperaturas por debajo de 10°C a 13°C y no efectúa bajo ningún tipo de desarrollo perceptible sino hasta que el agua llega a los 18°C a 21°C. El desarrollo de las etapas acuáticas puede tardar de 30 a 35 días. La temperatura más adecuada para el desarrollo de *A. quadrimaculatus* es entre 26°C y 32°C; a esta temperatura se requieren solamente de 8 a 14 días. Las larvas pueden encontrarse a menudo donde la temperatura de la superficie del agua pasa de 37°C, durante la tarde, aunque es poco probable que puedan sobrevivir a temperaturas constantes de mucho más de 35°C (Pratt 1973).

Los machos emergen primero y permanecen cerca de sus criaderos. Las hembras se aparean poco después de haber salido, con frecuencia, en el transcurso de su primer día fuera, ya sea antes o después de haber ingerido sangre humana. Una hembra puede copular repetidamente, aunque con una sola

vez que lo haga sea suficiente para garantizar la producción de huevecillos fértiles durante toda su vida. La postura de los huevecillos se inicia 2 ó 3 días después de haber ingerido sangre (Pratt 1973).

Durante el día los adultos permanecen inactivos; descansan en resguardos frescos, húmedos y oscuros tales como edificios, cuevas o debajo de los puentes. La alimentación ocurre casi totalmente en el transcurso de la noche. Por lo general los adultos no vuelan a más de 800 m de sus criaderos y solamente un pequeño porcentaje vuela más de 1600 m (Pratt 1973).

Según Pratt (1973) *Anopheles quadrimaculatus* se distribuye desde Canadá hasta Veracruz. No hay reportes de su presencia en Guatemala, pero por las características ambientales de la Costa Sur de Guatemala y por la presencia de *Anopheles albimanus*, se puede suponer que sí existe en la región.

4.3.2 *Aedes aegypti*

Aedes aegypti es una especie tropical que se cree fue introducida en el mundo occidental a través de África. Para el año 2002, este mosquito se distribuía desde la parte sur de Estados Unidos de América hasta el norte de Argentina, sin incluir Perú y la mayor parte de Bolivia (CDC 2005).

Aedes aegypti se considera semidoméstico (Pratt 1973). Los huevos de *Aedes aegypti* son depositados en las paredes de los recipientes y alrededor de las habitaciones humanas (Pratt 1973), sobre el nivel del agua y poseen una marcada resistencia a la desecación (Fuentes). Pueden soportar sequías durante varios meses y madurar rápidamente cuando se vuelve a llenar de agua el recipiente. La maduración puede llevar de dos a tres días si las temperaturas son altas. Los criaderos típicos son los floreros, latas, frascos, llantas de carro desechadas, retretes no utilizados, cisternas, barriles para lluvias y canalones de techo flojos. Esta especie también se cría en los huecos de los árboles, siendo su sitio tradicional para la reproducción (Pratt 1973). Las larvas pueden desarrollarse

en diferentes volúmenes de agua limpia. Son altamente competitivas cuando viven con otras especies. A temperaturas óptimas pueden desarrollarse entre 5 a 7 días (Fuentes).

La pupa es el último estadio acuático. No se alimentan y en 24 a 48 horas se transforman en adultos. El adulto femenino, vuela sólo lo necesario para alimentarse. Pueden interrumpir su ingesta, lo que motiva varios ataques para completarla. Las ingestas sanguíneas son durante el reposo post hemofágico. Su actividad es generalmente diurna y su capacidad de ingesta es de 2 a 2.5 mg, dos veces su peso (Fuentes). Su capacidad de vuelo es normalmente de alrededor de 30 a 90 metros, pero se han registrado distancias mayores (Pratt 1973).

4.4 PCR (Polymerase Chain Reaction-Reacción en Cadena de Polimerasa)

La Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es un método que permite la amplificación de ADN. La enzima polimerasa permite a todo el proceso llevarse a cabo. La polimerasa sintetiza una secuencia de bases complementaria a cualquiera cadena de ADN que albergue el gen que se busca. Estas pequeñas porciones de ADN son conocidos como “primers”² o cebadores, ya que de aquí deriva la muestra de ADN a donde se ligará la polimerasa e inicia el proceso de copia genética (PrimerDesign).

La principal función de la polimerasa en el ADN es crear nuevas cadenas de material genético en dirección 5’-3’, a partir de una sola cadena. Sin embargo, en un organismo la polimerasa también remueve nucleótidos secuencialmente al final de la cadena (PCR Applications Manual).

La amplificación en PCR puede convertir unas pocas moléculas de un ácido nucleico específico, que es demasiado poco para ser analizado directamente o usado en reacciones bioquímicas, en un microgramo de ADN. Todo el proceso está basado en el proceso natural de replicación genética. Dos

² “Primer”, que deriva de “prime”, cuyo significado en inglés es cosa a partir de la cual otra se origina o deriva.

oligonucleótidos se colocan lado a lado y definen la secuencia que debe ser amplificada. Estos cebadores se mezclan por hibridación a cadenas opuestas de ADN para ser punto de iniciación en la síntesis de nuevas cadenas de ADN. La Taq Polimerasa, que es termoestable, cataliza dicha síntesis (PCR Applications Manual).

