

Eco-epidemiología

de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en Guatemala

Celia Cordón-Rosales
Pamela Marie Pennington

Resumen

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana ha sido un problema de salud pública en América Latina y existen tres iniciativas sub-regionales en marcha que buscan su eliminación. En Guatemala, se desarrolla un programa nacional centrado en gran parte en la interrupción de la transmisión a través de los insectos vectores. En esta publicación se presenta una revisión de los principales resultados de los estudios ecológicos-epidemiológicos realizados en la Universidad del Valle de Guatemala con la finalidad de contribuir al desarrollo de una estrategia más efectiva. Los principales temas comprenden la eficacia y efectividad de las medidas basadas en el uso de los insecticidas para el control de los insectos transmisores, la mejor definición del área endémica, y el establecimiento de las líneas basales serológica y entomológica para guiar la implementación y posterior evaluación de impacto de las acciones de control, la genética poblacional de los principales vectores *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*, la variabilidad genética del parásito *Trypanosoma cruzi* y la influencia del ciclo silvestre de transmisión en el ambiente doméstico.

Abstract

Chagas Disease or American Trypanosomiasis has been a public health problem in Latin America and three sub-regional initiatives are underway to eliminate its transmission. A national program has been implemented in Guatemala centered mainly on the interruption of insect vector transmission. In this publication a review is presented of the main results from ecologic-epidemiologic studies conducted by Universidad del Valle de Guatemala in contribution to the improvement of an effective control strategy. The main topics addressed include the efficacy and effectiveness of insect vector control based on insecticides, the better definition of the endemic area and the establishment of serologic and entomologic baseline data to guide and subsequently evaluate the impact of vector control interventions, population genetics of the main vectors *Rhodnius prolixus* and *Triatoma dimidiata*, the genetic variability of the parasite *Trypanosoma cruzi*, and the influence of the sylvatic transmission cycle in the domestic environment.

Introducción

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana fue descubierta en Brasil en 1909 por el Dr. Carlos Chagas y ha sido un problema de la salud pública en Centro y Sur América. En la década de los noventa se estimaban 100 millones de personas en riesgo de transmisión, 16-18 millones de personas infectadas con el agente etiológico, *Trypanosoma cruzi* (1), y la generación de 700,000 casos nuevos por año (2) en Latinoamérica. La Enfermedad de Chagas se manifiesta durante la fase crónica de la infección, 10-20 años después de su inicio, ocasionando daños incurables. Aunque las manifestaciones clínicas varían de

una región endémica a otra, se estima que aproximadamente un 30% de las personas infectadas sufrirán daños cardíacos y otro 10%, lesiones gastrointestinales o neurológicas, constituyéndose como una importante causa de mortalidad. Unas 45,000 muertes por año eran atribuibles a la Enfermedad de Chagas en América Latina antes del inicio de los programas de control (3).

La Enfermedad de Chagas es transmitida por chinches hematófagas, de la subfamilia *Triatominae*, que cohabitan con los residentes de viviendas precariamente construidas y mantenidas bajo malas condiciones higiénicas (Figura 1 Ciclo de transmisión). Antes

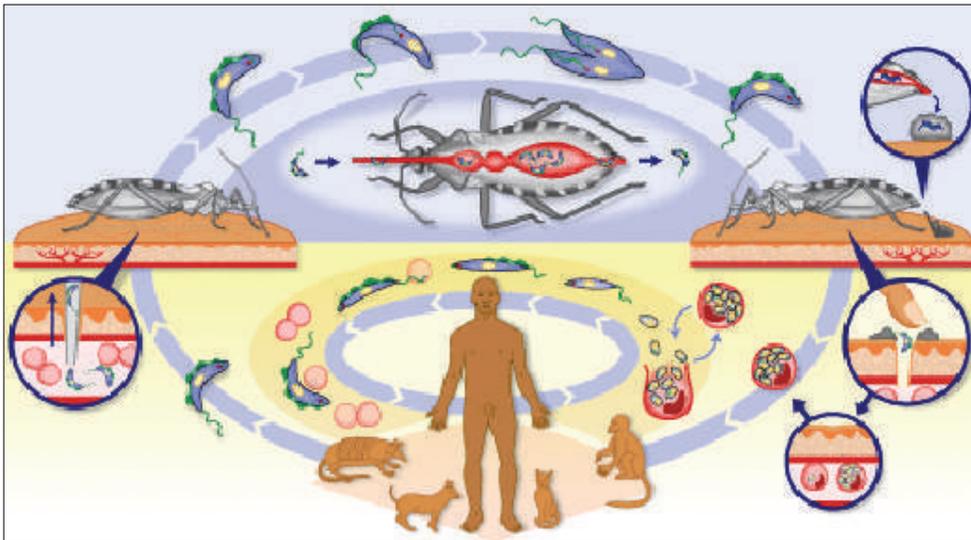


Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. figura tomada de: <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>. De acuerdo con información publicada por el CDC (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmericana.htm#Life%20Cycle>) un insecto triatomino o chinche pica al hombre u otro mamífero para tomar sangre y libera al tripomastigote (estado extracelular y flagelado del parásito) en las heces. El tripomastigote penetra al hospedero a través de la herida o las membranas mucosas e invade las células cercanas al sitio de inoculación donde se desarrolla a amastigote (estado intracelular y sin flagelo del parásito). Los amastigotes se multiplican por fisión binaria y se diferencian en tripomastigotes que son liberados en el torrente sanguíneo para infectar otros tipos de tejido y transformarse en amastigotes. Las manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Chagas son el resultado de este ciclo de infección. Los tripomastigotes sanguíneos no se replican. La replicación ocurre solamente cuando invaden otras células o son ingeridos por las chinches. Las chinches se infectan al alimentarse en hospederos (humanos u otros mamíferos) que tengan parásitos circulando en la sangre. Los tripomastigotes ingeridos se transforman a epimastigotes en el intestino del insecto vector. Los parásitos se multiplican y diferencian en el intestino medio y se diferencian a tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior.

del inicio de los programas regionales para el control de la enfermedad, se estimaba que un 80% de la transmisión se realizaba a través de los insectos vectores. Sin embargo, existen otros modos de transmisión que incluyen la transfusión sanguínea (16%), la vía congénita de madre a hijo (2%), y otros como el transplante de órganos, los accidentes de laboratorio y la contaminación de alimentos. Se anticipa que la importancia epidemiológica de estas maneras de transmisión variará con el grado de avance del control vectorial y otras condicionantes de índole socio-económica.

Recientemente se han reportado casos de transmisión local fuera de Latinoamérica: en Europa, Canadá y Estados Unidos, debido a las transfusiones sanguíneas (4,5) y transplante de órganos (6,7) que involucran a inmigrantes provenientes de áreas endémicas. Es principalmente en el ambiente doméstico donde se mantiene el ciclo de transmisión humana

de *T. cruzi* debido al contacto hombre-chinche. Sin embargo, la infección con *T. cruzi* puede constituir una epizoonosis en los ambientes silvestres. Los tatuacines y otros mamíferos pequeños han sido considerados como reservorios del agente etiológico, *T. cruzi*, y pueden constituir un enlace importante entre los ciclos silvestres y domésticos.

Guatemala ha sido considerado como uno de los países con niveles más altos de transmisión, afuera de los países de Sur América (8). Según la información presentada en una de las primeras reuniones centroamericanas que buscaban la puesta en marcha de una iniciativa de control regional (Tegucigalpa, Honduras, Octubre 1997), la situación epidemiológica era la siguiente: 34% de la población nacional estaba en riesgo de infección (aproximadamente 3.4 millones de habitantes); un total de 730,000 personas se encontraban infectadas; 28-30 mil nuevas infecciones se presentaban anualmente; y los



Figura 2 Fotos de *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* adultos. Las chinches son insectos hemimetábolos que presentan cuatro estadios de ninfa antes de completar su desarrollo a adultos. Todos los estadios se alimentan exclusivamente de sangre y son capaces de la transmisión de *Trypanosoma cruzi*.

principales insectos vectores eran las chinches *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* (Figura 2), presentando niveles de infestación de 10-34% y de 3-18% respectivamente. Se estimaba que la prevalencia en donadores de sangre era de 0.97%.

La presencia de la Enfermedad de Chagas en Guatemala se conoce desde principios de este siglo (9, 10, 11, 12); sin embargo, fue hasta el año de 1993 que se estableció el Departamento de Vigilancia y Control de la Enfermedad de Chagas dentro de la División de Malaria, Ministerio de Salud de Guatemala, en respuesta a las iniciativas apoyadas por la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Dicho evento podría calificarse como el primer esfuerzo por parte de las autoridades de salud del país para poner en marcha un programa tendiente a interrumpir la transmisión de la enfermedad. En 1994, a solicitud del primer jefe de ese departamento^a el Centro de Investigaciones y Adiestramiento en Entomología Médica (MERTUG)^b, estación de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en Guatemala, y el Instituto de Investigaciones (IINV) de la Universidad del Valle de Guatemala (UVG), iniciaron las gestiones para desarrollar un estudio piloto para el control vectorial de la enfermedad. Desde entonces, en el Centro de Estudios en Salud (CES), en colaboración con la estación del Centro para Prevención y Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC) en Guatemala, se han llevado a cabo estudios en asistencia al Programa

Nacional de Control de la Enfermedad de Chagas. En esta publicación se presenta una revisión de los principales resultados de estos estudios ecológicos-epidemiológicos realizados con la finalidad de contribuir al desarrollo de una estrategia más efectiva para el control de la Enfermedad de Chagas.

