

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Respuesta humoral secundaria de gallinas  
inmunizadas con saliva de *Triatoma dimidiata*  
(provenientes del sur de Chiapas, México) y su  
reacción cruzada con otros triatóminos

Trabajo de graduación presentado por  
Paulo Roberto Juárez Peláez  
para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y  
Microbiología

Guatemala  
2012



Respuesta humoral secundaria de gallinas  
inmunizadas con saliva de *Triatoma dimidiata*  
(provenientes del sur de Chiapas, México) y su  
reacción cruzada con otros triatóminos

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades

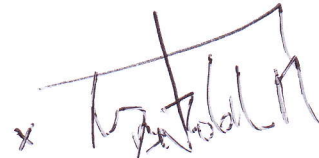


Respuesta humoral secundaria de gallinas  
inmunizadas con saliva de *Triatoma dimidiata*  
(provenientes del sur de Chiapas, México) y su  
reacción cruzada con otros triatóminos


Trabajo de graduación presentado por  
Paulo Roberto Juárez Peláez  
para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología


Guatemala  
2012

Vo.Bo. :

(f)   
Licda. Nancy Cruz  
Asesora de Tesis

Tribunal examinador:

(f)   
Dra. Pamela Marie Aycineha de Sánchez  
Directora Departamento de Bioquímica y Microbiología

(f)   
Licda. Nancy Cruz  
Asesora de Tesis

(f)   
Dra. Dalia Lau-Bonilla

Fecha de Aprobación: Guatemala, 1 de junio 2012. ✓

## PREFACIO

- Este Trabajo de Graduación se desarrolló con el apoyo de laboratorios del departamento de Bioquímica y Microbiología, Entomología y Ecología de Vectores y de Oncocercosis y Leishmaniasis del Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala, complementado con fondos de “The Third World Academy of Science” – TWAS.
  
- Agradezco a:
  - Mis padres, hermanos y familiares, por el apoyo incondicional y la sabia lección de que los éxitos se alcanzan luego de una gran batalla.
  - El departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala, por el apoyo para desarrollar el proyecto mediante la provisión de material, equipo y reactivos.
  - Dra. Pamela Pennington y Licda. Nancy Cruz por sus sabios consejos, paciencia y orientación para el desarrollo de este trabajo de investigación.
  - Dra. Teresa López Ordoñez del Instituto Nacional de Salud Pública de Tapachula, Chiapas, México por la donación de *Triatoma dimidiata* utilizados para la inmunización y obtención de antígeno.
  - El Dr. Jesús Valenzuela del National Institutes of Health de Estados Unidos de América y la Dra. Alexandra Schwartz de la Academia de Ciencias de la República Checa por las sugerencias y comentarios en todo el proceso de la investigación.
  - Licda. Margarita Palmieri, Licda. Elena Dardón y Lic. Andrés Ávalos por las palabras de aliento y motivación que brindaron oportunamente.
  - Los amigos y colegas que siempre estuvieron en los éxitos y obstáculos académicos y personales.

# CONTENIDO

PREFACIO.....	iv
LISTA DE CUADROS .....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
I. INTRODUCCIÓN .....	1
A. Contexto .....	1
B. Justificación.....	3
C. Objetivos .....	4
1. Objetivo general .....	4
2. Objetivos específicos .....	4
II. MARCO TEÓRICO .....	5
A. Enfermedad de Chagas.....	5
1. Transmisión.....	5
2. Formas clínicas .....	6
B. Parasitología .....	7
1. Taxonomía .....	7
2. Ciclo de vida.....	7
C. Vectores .....	8
1. Taxonomía .....	8
2. Distribución geográfica.....	9
D. <i>Triatoma dimidiata</i> .....	10
1. Ciclo de vida.....	10
2. Relación con el domicilio.....	11
3. Alimentos y preferencias alimentarias.....	11
4. Componentes salivales .....	12
E. Reservorios naturales.....	13
1. Reservorios domésticos .....	13
2. Reservorios selváticos .....	14
3. Importancia de aves en la prevalencia.....	14

F. Epidemiología .....	14
1. Prevalencia .....	14
2. Incidencia .....	15
3. Situación en Guatemala .....	15
G. Estrategias de control y prevención .....	15
1. Control químico .....	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
A. Descripción de la investigación .....	18
1. Enfoque y alcance de la investigación .....	18
2. Diseño y tipo de investigación .....	18
B. Sujetos de estudio .....	18
C. Hipótesis .....	19
1. Hipótesis conceptual .....	19
2. Hipótesis nula.....	19
3. Hipótesis de trabajo.....	19
D. Métodos .....	19
1. Protocolo de Manejo y Uso de Animales.....	19
2. Mantenimiento y origen de los triatóminos .....	19
3. Extracción de glándula salival .....	20
4. Inmunización de gallinas con <i>Triatoma dimidiata</i> proveniente de Manacal, México y obtención de suero .....	20
5. Separación de proteínas salivales.....	22
6. Western Blot.....	23
IV. RESULTADOS.....	25
A. Perfil proteico salival.....	25
B. Antígenos salivales de <i>Triatoma dimidiata</i> proveniente de Manacal, México .....	26
C. Reactividad cruzada del suero de gallinas inmunizadas con <i>Triatoma</i> <i>dimidiata</i> proveniente de Comapa, Guatemala.....	28
D. Reactividad cruzada del suero de gallinas inmunizadas con picadura de <i>Triatoma dimidiata</i> proveniente de Manacal, México y antígenos	

salivales de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	29
V. DISCUSIÓN.....	31
VI. CONCLUSIONES .....	35
VII. RECOMENDACIONES .....	36
VIII. REFERENCIAS .....	37

## LISTA DE CUADROS

CUADRO	PAGINA
1. Preferencias alimenticias de <i>T. dimidiata</i> por región geográfica.....	12
2. Cronograma de exposiciones a <i>Triatoma dimidiata</i> proveniente de Manacal, México.....	22

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA.....	PAGINA
1. Insecto triatómino transmisor de <i>Trypanosoma cruzi</i> . ( <i>Triatoma dimidiata</i> .....	5
2. Síntoma característico del Signo de Romaña .....	6
3. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	8
4. Distribución geográfica de los vectores importantes de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica .....	9
5. Estadios de <i>Triatoma dimidiata</i> .....	11
6. Inmunización de gallinas con <i>Triatoma dimidiata</i> proveniente de Manacal, México .....	20
7. Toma de muestras de sangre .....	21
8. Perfil proteico de los organismos utilizados .....	26
9. Inmuno blot de antígenos salivales de <i>Triatoma dimidiata</i> proveniente de Manacal, México y sueros de gallinas expuestas y no expuestas a Picadura de <i>Triatoma dimidiata</i> .....	27
10. Inmuno blot de antígenos salivales de <i>Triatoma dimidiata</i> proveniente de Comapa, Jutiapa, Guatemala y sueros de gallinas expuestas y no expuestas a picadura de <i>Triatoma dimidiata</i> proveniente de Manacal, México.....	28
11. Inmuno blot de antígenos salivales de <i>Rhodnius prolixus</i> y sueros de Gallinas expuestas y no expuestas a picadura de <i>Triatoma dimidiata</i> Proveniente de Manacal, México .....	30

# RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una zoonosis que afecta a varios países latinoamericanos, entre ellos Guatemala, en donde el vector más importante es *Triatoma dimidiata*. Este insecto presenta diferentes tasas de reinfestación luego de que en las áreas endémicas se han realizado campañas de rociamiento de insecticida residual. Este vector tiene varios subtipos genéticos distribuidos desde México hasta Ecuador con distintas capacidades de colonización de viviendas.

El objetivo general de esta investigación fue identificar proteínas salivales de *Triatoma dimidiata* (Manacal, México) que inducen una respuesta inmune humoral en gallinas que fueron expuestas a una tasa baja de éstos triatóminos. Este estudio permitió demostrar la capacidad de utilizar los anticuerpos desarrollados por algunos animales hacia los componentes salivales de insectos vectores como una herramienta de evaluación epidemiológica.

Al no contar con una colonia de *T. dimidiata* de origen nacional, se decidió trabajar con una colonia establecida de origen mexicano y que presenta el mismo subtipo genético detectado en el país. Para ello, la producción de anticuerpos contra las proteínas salivales de *T. dimidiata* fue estudiada en dos gallinas expuestas a la picadura de cinco adultos cada 15 días durante 16 semanas, 7 días después de cada exposición se tomó una muestra de sangre para la obtención de suero. Adicionalmente, se tomó una muestra de sangre basal, cuatro muestras post-exposición y se realizó un SDS-PAGE para observar el perfil proteico de extractos de glándulas salivales, lo que permitió desarrollar un perfil antigénico mediante un inmunoblot tipo Western utilizando los sueros colectados.

Para evaluar las reacciones cruzadas con otros triatóminos se utilizó saliva de *T. dimidiata* proveniente de Comapa, Guatemala y saliva de *Rhodnius prolixus*. El perfil proteico de los triatóminos utilizados presentó una similitud de 87.5% entre las subespecies de *T. dimidiata* y un 56.25% entre *T. dimidiata* y *R. prolixus*. Se identificaron 2 proteínas antigénicas de *T. dimidiata* (Manacal, México) de 11 y 14 kDa aproximadamente.

Al evaluar la reacción cruzada de los sueros con la saliva de *T. dimidiata* (Comapa, Guatemala) y *R. prolixus* se encontraron las mismas masas moleculares identificadas en *T. dimidiata* (Manacal, México). Se recomienda continuar con la caracterización de estos antígenos para evaluarlos como marcadores biológicos en la detección de exposición de las gallinas al vector.

# I. INTRODUCCIÓN

## A. Contexto

La enfermedad de Chagas es una enfermedad parasitaria endémica en 18 países del continente americano, abarcando los territorios desde Estados Unidos hasta Chile (Strosberg *et al*, 2007). Esta enfermedad afecta aproximadamente entre el 2 y 3% de la población de América Latina (Strosberg *et al*, 2007). El agente etiológico de la enfermedad es el parásito *Trypanosoma cruzi*, un protozoo euglenoide que se alimenta principalmente de la sangre o de la linfa de vertebrados. Este parásito puede ser transmitido por tres vías: (i) por medio de las heces infectadas de vectores: insectos triatóminos de la familia Reduviidae, los cuales se alimentan obligatoriamente de la sangre de vertebrados y por lo que se les conoce como hematófagos obligados, (ii) a través de donaciones de sangre u órganos infectados o (iii) por intercambio de fluidos entre personas infectadas. Bien si existen diferentes vías de transmisión, la mayoría de casos emergentes de la enfermedad de Chagas son provocados por la transmisión vía vectorial, específicamente por especies de triatóminos domiciliarios o peridomiciliarios (WHO, 2000).

Actualmente, existen programas que buscan reducir la incidencia de esta enfermedad mediante el control programado de vectores y educación informativa en las regiones endémicas (Strosberg *et al*. 2007). El control programado de vectores incluye, entre otros, el rociamiento de insecticidas piretroides en los domicilios infectados. Este rociamiento puede ser de una simple aplicación o de múltiples aplicaciones dependiendo de la tasa de infestación del área. De esta manera se ha logrado eliminar casi por completo las especies domiciliarias. Sin embargo, es muy común que algunas especies silvestres re-infesten rápidamente las regiones tratadas por insecticidas (Hashimoto *et al*. 2006).

En Guatemala, antes de la implementación del programa de control vectorial y transfusional, la enfermedad de Chagas afectaba a un 7.3% de la población nacional, con una incidencia anual del 0.3% (WHO, 2000), documentándose la presencia de dos vectores: *Triatoma dimidiata*, una especie silvestre endémica en

21 de 23 departamentos del territorio guatemalteco y *Rhodnius prolixus*, una especie presuntamente introducida del área andina que se ha encontrado solamente en 9 departamentos (OPS 2003, Tabaru *et al.* 1999). La tasa de infestación de estos vectores en hábitats domiciliarios variaba entre 12 y 35% (Tabaru *et al.*, 1999).