Cada ciclo de síntesis de PCR comprende (1) desnaturalización, (2) hibridación y (3) extensión (PCR Applications Manual). Estos tres pasos son repetidos varias veces; la temperatura juega un papel vital. Para empezar esta reacción, la temperatura (T) se incrementa a 95 °C lo que separa la doble cadena de ADN y queda como dos cadenas independientes. Luego, se baja la T a 50 °C, permitiendo al cebador unirse al gen de interés, por lo que la polimerasa tiene a donde unirse e inicia el proceso de replicación genética. La T óptima para la polimerasa es 72 °C (PrimerDesign). Todo el proceso se lleva a cabo en un termociclador, un instrumento que automáticamente controla los ciclos de calentado y enfriado requerido para PCR (PCR Applications Manual).

Desnaturalización

El calor, usualmente 90 °C, separa el ADN bicatenario y lo convierte en monocatenario. Las uniones de H entre las bases son débiles y son termolábiles, mientras que las uniones entre la desoxirribosa y fosfatos, permanecen intactos por ser uniones covalentes más fuertes (PCR Applications Manual).

Hibridación

La finalidad de este paso no es replicar la cadena completa de ADN, sino una secuencia de 100-35,000 bases que es único para ese organismo. Los cebadores definen los extremos de esa secuencia *blanco*. Los cebadores son secuencias cortas y sintéticas de ADN monocatenaria, de 20-30 bases. La unión de los cebadores se lleva a cabo entre los 40 y 65 °C, dependiendo de su longitud y secuencia. Esto permite a los cebadores unirse específicamente a la secuencia *blanco* (PCR Applications Manual).

Extensión

Una vez que los cebadores se han unido al ADN complementario, la T se aumenta a 72 °C y una polimerasa termoestable, como Taq Polimerasa, sintetiza nuevo ADN bicatenario idéntico al ADN *blanco* original. Los nucleótidos complementarios que están libres en solución permiten este proceso. La síntesis siempre inicia en el extremo 3' del cebador y sigue en dirección 5' a 3', por lo que la síntesis extiende los cebadores, creando una molécula bicatenaria a partir de una monocatenaria (PCR Applications Manual).

Al final del ciclo, hay dos cadenas de ADN idénticos al ADN original. La polimerasa no reconoce el final de la secuencia *blanco*. Las cadenas recién formadas tienen un inicio, definido por el extremo 5' del cebador, pero carecen de un final 3' (PCR Applications Manual).

Cada ciclo repite y multiplica este proceso, y a más ciclos, mayor la longitud de la cadena que será patrón para la síntesis de la nueva secuencia. El ADN formado de este patrón tiene una longitud definida que se limita por el extremo 5' de cada uno de los cebadores. Estas hebras de ADN son llamadas *amplicons* (PCR Applications Manual).

Al terminar el ciclo, hay doble cantidad del gen de interés que cuando se inició (PrimerDesign). Tras 20 ciclos, PCR produce un millón de copias del gen *blanco* (PCR Applications Manual). Con cada ciclo, la cantidad de copias del gen se duplica por lo que su replicación es exponencial (PrimerDesign).

Teniendo ya millones de copias del gen, se puede extender el ADN en un gel de poliacrilamida y teñirlo para que sea visible. Entre más grande la banda, mayor cantidad de copias se han creado (PrimerDesign).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Área de Estudio

El municipio de La Gomera tiene un área aproximada de 640 km². Se encuentra situado en la parte sur del departamento de Escuintla, en la Región V. Se localiza en la latitud 14° 05' 03" y en la longitud 91° 02' 55". Está a 35 metros sobre el nivel del mar, por lo que generalmente su clima es cálido. Se sitúa a 57 kilómetros de la cabecera departamental de Escuintla (SIM).

El municipio está conformado por siete aldeas que son Sipacate, El Terrero, Texcuaco, Cerro Colorado, Paredón Buena Vista, Ceiba Amelia y El Naranjo.