Control de las chinches en Guatemala a través de la aplicación de insecticidas

En la ausencia de una cura efectiva para la Enfermedad de Chagas y de vacunas que eviten la infección, la prevención y el control han descansado fundamentalmente en la interrupción de la transmisión por vía del insecto y de las transfusiones sanguíneas. Actualmente existen en las Américas varias iniciativas regionales para el control y prevención de la Enfermedad de Chagas (13, 14, 15, 16) que incluyen dentro de sus fundamentos la eliminación de las poblaciones domiciliadas de triatomos, empleando como primera línea de ataque la aplicación de insecticidas con acción residual en los domicilios. En 1991 se lanzó la primera iniciativa, llamada del Cono Sur (Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay) con la finalidad de eliminar las poblaciones domiciliarias de la principal especie de insecto transmisor en esta región, *T. infestans* (Figura 3). Ya para finales de la década de los noventa la iniciativa del Cono Sur había logrado un 65% de reducción en la incidencia de la enfermedad y la certificación de la eliminación de la transmisión vectorial

^a El Dr. Carlos Padilla fungió como el primer jefe del Departamento de Vigilancia y Control de la Enfermedad de Chagas.

^b El Dr. Robert Klein, director de MERTUG, apoyó sustancialmente esta iniciativa.



en Uruguay, Chile y 10 de los 12 estados del Brasil (2). En 1997 se iniciaron las iniciativas de los países Andinos (Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela) y la de Centroamérica (IPCA- Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Panamá), animados por los logros alcanzados por los países del Cono Sur. En reconocimiento a las decisiones adoptadas por los países en la región, la Organización Mundial de la

Salud (OMS) propuso la eliminación de transmisión de la enfermedad de Chagas para el año 2010 en su 51^a Asamblea Mundial de la Salud en 1998 (17). Como refuerzo para alcanzar esta meta, en el mes de julio de 2007 la OMS ha lanzando una nueva iniciativa para la conformación de una red mundial para el control de la Enfermedad de Chagas, dentro de una iniciativa global contra las enfermedades tropicales descuidadas (18).

Antes que Guatemala adquiriera el compromiso de realizar acciones dirigidas al control de los insectos transmisores de la Enfermedad de Chagas era necesario verificar si la intervención basada en el uso de insecticidas era capaz de controlar los principales insectos vectores encontrados en el país. En 1995, se inició un estudio piloto de control vectorial^c, para evaluar la eficacia del rociamiento con insecticidas en la reducción de la infestación domiciliar con *T. dimidiata* y *R. prolixus* (19). El estudio se desarrolló en las Aldeas de Tituque y Tuticopote, departamento de Chiquimula, Guatemala. La infestación domiciliar se midió durante el período de marzo de 1995 a diciembre de 1998, en intervalos de 3-4 meses (Figura 4). El insecticida se aplicó una sola vez en el domicilio y peri-domicilio en noviembre de 1995, utilizando lambda cialotrina (30

mg a.i./m₂) y propoxur (1 g a.i./ m₂) en Tituque y Tuticopote respectivamente. En 1995, antes de intervención, la tasa de infestación domiciliar con *T. dimidiata* y *R. prolixus* oscilaba entre 34-42% y 19-20% respectivamente en una muestra de casas. Tres meses después de la intervención, la infestación domiciliar con *T. dimidiata* y *R. prolixus* había disminuido a 8% y 4% respectivamente. Un año después, había disminuido hasta 0% para *R. prolixus* mientras que había aumentado al 13% para *T. dimidiata*. Los datos colectados hasta tres años después indican que *T. dimidiata* presenta una tendencia hacia la recuperación de las poblaciones domiciliarias mientras que esto no ocurre para *R. prolixus*. Sin embargo, la aplicación de insecticida, logra un impacto importante en la reducción de las poblaciones domiciliarias de *T. dimidiata* porque tres años después de

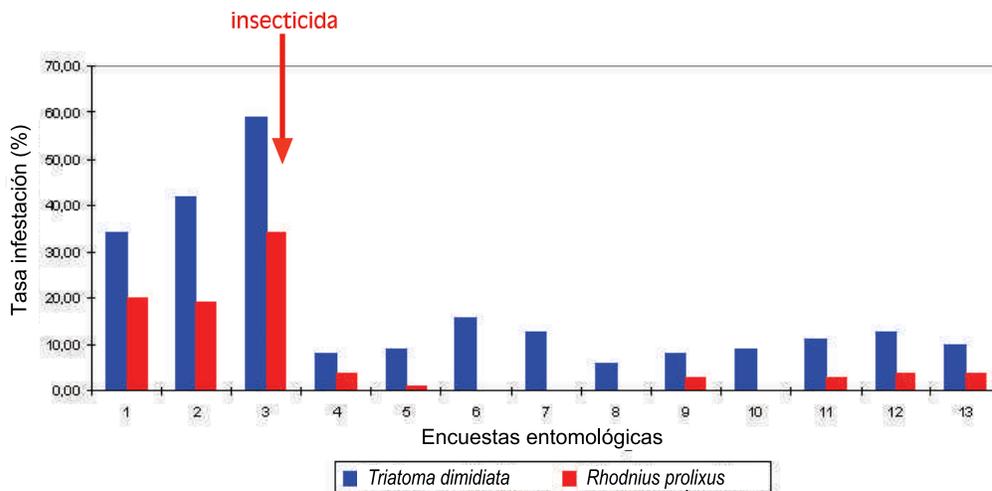


Figura 4. Eficacia del rociado intradomiciliar en el control de *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* en Guatemala. Tasas de infestación determinadas por el método de colecta hora-hombre antes (1&2), durante (3, solamente en una comunidad) y después (4 a 13) de la aplicación domiciliar de insecticida residual. Encuestas entomológicas realizadas cada 3-4 meses, en Aldea Tituque y Tuticopote, Olopa, Chiquimula (marzo 1995- diciembre 1998).

^c Estudio parcialmente financiado por el Programa Especial de Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales (TDR), Organización Mundial de la Salud (OMS), proyecto no. 960320, Celia Córdón-Rosales, Investigador Principal.

la intervención la infestación domiciliar era más de tres veces menor que al inicio. Los resultados demostraron que *T. dimidiata* presenta el riesgo de re-infestación mientras *R. prolixus* tendía a la eliminación. Con fundamento en este estudio piloto y otras experiencias en Honduras y El Salvador la Iniciativa de los Países de Centro América (IPCA) se planteó como objetivos eliminar la infestación con *R. prolixus* y reducir las poblaciones domésticas de *T. dimidiata* para interrumpir la transmisión a través de los insectos.

En Guatemala, las actividades de control implementadas por el Ministerio Nacional de Salud y Asistencia Social (MSAS) se iniciaron en el año 2002 con el apoyo de la Agencia Japonesa de Cooperación Internacional, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y de las Universidades San Carlos y del Valle de Guatemala. Nuestro grupo ha continuado la colaboración mediante estudios que evalúan la efectividad de las acciones contra los insectos. Se ha podido monitorear que las acciones ejecutadas por el Programa Nacional siguen mostrando una disminución significativa de *T. dimidiata* después de un solo rociado en un orden de por lo menos 3 veces, tomando como casos los departamentos de Zacapa (20) y Jutiapa (14), como también el efecto acumulativo de rociados sucesivos que tienden a reducir el riesgo de re-infestación (21), mostrando una reducción de 9 veces en comparación con los niveles iniciales. También se ha confirmado la posibilidad de eliminación de *R. prolixus* (19). Actualmente se está

realizando un estudio que pretende estratificar el área endémica en Guatemala en base al riesgo de re-infestación con *T. dimidiata* utilizando modelos de predicción que incorporan las variables ambientales y climáticas^d.

Delimitación del área endémica y línea basal

Una vez adquirido el compromiso para desarrollar un Programa Nacional de Control, era necesario delimitar de mejor manera la región endémica pues la información existente era anecdótica o basada en muestras de conveniencia, que limitaban su uso. En colaboración con el Ministerio de Salud se realizaron dos encuestas, una serológica en niños de edad escolar y otra entomológica, basadas en muestras probabilísticas con representatividad a nivel de municipio. Los resultados de las encuestas contribuyeron a la estratificación epidemiológica de la región endémica para la eficiente implementación y asignación de prioridades de las operaciones de control vectorial. Adicionalmente, constituyen la información serológica y entomológica basal para la subsiguiente evaluación de impacto del programa de control.