En el 2008, después de una campaña nacional de control vectorial, el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala (MSPAS), declaró al país libre de la transmisión domiciliar por el vector *R. prolixus*, pero la transmisión por *T. dimidiata* aún continúa (Hashimoto *et al.*, 2012).

Los animales domésticos que habitan dentro de las casas como gallinas, cobayos o perros pueden mantener altos niveles de infestación de triatóminos ya que representan una fuente agrupada de alimentación para estos insectos (Zeledón *et al.* 2005). Estudios con *Triatoma infestans* han demostrado que perros y gatos son importantes reservorios para el parásito en los ambientes domésticos (Gurtler *et al.* 2007). Adicionalmente, los animales en el ambiente peridoméstico son importantes fuentes de sangre con un rol en el mantenimiento del vector *T. dimidiata* y el parásito *T. cruzi*.

La presencia de animales domésticos y de roedores habitando en el interior de las casas es asociada a la infestación de *T. dimidiata* en Jutiapa (Bustamante *et al.* 2009). En los años 2007 y 2011 se midió la presencia de perros y gallinas durante una evaluación del programa de control en Jutiapa, Guatemala y los resultados demostraron que esta área mantiene una alta tasa de re-infestación post-rociamiento y que la infestación está asociada con la presencia de perros y gallinas empollando dentro de la vivienda (Cordón & Pennington, datos no publicados).

El método utilizado actualmente por el MSPAS para estudiar la re-infestación es ingresar a las casas en busca de vectores, tanto en ambientes domésticos como peridomésticos. Este procedimiento presenta un trabajo con un impacto económico importante y no permite obtener resultados para la detección temprana de infestación. Por esta razón es necesario implementar métodos innovadores para detectar esta tasa de re-infestación lo que permitiría al Ministerio de Salud Pública

y Asistencia Social de Guatemala mejorar sus sistemas de vigilancia para lograr un control sostenible del vector.

Estudios recientes demostraron que en la saliva del triatómino existen componentes proteicos capaces de inducir una respuesta inmune humoral en distintos hospederos al momento de que el vector se alimenta, esta respuesta antígeno-anticuerpo es muy específica y puede ser utilizada como herramienta epidemiológica para medir la exposición a los vectores (Schwarz *et al.* 2009a).

Una de estas proteínas inmunogénicas perteneciente a *T. infestans* ha sido caracterizada y sintetizada como un antígeno recombinante (rTiSP14.6) para la detección de infestación de triatóminos, la cual ha sido probada con sueros de gallinas que han sido expuestas a diferentes especies de triatóminos (Schwartz *et al.*, 2009b) demostrando que puede ser utilizada para la detección de infestación de distintas especies de vectores.

Este proyecto permitió identificar componentes salivales de *T. dimidiata*, la principal especie transmisora en Guatemala, que lograron inducir una respuesta inmune humoral en gallinas; por esta razón se propone que la identificación de antígenos salivales debería ser la primera fase en el desarrollo de una nueva estrategia para medir la tasa de re-infestación del vector *T. dimidiata* mediante una prueba serológica de gallinas (*Gallus gallus domesticus*) que se encuentran comúnmente habitando en el domicilio o peridomicilio de áreas endémicas.

## **B. Justificación**

Antes de la Iniciativa Centroamericana para el Control de Chagas, en Guatemala esta enfermedad afectaba aproximadamente a un 7.3% de la población. La implementación de programas para el control de vectores ha logrado reducir la incidencia de esta enfermedad en el territorio nacional (Hashimoto *et al.*, 2012), pero estos programas no son 100% efectivos, ya que en algunas regiones el control del vector es temporal y luego de cierto tiempo se inicia la re-infestación de ambientes domésticos y peridomésticos.

El único método para la evaluación de re-infestación del vector en estos ambientes consiste en ingresar en los domicilios en búsqueda de triatóminos. Sin

embargo, este procedimiento es un trabajo laborioso y poco sensible ya que no permite la identificación temprana de re-infestación y por lo tanto retrasa las acciones necesarias para el control del vector.

Estudios que se han realizado con *Triatoma infestans*, vector principal de la enfermedad en Brasil, han demostrado que la picadura del triatómino induce una respuesta humoral específica en ciertos hospederos. *Gallus gallus* fue inmunizado con saliva de *T. infestans* y se observó que proteínas de 14 y 21 kDa presentan una reacción cruzada al utilizar la saliva de otros triatóminos como antígeno (Schwartz *et al*, 2009).

Con el objetivo de desarrollar un marcador epidemiológico de infestación, útil en el área endémica de Guatemala, es necesario determinar los antígenos salivales de *Triatoma dimidiata* que desarrollen una respuesta humoral en *Gallus gallus* y observar su reacción cruzada con otros posibles vectores.

## **C. Objetivos**

### **1. Objetivo general**

Identificar los componentes salivales de *Triatoma dimidiata* (Manacal, México) que inducen a una respuesta inmune humoral en gallinas que han sido expuestas a una tasa baja de estos triatóminos.

### **2. Objetivos específicos**

- Determinar si los anticuerpos circulantes en las gallinas inmunizadas permanecen por más de 2 meses después de la última exposición a la saliva de *Triatoma dimidiata*.
- Comparar el perfil proteico y antigénico de *Triatoma dimidiata* proveniente del sur de Chiapas, México con *Triatoma dimidiata* proveniente de Comapa, Jutiapa.
- Determinar si existe una reacción cruzada entre antígenos salivales de *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*.

## II. MARCO TEÓRICO

### A. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas fue descrita por primera vez por Carlos Chagas en 1909, su descubrimiento fue muy particular ya que describió la presencia del parásito en el vector antes de tener conocimiento alguno acerca de los reservorios animales de la enfermedad o los síntomas clínicos de esta patología en humanos. (Kirchof L, 2009).

Esta enfermedad es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* el cual es transmitido vectorialmente por insectos triatóminos (familia Reduviidae). El ciclo enzoótico del parásito se encuentra en mamíferos pequeños, entre los que se puede mencionar marsupiales, ratones, ratas, cobayos y conejos, sin embargo el ciclo doméstico incluye al ser humano y animales tales como perros y gatos. Existe un caso particular de resistencia natural a la infección en caso de las aves, reptiles y anfibios (Kirchof 2009, Ramsey 2003).

**1. Transmisión.** La transmisión de la enfermedad de Chagas puede ocurrir durante la picadura de insectos triatóminos (familia Reduviidae) infectados con el parásito (Fig. 1).

**Figura 1:** Insecto triatómino transmisor de *Trypanosoma cruzi*. (*Triatoma dimidiata*)



CIEI, 2007.

La infección ocurre cuando estos puncionan un área para alimentarse de sangre y simultáneamente depositan heces u orina conteniendo tripomastigotes de *T. cruzi* que pueden ingresar al tejido mucoso subcutáneo por las mucosas o por abrasiones cutáneas. La reacción alérgica causada por la picadura hace que la persona se auto-infecte permitiendo que el parásito ingrese a la circulación sanguínea en donde inicia la infección (WHO, 2000).

**2. Formas clínicas.** La enfermedad se presenta en dos fases sucesivas: La fase aguda que dura de 6 a 8 semanas post-infección, transcurrido este tiempo la mayoría de los pacientes no presenta síntomas clínicos, parecen saludables y es imposible determinar daño alguno, por lo que la infección previa solamente puede ser detectada utilizando métodos serológicos o parasitológicos. La segunda fase es la fase crónica indeterminada, en la cual algunos pacientes pueden desarrollar daños en diferentes órganos, principalmente en el sistema digestivo y el corazón. (Laranja FS *et al*, 1956).

En algunos casos, cuando la picadura del vector ocurre cerca del área ocular, la infección puede iniciarse con una inflamación ocular unilateral, esta forma especial de la fase aguda es llamada Signo de Romaña (Fig. 2).

**Figura 2:** Síntoma característico del Signo de Romaña.



(WHO, 2000)

## B. Parasitología

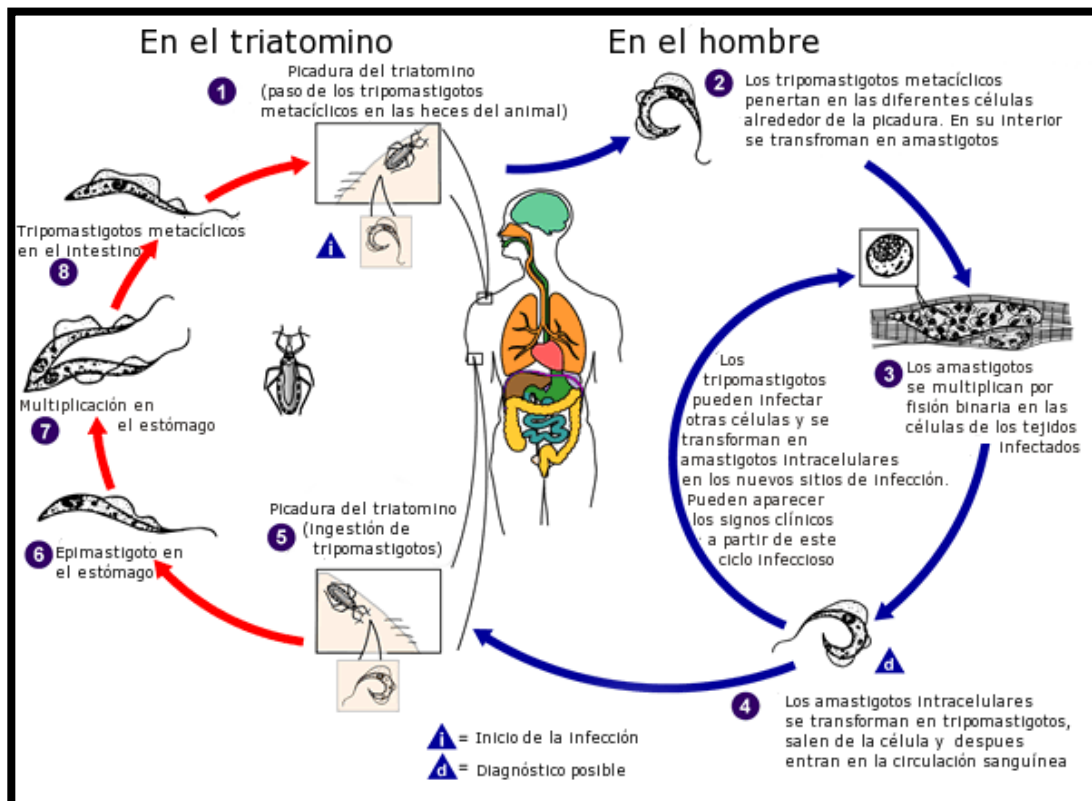
1. **Taxonomía.** *Trypanosoma cruzi* pertenece al orden Kinetoplastida del phylum Sarcomastigophora, los organismos pertenecientes a este orden se caracterizan por ser organismos flagelados que poseen un organelo particular llamado cinetoplasto, este organelo consiste en una red fibrosa de ADN asociada a la mitocondria.

*Trypanosoma cruzi* se incluye dentro del grupo de los tripanosomas que desarrollan su etapa infectiva en el aparato digestivo del insecto vector y que invaden a los hospederos mamíferos por medio de las heces desechadas en el momento de la alimentación. El subgénero *Schizotrypanum* fue creado para describir a aquellos tripanosomas que se replican en los vertebrados vía intracelular, por lo tanto el nombre completo de este parásito es *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* lo cual describe en específico el papel que este juega en el hospedero. (WHO, 2000).