5.2 Materiales

5.2.1 Recursos humanos

- ❖ Estudiante investigador
- ❖ Cuatro (4) asesores Médicos Veterinarios

5.2.2 Recursos de campo

- ❖ Jeringas de 3 ml con aguja 21
- ❖ Tubos de ensayo
- ❖ Hielera
- ❖ Refrigerante
- ❖ Lapicero
- ❖ Cuaderno
- ❖ Balanza digital

5.2.3 Recursos de laboratorio

- ❖ Pipetas
- ❖ Puntas doble filtro estériles para pipeta, de 20 y 100 µL
- ❖ Puntas estériles para pipeta, de 10, 100, 300 y 1000 µL

- ❖ Campana de flujo laminar #2
- ❖ Microtubos de 200, 500 y 1,500 μL
- ❖ Kit de purificación genómico (Wizard® Genomic DNA Purification Kit)
- ❖ Marcador de peso molecular
- ❖ Escalera 100-1500 pares de bases (Roche)
- ❖ NovaTaq™ PCR Master Mix (Novagen®)
- ❖ Cebador iniciador
- ❖ Cebador reversa
- ❖ Muestra sanguínea de ave
- ❖ Tubos de 15 mL
- ❖ Balón 125 mL
- ❖ Pipeta 10 mL
- ❖ Probeta 50 mL
- ❖ Buffer TAE (Tri-acetato-EDTA)
- ❖ Agarosa
- ❖ Papel estéril
- ❖ Balanza
- ❖ Platina
- ❖ Paleta estéril
- ❖ Pipeteadora
- ❖ Tijeras
- ❖ Gradillas
- ❖ Centrifugadora
- ❖ Vórtex
- ❖ Espectrofotómetro
- ❖ Cámara de electroforesis
- ❖ Termociclador
- ❖ Cubeta electroforesis
- ❖ Transiluminador
- ❖ Marcador indeleble
- ❖ Isopropanol

- ❖ Etanol
- ❖ Reloj
- ❖ Tijeras
- ❖ Guantes de látex sin talco
- ❖ Papel absorbente
- ❖ Refrigeradora
- ❖ Congeladora (-40 °C)
- ❖ Agua grado molecular
- ❖ Agua destilada esterilizada
- ❖ Masking tape

5.2.4 Recursos biológicos

- ❖ 100 aves de traspatio

5.3 Métodos

5.3.1 Toma de muestras en aldeas

En la comunidad de Nuevo Texcuaco, El Naranjo y Ceiba Amelia tomé 15 muestras en cada aldea, para un total de 45. En Sipacate, obtuve 14 muestras; de El Terrero, 20; y del Cerro Colorado, 16. En total, obtuve 100 muestras sanguíneas de 100 aves de traspatio.

5.3.2 Toma de muestras sanguíneas

Tomé la muestra sanguínea sólo de aves vivas y de la vena braquial, en el ala, donde cruza el húmero (Valkiunas 2005). El asistente de campo o dueño del animal sujetó al ave de las patas con la mano derecha y tomó su cuello con la mano izquierda (Valkiunas 2005). Tomé el ala derecha con la mano izquierda y para mejor visualización de la vena, desprendí las plumas en la parte ventral de la región humeral, en donde observé la vena en la depresión entre el bíceps y el tríceps (Jordan 1998). Luego, inserté la aguja calibre 23 en sentido contrario al flujo sanguíneo. Al insertar la aguja, succioné para determinar el momento exacto

en el que lograba tomar la muestra y evité el traspaso de la aguja por la vena. El volumen total de la muestra obtenida variaba entre 0.5 a 1.5 ml de sangre.

5.3.3. Manejo de muestras

Guardé la muestra sanguínea en un tubo de ensayo con anticoagulante, la coloqué en una hielera con refrigerante para conservarla en buen estado. Identifiqué los tubos con el correlativo numérico correspondiente a la muestra. Anoté el nombre del dueño de las aves muestreadas, el nombre de la aldea, edad, peso, raza y propósito del ave muestreada.

5.3.4 Procesamiento de muestras

Guardé las muestras a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Extraje el material genético de las muestras usando el kit de purificación (Wizard® Genomic DNA Purification Kit). Descongelé la sangre y agregué 900 μL de la solución de lisis celular (Cell Lysis Solution) a un tubo estéril de 1.5 mL para microcentrifugación y luego mezclé el vial de sangre hasta homogenizar y vertí 300 μL en la solución de lisis celular. Invertí el tubo 5 ó 6 veces para mezclar.

Luego, incubé la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente, invirtiéndolo 2 ó 3 veces durante este período, para lisar los glóbulos rojos. Centrifugué a $14,500 \times g$ por 20 segundos a temperatura ambiente.

Descarté el sobrenadante sin remover el sedimento blanco, quedando 10-20 μL de líquido residual en el tubo de 1.5 mL. Mezclé vigorosamente hasta que los glóbulos blancos se homogenizaban. Agregué 300 μL de solución de lisis nuclear (Nucleic Lysis Solution) y luego pipeteé la solución 5 ó 6 veces para destruir los glóbulos blancos. Agregué 100 μL de solución de precipitación proteica (Protein Precipitation Solution) a la lisis nuclear y mezclé vigorosamente 10 a 20 segundos.

Centrifugué a 14,500 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante lo transferí a un microtubo de 1.5 mL limpio con 300µL de isopropanol a temperatura ambiente. Mezclé suavemente la solución hasta que las cadenas blancas de ADN formaban una masa.

Centrifugué a 14,500 x g por 1 minuto a temperatura ambiente. Descarté el sobrenadante y agregué 300 µL de etanol al 70% a temperatura ambiente al ADN. Luego mezclé suavemente el ADN manualmente y centrifugué otra vez a 14,500 x g por 1 minuto.