La encuesta serológica (22) fue un estudio transversal, realizado en el año de 1999, para estimar la tasa de seroprevalencia a *T. cruzi* y fue realizada en cinco departamentos (Chiquimula, Jalapa, Zacapa, Jutiapa, y Santa Rosa), que en base a la información disponible comprendían al área endémica principal en Guatemala^e. Utilizando un ensayo

^dEstudio parcialmente financiado TDR/OMS, proyecto no. A50685, Clive Davies, Investigador Principal.

^eEstudio parcialmente financiado por TDR/OMS proyecto no. 98094 Byron Arana, Investigador Principal.

enzimático de inmunoadsorción (ELISA por sus siglas en inglés) se analizaron muestras de sangre de niños en edad escolar, colectadas en papel filtro. La seroreactividad general a *T. cruzi* en los municipios encuestados fue de 5.28% (235 de 4,447). De un total de 173 comunidades evaluadas, 35 (20.23%) presentaron una seropositividad entre 10% a 45% (Figura 5) Se analizaron varios parámetros, incluyendo las características de la vivienda, para determinar su relación con la seropositividad. Aunque se encontraron varias asociaciones, la más fuerte fue con casas con techos de palma.

La inspección de los domicilios para la realización de la encuesta entomológica se realizó durante el período de Mayo del 2000 a Agosto del 2002. La encuesta fue conducida en seis de-

partamentos en el siguiente orden: Zacapa, Chiquimula, Jutiapa, Santa Rosa, Jalapa y Baja Verapaz. Un total de 9,449 casas en 737 comunidades fueron encuestadas en colaboración con el personal Ministerio de Salud. Los resultados indicaron que *T. dimidiata* era la especie más ampliamente distribuida, 48.7 % de dispersión, mientras que *R. prolixus* estaba presente en solamente 4.2 % de los poblados. La infestación general con *R. prolixus* era de 0.8% . Trece municipios (20.0%) registraban la presencia de *R. prolixus* pero solamente 4 (6.2%) presentaban una infestación domiciliar > 4% y una densidad de infestación >48 chinches/100 casas. En contraste, la infestación promedio con *T. dimidiata* era 12.4%, con un rango del 12-45% en un 49% de los municipios infestados

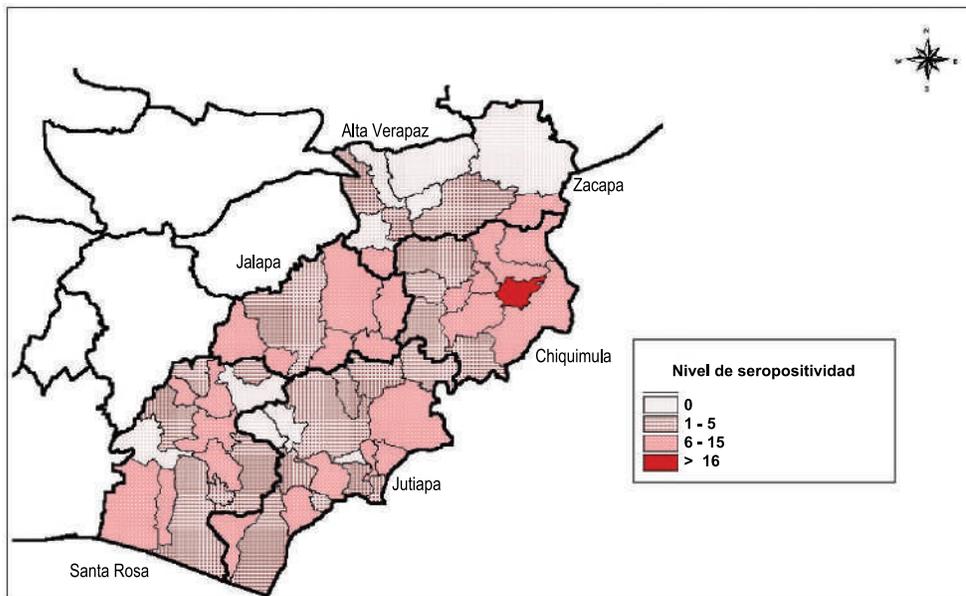


Figura 5. Estratificación de los municipios por nivel de seropositividad a *Trypanosoma cruzi* en niños de edad escolar. La seroreactividad a *T. cruzi* fue medida a través de una prueba de ELISA utilizando antígeno crudo.

† Estudio parcialmente financiado por TDR/ proyecto no. 990545 Celia Cordón-Rosales, Investigador Principal.

(Figura 6 y 7).). Además de *R. prolixus* y *T. dimidiata*, también se reportó la presencia de *T. nítida*; únicamente se colectaron 78 especímenes mientras que para *T. dimidiata* y *R. prolixus* se colectaron 6,478 y 759 respectivamente. Los domicilios infestados con *T. dimidiata* mostraban una asociación con pisos de tierra ($r^2=0.1183$, $p<0.0001$), y la infestación de *R. prolixus* con techos de palma y paja ($r^2=0.1467$, $p<0.0001$; $r^2=0.2081$, $p<0.0001$; respectivamente). Sin embargo, el riesgo de infestación con *T. dimidiata* solamente aumentaba con la presencia de las paredes de adobe ($OR=1.6563$, $p<0.0001$). En contraste, el riesgo de infestación con *R. prolixus* sí aumentaba con la presencia de paredes de palopique, y techos de palma y paja; en todos los casos la razón

de probabilidad era >2 , y especialmente alta para los techos de palma y paja ($OR >10$, $p<0.0001$).

Los resultados de la encuesta entomológica no solamente ayudaron a definir la distribución de ambos vectores, también permitieron especular sobre los factores que la determinan. En el caso de *R. prolixus*, el alto riesgo de infestación asociado con las características de la vivienda puede interpretarse como una alta adaptación al ambiente domiciliar, y su distribución altamente focalizada y más restringida en comparación con los datos disponibles de 1943 (23), como un proceso natural de extinción de la especie. Podría pensarse que la degradación del que fuera su hábitat silvestre (esta es una especie que se

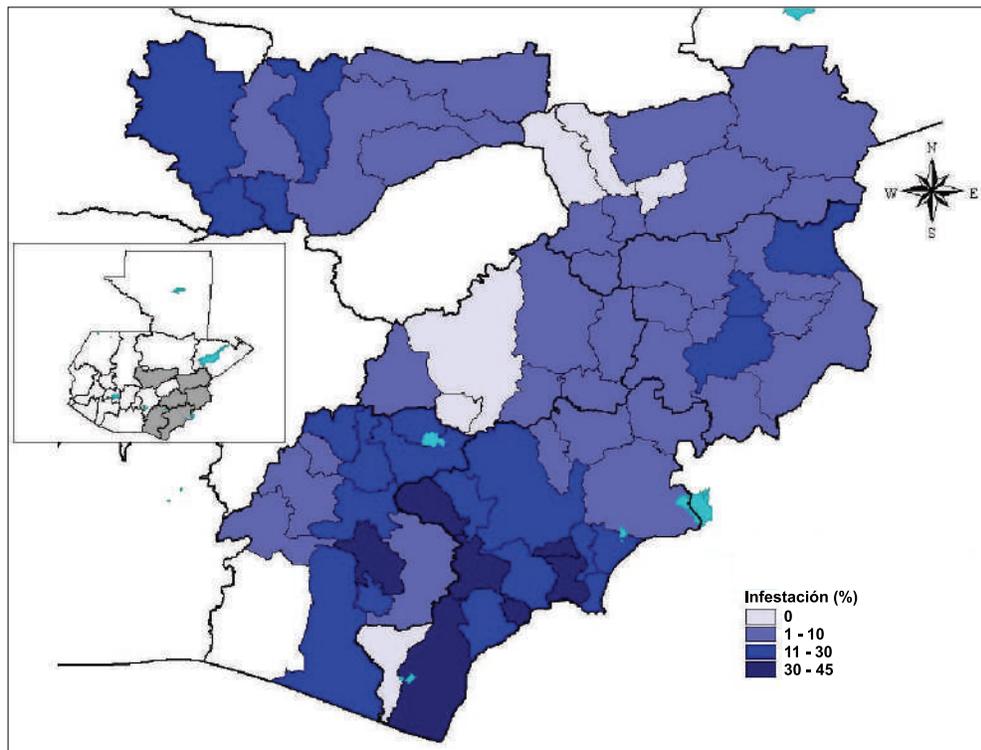


Figura 6. Estratificación de los municipios en base al niveles de infestación domiciliar con *Triatoma dimidiata*, según los resultado de la encuesta entomológica basal realizada por la Universidad del Valle de Guatemala con la colaboración del Ministerio de Salud de Guatemala y la estación del Centro de Enfermedades de los Estados Unidos de América en Guatemala, abril 2000 a agosto 2002.