2. **Ciclo de vida.** El ciclo de vida del parásito es complejo ya que involucra un desarrollo tanto en el hospedero mamífero como en el vector (Fig. 3). Puede observarse que el diagnóstico posible puede darse en la etapa 4 del ciclo en donde los tripomastigotos pueden ser liberados y el hospedero puede producir una respuesta inmune humoral hacia el patógeno, por lo tanto, técnicas serológicas son utilizadas en esta fase. Otra posible práctica para la detección es la realización de hemocultivos o tinción de Giemsa de gota gruesa para la observación directa del patógeno.

**Figura 3:** ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

El ciclo se inicia cuando un triatómino infectado, durante su alimentación del hospedero mamífero, deposita tripomastigotos metacíclicos del parásito presentes en las heces u orina. De esta manera, el hospedero se autoinfecta con el parásito por medio de la reacción alérgica asociada a la picadura del insecto vector (1). Posteriormente los tripomastigotos invaden las células alrededor de la picadura en donde se transforman en amastigotos (2). Los amastigotos se replican intracelularmente mediante fisión binaria (3). Cuando la replicación es alta pueden transformarse en tripomastigotos los cuales son liberados por lisis celular, estos pueden infectar otras células y crear amastigotos intracelulares (4). Si un insecto triatómino libre de tripanosoma se alimenta de un hospedero infectado con tripomastigotos puede adquirirlos vía oral (5). Los tripomastigotos ingeridos viajan a través del sistema digestivo del triatómino y es en el estómago en donde se transforman en epimastigotos (6) los cuales pueden multiplicarse rápidamente sin representar algún riesgo para el insecto vector (7). Finalmente, los epimastigotos se transforman en tripomastigotos metacíclicos en el intestino lo cual completa el ciclo de vida del parásito (8).



(tomado de [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov))

## C. Vectores

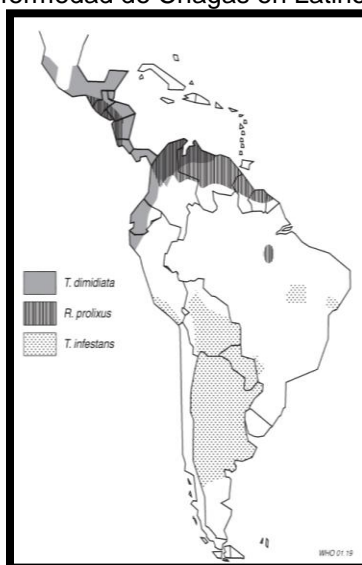
**1. Taxonomía.** Los insectos transmisores de la enfermedad de Chagas pertenecen al orden Hemíptera, familia Reduviidae, sub-familia Triatominae; son insectos hematófagos obligados ya que se alimentan solamente de sangre o linfa de animales vertebrados. En algunos casos, los triatóminos pueden alimentarse de otros insectos (Zeledón, 1981).

Se han descrito más de 130 especies de triatóminos. Sin embargo, solamente las especies pertenecientes a los géneros *Triatoma* spp., *Rhodnius* spp. y *Panstrongylus* spp. representan un riesgo epidemiológico importante en la transmisión de la enfermedad de Chagas (Carod-Artal, 2013).

La mayoría de estos insectos viven en hábitats naturales en contacto con mamíferos, aves y reptiles en diferentes ecosistemas. Algunas especies pueden vivir en distintas condiciones climáticas como temperatura, humedad y altitud (Lent 1999, Carcavallo 1999).

**2. Distribución geográfica.** La mayoría de triatóminos viven en hábitats entre los trópicos, sin embargo se han encontrado algunas especies en climas invernales. La distribución de las especies más impactantes en la enfermedad de Chagas abarca desde México hasta Argentina (Fig. 4).

Figura 4: Distribución geográfica de los vectores importantes de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica.



(WHO, 2000)

En Guatemala se ha documentado la presencia de dos vectores: (i) *Triatoma dimidiata* que es una especie silvestre endémica en 21 de 22 departamentos del territorio guatemalteco y (ii) *Rhodnius prolixus* que es una variedad presuntamente introducida del área Andina, que se ha encontrado solamente en 9 departamentos. (OPS 2003, Tabaru *et al*, 1999).

#### **D. *Triatoma dimidiata*.**

Este vector habita tanto ambientes silvestres como domésticos. Se encuentra ampliamente distribuido en Guatemala y parece tener preferencia por los departamentos secos del oriente del país (Zacapa, Jutiapa, Jalapa), aunque también se ha encontrado habitando ambientes húmedos como Alta y Baja Verapaz.

Además, se han localizado habitando cuevas que albergan marsupiales o pequeños mamíferos y también en algunos montículos de piedras (Monroy et al, 2003). En los ambientes domésticos habitan en cercados de piedra y paredes de adobe (Zeledón 1981).

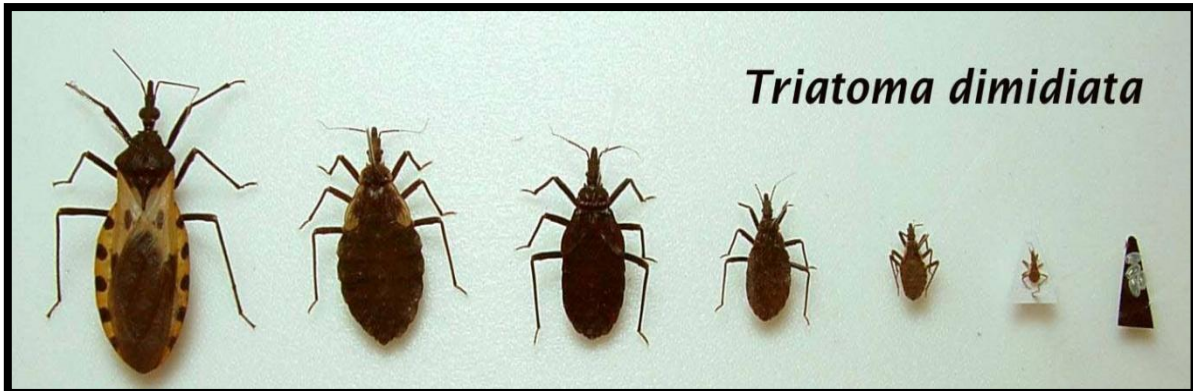
Actualmente, *Triatoma dimidiata* es el vector más importante de la enfermedad de Chagas en Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica (Dorn et al. 2007) por lo que se considera que el control de vectores para la detección de la enfermedad es un tema significativo.

1. **Ciclo de vida.** En la naturaleza se estima que el ciclo de vida de *Triatoma dimidiata* posee una duración de un año y medio (Peñaveler et al. 1956). El ciclo de vida de este insecto incluye cinco estados ninfales con metamorfosis incompleta y un estado adulto (Fig. 5). Cuando las hembras ovopositan, los oocitos maduran entre 24 y 30 días. Los estadios más vulnerables del ciclo son las primeras dos ninfas, las cuales poseen una gran tasa de mortalidad. Además, se ha observado que toda alimentación sanguínea que produce una distensión considerable del abdomen es suficiente para que cualquier estadio logre la ecdisis (muda de exoesqueleto) (Zeledón, 1981).

La ovoposición de las hembras se ve afectada por factores físicos como la temperatura y humedad, además de la frecuencia de alimentación. En estudios hechos en el laboratorio se estimó que una hembra produce en promedio entre 10 y 31 oocitos por día, además la presencia del parásito en el adulto no parece afectar el proceso de ovoposición (Zeledón, 1981).

**Figura 5:** Estadios de *Triatoma dimidiata*.

De derecha a izquierda, oocitos, estado ninfal 1 – 5, adulto



(OPS, 2003)

2. **Relación con el domicilio.** El estudio de poblaciones tanto domiciliarias como peridomiciliarias parecen indicar que existe un intercambio constante de individuos tanto hacia adentro como hacia afuera del domicilio.

Una característica importante de este insecto es que se organiza en colonias de varios individuos. Estas colonias se asocian comúnmente a roedores o marsupiales anidando en el ambiente peridomiciliario, aunque también puede haber una asociación colonial con los animales domiciliarios tales como perros y gatos (Zeledón 1981).

3. **Alimentación y preferencias alimentarias.** Sobre el comportamiento y alimentación, *Triatoma dimidiata* se caracteriza como un animal tímido, especialmente las ninfas pequeñas. El período de alimentación está muy relacionado al tamaño del insecto. *Triatoma dimidiata* es una especie particular que posee períodos de alimentación interrumpidos, haciendo que su alimentación sea extensa. A pesar de esto, en el laboratorio se han observado comidas ininterrumpidas en cortos períodos de aproximadamente 10 minutos (Zeledón 1981). Sin embargo, en algunas ocasiones su alimentación en el laboratorio se hace muy laboriosa a menos que los insectos se encuentren famélicos.

En cuanto a la manutención de colonias provenientes del campo, se ha observado que estos insectos presentan usualmente una alta mortalidad ya que no

aceptan ser alimentados por animales de laboratorio (Zeledón 1981), lo cual contrasta con el hecho que *Triatoma dimidiata* es altamente oportunista mostrándose capaz de alimentarse de varias especies de vertebrados, incluyendo reptiles, aves y mamíferos (Cuadro 1).

**Cuadro 1:** Preferencias alimenticias de *T. dimidiata* por región geográfica

Hospedero	*Guatemala	**México	***Panamá
Gato	5.7%	0.2%	1.4%
Gallina	4.5%	13.1%	19.0%
Humano	30.6%	3.5%	38.0%
Perro	0.6%	8.65%	17.0%
Vaca	7.0%	No realizado	3.3%
Zarigüeya	15.3%	3.8%	0%

Adaptado de \*\*\*Christensen *et al* 1988, \*\*Quintal *et al* 1977, \*Sasaki *et al* 2003.

**4. Componentes salivales.** La saliva de los insectos hematófagos contiene una farmacopea de componentes que permite manipular la hemostasis del hospedero. Diferentes estudios se han realizado con los componentes salivales de varias especies de triatóminos con el fin de describir las actividades fisiológicas que causan en el hospedero. Además, se ha llegado a identificar posibles candidatos farmacológicos para la prevención o control de la enfermedad, inclusive como posibles anticoagulantes (Kato, 2010).

Se han realizado estudios relacionados a la saliva de los triatóminos enfocados especialmente en *R. prolixus* cuyos análisis han demostrado la presencia de componentes farmacológicamente activos, dentro de los cuales se pueden mencionar anticoagulantes, vasodilatadores, inhibidores de agregación de plaquetas, antihistamínicos entre otros. (Montfort *et al.* 2000, Andersen *et al.* 2005).

En cuanto a los componentes salivales de *T. dimidiata* se ha reportado que un 89.9% de los transcritos de las glándulas salivales corresponden a proteínas secretadas de la familia de las lipocalinas. Adicionalmente, se han reportado las hemolisinas, fosfatasas, serpinas, apirinas, tripsinas y una hemoproteína (Kato, 2010). Es necesario resaltar la importancia de estos estudios recientes pues mencionan la posibilidad de utilizar estos componentes salivales como marcadores de la exposición a *T. dimidiata* en estudios epidemiológicos.

## **E. Reservorios naturales**

En sus comienzos, la enfermedad de Chagas era una zoonosis que involucraba una gran cantidad de triatóminos selváticos y mamíferos en donde los humanos y ambientes domésticos estaban ausentes.

Cuando el ser humano construyó ambientes propicios para la colonización de algunas especies, esta enfermedad comenzó a tener un alcance epidemiológico.

Los reservorios naturales son aquellos mamíferos que consecuentemente son infectados por el parásito y que juegan un papel importante en el desarrollo, mantenimiento e interacción entre los ciclos selváticos y domésticos de la enfermedad (WHO, 2000).