Aspiré cuidadosamente el etanol con la pipeta y luego invertí el tubo en papel absorbente limpio, dejé secar el sedimento al aire por 10 minutos. Agregué 100 µL de solución de rehidratación (DNA Rehydration Solution) al tubo y rehidraté el ADN incubando a 4 °C durante la noche. Por último, guardé el ADN a 2-8 °C.

Medí la concentración del material genético mediante espectrofotometría en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Médicas de la USAC. Vertí 80 µL de agua grado molecular en la cubeta, presioné “Blank” y vacié la cubeta. Vertí 77 µL de agua grado molecular más 3 µL del ADN extraído de cada muestra sanguínea en tubos Eppendorf. Mezclé por aspiración tres veces antes de traspasar a la cubeta y realizar la lectura³. Limpié la cubeta vertiendo un poco de agua grado molecular vaciando varias veces, antes de medir la siguiente muestra. Separé las muestras según su procedencia, entre cada grupo repetí el proceso de “blanqueo”.

³ Consultar Anexos: Tabla 1: Lectura concentración proteica muestras ADN

5.3.5. Montaje de Prueba

Monté la prueba en el “Área Limpia” del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, usando una campana de flujo laminar # 2.

El experimento lo corrí usando reacciones de 25 μ L con el cebador iniciador (5'-GGTATATAGAAGTACTTATATGTTTCGGTATTGCA-3') y cebador reversa (5'-ACAAGTTGTCTCTATGAATAGTGGTATAGC-3'). Estos cebadores fueron diseñados usando la región más disímil entre *Plasmodium gallinaceum* y *Plasmodium juxtannucleare*, y amplifican el gen LS1. Cada reacción la monté sobre hielo e incluyó 1.5 mM de $MgCl_2$, 25 μ L de buffer PCR (NovaTaq™ PCR Master Mix), 0.2 μ M de cada cebador, 15 μ L agua grado molecular y 5 μ L de ADN molde. Inicié el termociclador usando un programa con una primera desnaturalización a 95 °C por 5 minutos; seguido de 31 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 53 °C por 20 segs y 72 °C por 30 segs. Terminé el programa con una extensión a 72 °C por 8 minutos.

Usé dos controles negativos en el experimento. En lugar de usar ADN molde, agregué agua grado molecular al inicio del montaje de las reacciones y al final, para corroborar ausencia de contaminantes durante manipulación y ensamblaje de reacciones. El experimento no contó con control positivo porque no se previeron todas las circunstancias necesarias para estandarización de un control positivo.

Las muestras amplificadas las monté en agar gel al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Cada reacción la cargué en tubos estériles Eppendorf manteniendo una relación de dos partes del colorante y ocho partes de muestra. El gel recibió una carga eléctrica de 120 voltios y 80 miliamperios por 60 minutos. Los productos los visualicé bajo luz ultravioleta.

5.3.6. Criterio de interpretación

Diagnosticué una muestra como positiva si observaba una amplicón final de 281 pares de bases.

5.3.7 Análisis Estadístico

Tomé 100 muestras de 100 aves adultas, provenientes de las aldeas de La Gomera, Escuintla. De estas, sólo se lograron procesar 82 muestras ya que las restantes 18 presentaban hemólisis y no las consideré aptas para el proceso de extracción de ADN.

Las características de las aves muestreadas se pueden ver en la Tabla 2 (Anexos).

Con respecto a la edad (Tabla 3, Anexos) el grupo con más aves es el de cero a 10 meses, con 60 animales. Le sigue el grupo de 11 a 20 meses, con 15 aves. Los grupos de 21 a 30 meses y de 41 a 50, tienen dos aves cada uno. Solamente se muestreó un ave de 60 meses. Ningún dueño de las aves reportó una edad que oscilara entre 31 y 40 meses. El número de casos es 80, el promedio de edad fue de 9.25 meses, el rango de edades es de dos a 60 meses y la desviación estándar es 9.6 (ver Tabal 4, Anexos).

En la Tabla 5 (ver Anexos) se detalla que la mayoría de aves tuvo un peso que osciló entre 2.1 y 4 lbs. Venticuatro aves pesaron entre 4.1 y 6 lbs. Sólo ocho aves tuvieron un peso entre cero y 2 lbs y dos aves están en el grupo de 6.1 a 8 libras de peso. El número de casos es de 82, el promedio de peso fue 3.69 lbs., siendo el mínimo 1.5 lbs y el máximo, 8. La desviación estándar fue de 1.29 (ver Tabla 6, Anexos).

El 84.15% de las muestras provinieron de hembras y el restante, 15.85%, machos (Tabla 7, Anexos). Con respecto al propósito, el 25% de aves serían usadas por su carne; el 46.05%, era de doble propósito y el 26.32%, se criaban

para el consumo de huevos. Todas las muestras fueron de aves de raza criolla (Tabla 8, Anexos).