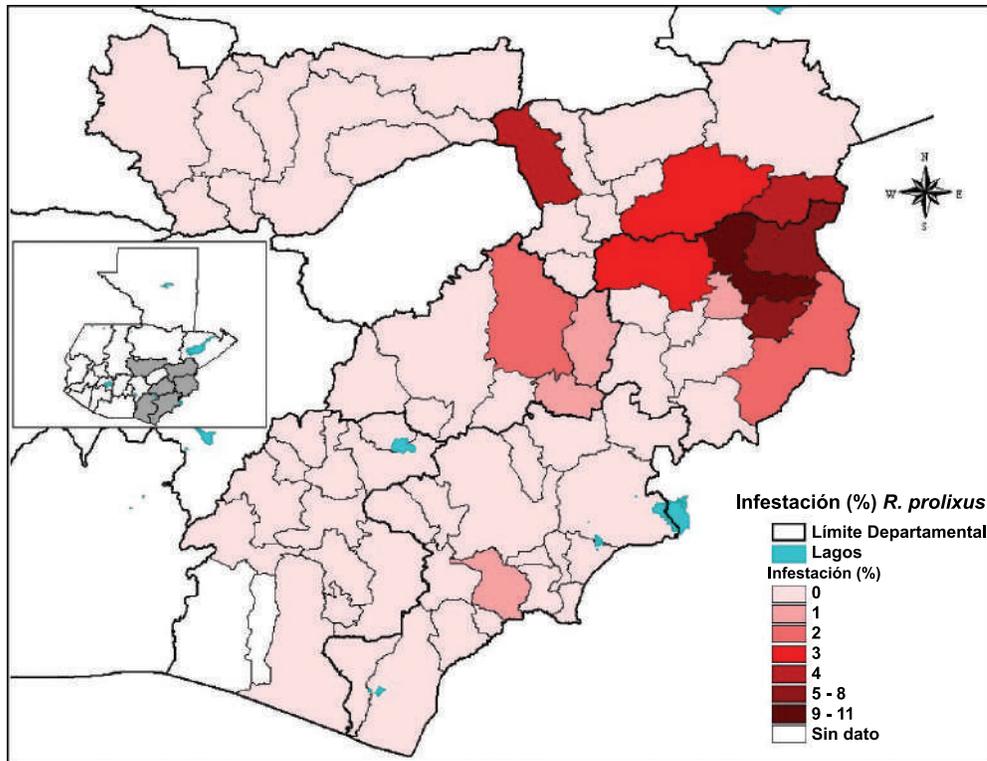


Figura 7. Estratificación de los municipios en base al nivel de infestación domiciliar con *Rhodnius prolixus* según los resultados de la encuesta entomológica basal realizada por la Universidad del Valle de Guatemala con la colaboración del Ministerio de Salud de Guatemala y la estación del Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos de América en Guatemala, abril 2000 a agosto 2002.

originó en ecosistemas de sabana (24) ha obligado a esta especie a colonizar ambientes más estables, como el domicilio humano, perdiendo en el proceso su capacidad para adaptarse a diferentes ecotopos. En contraste, en el caso de *T. dimidiata* no se marca una adaptación al ambiente domiciliar a la luz del bajo riesgo de infestación asociado con las características de la vivienda y se asume que presenta la plasticidad para habitar ambientes diversos dada su amplia distribución y el poco cambio registrado en comparación con los datos de 1943 (20). Estos datos apoyan la posibilidad de eliminación de *R. prolixus* y la dificultad en el control de *T. dimidiata* y señalan la necesidad de establecer un sistema de vigilancia entomológica al nivel de casa

para estratificar y dirigir las acciones de control dentro del área de prevalencia de *T. dimidiata*.

Al combinar los datos de la encuesta serológica y entomológica, pueden hacerse inferencias sobre la importancia epidemiológica de ambas especies de chinches en la transmisión de la Enfermedad de Chagas en la región. En 29 de los municipios con una seroprevalencia en niños de edad escolar >5%, 37.9% y 89.7% se encontraban infestados *R. prolixus* y *T. dimidiata* respectivamente, indicando la importancia de ambas especies aún cuando la opinión más aceptada ha sido la supremacía de *R. prolixus* sobre *T. dimidiata* como transmisor de la Enfermedad de Chagas. Sin embargo,

no ha podido establecerse una relación directa entre los niveles de infestación para cada una de las especies y la seroprevalencia en niños. En los municipios infestados con *R. prolixus*, 84.6 % de un total de trece, presentaban una seroprevalencia >5%, en contraste, el 51.0% de los 51 municipios infestados con *T. dimidiata* presentaban la misma seroprevalencia >5%. Una vez eliminado *R. prolixus* del ambiente domiciliar podrá medirse mejor la contribución de *T. dimidiata* en la transmisión de la Enfermedad de Chagas en Guatemala.

Genética poblacional y relaciones filogenéticas de los insectos transmisores de la Enfermedad de Chagas

Aunque ha quedado demostrado que el control vectorial tiene un gran impacto en la interrupción de la transmisión de la Enfermedad de Chagas (25, 26), la limitación principal de esta estrategia es la sustentabilidad si se depende exclusivamente del uso de insecticidas.

Con el decaimiento del efecto residual de los insecticidas se presenta el riesgo de la reinfestación domiciliar, con aquellas especies de triatominos que presentan focos silvestres o extra-domiciliares en las áreas bajo control. En el caso de Centro América, *R. prolixus* indica estar restringido de manera exclusiva a los ambientes domiciliarios, mientras que *T. dimidiata* ha sido reportada adicionalmente en habitats silvestres y peridomésticos (27, 28, 29). Desde el punto de vista de control vectorial esta parece ser la razón de la vulnerabilidad de *R. prolixus* para la eliminación y de la persistencia (de origen residual o re-

infestación) de *T. dimidiata* en los ambientes domésticos. Por lo tanto, es necesario tener un mejor entendimiento sobre la biología de las poblaciones de triatominos especialmente en lo referente a la interacción entre las diferentes poblaciones y sus efectos sobre las estrategias de control vectorial. Estudiar la dinámica de las poblaciones de triatominos permitirá establecer la extensión mínima de las áreas que deben someterse al control con insecticidas, predecir la velocidad y origen de la reinfestación domiciliar, y la dispersión de la resistencia a los insecticidas si esta llegara a aparecer. Las técnicas basadas en la biología molecular ofrecen novedosas posibilidades para abordar el estudio de la reinfestación y sus implicaciones en las medidas de control.

Desde el enfoque de la dinámica poblacional de los triatominos, se pretende identificar las fuentes de la reinfestación domiciliar, y predecir el lugar y tiempo donde se presentará la reinfestación. Contando con marcadores altamente polimórficos, es posible derivar estas estimaciones a partir de la determinación de la estructura de las poblaciones, el flujo genético entre los grupos y el grado de dispersión de sus individuos. La amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD's), a través de la reacción de polimerización en cadena (PCR), ofrece esta posibilidad (30, 31). Con esta finalidad, desarrollamos un estudio⁹ en el cual se analizaron con PCR-RAPD's especímenes de *T. dimidiata* y *R. prolixus* colectados de viviendas seleccionadas (1995-1999), antes y después del rociamiento domiciliar en dos comunidades (Tituque

⁹ Estudio parcialmente financiado por TDR/OMS proyecto no. 960320 Celia Cordón-Rosales, Investigador Principal.

y Tutucopote, Olopa, Chiquimula) como también en dos localidades no intervenidas (Las Palmas, Olopa, Chiquimula y Sabanetas, Nueva Santa Rosa, Santa Rosa), ambos grupos en la región oriental de Guatemala.

El polimorfismo se midió a través de la amplificación de ADN polimórfico utilizando iniciadores al azar, a través de la reacción de polimerasa en cadena (RAPD-PCR). Dos pares de iniciadores, OPERON™ A-08 y B-18, fueron seleccionados para *T. dimidiata* generando 15 bandas (*loci*) calificables, con tamaños en el rango de 340-870 pb y 260-860 pb respectivamente. Para *R. prolixus* se utilizó un par de iniciadores, OPERON™ A-08, produciendo 23 bandas con tamaños entre 300-1500 pb y 50-300 pb en geles de agarosa y poliacrilamida respectivamente. Los resultados mostraron que el flujo genético entre poblaciones asociadas con las casas es dos veces más restringido para *R. prolixus* en comparación con *T. dimidiata* (las tasas de migración efectiva $Nm(\theta)$ fueron 0.6 y 1.2 respectivamente^h), indicando que el proceso de domiciliación se encuentra más evolucionado en *R. prolixus*. También se observó que la homogeneidad genética aumentaba con la extensión geográfica ocupada por las poblaciones, entre distancias no mayores a 110 Km. y 5 Km. para *T. dimidiata* y *R. prolixus* respectivamente. Nuestra interpretación para esta observación es que las poblaciones ancestrales estaban distribuidas continuamente y se han visto fraccionadas

por cambios ambientales y/o antropogénicos.