**1. Reservorios domésticos.** El más importante para la enfermedad de Chagas es sin duda el ser humano, para el cual los vectores presentan una alta preferencia alimenticia. De manera interesante, se ha documentado que ciertas especies de triatóminos poseen una preferencia alimenticia por los perros y gatos. Esos animales poseen una tolerancia a la enfermedad de siete años aproximadamente, tiempo durante el cual son un foco importante de infección en el ambiente doméstico (WHO 2000).

La proporción de hospederos para el parásito puede variar según la diversidad biológica del área en estudio y además también depende mucho de la densidad poblacional del vector.

La circulación del parásito en el ambiente doméstico es muy dinámica ya que la probabilidad de que un insecto se infecte aumenta considerablemente al encontrarse en un ambiente restringido.

La eficiencia de transmisión del parásito, la relación comensal con el vector, la persistencia riesgosa de parasitemia con la edad y una alta exposición califican a los perros como reservorios amplificadores importantes en comunidades rurales.

Estos reservorios son factores de riesgo para los seres humanos, especialmente si habitan en la misma vivienda. Los perros también pueden ser utilizados como

centinelas en la fase de vigilancia para detectar la introducción de *T. cruzi* en el ciclo doméstico. (WHO 2000).

**2. Reservorios selváticos.** Se han descrito más de 180 especies de mamíferos que pueden ser infectados con *Trypanosoma cruzi* y su distribución se encuentra a lo largo de todo el continente americano (WHO, 2002). Los reservorios selváticos que representan una importancia epidemiológica incluyen algunos edentados, marsupiales y roedores, que por ser sinantrópicos tienen mayor probabilidad de transferir el parásito del ciclo selvático al ciclo doméstico.

**3. Importancia de aves en la prevalencia.** Las aves son muy importantes en la alimentación del vector, especialmente las aves domésticas como gallinas y patos que se encuentran habitando en el peridomicilio de áreas endémicas. Por esta razón, se considera que las aves domésticas contribuyen a la prevalencia del parásito en el ambiente peridoméstico (Gurtler *et al*, 2007)

Se ha observado que las aves, junto a los reptiles y anfibios, poseen una resistencia natural hacia la infección de *T. cruzi* debido a que poseen un componente innato de defensa hacia el parásito. Esta resistencia natural puede utilizarse también como una herramienta para utilizar gallinas como centinelas en la evaluación de introducción del vector en el ambiente doméstico. (WHO, 2000).

## **F. Epidemiología**

**1. Prevalencia.** La prevalencia estimada en el año 2007 indica que un 2.3% de la población latinoamericana se encuentra infectada con la enfermedad. Reportes del año 2002 indican una prevalencia entre 2.5 y 4.5% en Centroamérica, sin embargo, se menciona que desde la implementación de programas de control de vectores se ha reducido considerablemente estas estadísticas (Strosberg *et al*. 2007).

2. **Incidencia.** En algunos países de Sudamérica se ha logrado erradicar la transmisión de la enfermedad gracias al éxito de los programas de control vectorial. En general, se estima que la incidencia de la enfermedad en Latinoamérica se ha reducido en un 70% entre los años 1983 y 2002 (Strosberg *et al.* 2007). Sin embargo, en algunos países como Perú, Colombia y Ecuador la erradicación ha sido difícil porque no se ha demostrado un decrecimiento significativo de la incidencia. Existen también regiones endémicas en donde los programas de control no han sido efectivos por problemas de re-infestación con vectores silvestres.

3. **Situación en Guatemala.** En el territorio guatemalteco se han descrito dos especies importantes en la transmisión de la enfermedad de Chagas: *Triatoma dimidiata* que ha sido reportado en 22 de 23 departamentos y *Rhodnius prolixus* que ha sido reportado en 9 departamentos (OPS 2003, Tabaru 1999).

Antes de la implementación del programa de control vectorial, se calculaba una prevalencia de 7.3% y una incidencia anual del 0.3% de la población nacional (WHO, 2000). Datos más recientes reportan aproximadamente 30,000 nuevos casos al año con una prevalencia anual de 730,000 casos (King *et al.*, 2011).

En el año 2008 el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social reportó la erradicación nacional de la transmisión domiciliar de Chagas por el vector *R. prolixus* (Hashimoto & Schofield, 2012). Sin embargo, la infección por *T. dimidiata* presenta un problema para la población ya que los programas de control no permiten la erradicación total del vector por su presencia tanto en ambientes domésticos como selváticos (Hashimoto & Schofield, 2012).

## **G. Estrategias de control y prevención.**

La enfermedad de Chagas no puede ser totalmente erradicada ya que naturalmente es una zoonosis, sin embargo, se puede controlar hasta un nivel mínimo de infección. En los últimos años, varios programas de control y prevención han sido implementados en distintos países latinoamericanos que se ven afectados por este problema. Las drogas anti-chagásicas no son un tratamiento adecuado para los pacientes infectados de forma crónica. Finalmente, la mejor manera de

prevenir y controlar la dispersión de la enfermedad es mediante el control del vector (WHO, 2000). Por ello, los programas de rociamiento de insecticida y mejoramiento de las viviendas tienen como objetivo reducir al máximo la probabilidad de re-infestación de domicilios de áreas endémicas (Strosberg *et al.* 2007).

**1. Control químico.** El control químico del vector consiste en el rociamiento de insecticidas piretroides que fueron los sustitutos de los insecticidas organoclorados a finales de los años 70. El cambio fue bien aceptado por muchas razones, entre las cuales puede mencionarse su efectividad contra otras plagas, no solamente el vector de la enfermedad de Chagas.

El costo del control químico del vector es contrarrestado por las bajas dosis que se aplican. Adicionalmente, los insecticidas piretroides poseen otras ventajas como la no deterioración de las paredes domiciliarias y el hecho de ser inodoros; ventajas que fortalecieron las iniciativas en toda Latinoamérica para crear programas nacionales orientados al control vectorial de la enfermedad. Estos programas son generalmente acompañados de una instancia de mejoramientos de los hogares para reducir al máximo los posibles hábitats para el vector. (Strosberg *et al.* 2007).

Sin embargo, algunas regiones endémicas han presentado problemas de re-infestación vectorial en los sitios en donde se ha aplicado el método químico de erradicación. Esta re-infestación se debe posiblemente a la falta de un programa adecuado de monitoreo continuo, ya que el único método existente es el ingreso de personal capacitado en busca de triatóminos en el ambiente doméstico y peri doméstico, así como el reporte a nivel comunitario sobre la presencia del vector. En todo caso, los programas actuales de monitoreo dificultan la detección temprana de una re-infestación y reducen considerablemente la eficiencia del control químico a largo plazo (Strosberg *et al.* 2007).

En Guatemala, el departamento de Jutiapa presenta la incidencia más alta de la enfermedad. Trabajos realizados en este departamento demostraron que era necesaria la aplicación de tres rondas de insecticida para observar una reducción considerable del vector debido a la alta tasa de re-infestación (Hashimoto *et al.* 2006).

La efectividad del procedimiento en Jutiapa fue evaluada, determinándose que en áreas en donde la línea base de infestación era de 20%, luego de la aplicación del insecticida se redujo a un 1.4% en un período de 3 a 21 meses post-aplicación. Sin embargo, la tasa de infestación aumentó al 8.4% luego de 20 a 45 meses del rociamiento. Estas observaciones ponen en manifiesto que las poblaciones de triatóminos en el peridomicilio presentan un alto riesgo para la re-infestación doméstica (Nakagawa *et al.* 2003, Hashimoto *et al.* 2006).

Recientemente se ha planteado la idea de utilizar los componentes salivales del vector como herramienta de evaluación epidemiológica para la invasión de ambientes domésticos y peri domésticos luego de la aplicación del control químico (Schwarz *et al* 2009a y b, Kato 2010).

Estudios sobre los componentes salivales de *Triatoma infestans* han llevado a la síntesis de un antígeno recombinante (rTISP14.6) el cual ha sido evaluado en gallinas y cobayos (Schwarz *et al* 2009). El suero proveniente de gallinas expuestas a diferentes especies de triatóminos incluyendo *T. infestans*, *T. brasiliensis*, *T. sordida*, *R. prolixus* y *P. megistus* reconocieron el antígeno rTISP14.6, lo que sugiere que éste antígeno puede ser útil como un marcador epidemiológico para varias especies de triatóminos cuando el hospedero ha sido expuesto a un solo vector. Este descubrimiento se complementa con experimentos de reacción cruzada utilizando Western blot, en donde una proteína salival de 14kDa de *T. infestans* fue detectada por suero de gallinas expuestas a cinco diferentes especies de triatóminos (Schwarz *et al* 2009b).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### A. Descripción de la investigación

**1. Enfoque y alcance de la investigación.** El estudio se realizó con un enfoque cuantitativo que permitió la recolección de datos numéricos que fueron necesarios para medir el efecto de cada variable, para lo cual se utilizó un procedimiento sistemático que requirió la formulación de las hipótesis previamente a la experimentación.

El alcance de la investigación es descriptivo y su importancia radica en que por primera vez se determinaron cuáles son los componentes salivales de *Triatoma dimidiata* presente en el territorio guatemalteco que inducen una respuesta inmune humoral en *Gallus gallus*.

**2. Diseño y tipo de investigación.** El diseño experimental de esta investigación es del tipo cuasiexperimento, debido a que la muestra tomada no fue elegida al azar. Además, los resultados obtenidos estuvieron distribuidos de una manera no normal debido a que se trabajó con un tamaño de muestra menor a 15 sujetos de estudio, situación que requirió de la aplicación estadística no paramétrica para el análisis de los resultados.

#### B. Sujetos de estudio.

Se trabajó con gallinas ponedoras de cinco meses de edad, las cuales fueron vacunadas contra el virus de New Castle, la enfermedad de Gumbaro, la viruela, rotavirus (Coris), cólera y una vacuna combinada del virus de New Castle y bronquitis. Además, se utilizaron dos individuos experimentales denominados “test” y otros dos individuos control denominados “control”.

## C. Hipótesis.

**1. Hipótesis conceptual:** Existen componentes salivales de *Triatoma dimidiata* proveniente del Sur de Chiapas, México que inducen una respuesta inmune humoral secundaria en *Gallus gallus*.

**2. Hipótesis nula:** Los componentes salivales de *Triatoma dimidiata* no inducen una respuesta inmune humoral en *Gallus gallus*.

**3 Hipótesis de trabajo:** Los anticuerpos circulantes de las gallinas inmunizadas permanecen por más de 2 meses después de la última exposición a la saliva de *T. dimidiata* proveniente del Sur de Chiapas, México.

Existen diferencias entre el perfil proteico y antigénico de *T. dimidiata* proveniente del sur de Chiapas, México con *T. dimidiata* proveniente de Comapa, Jutiapa.

Existe una reacción cruzada entre antígenos salivales de *T. dimidiata* y *Rhodnius prolixus*.

## D. Métodos

**1. Protocolo de Manejo y Uso de Animales.** Todos los procedimientos que involucraron el uso o manipulación de gallinas fueron aprobados por el Comité de Ética de Manejo y Uso de Animales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**2. Mantenimiento y origen de los triatóminos.** Todos los insectos triatóminos se mantuvieron en el insectario del Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala (CES-UVG). La temperatura promedio de la sala de incubación fue de 28.2°C (DS 0.8) con un porcentaje de humedad relativa de 74.5% (DS 4.0), y un foto-período de 14/10h. Los insectos fueron alimentados con gallinas cada 15 días.

*Triatoma dimidiata* proveniente de Manacal, México fue donado por el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) de Tapachula, Chiapas. Adicionalmente se utilizaron las colonias de *Triatoma dimidiata* proveniente de Comapa, Jutiapa, Guatemala y *Rhodnius prolixus* del CES-UVG.