La Tabla 9 (Anexos), muestra que el 23.17% de las muestras usadas para este estudio provenían de El Terrero. Sigue El Naranjo, de donde obtuve el 19.51% de mis muestras; en Sipacate, 17.07% y en Ceiba Amelia, 13.41%. Las aldeas de donde trabajé menos muestras fueron Nuevo Texcuaco, con 12.2%; El Cerro Colorado con 9.76% y El Paredón, 4.88%.

VI. RESULTADOS

Todas las muestras analizadas dieron resultados negativos, por lo que no se corrió una prueba estadística.

Los resultados negativos pueden deberse a las siguientes condiciones:

1. Usé el kit de extracción Wizard Promega, que según Freed (2003), no produce ADN puro para usarse en protocolos de PCR. Este tipo de kit se diseñó asumiendo que la concentración de ADN en una muestra es baja. Este no es el caso con aves porque las aves tienen glóbulos rojos y trombocitos nucleados, por lo que aumenta la concentración de material genético en la muestra analizada.
2. En el área de investigación no se hicieron estudios previos para identificar al agente general de la malaria aviar, por lo que los cebadores diseñados, probablemente no concordaron con el ADN molde (Freed, 2003). Asumí que las aves infectadas por malaria aviar en La Gomera estarían infectadas por *P. gallinaceum*, limitando mi diagnóstico a un solo agente etiológico. Debí haber ampliado mi búsqueda a otros agentes causantes de la malaria en pollos, y realizar un PCR anidado.
3. Los cebadores se diseñaron según las regiones más polimórficas entre dos agentes causantes de malaria aviar, en lugar de las áreas conservadas de las secuencias genéticas. Al no seguir este criterio, los cebadores pueden tener como blanco pares que varían en secuencia genética (Waldentström, 2004). Según la experiencia de Richard (2002), al secuenciar muestras positivas, algunas especies de *Plasmodium* presentaron variaciones de hasta 8% en sus secuencias, incluyendo las regiones en donde se unen los cebadores en las secuencias blanco.

VII. CONCLUSIONES

1. La prueba diagnóstica no identificó aves con malaria aviar provenientes de La Gomera, Escuintla.
2. La prueba diagnóstica no determinó presencia de *Plasmodium gallinaceum* en el área de estudio.

RECOMENDACIONES

1. Usar muestras almacenadas en buffer con EDTA, que inactiva nucleasas liberadas por células posiblemente dañadas por la aguja o traspaso de la muestra a tubo de recolección. Según Freed (2006), las pruebas de PCR para el diagnóstico de malaria aviar con precisión⁴ de 1.00, usan buffer con EDTA, pero sin SDS (dodecil sulfato de sodio), que es un surfactante que lisa células.
2. Considerar que al trabajar con sangre entera de aves, el factor hem y los citocromos son inhibidores de PCR (Freed, 2006).
3. Optimizar concentración de cebadores, Mg²⁺, condiciones y número de ciclos en la amplificación. También poner especial atención a la dilución de las muestras y la pureza de ADN, ya que las aves tienen 350 veces más ADN en una muestra de sangre periférica que los humanos, por los eritrocitos nucleados, diluyendo la relación ADN parásito:hospedador. Ésto limita la detección de niveles bajos de parasitemia, asociados con infecciones crónicas, porque se deben detectar los pares de base blanco en menos copias de ADN molde (Freed, 2006).
4. Analizar el material genético extraído por PCR, buscando el gen aviar nuclear (BDNF), para corroborar presencia de ADN aviar en las muestras. (Richard, 2002).
5. Realizar un PCR anidado buscando especies de *Plasmodium*, usando protocolo implementado por Ribeiro et. al. (2005), que amplifica una parte específica del genoma de *Plasmodium spp*, el gen de la subunidad ribosomal 18S, un gen conservado de la secuencia. Esto se hace con el objetivo de identificar las especies presentes en el área de estudio.

⁴ Proporción de muestras diagnosticadas como positivas por microscopía (frotis) y PCR.

VIII. RESUMEN

Tomé 100 muestras de sangre entera aviar en siete aldeas de La Gomera, Escuintla, y sólo procesé 82 por PCR. Analicé las muestras para diagnosticar malaria aviar usando cebadores que amplifican el gen LS1. Cada reacción incluyó 1.5 mM de MgCl₂, 25 µL de buffer PCR (NovaTaq™ PCR Master Mix), 0.2 µM de cada cebador, 15 µL agua grado molecular y 5 µL de ADN molde. Estas muestras las amplifiqué y luego visualicé bajo luz UV, para observar un amplicón final de 281 pares de bases. No se encontraron muestras positivas a malaria aviar, debiéndose a: (1) Uso del kit de extracción Wizard Promega, que no produce ADN puro; (2) En La Gomera no se hicieron estudios previos para identificar al agente causal de malaria aviar, los cebadores probablemente no concordaron con ADN molde y (3) Uso de cebadores diseñados a partir de regiones más polimórficas entre dos agentes de la malaria aviar, en lugar de diseñados a partir de las áreas genéticas más conservadas. Recomiendo usar muestras almacenadas en buffer con EDTA, pero sin SDS, para inactivar las nucleasas liberadas por células dañadas. También, se debe optimizar la concentración de cebadores, Mg²⁺, condiciones y número de ciclos en la amplificación; poner especial atención a la dilución de las muestras y pureza del ADN para trabajar con una muestra de buena calidad. Por último, recomiendo realizar un PCR anidado buscando especies de *Plasmodium*, según protocolo de Ribeiro et.al. (2005).