Finalmente, se encontró que las poblaciones de *T. dimidiata* son genéticamente más homogéneas entre pre vs. post intervención ($F_{st\theta}=0.009$) en comparación con la poblaciones segmentadas por tiempo en ausencia de intervención ($F_{st\theta}=0.027$), mientras que en el caso de *R. prolixus* se observó lo contrario (pre vs. post intervención $F_{st\theta}=0.061$, sin intervención $F_{st\theta}=0.024$). Por lo tanto, dilucidamos que existe un foco de dispersión fuera de las casas en el caso de *T. dimidiata* que contribuye a la reinfestación domiciliar, mientras que para *R. prolixus* las infestaciones observadas post-rociamiento son de origen residual.

Además de la utilización de los RAPD's para el estudio del flujo genético y estructura poblacional de *T. dimidiata*, se ha empezado a desarrollar y aplicar otros marcadores más informativos. Se ha participado en el desarrollo y prueba de microsatélites, secuencias de ADN repetitivas, las cuales tienen una alta tasa de mutación y permiten estudiar las relaciones entre individuos y entre poblaciones de individuos (32). A la fecha, estos marcadores producen un nivel inaceptable de alelos nulos (50-67%) al utilizarlos en muestras provenientes de diferentes localidades de Guatemala ($n=289$) y México ($n=28$) (33). Por lo tanto, se continua en el esfuerzo de desarrollar los oligonucleótidos iniciadores más idóneos para la amplificación de los microsatélitesⁱ.

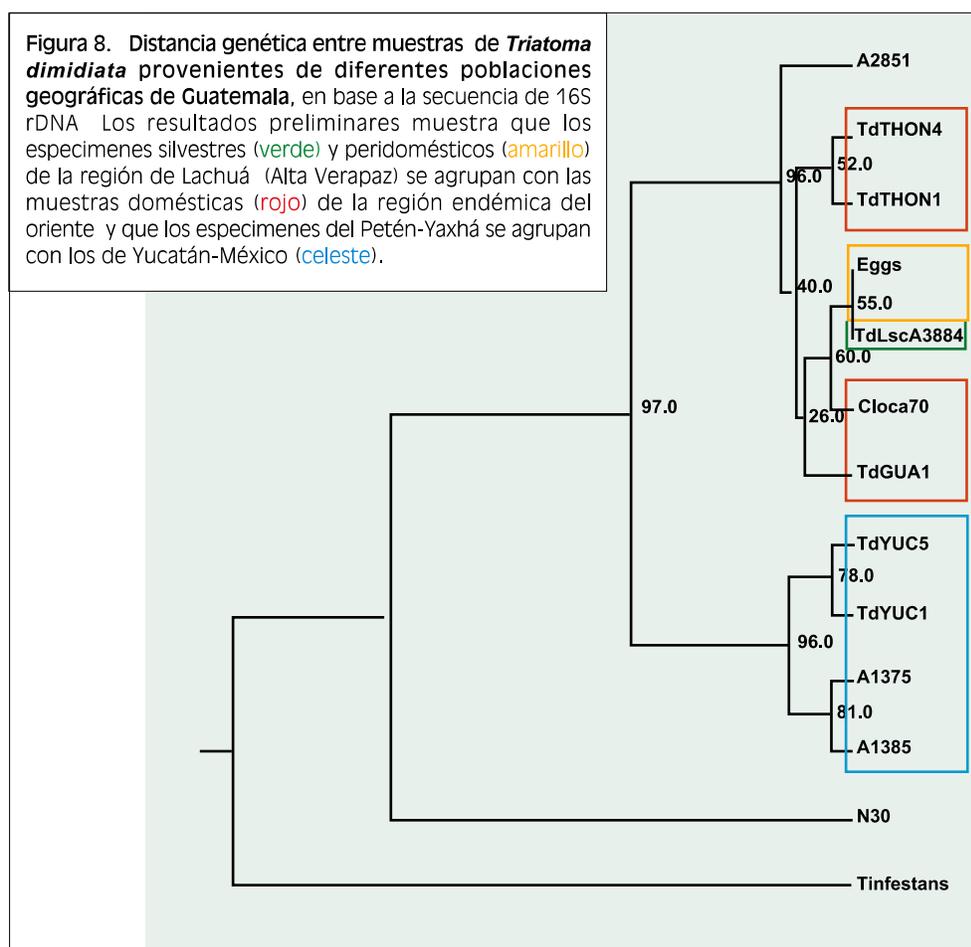
^h La heterogeneidad genética y la tasa de migración efectiva se calcularon de acuerdo a lo publicado por Apostol et al. (55) y utilizando el programa RAPDFST (56)

ⁱ Estudio parcialmente financiado por TDR/OMS, proyecto no. 10118, Pamela Pennington, Investigador Principal.

También se han realizado estudios para determinar la estructura genética de las poblaciones *T. dimidiata* provenientes de diferentes regiones geográficas y sus relaciones filogenéticas, con la finalidad de comprender mejor su ecología y rol como transmisores de *T. cruzi*. En colaboración con la Dra Carlota Monroy (Laboratorio de Entomología Aplicada, Universidad de San Carlos de Guatemala), se ha empezado a determinar las relaciones filogenéticas entre la poblaciones silvestres, colectadas por su equipo en los bosques tropicales del norte de Guatemala, y las poblaciones domésticas y peridomésticas de la región endémica para la Enfermedad de Chagas. Los especímenes silvestres provienen del

bosque sub-tropical de la biosfera Maya en Petén (Yaxhá) y del bosque sub-tropical húmedo de la reserva de Lachuá en el departamento de Alta Verapaz. Los especímenes peridomésticos provienen de la Aldea Rojá Punctilá, también en Alta Verapaz, en una zona aledaña a la Reserva de la Lachuá.

Utilizando como marcador el gen del ADN ribosomal 16S mitocondrial (mtADN), los datos preliminares revelan que la poblaciones peridomésticas de la región de Lachuá representan la transición entre los ambientes silvestres y domésticos de las poblaciones epidemiológicamente relevantes. El análisis de estas secuencias (Figura 8), permite agrupar las muestras silvestres y peridomésticas



de la región de Lachuá con las de ambientes domésticos de la región endémica del oriente del país. Las muestras de Petén se separan, agrupándose con especímenes provenientes de Yucatán, México. Estos datos concuerdan con los descritos empleando otro marcador (i.e. RAPD's (34)) que señalan que existe un flujo genético restringido entre las poblaciones de Yaxhá y Lachuá y las poblaciones domésticas del sur de la región endémica. Actualmente, se continua con el análisis de muestras para delucidar mejor las relaciones filogenéticas entre las poblaciones de *T. dimidiata* dentro de Guatemala y a lo largo de su distribución en el continente americano.

Variabilidad de *T. cruzi* en Guatemala

El *T. cruzi* se reproduce asexualmente por fisión binaria (Figura 9). En base a estudios de genética poblacional con marcadores fenotípicos y genéticos, se le ha descrito como un parásito clonal, es decir, existen diferentes variantes (i.e.

clones) con características biológicas y genéticas que las diferencian de otras (35, 36, 37, 38). Se ha dividido a la especie de *T. cruzi* en dos grandes grupos filogenéticos denominados *T. cruzi* I (TCI) y *T. cruzi* II (TCII) (39, 40, 41, 42, 43). El TCI se ha encontrado asociado a ambientes silvestres y domésticos en América del Norte, Centro América y al norte de América del Sur. El TCII se ha encontrado principalmente asociado a ambientes domésticos en América del Sur.

En México y Guatemala se ha encontrado principalmente el TCI en hemocultivos de humanos y en los vectores domésticos y peridomésticos (44). El TCII fue identificado en marsupiales en Veracruz, México. La tipificación de las muestras de humanos se ha hecho a partir de hemocultivos, usando marcadores moleculares (RAPDs y miniexón) (45, 46). Los contenidos intestinales de los vectores han sido analizados mediante un multiplex que detecta a TCI y a TCII en la misma reacción (47). Estos resultados han sugerido que el TCI es el principal linaje

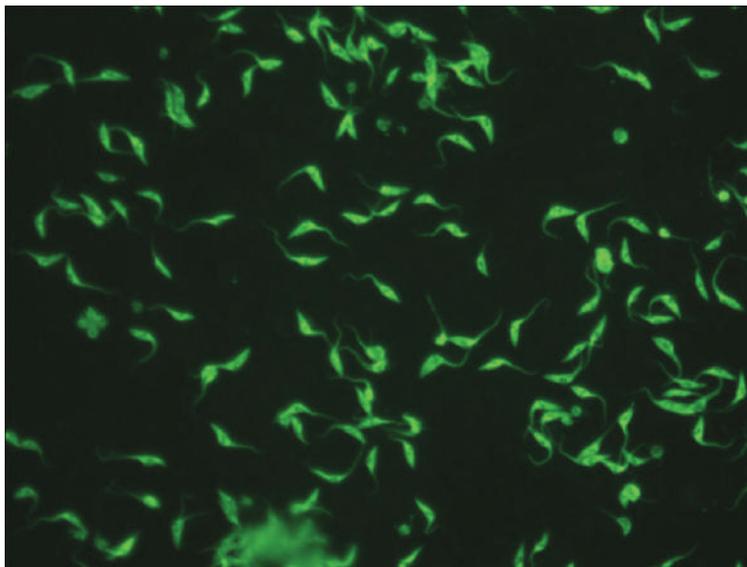


Figura 9. Fotografía microscópica de *Trypanosoma cruzi*. Inmunofluorescencia indirecta de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* detectada con un microscopio fluorescente. 400X.