**3. Extracción de glándula salival.** El antígeno utilizado fue extraído de la glándula salival de los triatóminos. Los insectos fueron disectados bajo un estereoscopio utilizando material previamente estéril. Las glándulas salivales se obtuvieron mediante la remoción cuidadosa de la cabeza de insectos adultos y ninfas de estadio 5. Las glándulas salivales, que se encuentran adheridas al esófago, fueron lavadas con PBS estéril (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM; pH 7.4) y posteriormente colocadas en un tubo en hielo.

Se realizaron conglomerados de 5 glándulas suspendidas en 30µL de PBS las cuales fueron centrifugadas a 14,000 rpm por 15min a 4°C, se separó el sobrenadante y fue almacenado a -20°C hasta su utilización

**4. Inmunización de gallinas con *Triatoma dimidiata* proveniente de Manacal, México y obtención de suero.** Se inmunizaron dos gallinas cada 15 días utilizando 5 triatóminos adultos, equivalente a una tasa baja de exposición según se esperaría ver en viviendas en proceso de colonización. El objetivo fue de evaluar el desarrollo de anticuerpos hacia la saliva inyectada de forma natural por la picadura del insecto.

Las gallinas fueron inmovilizadas y expuestas por 30 min cada 2 semanas, durante 16 semanas, haciendo un total de 8 exposiciones. Para asegurar la alimentación de cada insecto, éstos fueron colocados en tubos individuales los cuales se monitoreaban constantemente (Figura 6).

**Figura 6. Inmunización de gallinas con *Triatoma dimidiata* proveniente de Manacal, México.** Se inmovilizaron las gallinas test y fueron expuestas a 5 triatóminos adultos los cuales se encontraban en los tubos individuales para monitorear y asegurar su alimentación.



(Nancy Cruz, 2012, p 38. University of Manchester, Master of Science in Immunology and Immunogenetics in the Faculty of Life "Antibody response in hens to triatomine bites as a surveillance tool for *Triatoma dimidiata* infestation").

Siete días después de cada exposición y hasta dos meses post-exposición se tomó una muestra de sangre de la vena braquial (Figura 7) la cual fue centrifugada a 3,000rpm a temperatura ambiente durante 45 min seguidos de una segunda centrifugación a 14,000 rpm a 4°C durante 15min para separar el suero. Adicionalmente, se tomó una muestra basal de todas las gallinas como control negativo.

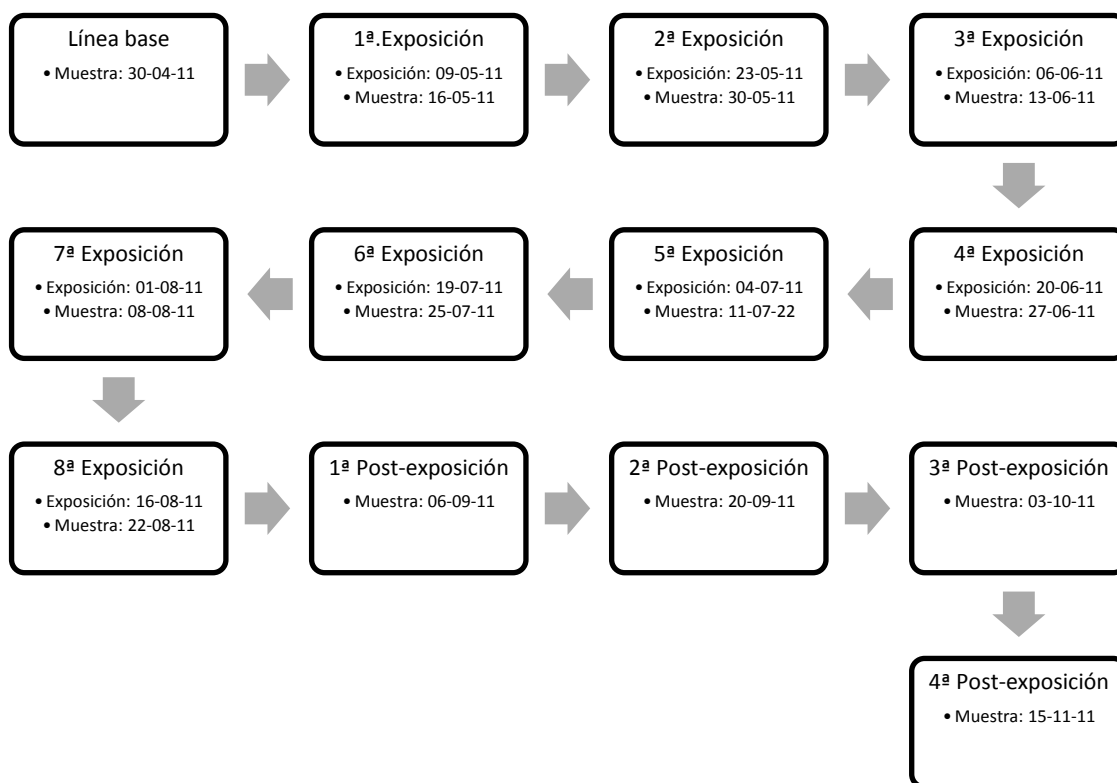
**Figura 7. Toma de muestra de sangre**



(Nancy Cruz, 2012, p 38. University of Manchester, Master of Science in Immunology and Immunogenetics in the Faculty of Life "Antibody response in hens to triatomine bites as a surveillance tool for *Triatoma dimidiata* infestation").

Para monitorear la permanencia de los anticuerpos producidos por la picadura de *Triatoma dimidiata*, se tomaron cuatro muestras post-exposición luego de la octava y última exposición. Todos los sueros obtenidos durante las 28 semanas del estudio fueron almacenados a -20°C hasta su utilización. Como control negativo se tomó una muestra de sangre basal una semana antes de iniciar las inmunizaciones (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Cronograma de exposiciones a *Triatoma dimidiata* proveniente de Manacal, México y tomas de sangre.**



Adaptado de: Nancy Cruz, 2012, p.38. University of Manchester, Thesis, Master of Science in Immunology and Immunogenetics in the Faculty of Life "Antibody response in hens to triatomine bites as a surveillance tool for *Triatoma dimidiata* infestation"

**5. Separación de proteínas salivales.** La separación de las proteínas salivales se realizó mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con sulfato dodecil sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) en condiciones desnaturizantes (método de Laemmli). Se utilizaron geles de apilamiento al 4% y de separación al 15% de acrilamida-bisacrilamida 95%/5%; además, 3uL de suspensión de glándulas (0.5 glándulas aprox.) en una dilución 1:3 con amortiguador de muestra (Tris-HCl 0.5M pH6.8, Glicerol, SDS 1%, Azul de bromofenol 1% y  $\beta$ -mercaptoetanol 0.012%) e incubado a 95°C por 4min.

Para la estimación de las masas moleculares de las proteínas identificadas se utilizó un marcador molecular de rango amplio (Bio-Rad PreStained SDS-PAGE

Standard, Broad Range, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se optimizaron las condiciones de corriente para resolver dos geles al mismo tiempo a una corriente constante de 45mA hasta que las muestras alcanzaran el gel apilador, una vez logrado se aumentó a 55mA de corriente constante hasta que el tinte indicador alcanzara el borde inferior del gel. (BioRad, Mini Protean III, Hercules, CA, USA).

Los geles fueron sometidos a una tinción rápida de Azul de Coomasie para la observación de bandas. Se sumergieron en solución de fijado (Isopropanol 25%, Ácido acético 10%) durante 15min, posteriormente se dejaron de 30min a 2hrs en solución de tinción (Ácido acético 10%, Coomasie brilliant blue G250 0.006%) y por último se destiñeron durante 2hrs en Ácido acético 10%.

Los geles fueron secados a 80°C durante 2hrs al vacío, enseguida escaneados a máxima resolución y analizados con el programa gratuito ImageJ 14.5s utilizando el macro de masa molecular MolWt ([imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/)).

Se calculó la similitud de los perfiles proteicos utilizando el índice de similitud de Jaccard con base el programa estadístico en línea SIMCALC ([math.sri.com/](http://math.sri.com/)).

**6. Western Blot.** Los sueros de todas las gallinas fueron utilizados en el ensayo Western Blot para estudiar la producción de anticuerpos durante la exposición a triatóminos y la respuesta de éstos en el pre y post-exposición. Fueron necesarias las mismas condiciones para el SDS-PAGE de separación de proteínas salivales, que requirió la utilización de un pozo de 50µL en el cual se cargaron 30uL (5 glándulas) de suspensión de glándulas con la dilución previamente mencionada.

Se realizó una electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa utilizando el sistema Mini TransBlot de BioRad. Las esponjas, papel filtro y membrana de nitrocelulosa se hidrataron previamente en buffer de transferencia (Tris base 3%, Glicina 14%, metanol 20%) durante 2hrs. La transferencia se resolvió a 200mA durante 2hrs a 4°C con agitación constante, posteriormente, el

gel de poliacrilamida fue teñido con azul de Coomasie para comprobar el procedimiento.

La membrana de nitrocelulosa fue lavada con TBST (Tris HCl 0.05M, NaCl 0.15M, Tween 20 0.1% pH 7.5) y luego bloqueada con TBST-BSA 5% durante toda la noche a 4°C. Las membranas fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

Se cortaron bandas de 0.3cms aproximadamente para el análisis de los sueros de cada exposición. Se realizaron dos lavados con TBST durante 2min cada uno, agregando posteriormente los sueros de las diferentes gallinas (1:100 PBS) durante 2hrs a temperatura ambiente. Se procedió a realizar un lavado con TBST durante 1 min y posteriormente tres lavados más durante 3min cada uno. Se agregó el anticuerpo de conejo anti-IgY conjugado con Biotina (Invitrogen, ciudad de México, México) (1:10,000 PBS) durante 1hra a temperatura ambiente.

Se realizó otra ronda de lavado como se mencionó anteriormente, agregándose estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (Invitrogen) (1:625 PBS) durante 1hra a temperatura ambiente, enseguida se procedió con una ronda más de lavado con TBST y dos lavados más con H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> durante 2min cada uno. Es necesario señalar que todas las incubaciones y lavados se realizaron con agitación continua.

Se reveló la reacción con BCIP/NBT (Novex Chromogenic Substrate, Invitrogen) hasta obtener la intensidad de bandas deseada y se detuvo con H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> en exceso

Posteriormente se alinearon las bandas obtenidas sobre papel filtro y fueron escaneadas a máxima resolución para su análisis computarizado. Se trabajó con el software gratuito ImageJ 14.5s utilizando el macro de masa molecular MolWt.

## IV. RESULTADOS

### A. Perfil proteico salival

Se realizó un SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes para observar el patrón de proteínas salivales de los tres organismos objetos de estudio, utilizando el sobrenadante de la suspensión de glándulas salivales extraídas y un marcador molecular para estimar la masa de las proteínas encontradas.