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Billingsley, PF; Sinden, RE.1997. Determinants of malaria-mosquito specificity (formato PDF). *Parasitology Today*. 13 (8): 297-301.
2. CDC (Centers for Disease Control and Prevention, US). 2005. Reinfestation by *Aedes aegypti* in the Americas (en línea). Colorado, EU. Consultado 22 ene. 2009. Disponible en <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/map-ae-aegypti-distribution.htm>
3. Cordero del Campillo, M; Rojo Vásquez, FA. 1999. *Parasitología veterinaria*. España, McGrawHill. 968 p.
4. Fuentes, O. s.f. *Ecología de los vectores del dengue* (formato PDF). Instituto Pedro Kourí. Consultado 19 ene. 2009. Disponible en <http://www.ipk.sld.cu/memorias/dengue2007/conf/fuentes-o.pdf>
5. Freed, LA; Cann, R.L. 2003. On polymerase chain reaction tests for estimating prevalence of malaria in birds (formato PDF). *The Journal of Parasitology*. 89 (6): 1261-1264.
6. Freed, LA; Cann, R.L. 2006. DNA quality and accuracy of avian malaria PCR diagnostics: a review (formato PDF). *The Condor*. 108: 459-473.
7. Fum Wong, SS; Kuei, JJ; Prasad, N; Agonafer, E; Mendoza, GA; Pemberton, TJ, Patel, PI. 2007. A simple method for DNA isolation from clotted blood extricated rapidly from serum separator tubes (formato PDF). *Clinical Chemistry*. 53 (3): 522-524.
8. Gaagar, SM; Howard, WE; Marsh, RE. 1985. *Parasites, Pests and Predators*. World Animal Science. Elsevier, Amsterdam. 575 p.

9. Ghosh, A; Edwards, MJ; Jacobs-Lorena, M. 2000. The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century (formato PDF). *Parasitology Today* 16 (5): 196-210.
10. ITIS Report. 2008. *Anopheles quadrimaculatus* Say, 1824 (en línea). s.l. Consultado 27 dic. 2008. Disponible en <http://go6.us/de>
11. Jennings, L; Webb, J; LeRoy, BE. s.f. Avian Malaria (en línea). Estados Unidos. Universidad de Georgia. Consultado 29 dic. 2008. Disponible en <http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/jennings/index.php>
12. Jordan, FTW; Pattison, M. 1998. Enfermedades de las aves. Trad. AF Martínez Haro. 3 ed. Mundo Moderno. 522 p.
13. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. 2007. Estratificación de la Malaria. Guatemala, GT. El Ministerio. s.p.
14. _____. 2008. Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores: Estratificación con factores de riesgo, usando percentiles. Guatemala, GT. El Ministerio. s.p.
15. Nieves, E; Rondón, M. 2007. Sobrevivencia del parásito *Leishmania* en el insecto vector: interacciones moleculares (en línea). Venezuela. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 27 (2): 66-72. Consultado 30 dic. 2008. Disponible en http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562007000200003&lng=es&nrm=iso
16. OPS (Organización Panamericana de la Salud). Malaria Proyecto DDT/GEF (en línea). Consultado 4 ene. 2009. Disponible en <http://go6.us/eh4>

17. PCR Applications Manual (formato PDF). s. f. Estados Unidos de Norte América. 10 p.
18. Pratt, HD; Littig, KS; Barnes, RC. 1973. Mosquitos importantes para la salud pública. AID. México. 81 p.
19. PrimerDesign Ltd. beginners guide to Real-Time PCR (formato PDF). s.f. Estados Unidos de Norte América. 8 p.
20. Promega. 2008. Usage information. Estados Unidos de Norte América. Promega. 2 p.
21. Ribeiro, SF; Sebaio, F; Branquinho, FCS; Marini, MA; Vago, AR, Braga, E. 2005. Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears (formato PDF). Parasitology. 130: 261-267.
22. Richard, FA; Sehgal, RNM; Jones, HI; Smith, TB. 2002. A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria (formato PDF). The Journal of Parasitology. 88 (4): 819-822.
23. SIM (Servicio de Información Municipal, GT). s.f. La Gomera, Escuintla (en línea). Guatemala. Consultado 21 ene. 2009. Disponible en <http://go6.us/ri0>
24. The Merck Veterinary Manual. 2005. 9 ed. Ed. Cynthia M. Kahn. Merck. Estados Unidos de Norte América. 2712 p.
25. Valkiunas, G. 2005. Avian malaria parasites and other Haemosporidia (en línea). CRC Press. s.l. 932 p.
26. Waldenström, J; Bensch, S; Haseiquist, D; Östman, Ö. 2004. A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and

Haemoproteus infections from avian blood (formato PDF). The Journal of Parasitology. 90 (1): 191-194.