20 μ m

asociado a la transmisión doméstica en nuestra región.

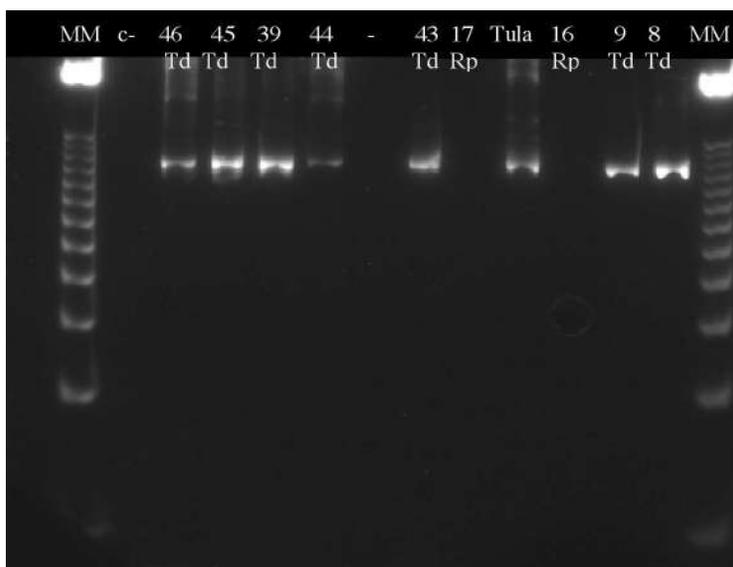
Existen al menos dos hipótesis que tratan de explicar el origen y evolución de los linajes de *T. cruzi* en asociación con la presencia de los marsupiales y placentales. Una hipótesis sugiere que el TCII se originó en Norte América y el TCI en Sur América de manera alopátrica cuando los continentes se encontraban físicamente separados. La otra hipótesis sugiere que ambos se desarrollaron simpátricamente en Sur América, asociados a diferentes reservorios cuando las placas continentales se habían unido (39). Nosotros hemos propuesto que, no importando si el origen del TCII está en Norte América con los placentales (39) o en Sur América con los edentados (48, 49), el gran intercambio de la fauna a través del istmo habría permitido el ingreso del TCII a Centro América. En apoyo a esta hipótesis, en Norte América se ha encontrado que ambos linajes circulan en el ciclo silvestre, el TCII asociado con mamíferos placentales como el mapache y el TCI con marsupiales (50).

Para probar esta hipótesis, se ha analizado los linajes de *T. cruzi* en los contenidos intestinales de *T. dimidiata* colectadas dentro de las casas. Para ello, se desarrolló una técnica que permite identificar ambos linajes incluso en la presencia de mezclas en las que predomine un linaje sobre el otro (Figura 10). Usando esta técnica, hemos encontrado que el 81% (38/47) de estos vectores están infectados simultáneamente con ambos linajes, TCI y TCII, en los ambientes domésticos.

La presencia de TCII en Guatemala es un hallazgo que pareciera contradecir los resultados de otros estudios en la región. Sin embargo, los resultados publicados por otros grupos pueden ser debidos a las limitaciones técnicas para la detección de ambos linajes en mezclas. En base a nuestros resultados, proponemos que ambos linajes circulan en ambientes domésticos en Centro América, pero el TCI crece mejor en el medio de cultivo utilizado y se encuentra en mayor concentración en el contenido intestinal de los triatominos, haciendo más fácil su aislamiento y detección.

Figura 10. Tipificación de linajes de *T. cruzi* de Guatemala.

Productos de PCR específicos para el TCII, utilizando el marcador del minixón, en muestras de cultivos de parásitos aislados de *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* colectados en ambientes domiciliarios en el área endémica de Guatemala. MM, marcador molecular de 25 pb; c-, control negativo; Td, *T. dimidiata*; Rp, *R. prolixus*; Tula (control positivo de TCII, proveniente de Chile).



Alternativamente, el TCI podría estar infectando humanos mientras que el TCII podría infectar a otro reservorio doméstico aún no identificado, manteniendo así la circulación de ambos linajes en el vector doméstico.

La asociación del TCII con ambientes domésticos en América del Sur y con la presencia de los síndromes de megaesófago y megacólon además de la miocarditis de prevalencia más alta, ha creado la noción de que esta cepa es más patogénica que la TCI (49). Consecuentemente, se ha sugerido y comúnmente asumido, que la enfermedad de Chagas en México y Centro América es menos patogénica que en América del Sur y por ello se le ha dado menor importancia a la vigilancia y patología de la enfermedad en nuestra región. Nuestros resultados deberían contribuir a re-evaluar las asociaciones de patogenicidad de los linajes y las manifestaciones de la Enfermedad en Centro América. Asimismo, estos resultados nos recuerdan de los peligros de aceptar la hipótesis nula (i.e. no se encuentra el TCII en Centro América) en la investigación científica.

Influencia del ciclo silvestre en la transmisión doméstica de *Trypanosoma cruzi*

La transmisión de *T. cruzi* a los humanos se ha atribuido tradicionalmente a dos ciclos interconectados definidos como el silvestre y el doméstico (Figura 1). En el ciclo doméstico, los humanos se infectan inicialmente como resultado de la domiciliación de los insectos vectores que acarrear el parásito de los ambientes silvestres a las viviendas humanas. La transmisión es amplificada

en los ambientes domésticos una vez que *T. cruzi* ha sido introducido a la población humana, y el vector permanece en el ambiente doméstico en estrecho contacto con sus hospederos (fuentes de sangre). Otras fuentes adicionales de infección adquieren relevancia cuando los vectores y/o reservorios silvestres invaden temporalmente en los ecotopos peridomésticos y domésticos en búsqueda de fuentes alternativas de alimento o refugio. Por otro lado, el riesgo de transmisión en el ciclo doméstico puede aumentar cuando los animales domésticos se convierten en reservorios de *T. cruzi* y las poblaciones peridomésticas de vectores ya domiciliados aumentan alrededor del habitat humano en asociación con animales domésticos como las gallinas y los perros (51, 52, 53). Bajo estas circunstancias se podría considerar la existencia de un ciclo peridoméstico interconectado con el doméstico.

Existen señales que permiten sospechar sobre la relevancia de los ciclos silvestres y peridomésticos en la transmisión de *T. cruzi* en la región de Centro América. En relación con el reservorio silvestre, los tatuacines (marsupiales facultativamente silvestres y sinantrópicos) se han encontrado infectados con *T. cruzi* en los habitats peridomésticos (24) señalando la existencia de ciclos silvestres y peridomésticos activos que pueden extenderse para incluir otros hospederos mamíferos. En el caso de *T. dimidiata*, la especie ha sido encontrada en el peridomicilio en asociación con las madrigueras de animales silvestres como los tatuacines, en áreas circundantes a aldeas o poblados (29). Además, como lo indican nuestros estudios (54) los focos silvestres

y peridomésticos constituyen una fuente de reinfestación después de la aplicación de insecticidas. Se han realizado estudios^j para caracterizar la contribución de los ciclos silvestres y peridomésticos de *T. dimidiata* a la transmisión humana de *T. cruzi* en Guatemala.

Durante el período de Junio del 2004 a mayo del 2005 se realizaron encuestas entomológicas y de mamíferos en los ambientes silvestres en las Aldea Santa Rosalía Mármol en Zacapa, Aldea Rojá Punctila en Alta Verapaz, y Aldeas Tituque y Tuticopote en Chiquimula, en sendas estaciones seca y lluviosa. Adicionalmente, se llevaron a cabo encuestas entomológicas en los peridomicilios e intradomicilios de los tres sitios de estudio. Un total de 58 tacuacines y 68 roedores fueron capturados con trampas *Tomahawk* y *Sherman*, respectivamente. En general, las densidades relativas de los roedores fueron 9 veces más bajas que las densidades relativas de los tacuacines con la excepción de Santa Rosalía Mármol donde mostró las densidades más altas, 8.6 -18.6 roedores/ trampa-año. Las densidades de los tacuacines fueron por los menos 3 veces más altas en Tituque & Tuticopote, 24.3 - 45.1 tacuacines/trampa-año, en comparación con las otras dos localidades.