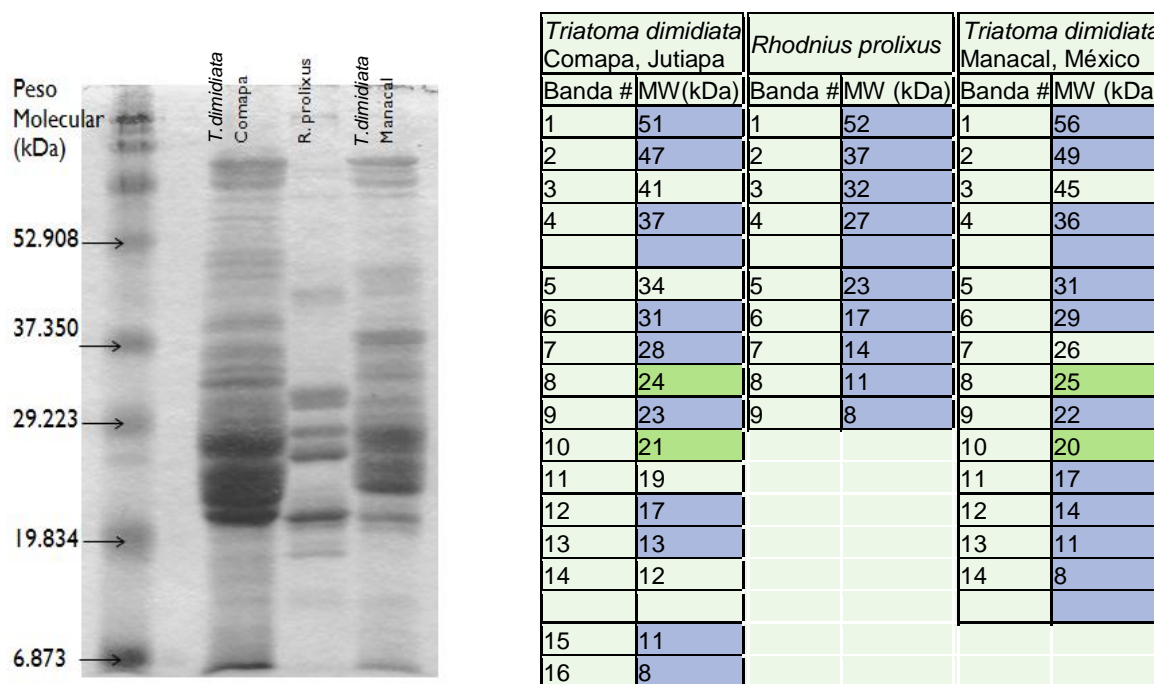
La Figura 8 presenta el gel de poliacrilamida 15% obtenido luego de ser teñido y la masa molecular aproximada de cada banda identificada, que hacen un total de 16 bandas proteicas salivales en *T. dimidiata* proveniente de Comapa, Guatemala en un rango entre 8 y 51 kDa; se logra observar que existe una alta concentración de proteínas en el rango de 19 a 34 kDa aproximadamente lo que dificulta una identificación apropiada de todas las proteínas que se encuentran en este rango.

En el caso de *Rhodnius prolixus* se identificaron 9 proteínas en un rango entre 8 y 52kDa aproximadamente y en el caso de *T. dimidiata* proveniente de Manacal, México se logró la identificación de 14 proteínas en un rango entre 8 y 56kDa aproximadamente.

Es importante señalar que no se logró estimar la masa molecular de aquellas proteínas que sobrepasaran los 52.908 kDa ya que está fuera del rango recomendado para las condiciones de corrimiento, según las instrucciones del fabricante del marcador molecular utilizado. Además, se determinó una similitud del 87.5% (IJ 0.8750) entre *T. dimidiata* proveniente de Manacal, México y *T. dimidiata* proveniente de Comapa, Guatemala mediante el índice de Jaccard, de igual manera se determinó que la similitud entre *R. prolixus* y los otros triatóminos es de 56.25% (IJ 0.5625).

**Figura 8 Perfil proteico de los organismos utilizados.**

En las columnas de la derecha se observa la masa molecular calculada de las proteínas salivales identificadas para *Triatoma dimidiata*, proveniente de Comapa, Jutiapa; *Rhodnius prolixus*; y *T. dimidiata* proveniente de Manacal, México. Las celdas de color azul representan proteínas con masa molecular similar entre los tres organismos mientras que las celdas de color verde representan proteínas con masa molecular similar entre los *T. dimidiata* utilizados. A la izquierda se presenta el gel de SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes en el cual se observa el patrón de proteínas salivales de cada uno de los organismos utilizados. La concentración proteica no fue equilibrada debido a la limitación de antígeno (saliva) extraído. El marcador molecular utilizado fue Prestained SDS-PAGE Stadarnds Broad-Range.



## B. Antígenos salivales de *T. dimidiata* proveniente de Manacal, México

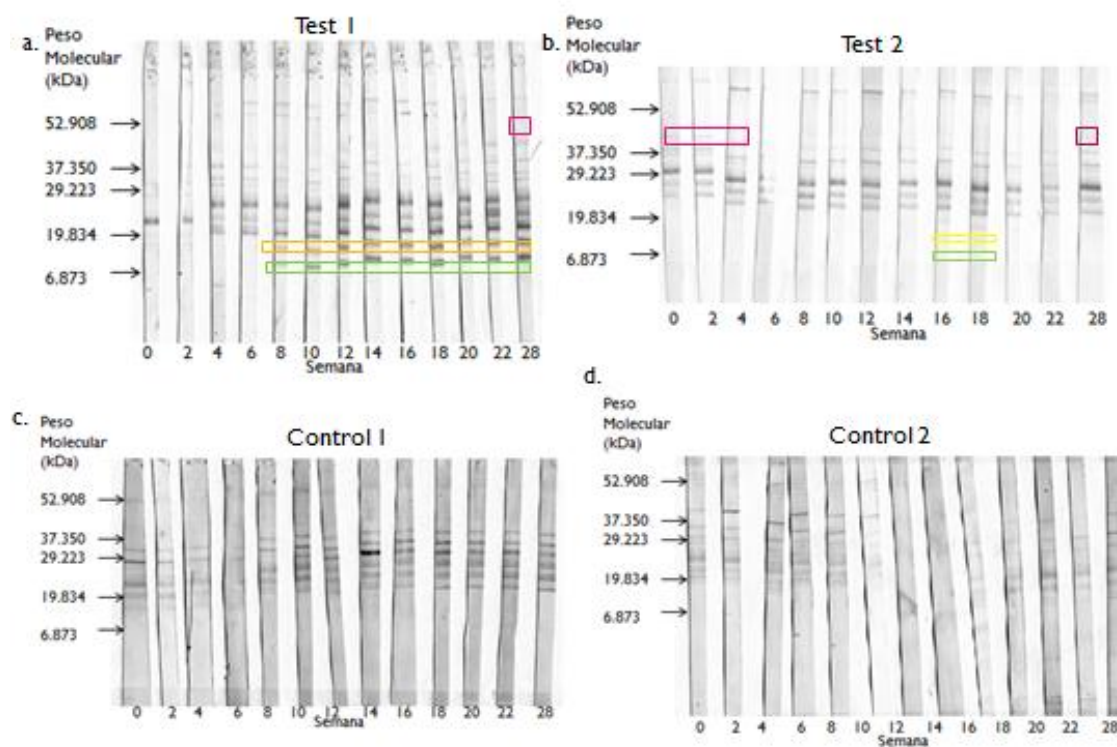
Los sueros extraídos de cuatro gallinas (2 test y 2 control) fueron utilizados en un Western Blot contra la saliva de *T. dimidiata* proveniente de Manacal, México. La Figura 9 presenta los perfiles antigénicos de cada gallina utilizada; para el análisis de estos resultados se realizó un alineamiento de los perfiles antigénicos obtenidos de la línea base (semana 0), la exposición (semanas 2 – 16) y la post-exposición (semanas 18 – 22).

Se identificaron visualmente los antígenos de interés mediante la comparación entre los perfiles antigénicos de las gallinas Test y las gallinas Control,

posteriormente se realizó un análisis de regresión para estimar la masa molecular de los mismos. Se logró determinar la presencia de tres antígenos específicos de la inmunización de *T. dimidiata* los cuales poseen una masa molecular de 14 y 11kDa aproximadamente. Además de otros ocho antígenos que se encuentran presentes desde el suero línea base por lo cual no podían ser considerados como antígenos específicos de la inmunización del triatómino. Adicionalmente se excluyeron dos antígenos más (37 y 46 kDa aprox.) debido a que se presentaban tanto en las gallinas Test como las gallinas Control.

**Figura 9. Inmunoblot de antígenos salivales de *Triatoma dimidiata* proveniente de Manacal, México y sueros de gallinas expuestas y no expuestas a picadura de *Triatoma dimidiata* proveniente de Manacal, México:**

Las proteínas salivales del triatómino se evaluaron como antígenos en inmunoblot con el suero extraído (1:100 PBS) de dos gallinas expuestas a picaduras cada dos semanas durante 16 semanas (Test 1 y 2) y dos gallinas control no expuestas a picaduras (Control 1 y 2) desde la línea base (Semana 0) y durante las semanas de exposición (Semanas 2 – 16) y las semanas post-exposición (Semanas 18 – 20) utilizando un anticuerpo anti-IgY (1:10,000 PBS). Los pesos moleculares de las bandas de interés fueron calculados en base al marcador molecular BioRad Prestained SDS-PAGE standards Broad-Range. Los cuadros representan los antígenos específicos de *T. dimidiata* proveniente de Manacal, México con masa moleculares de 11, 14 y 52kDa aproximadamente.



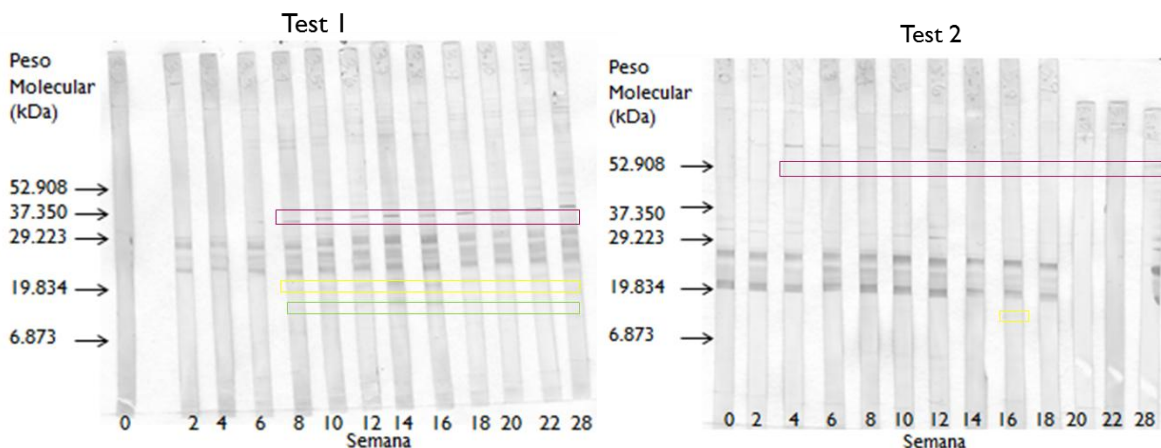
### C. Reactividad cruzada del suero de gallinas inmunizadas con *Triatoma dimidiata* proveniente de Comapa, Guatemala

Los sueros extraídos de las cuatro gallinas (2 test y 2 control) fueron utilizados en un Western Blot contra la saliva de *T. dimidiata* proveniente de Comapa, Guatemala. La figura 10 presenta los perfiles antigénicos de cada gallina utilizada lográndose identificar antígenos con masas moleculares similares a los encontrados en *T. dimidiata* proveniente de Manacal, México (52, 14 y 10kDa aprox.), presencia que se observa a partir de la semana 8 de la exposición y prevalecen hasta la semana 28. También se identifican antígenos en la línea basal de 28 y 31kDa aproximadamente.

Es oportuno mencionar que se encuentran otros 6 antígenos que se presentan en las gallinas control, aunque los datos no son mostrados, por lo que no se consideraron como antígenos específicos de la inmunización realizada.