XI. ANEXOS

Tabla 1:					
Lectura concentración proteica, muestras de ADN aviar. La Gomera, Escuintla, 2009-2010					
<i>Muestra</i>	<i>Concentración ng/μL</i>	<i>Muestra</i>	<i>Concentración ng/μL</i>	<i>Muestra</i>	<i>Concentración ng/μL</i>
EP1	135.1	NT7	1230.2	ET8	3621.7
EP2	245.0	NT8	14.9	ET9	1867.9
EP3	SL	NT9	21.7	ET10	1020.3
EP4	385.9	NT13	24.7	ET11	2663.6
CA1	242.7	NT14	38.7	ET12	3171.0
CA2	200.3	NT15	33.0	ET13	2484.8
CA3	583.6	EN1	370.4	ET14	287.2
CA4	973.7	EN2	204.4	ET15	1830.3
CA5	50.0	EN3	182.3	ET16	679.6
CA6	1201.3	EN4	660.1	ET17	2669.8
CA11	285.9	EN5	285.0	ET18	1569.3
CA12	SL	EN6	350.0	ET19	755.7
CA13	203.5	EN7	850.6	S1	942.1
CA14	853.2	EN8	1631.9	S2	1017.5
CA15	SL	EN9	316.9	S3	2037.2
CC1	SL	EN10	843.6	S4	373.0
CC2	256.8	EN11	705.2	S5	287.4
CC3	SL	EN12	75.4	S6	1382.8
CC4	1203.5	EN13	503.6	S7	66.5
CC5	240.5	EN14	149.5	S8	993.4
CC6	70.6	EN15	1073.3	S9	988.5
CC8	SL	ET1	256.5	S10	2403.9
CC9	176.0	ET2	887.4	S11	1435.5
NT1	503.8	ET3	1463.2	S12	810.3
NT2	62.0	ET4	217.2	S13	2719.3
NT4	77.6	ET5	1990.1	S14	1203.5
NT5	38.3	ET6	279.5		
NT6	23.7	ET7	36.8		

EP: El Paredón; CA: Ceiba Amelia; CC: Cerro Colorado; NT: Nuevo Texcuaco; EN: El Naranja; ET: El Terrero; S: Sipacate. SL: espectrofotómetro no hizo lectura de concentración proteica.

Tabla 2: Características de Aves Muestreadas en La Gomera, Escuintla, 2009-2010						
Sexo	Edad (meses)	Peso (lbs)	Propósito	Procedencia	Raza	Resultado
1	4,0	3,0	2	1	1	0
1	4,0	4,0	2	1	1	0
1	4,0	4,0	2	1	1	0
1	24,0	5,0	3	1	1	0
1	3,0	1,5	3	2	1	0
1	3,0	2,0	3	2	1	0
1	5,0	3,0	2	2	1	0
1	5,0	3,0	3	2	1	0
1	2,5	3,5	2	2	1	0
1	2,5	4,5	2	2	1	0
1	3,0	3,0	1	2	1	0
1	12,0	3,0	2	2	1	0
2	12,0	6,0	1	2	1	0
1	2,0	3,0	1	2	1	0
1	2,0	2,0	1	2	1	0
1	6,0	3,0	3	3	1	0
1	6,0	3,0	3	3	1	0
1	12,0	4,5	3	3	1	0
1	ND ⁵	6,0	3	3	1	0
1	7,0	3,0	3	3	1	0
1	ND	4,0	3	3	1	0
1	6,0	3,0	3	3	1	0
1	6,0	4,0	3	3	1	0
1	8,0	3,0	2	4	1	0
1	5,0	4,0	2	4	1	0
1	7,0	3,0	2	4	1	0
1	3,0	3,0	2	4	1	0
1	9,0	5,0	2	4	1	0
1	10,0	2,0	2	4	1	0
1	11,0	3,0	2	4	1	0
1	18,0	4,5	2	4	1	0
1	3,0	2,0	2	4	1	0
1	8,0	5,0	2	4	1	0
2	12,0	5,0	1	5	1	0
1	8,0	4,0	3	5	1	0
1	8,0	4,0	3	5	1	0
1	4,0	2,0	2	5	1	0
1	24,0	3,0	1	5	1	0
1	9,0	3,0	3	5	1	0
1	9,0	4,0	3	5	1	0
1	48,0	4,0	3	5	1	0
1	48,0	4,0	3	5	1	0
1	6,0	3,0	2	5	1	0
2	7,0	5,0	1	5	1	0
1	10,0	4,0	3	5	1	0
1	6,0	3,0	1	5	1	0
1	5,0	3,0	1	5	1	0