A un total de 51 roedores y 55 tacuacines se les tomó muestra de sangre y estas fueron analizadas para detectar la presencia de *T. cruzi*. La tasa de infección en los roedores varió en un rango de 0-6.2% y no se encontraron diferencias significativas entre las localidades de estudio. En contraste, la tasa de infección con *T. cruzi* en

tacuacines presentó un rango de 0-90.9%; Rojá Punctilá fue la única localidad que presentó resultados significativamente diferentes con las tasas más altas de infección. También únicamente en Rojá Punctilá se encontró *T. dimidiata* en ecotopos peridomésticos, tanto ninfas como adultos, indicando una probable invasión del ambiente silvestre a la zona de transición en el peridomicilio ya que en el área aldeña de Lachuá se han encontrado *T. dimidiata* silvestres.^k

La principal conclusión de este estudio es la existencia de un foco silvestre para la transmisión de *T. cruzi* en Guatemala en donde los tacuacines juegan un papel importante como reservorios. La región de Lachuá es un sitio silvestre que pudiera tener importancia epidemiológica en el ciclo de transmisión doméstico de *T. cruzi*. Adicionalmente, la región de Lachuá puede representar un foco silvestre importante de poblaciones de *T. dimidiata* ya que solamente en esta área se enocontraron insectos peridomésticos. Combinando estos hallazgos con la información filogenética descrita previamente que indica la similitud entre las poblaciones silvestres y las domésticas, las poblaciones peridomésticas de *T. dimidiata* en la región de Lachuá parecen representar la transición entre los ambientes silvestres y domésticos. Adicionalmente, se puede argumentar que las poblaciones extradomiciliares de *T. dimidiata* estarían relacionadas con la re-infestación de los domicilios en el área endémica del oriente de Guatemala y especialmente en la región de Alta Verapaz.

^j Estudio parcialmente financiado por TDR/OMS proyecto no. A30454 Celia Cordón-Rosales, Investigador Principal.

^k Comunicación personal de Claudia Calderón

Una evidencia adicional de la importancia de *T. dimidiata* como un puente entre el ciclo silvestre y el doméstico ha surgido a partir de estudios genéticos de las cepas de *T. cruzi* que se encuentran en *T. dimidiata*, *R. prolixus* y los tacuacines. Utilizando microsatélites desarrollados por nuestro grupo para *T. cruzi*, hemos estudiado la variabilidad genética de *T. cruzi* aislado de estas tres fuentes. La diferenciación génica fue calculada y se encontró que existe una diferencia génica significativa

entre cepas de *T. cruzi* provenientes de *R. prolixus* (n=11) y de *T. dimidiata* (n=22) (Método de Fisher, $\chi^2=24$, 4 df, $p<0.0001$). Además, las cepas aisladas de tacuacines no eran genéticamente distinguibles de las cepas de *T. dimidiata* pero eran diferentes a las cepas de *R. prolixus*. Esto sugiere que el parásito transmitido por estas dos especies es diferente y que las cepas del parásito que circulan en el reservorio silvestre están siendo transmitidas por *T. dimidiata* y no por *R. prolixus*.

Principales contribuciones y futuras investigaciones

Las principales contribuciones de nuestros estudios a la eco-epidemiología de los insectos transmisores de la Enfermedad de Chagas en Guatemala se pueden resumir de la siguiente manera:

- Se definió el rol de *T. dimidiata* y *R. prolixus* en la transmisión doméstica de *T. cruzi*, a pesar que la noción prevaleciente reconocía a *R. prolixus* como el vector más importante.
- En Guatemala, se encontró que *R. prolixus* es una especie con distribución focalizada y completamente domiciliar, por lo que es susceptible a la eliminación a través de intervenciones basadas en el uso de insecticidas. Las poblaciones detectadas después de las intervenciones con insecticidas son de naturaleza residual y el flujo entre las poblaciones domiciliarias es restringido. *R. prolixus* presenta infecciones con *T. cruzi* y *T. rangeli*, y las cepas de *T. cruzi* que presenta son diferentes a las de *T. dimidiata* y reservorios silvestres.
- Por otro lado, *T. dimidiata* es una especie que presenta poblaciones extradomiciliares (peridomésticas y silvestres). Las poblaciones domésticas pueden disminuirse a través de las intervenciones con insecticidas pero la reinfestación ocurre a partir de las poblaciones extradomiciliares. Las poblaciones extradomiciliares de *T.*

dimidiata funcionan como un puente que conecta el ciclo silvestre y el doméstico del parásito. Esta especie se encuentra infectada solamente con *T. cruzi* y las cepas de *T. cruzi* que presenta son significativamente diferentes de las acarreadas por *R. prolixus*, pero similares a las de los reservorios silvestres. Existe un ciclo silvestre de *T. cruzi* en Alta Verapaz que puede representar una importante fuente de reinfestación en ambientes domésticos.

- Tanto el avance de los programas de control como la información generada a través de la investigación sobre transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas, apuntan hacia la factibilidad de eliminación de *R. prolixus* y a una interrupción significativa de la transmisión a través de *T. dimidiata*. Sin embargo, se reconocen grandes retos en el control vectorial de esta última especie debido a su presencia silvestre. Los estudios de la interacción de los ciclos silvestres y domésticos permitirán desarrollar mejores estrategias de control complementarias a los métodos tradicionales actuales, los cuales están orientados al control del vector domiciliado. Al mismo tiempo desde el punto de vista operativo será necesario contar con métodos más sensibles para la detección de las poblaciones de *T. dimidiata* como también el mejoramiento de la vigilancia epidemiológica y la estratificación del área de riesgo en base a la tasas de reinfestación de *T. dimidiata*

Bibliografía

- 1) World Health Organization *Control of Chagas Disease* Technical Report Series 811, WHO Expert Committee, Geneva, pp. 95, 1991
- 2) World Health Organization *Control of Chagas Disease* Technical Report Series 905, WHO Expert Committee, Geneva, pp. 116, 2002
- 3) United Nations Development Programme *Human Development Report*, UNDP New York, Oxford University Press, pp.172-173, 1996
- 4) *Risk of Chagas disease through transfusions in the Americas* Medicina (B Aires) 59 (Suppl 2):125-34, 1999
- 5) *Transfusion-acquired Trypanosoma cruzi infection* Transfusion 47 (3): 540-4, 2007 6) , 2006
- 7) *Acute Chagas' disease in a recipient of a bone marrow transplant in Spain: case report* Clin. Infect. Dis. 14 (2): 594-5, 1992
- 8) World Health Organization Press release WHO/20 Geneva *Problems relating to Chagas' control (ie. insecticide efficacy and re-infestation)* 8 March 1994
- 9) Reichenow, E. Folleto publicado por la Dirección General de Sanidad, Ministerio de Salud de Guatemala. 24 pp. 1932
- 10) De León, J.R. *Nota preliminar acerca de la enfermedad de Chagas en Guatemala*. Revista de la Cruz Roja guatemalteca, 1942
- 11) Peñalver, L.M. *El problema de la Enfermedad de Chagas en el medio rural de Guatemala* Memorias del I Congreso Interamericano de Higiene. La Habana, Cuba, 1952
- 12) Aguilar, F.J. *Historia de la Enfermedad de Chagas en Guatemala* Enfermedades Tropicales en Guatemala, Agencia de Cooperación Internacional del Japón Informe Anual 2: 1-23, 1993
- 13) Kingman, S. *South America declares war on Chagas' disease* New Sci. (19 October): 16-17, 1991
- 14) Schofield, C.J. & Dujardin J.P. *Chagas disease vector control in Central America* Parasitology Today 13 (4): 141-144, 1997
- 15) Guhl, F. *Programas para la eliminación de la transmisión de la Enfermedad de Chagas en los países andinos* en: Memorias de la Reunión sobre vectores de la enfermedad de Chagas en los países de Centro América, Tegucigalpa, Honduras, Octubre de 1997
- 16) TDR/World Health Organization *Chagas' Disease: Central American initiative launched* TDR news 55: 6, 1998
- 17) Resolution World Health Assembly WHA 51.14, 16 mayo 1998
- 18) World Health Organization Press release WHO/36, Geneva *New global effort to eliminate Chagas Disease* 3 July 2007
- 19) Cordon-Rosales, C. & Klein, R.E. *Domiciliary spraying with insecticides for the control of Chagas disease transmission: re-infestation risk with Triatoma dimidiata and Rhodnius prolixus* Proc. Annual Meeting American Soc. Tropical Medicine and Hygiene 1998