**Figura 10. Inmunoblot de antígenos salivales de *Triatoma dimidiata* proveniente de Comapa, Jutiapa, Guatemala y sueros de gallinas expuestas y no expuestas a picadura de *Triatoma dimidiata* proveniente de Manacal, México.**

Las proteínas salivales (equivalente a 5 glándulas por blot) de 5 adultos y ninfas de *Triatoma dimidiata* (Comapa, Jutiapa, Guatemala) se evaluaron como antígenos en inmunoblot con el suero extraído (1:100 PBS) de dos gallinas expuestas a picaduras de *Triatoma dimidiata* proveniente de Manacal, México cada dos semanas durante 16 semanas (Test 1 y 2) y dos gallinas control no expuestas a picaduras (Control 1 y 2) desde la línea base (Semana 0) y durante las semanas de exposición (Semanas 2 – 16) y las semanas post-exposición (Semanas 18 – 20) utilizando un anticuerpo secundario anti-IgY (1:10,000 PBS). Los pesos moleculares fueron determinados utilizando el marcador molecular BioRad Prestained SDS-PAGE Standards Broad-Range. Los cuadros representan los antígenos específicos de *T. dimidiata* proveniente de Manacal, México con masa moleculares de 11, 14 y 52kDa aproximadamente.

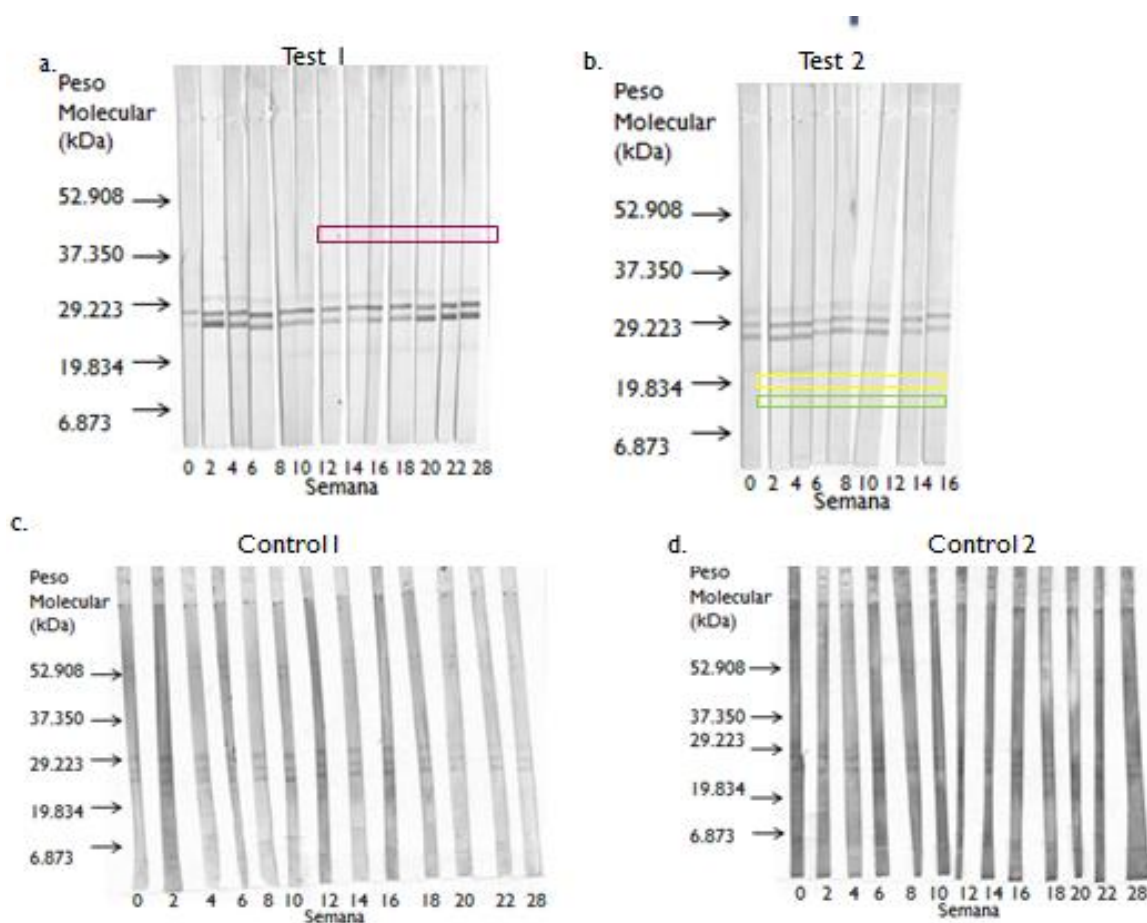


**D. Reactividad cruzada del suero de gallinas inmunizadas con picadura de *Triatoma dimidiata* proveniente de Manacal, México y antígenos salivales de *Rhodnius prolixus***

Los sueros extraídos de las cuatro gallinas, dos test y dos controles, fueron utilizados en un Western Blot contra el extracto de glándula salival de *Rhodnius prolixus* para evaluar la reactividad cruzada del suero de gallinas inmunizadas con picadura de *T. dimidiata* proveniente del sur de México. La Figura 11 presenta los perfiles protéicos *R. prolixus* reconocidos por los anticuerpos de cada gallina utilizada y se logra la identificación de antígenos salivales con reacción cruzada tanto en los sujetos control como experimentales).

Se encuentran tres antígenos de 17, 27 y 31 kDa aproximadamente, reconocidos por los sueros en ambos grupos por lo que no son considerados como antígenos específicos de la inmunización realizada. La reacción con los otros antígenos es demasiado débil para visualizar consistentemente.

**Figura 11. Inmunoblot de antígenos salivales de *Rhodnius prolixus* y sueros de gallinas expuestas y no expuestas a picadura de *Triatoma dimidiata* proveniente de Manacal, México**  
 Las proteínas salivales (equivalente a 5 glándulas por blot usando diferentes especímenes de triatóminos para control y test) de 5 adultos y ninfas de *R. prolixus* se evaluaron como antígenos en inmunoblot con el suero extraído (1:100 PBS) de dos gallinas expuestas a picaduras de *Triatoma dimidiata* proveniente de Manacal, México cada dos semanas durante 16 semanas (Test 1 y 2) y dos gallinas control no expuestas a picaduras (Control 1 y 2) desde la línea base (Semana 0) y durante las semanas de exposición (Semanas 2 – 16) y las semanas post-exposición (Semanas 18 – 20) utilizando un anticuerpo secundario anti-IgY (1:10,000 PBS). Para el individuo Test 2 solamente se cuenta con resultados hasta 16 semanas de exposición debido a la limitación de antígeno al final de estos experimentos. Las marcas magenta, amarillo y verde demarcan antígenos potencialmente inmunogénicos en gallinas Test 1 y 2.



## V. DISCUSIÓN

El desarrollo de pruebas serológicas con antígenos salivales como indicador de tasas bajas de infestación, ha abierto una puerta para desarrollar nuevas estrategias de monitoreo de infestación domiciliar con triatóminos. (Schwartz, 2009).

Dichos estudios han determinado que la respuesta inmune humoral contra la saliva de *T. infestans* muestra una reactividad cruzada con varios antígenos salivales de triatóminos y de otros insectos hematófagos.

Con la presente investigación se logró identificar una respuesta de anticuerpos específica a dos antígenos derivados de extractos de glándulas salivales de *Triatoma dimidiata* proveniente del sur de México y su reactividad cruzada con antígenos salivales de *Rhodnius prolixus* y de *T. dimidiata* proveniente del oriente de Guatemala.

Se comparó el perfil proteico de los tres triatóminos utilizados en esta investigación, los cuales poseen algunas proteínas salivales de similar masa molecular, sin embargo no se asume que sean proteínas ortólogas.

Se estudiaron los perfiles proteicos salivales de *T. infestans* (Volf, Grubhoffer *et al.* 1993; Pereira, Souza *et al.* 1996), *P. megistus* (Pereira, Souza *et al.* 1996; Barbosa, Diotaiuti *et al.* 2004), *T. dimidiata* (Pineda, Melgar *et al.* 2008; Flórez, Niño *et al.* 2009), *T. nitida*, *T. pallidipenis*, *T. ryckmani* (Pineda, Melgar *et al.* 2008) y varias especies de *Rhodnius* (Soares, Sant'Anna *et al.* 2000) las cuales describen proteínas entre el rango de 10 a 100kDa. En el caso de los triatóminos utilizados en este estudio, se observan proteínas en este mismo rango con la mayor concentración entre 19 a 38kDa.

La alta densidad de proteínas en este rango no permitió la estimación de su masa molecular. Así mismo se logró observar una baja concentración en las proteínas de baja masa molecular. Sin embargo, es importante señalar que debido a que no se cuantificaron las proteínas cargadas en el gel de poliacrilamida, las diferencias observadas en los perfiles proteicos deben ser analizadas nuevamente realizando una cuantificación correcta de las proteínas salivales. Esto coincide con

los resultados obtenidos por Kato *et al*, en los cuales encontraron que la mayoría de transcritos predecían proteínas del rango 19 a 32kDa, sugiriendo que la expresión a nivel de proteína está determinada en buena parte por la transcripción.

Las poblaciones de *T. dimidiata* presentan cierta diversidad genética desde el sur de México hasta el norte de Perú (Dorn et al, 2009) así también se han reportado diferencias en el perfil proteico salival (Pineda et al, 2008).

En este estudio se utilizó *T. dimidiata* proveniente de Manacal, México para inmunizar las gallinas. Dadas las diferencias en el perfil proteico salival entre individuos de *T. dimidiata* previamente publicadas, se determinó el porcentaje de similitud de los perfiles salivales de *T. dimidiata* provenientes de México y de Guatemala, situación que permitió comparar los perfiles antigénicos entre los dos grupos de *T. dimidiata* utilizadas y determinar si existía una reacción cruzada con proteínas potencialmente compartidas entre los dos grupos.

La similitud entre estos triatóminos fue de 87.5% lo cual indica que existen en ambos grupos proteínas salivales con masa molecular similar, sin embargo no se puede asegurar que sean las mismas. La única manera de determinar si éstas proteínas son idénticas, sería realizando una secuenciación peptídica y analizando *in silico* estas secuencias. Al comparar el perfil proteico de *R. prolixus* con el de *T. dimidiata* se obtuvo una similitud del 56.25%.

Se realizó un ensayo de Western Blot con el objetivo de identificar cuáles proteínas salivales de *T. dimidiata* proveniente de Manacal, México generan una respuesta inmune secundaria en gallinas. Se logró identificar un total de 14 proteínas inmunoreactivas con un rango de masa molecular entre 11 y 51 kDa aproximadamente. Solamente dos bandas proteicas, de aproximadamente 11 y 14 kDa, parecen ser antígenos específicos a la picadura de *T. dimidiata*. Estos antígenos se visualizaron luego de 8 semanas de exposición y se detectaron hasta la semana 28 luego de la primera exposición en al menos una gallina expuesta a la picadura durante 16 semanas.

Previamente Schwartz reporta, en el 2009, la identificación de 3 antígenos salivales de *T. infestans* de masas moleculares aproximadas de 14 y 21 kDa al

exponer gallinas a esta especie. En el caso de *T. dimidiata*, se logró identificar un antígeno de 14kDa que es similar en masa molecular al identificado en *T. infestans*, sin embargo, es necesario separar las proteínas en un sistema de dos dimensiones y secuenciar la proteína para determinar si éstas son ortólogas.

Los sueros de las gallinas inmunizadas con *T. dimidiata* (Manacal, México) se utilizaron en un Western Blot contra extracto salival de *T. dimidiata* (Comapa, Jutiapa) para determinar su reacción cruzada. Se identificaron antígenos con masas moleculares similares (11, 14 y 51kDa) a los encontrados en *T. dimidiata* (Manacal, México), y pueden ser candidatos para ser utilizados como marcadores biológicos de exposición del vector con el objetivo de detectar la infestación de *T. dimidiata* en las áreas endémicas de la enfermedad de Chagas en donde esta especie es el vector.