⁵ ND= No disponible; datos no proporcionados por dueños

Tabla 2:						
Características de Aves Muestreadas en La Gomera, Escuintla, 2009-2010						
Sexo	Edad (meses)	Peso (lbs)	Propósito	Procedencia	Raza	Resultado
1	4,0	4,0	2	5	1	0
2	12,0	6,0	1	6	1	0
2	6,0	6,0	1	6	1	0
2	12,0	3,0	1	6	1	0
2	7,0	4,0	1	6	1	0
1	7,0	3,0	2	6	1	0
1	60,0	2,0	2	6	1	0
1	7,0	4,0	2	6	1	0
2	12,0	6,0	1	6	1	0
1	3,0	4,0	1	6	1	0
1	3,0	3,0	1	6	1	0
1	12,0	5,0	2	6	1	0
1	7,0	5,0	2	6	1	0
1	6,0	3,0	2	6	1	0
1	6,0	4,0	2	6	1	0
1	7,0	6,0	1	6	1	0
2	8,0	5,0	1	6	1	0
1	7,0	3,0	2	6	1	0
1	5,0	2,0	2	6	1	0
2	5,0	2,0	1	6	1	0
1	4,0	4,0	2	7	1	0
1	7,0	5,0	2	7	1	0
1	9,0	2,0	2	7	1	0
1	12,0	4,0	2	7	1	0
1	3,0	2,5	2	7	1	0
2	9,0	4,0	2	7	1	0
1	5,0	3,0	ND	7	1	0
1	8,0	2,0	ND	7	1	0
1	13,0	5,0	ND	7	1	0
1	18,0	2,0	ND	7	1	0
1	12,0	2,0	ND	7	1	0
2	5,0	7,0	ND	7	1	0
2	3,0	8,0	ND	7	1	0
1	7,0	3,0	ND	7	1	0

Sexo: 1, hembra; 2, macho. Propósito: 1, carne; 2, doble propósito; 3, ponedora. Procedencia: 1, El Paredón; 2, Ceiba Amelia; 3, Cerro Colorado; 4, Nuevo Texcuaco; 5, El Naranjo; 6, El Terrero; 7, Sipacate. Raza: 1, criollo. Resultado: 0, negativo; 1, positivo.

Tabla 3:
Aves catalogadas según edad (meses). La Gomera,
Escuintla, 2009-2010.

<i>Edad</i>	<i>Cantidad aves</i>
0-10	60
11-20	15
21-30	2
31-40	0
41-50	2
51-60	1
Total	80 ⁶

Tabla 4:
Promedio de edad (meses) de aves muestreadas en La Gomera, Escuintla. 2009-2010.

	N	Mínimo	Máximo	Promedio	Desviación est.
Meses	80	2,0000	60,0000	9,250000	9,6038626
N válidos (en lista)	80				

Tabla 5:
Aves catalogadas según peso (lbs). La Gomera,
Escuintla, 2009-2010.

<i>Peso</i>	<i>Cantidad aves</i>
0-2	8
2.1-4	48
4.1-6	24
6.1-8	2
Total	82

⁶ No hay datos de edad para dos aves porque los dueños no brindaron esta información.

Tabla 6:
Promedio de peso (lbs) de aves muestreadas en La Gomera, Escuintla, 2009-2010.

	N	Mínimo	Máximo	Promedio	Desviación est.
Lbs	82	1,5000	8,0000	3,695122	1,2951860
N válido (en lista)	82				

Tabla 7:
Aves catalogadas según sexo. La Gomera, Escuintla, 2009-2010.

<i>Sexo</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Porcentaje (%)</i>
Hembra	69	84.15
Macho	13	15.85
Total	82	100

Tabla 8:
Aves catalogadas según propósito de explotación. La Gomera, Escuintla, 2009-2010.

<i>Propósito</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Porcentaje (%)</i>
Carne	19	25
Doble propósito	35	46.05
Ponedoras	20	26.32
Total	76	100

Tabla 9:
Aves catalogadas según aldea de La Gomera, Escuintla, 2009-2010.

<i>Aldea</i>	<i>Cantidad aves</i>	<i>Porcentaje (%)</i>
El Paredón	4	4.88
Ceiba Amelia	11	13.41
El Cerro Colorado	8	9.76
Nuevo Texcuaco	10	12.20
El Naranja	16	19.51
El Terrero	19	23.17
Sipacate	14	17.07
Total	82	100

CLARA HAYDÉE QUEVEDO SALAZAR

DR. MANUEL RODRÍGUEZ ZEA
ASESOR PRINCIPAL

DRA. VIRGINIA DE CORZO
ASESORA

DR. CARLOS CAMEY
ASESOR

DRA. BEATRIZ SANTIZO
ASESORA

IMPRÍMASE:

MED. VET. LEONIDAS ÁVILA PALMA
DECANO