- 20) Nakagawa, J., Córdón-Rosales, C. et al. *Impact of residual spraying on Rhodnius prolixus and Triatoma dimidiata in the department of Zacapa in Guatemala* Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98 (2): 277-281, 2003
- 21) Hashimoto, K., Córdón-Rosales, C. et al. *Impact of single and multiple residual sprayings of pyrethroid insecticides against Triatoma dimidiata (Reduviidae; Triatominae), the principal vector of Chagas disease in Guatemala* Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (2): 226-230, 2006
- 22) Rizzo, N.R., Arana, B.A., Díaz, A., Córdón-Rosales, C., Klein, R.E. & Powell, M. *Chagas disease seroprevalence among school age children in the endemic area of Guatemala* Am. J. Trop. Med. Hyg. 68 (6): 678-82, 2003
- 23) Montenegro, M.L. *Consideraciones sobre la tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas en Guatemala* Trabajo de tesis, Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Guatemala, Tipografía Nacional, Guatemala. pp 73, 1943
- 24) Monteiro, F.A., Barrett, T.V., Fitzpatrick, S., Córdón-Rosales, C. & Feliciangeli, D. *Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors Rhodnius prolixus and R. robustus* Mol Ecol 12 (4): 997-1006, 2003
- 25) Schmunis, G.A., Zicker, F. & Moncayo, A. *Interruption of Chagas' disease transmission through vector elimination* The Lancet 348 (9035):1171, 1996
- 26) Basombrío, M.A., Schofield, C.J., Rojas, C.L. & del Rey, E.C. *A cost-benefit analysis of Chagas' Disease control in north-western Argentina* Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 92: 137-143, 1998
- 27) Zeledón, R., Solano, G., Zúñiga, A. & Swartzwelder, J.C. *Biology and ethology of Triatoma dimidiata (Latreille, 1811). III. Habitat and blood sources* J. Med. Entomol. 10: 363-370, 1973
- 28) Zeledón, R., Solano, G., Sáenz, G. & Swartzwelder, J.C. *Wild reservoirs of T. cruzi with special mention of the opossum, Didelphis marsupialis, and its role in the epidemiology of Chagas' disease in an endemic area of Costa Rica* J. Parasitol. 56: 38, 1970
- 29) Organización Panamericana de la Salud *Segunda reunión de la Comisión Intergubernamental de la iniciativa de Centroamérica y Belice para la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas por Rhodnius prolixus, disminución de la infestación domiciliar por Triatoma dimidiata y eliminación de la transmisión transfusional del Trypanosoma cruzi* Document OPS/HCP/HCT/164/00, 2000
- 30) Black IV, W.C., DuTeau, N.M., Puterka, G.J., Nechols, J.R. & Pettorni, J.M. *Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae)* Bull. Entomol. Res. 82: 151-159, 1992
- 31) García, A.L., Carrasco, H.J., Schofield, C.J., Stothard, J.R, Frame, I.A., Valente, S.A. & Milles, M.A. *Random amplification of polymorphic DNA as a tool for taxonomic studies of triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae)* J. Med. Entomol. 35:38-45, 1998
- 32) Anderson, J.M., Lai, J.E., Dotson, E.M., Córdón-Rosales, C. Ponce, C., Norris, D.E. & Beard, C.B. *Identification and characterization of microsatellite markers in the Chagas Disease vectors of Triatoma dimidiata* Infection, genetics and evolution 30: 1-6, 2002

- 33) Krische Palacios, M.A. *Desarrollo de una técnica costo efectiva para la identificación y caracterización automatizada de microsatélites aplicada en Triatoma dimidiata* Tesis, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala, 2004
- 34) Calderon, C.I., Dorn, P.L. et al. *A preliminary assessment of genetic differentiation of Triatoma dimidiata (Hemiptera: Reduviidae) in Guatemala by random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction* J Med Entomol 41 (5): 882-7, 2004
- 35) de Luca D'oro, G., Gardenal, M.C.N., et al. *Genetic structure of Trypanosoma cruzi populations from estimated from enzyme polymorphism* Parasitology 107 (Pt 4): 405-10, 1993
- 36) Higo, H., Yanagi, T. et al. *Genetic structure of Trypanosoma cruzi in Central America and its comparison with South American strains* Int J Parasitol 27 (11): 1369-74, 1997
- 37) Breniere, S.F., Bosseno, M.F. et al. *Different behavior of two Trypanosoma cruzi major clones: transmission and circulation in young Bolivian patients* Experimental Parasitology 89: 285-295, 1998
- 38) Tibayrenc, M. & Ayala, F.J. *Evolutionary genetics of Trypanosoma and Leishmania* Microbes Infect. 1 (6): 465-72, 1999
- 39) Fernandes, O., Souto, R.P. et al. *Brazilian isolates of Trypanosoma cruzi from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences* American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 58 (6): 807-811, 1998
- 40) Zingales, B., Stolf, B.S. et al. *Epidemiology, biochemistry and evolution of Trypanosoma cruzi lineages based on ribosomal RNA sequences* Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94 Suppl 1: 159-64, 1999
- 41) Barnabé, C., S. Brisse, et al. (2000). "Population structure and genetic typing of Trypanosoma cruzi, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach." Parasitology 120: 513-526.
- 42) Barnabe, C., Neubauer, K. et al. *Trypanosoma cruzi: presence of the two major phylogenetic several lesser discrete typing units (DTUs) in Chile and Paraguay* Acta Trop 78 (2): 127-37, 2001
- 43) Kawashita, S. Y., Sanson, G. F. et al. *Maximum-likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of Trypanosoma cruzi intraspecific evolution* Mol Biol Evol 18 (12): 2250-9, 2001
- 44) Higo, H., Miura, S. et al. *Genotypic variation among lineages of Trypanosoma cruzi and its geographic aspects* Parasitol. Int. 53 (4): 337-44, 2004
- 45) Bosseno, M. F., Barnabe, C. et al. *Predominance of Trypanosoma cruzi lineage I in Mexico* J. Clin. Microbiol. 40 (2): 627-32, 2002
- 46) Ruiz-Sanchez, R., Leon, M.P. et al. *Trypanosoma cruzi isolates from Mexican and Guatemalan acute and chronic chagasic cardiopathy patients belong to Trypanosoma cruzi I* Mem. Inst. Oswaldo Cruz 100 (3): 281-3, 2005
- 47) Bosseno, M.F., Garcia, L.S. et al. *Identification in triatomine vectors of feeding sources and Trypanosoma cruzi variants by heteroduplex assay and a multiplex miniexon polymerase chain reaction* Am. J. Trop. Med. Hyg. 74 (2): 303-5, 2006
- 48) Gaunt, M. & Miles, M. *The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) associated trypanosomes* Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95 (4): 557-65, 2000

- 49) Yeo, M., Acosta, N. et al. *Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of Trypanosoma cruzi I and armadillos hosts of Trypanosoma cruzi II, including hybrids* Int. J. Parasitol. **35** (2): 225-33, 2005
- 50) Clark, C.G., Pung, O.J. *Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic Trypanosoma cruzi from North America* Mol. Biochem. Parasitol. **66** (1):175-9, 1994
- 51) Zeledón, R, Montenegro, V.M. & Zeledón, O. *Evidence of colonization of man-made ecotopes by Triatoma dimidiata (Laterille, 1811) in Costa Rica* Mem. Inst. Oswaldo Cruz **96** (5): 659-660, 2001
- 52) Gurtler, R.E., Cecere, M.C., Rubel, D.N. & Schweigmann, N.J. *Determinants of the domiciliary density of Triatoma infestans, vector of Chagas disease* Med. Vet. Entomol **6** (1):75-83, 1992
- 53) Cecere, M.C., Gurtler, R.E., Chuit, R. & Cohen, J.E. *Factors limiting the domestic density of Triatoma infestans in north-west Argentina: a longitudinal study* Bull. World Health Organ. **76** (4):373-384, 1998
- 54) Cordón-Rosales, C. *Investigación operativa sobre los triatomíneos vectores de la enfermedad de Chagas en Guatemala* en: OPS-Organización Panamericana de la Salud Taller para el establecimiento de pautas técnicas en el control de Triatoma dimidiata. Document OPS/HCP/HCT/214/02. Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. 36p., 2002
- 55) Apostol, B.L., Black IV, W.C., Reiter, P. Miller, B.R. *Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of Aedes aegypti in Puerto Rico* Heredity **76** :325-334, 1996
- 56) Black, B. 1997. RAPDFST 401 - A FORTRAN Program to estimate F(ST) and effective migration rates among subpopulations using RAPD-PCR files. Colorado State University



Celia Cordón-Rosales
ccordon@gt.cdc.gov

Co-Director e Investigador del Centro de Estudios en Salud del Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala



Pamela Marie Pennington
ppennington@gt.cdc.gov

Director e Investigador del Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Estudios en Salud del Instituto de Investigaciones y Director del Departamento de Bioquímica y Microbiología de la Facultad de Ciencias y Humanidades de la Universidad del Valle de Guatemala.