La saliva de *R. prolixus* fue necesaria para establecer si los marcadores biológicos de exposición identificados en *T. dimidiata* podrían ser utilizados para medir la infestación por parte de otras especies. Los sueros de las gallinas control e inmunizadas con *T. dimidiata* (Manacal, México) presentaron una reacción cruzada contra la saliva de *R. prolixus*, sugiriendo así que está relacionada a los antígenos salivales de insectos hematófagos, según se reportó previamente (Schwarz, 2009).

Se encontraron varias bandas proteicas que son inmunoreactivas con anticuerpos encontrados en la línea base de los dos grupos experimentales. Estas proteínas pueden tener alguna identidad entre insectos hematófagos como por ejemplo los mosquitos.

Las gallinas se encontraron en condiciones de gallinero, expuesto al medio ambiente, por lo que todas las noches fueron expuestas a la picadura de mosquitos. A pesar de que esta variable no pudo ser controlada, el experimento muestra la importancia de tener en cuenta posibles reacciones cruzadas generadas por otros insectos.

Los tres grupos de triatóminos mostraron antígenos de masa molecular debajo de 19 kDa reconocidos por sueros de gallinas expuestas a picadura de *T. dimidiata* proveniente de México. Estas proteínas se encuentran en baja

concentración relativa a las proteínas 19 a 38kDa, sugiriendo que pueden ser expresadas en menor cantidad en la saliva. La base de datos de transcritos salivales de *T. dimidiata* muestra dos genes con péptidos que predicen secreción y que tendrían el peso molecular menor a 20 kDa, se encontraron en bajo número relativo al total de transcritos por lo que es posible que éstos codifiquen las proteínas detectadas por el suero post-exposición a la picadura. La secuenciación de dichas proteínas podrá confirmar si estos transcritos podrían ser usados para generar en un futuro péptidos recombinantes para desarrollar una prueba serológica como la propuesta por Schwarz *et al.*

El suero de gallinas expuestas a la picadura de *T. infestans* presentó una reactividad cruzada con las proteínas salivales (14 y 21kDa) de *T. brasiliensis*, *T. sordida*, *R. prolixus* y *P. megistus* (Schwarz, Sternberg *et al.* 2009). Los anticuerpos específicos producidos por gallinas expuestas a *T. dimidiata* únicamente presentan reacción cruzada al antígeno de 14kDa por lo que se sugiere continuar el estudio sobre la reactividad de este antígeno con otros vectores para establecer su uso como marcador biológico de exposición.

En la exposición de Schwarz *et al.*, el péptido más pequeño (de 11 kDa) no fue incluido en el panel para la producción de proteína recombinante, aunque en esta investigación se considera que dicho péptido podría ser un buen candidato, dada su presencia en *R. prolixus* y *T. dimidiata*.

El siguiente paso es la secuenciación y clonación de esta proteína para obtener un antígeno recombinante y lograr el desarrollo de un método serológico de exposición al vector. Sin embargo, es necesario evaluar la utilidad del antígeno de 11 kDa para desarrollar un método de detección con mayor sensibilidad y especificidad, utilizando una combinación de varios antígenos.

## VI. CONCLUSIONES

- Se identificaron dos bandas proteicas de aproximadamente 11 y 14 kDa en extractos salivales de *T. dimidiata* provenientes de México y de Guatemala que son reconocidos por anticuerpos IgG en sueros de gallinas expuestas a una tasa baja de *T. dimidiata* de México.
- Los anticuerpos aparecieron a la semana 8 y persistieron 10 semanas después de parar la exposición en la gallina Test 1. En la gallina Test 2 solamente se detectó la respuesta inmune entre las semanas 16 y 18 de exposición.
- La mayor concentración de proteínas salivales para *Triatoma dimidiata* se encuentra en un rango de 19 a 38kDa aproximadamente
- La similitud del perfil proteico entre las subespecies de *T. dimidiata* utilizadas fue de 87.5% y la similitud de *T. dimidiata* (Manacal, México) con *R. prolixus* fue de 56.25%
- Los sueros de las gallinas inmunizadas con *T. dimidiata* (Manacal, México) fueron reactivos incluso dos semanas de post-exposición lo cual indica que los anticuerpos específicos continúan circulando.

## VII. RECOMENDACIONES

- Utilizar gallinas criadas desde el huevo, bajo condiciones de bioterio, para reducir la exposición a insectos hematófagos y evitar la detección de anticuerpos no específicos previos a una inmunización en la que se debe utilizar al menos 4 individuos experimentales.
- Implementar métodos para extraer la saliva de triatóminos para realizar el análisis proteico, ya que los sobrenadantes de glándula salival pueden contener proteínas no secretadas.
- Cuantificar las proteínas utilizando un método comercial para estandarizar la concentración de proteína salival que se utiliza en los procedimientos de SDS-PAGE y Western Blot, asegurando la reproducibilidad de los resultados.
- Se sugiere utilizar un marcador apropiado de masa molecular de las proteínas y/o antígenos, debido a que el utilizado es de amplio espectro dificultándose la estimación exacta. de las mismas.
- Utilizar geles de gradiente de poliacrilamida del 4 – 20% en el SDS-PAGE para lograr una mejor separación de las proteínas salivales
- Realizar duplicados o triplicados de cada uno de los sueros utilizados en este proyecto para evaluar la reproducibilidad de los ensayos.
- Efectuar electroforesis en dos dimensiones para lograr la separación de las proteínas con base a la masa molecular y carga.
- Hacer un análisis genotípico de las *T. dimidiata* utilizadas, para determinar si existe una diferencia en el tipo genético debido a que existen diferentes tipos en el área endémica y utilizar como marcador la secuencia del espacio interno transcrito 2(ITS-2, por sus siglas en ingles).

## VIII. REFERENCIAS

- 1 Andersen, J., Gudderra, N., Francischetti, I., & Ribeiro, J. (2005). The role of salivary proteins on blood feeding by *Rhodnius prolixus*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 58, 97 - 105.
- 2 Bustamante, D. M., Monroy, C., Pineda, S., Rodas, A., Castro, X., Ayala, V., et al. (2009). Risk factors for intradomiciliary infestation by the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata* in Jutiapa, Guatemala. *Cad Saude Publica*, 25 Suppl 1, S83-92.
- 3 Christensen, H., Sousa, O., & Vásquez, A. (1988). Host feeding profiles of *Triatomadimidiata* in peridomestic habitats of western Panama. *Am Trop Med Hyg*, 38 (3), 477 - 79.
- 4 Cruz, N. (2012). Antibody response in hens to triatomine bites as a surveillance tool for *Triatoma dimidiata* infestation, 38.
- 5 Gurtler, R. E., Cecere, M. C., Lauricella, M. A., Cardinal, M. V., Kitron, U., & Cohen, J. E. (2007). Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology*, 134(Pt 1), 69-82
- 6 Hashimoto, K., Cordon-Rosales, C., Trampe, R., & Kawabato, M. (2006). Impact of single and multiple residual spraying of pyrethroid insecticides against *Triatomadimidiata* (Reduviidae: Triatominae); the principal vector of Chagas disease Jutiapa, Guatemala. *Am J Trop Med Hyg*, 75 (2), 226 - 30
- 7 Kato, H., Jochin, R., Gómez, E., Sakoda, R., Iwata, H., Valenzuela, J., y otros. (2010). Repertoire of the dominant transcripts from the salivary glands of the blood-sucking bug *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease. *Infect Genet Evol*(2), 184-91.
- 8 Kirchoff, L. V. (17 de Diciembre de 2009). *Emedicine*. Recuperado el 10 de Octubre 2010, de <http://emedicine.medscape.com/article/214581-overview>
- 9 Laranja, F., Dias, E., Nobrega, G., & Miranda, A. (1956). Chagas' Disease A Clinical, Epidemiologic and Pathologic Study. *Circulation*, 14, 1035 - 1060
- 9 Lent, H. e. (1999). Addenda et corrigenda, In: Carcavallu RU et al., eds. Atlas of Chagas disease vectors in the Americas. *FIOCRUZ*, 3, 1183 - 1192.

- 10 Montfort, W., Weichsel, A., & Andersen, J. (2000). Nitrophorins and related anti hemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood sucking arthropods. *Biochim Biophys Acta* 1482 , 110 - 118.
- 11 Nakagawa, J., Hashimoto, K., Cordon-Rosales, C., Juárez, A., Trampe, R., & Marroquín, L. (2003). The impact of vector control on *Triatoma dimidiata* in the Guatemala department of Jutiapa. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 97 (3), 2089 -2298.
- 12 Organización Panamericana de la Salud, O. (2003). *Comisión intergubernamental de la iniciativa de los países centroamericanos para la interrupción de la transmisión vectorial y transfuncional de la enfermedad de Chagas. Reunión internacional para el establecimiento de certificación de la eliminación de Rhodnius prolixus en Guatemala*. Guatemala.
- 13 Peñaveler, L., Fajardo, J., & Aguilar, F. (1958). Aporte al conocimiento de la enfermedad de Chagas en Guatemala. *Rev Col Med Guat*, 4, 20 - 35.
- 14 Quintal, R., & Polanco, G. (1977). Feeding patterns of *Triatoma dimidiata maculipennis* in Yucatán, México. *The American Journal of Tropical Disease and Hygiene*(1), 176 - 78.
- 15 Ramsey, J., & CJ, S. (2003). Control of Chagas Disease Vectors. *Salud Pública Mexicana*, 45 (2), 123 - 128.
- 16 Sasaki, H., Rosales, R., & Y, T. (2003). Host feeding profiles of *Rhodnius prolixus* and *Triatoma dimidiata* in Guatemala (Hemiptera; Reduviidae: Triatominae). *Med Entomol Zool*, 54 (3), 282 - 289.
- 17 Schwarz, A., Helling, S., Collin, N., Teixeira, C., & Medrano-Mercado, N. (2009). Immunogenic salivary proteins of *Triatoma infestans*: Development of a recombinant antigen for the detection of low-level infestation of triatomines. *PLoS Negl Trop Dis*, 3 (10).
- 18 Schwarz, A., Sternberg, J., Johnston, V., Medrano-Mercado, N., Anderson, J., Hume, J., y otros. (2009). Antibody response of domestic animals to salivary antigens of *Triatoma infestans* as biomarkers for low levels infestation of triatomines. *International Journal for Parasitology*, 39, 1021 - 1029.
- 19 Strosberg, A., Barrio, K., Stinger, V., Tashker, J., Wilbur, J., Wilson, L., y otros. (2007). *Chagas disease: A Latin American nemesis*. Institute for One World Health.
- 20 Tabaru, Y., Monroy, C., Rodas, H., Mejía, M., & Rosales, R. (1999). The Geographical distribution of vectors of Chagas disease and populations at

- risk of infection in Guatemala. *Med Entomol Zool*, 50, 9 - 17.
- 21 World of Health Organization, W. (2000). *Control of Chagas Disease. Second report of the WHO expert committee*. Basilia, Brasil.
  - 22 World of Health Organization. (2000). *Global Collaboration for Development of Pesticides for Public Health (GCDPP)-Challenge of Chagas Disease Vector Control in Central Am3rica*. Geneva: World Health Organization
  - 23 Zeled3n, R. (1981). *El Triatoma dimidiata (Latreille 1811) y su relaci3n con la enfermedad de Chagas*. San Jos3, Costa Rica: Editorial universitaria estatal adistancia. INCIENSA.
  - 24 Zeledon, R., Calvo, N., Montenegro, V. M., Lorosa, E. S., & Arevalo, C. (2005). *A survey on Triatoma dimidiata in an urban area of the province of Heredia, Costa Rica*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100(6), 507-512.
  - 25 HYPERLINK  
"[http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_905.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905.pdf)"[http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_905.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905.pdf)