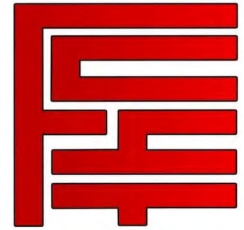




**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN SIMÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA**  
**CARRERA DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**



**PREVALENCIA DE INFECCIÓN DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN  
*TRITOMA INFESTANS* EN OCHO COMUNIDADES GUARANÍES  
DE LA REGIÓN DE LAGUNILLAS, PROVINCIA CORDILLERA,  
SANTA CRUZ**

Tesis, Presentada Para Optar al Diploma Académico de Licenciatura en Biología

**Presentada por:** MARIEL DENISSE VERGARA PRADO

**Asesor:** Dr. Frédéric Lardeux, Institut de Recherche pour le Développement, (IRD)

**Co Asesora:** Dra. Ana Lineth García Orellana, IIBISMED y Carrera de Biología, UMSS

**COCHABAMBA - BOLIVIA**

Mayo, 2022

## **Dedicatoria**

A mis papas, Humberto y Lena por haberme apoyado con mi carrera desde el principio, preocuparse por mi vida profesional, mi bienestar en todo momento y por todo el amor y cariño brindado.

A mi familia, que siempre ha sido muy atenta conmigo, a mis abuelitos, Julio y Delina quienes me apoyaron y brindaron su cariño en cada paso que di, a mi hermana Favi, mis primos y tíos más cercanos por acompañarme en mi día a día y el transcurso de mi carrera, gracias por su apoyo y cariño brindado.

A esas personas incondicionales, a quienes considero mi familia, que me han acompañado en mi formación profesional, en mi desarrollo y crecimiento personal desde mi vida escolar hasta mi camino en el escultismo, que hoy en día siguen siendo muy cercanos: Adri, Fabi, Leffon, Pablo, Clauder, Juan Pablo, Dani, Brian, Jorge, Giss, Vio, Fabio, y muchas personas especiales que considero importantes en mi vida actualmente.

Gracias por ser parte de mi vida y acompañarme en el desarrollo de esta tesis.

## Agradecimientos

Primeramente, agradecer a la Universidad Mayor de San Simón y a la Carrera de Biología por brindarme los conocimientos necesarios y la experiencia que conlleva esta apasionante carrera profesional, he conocido a muchos docentes y biólogos en mi camino como estudiante y auxiliar que hacen un excelente trabajo.

Agradecimientos especiales a mis tutores, el Dr. Frédéric Lardeux quien me guio en la idea y elaboración de este proyecto hasta el final y a la Dra. Ana Lineth García Orellana por brindarme su apoyo y conocimientos en la realización del trabajo.

Agradezco a todas las entidades que trabajaron de la mano junto a este proyecto, al IRD (Institut de Recherche pour le Développement) quienes hicieron posible que este trabajo se lleve a cabo junto a la empresa TOTAL, del Banco de Desarrollo de América Latina CAF (Corporación Andina de Fomento). Al IIBISMED (Instituto de Investigaciones Biomédicas) y a LEMUMSS (Laboratorio de Entomología Médica) por la capacitación y la guía realizada en el procesamiento de las muestras en laboratorio.

A la Lic. y amiga Libia Torrez, por apoyarme y acompañarme a lo largo de toda esta travesía, darme ánimos, valiosos consejos, colaborar y dirigirme en la realización de este trabajo y hacer más fácil mi camino.

A la Dra. Nair Montaña, por el apoyo en el procesamiento de muestras en laboratorio, brindarme sus conocimientos amablemente y colaborar en la corrección de documentos.

A la Dra. Nora Medrano, por su tiempo brindado a la corrección de documentos y los valiosos consejos que fueron tomados en cuenta en este proyecto.

A los profesionales que siguieron mi trabajo y ayudaron en gran medida, al MSc. José Carlos Pérez Zubieta por brindar sus conocimientos en el análisis de datos y la parte estadística, a la MSc. Cecilia Angulo y a la Dra. Anabelle de la Barra por el apoyo en el procesamiento de muestras por PCR, y a los investigadores y amigos que trabajaron con el Laboratorio de Entomología Médica y me apoyaron desde el inicio, Dr. Jorge Espinoza, Lic. Wendy Buhezo, Lic. André Coca y Deysi Vásquez.

A las familias de las ocho comunidades guaraníes de este estudio que nos recibieron cordialmente y nos permitieron realizar la captura de triatominos en sus viviendas.

## FICHA RESUMEN

El parásito *Trypanosoma cruzi* es conocido como el agente causal de la enfermedad de Chagas. En Bolivia, el vector principal de este parásito es el insecto *Triatoma infestans* (Triatominae, Reduviidae). En la región de Lagunillas (Cordillera, Santa Cruz), en 8 comunidades (Curupaiti, El Tunal, Itaimi, Iviyeca, Tasete, Tenta Piau, Yaiti y Yapumbia) se desarrolló el proyecto científico CHAGLAG que significa “*Estudio de la enfermedad de Chagas en la zona de Lagunillas*”, donde se realizó el presente estudio que representa una línea de base para coleccionar los datos necesarios para entender mejor las condiciones de transmisión de la enfermedad de Chagas en la zona y determinar la prevalencia de infección de *Trypanosoma cruzi* en *Triatoma infestans*.

Se muestrearon 195 viviendas entre las 8 comunidades del estudio, de estas, 48% resultaron infestadas por *Triatoma infestans*, capturándose entre 1 y 153 ejemplares por casa mediante la técnica “búsqueda activa” que consiste en la revisión de las instalaciones con linternas y pinzas. En total, se coleccionaron 1640 *Triatoma infestans* (1142 ninfas y 498 adultos) tanto en el domicilio (dormitorios, cocinas, salas) como en el peri domicilio (gallineros, trojes, depósitos, corrales). Se seleccionaron al azar 883 de estos ejemplares, los cuales fueron procesados por PCR analizando el tracto digestivo de los insectos en búsqueda del parásito. La prevalencia global fue de 4.99%, variando entre comunidades del 2% (en Iviyeca) al 10% (en El Tunal y Curupaiti).

En cuanto a los DTUs (Discrete Typing Units) del parásito, la prevalencia global se dividió en 3% para el DTU TcI, 1.64% para el grupo [TcII – TcV - TcVI] y 0.23% para el grupo [TcIII - TcIV], indicando que la transmisión era más doméstica que silvestre.

La prevalencia de infección fue estadísticamente más elevada en los triatominos capturados en el intra domicilio (5,31%) que en el peri domicilio (1,98%), especialmente en los dormitorios, que fueron los ambientes donde la prevalencia de infección fue la más alta (4,71%).

En cuanto al estadio de desarrollo, los triatominos adultos resultaron más infectados que las ninfas, con 8,35% y 1,31% respectivamente. Sin embargo, en las 8 comunidades de estudio, la transmisión de *Trypanosoma cruzi* por *Triatoma infestans* obtuvo un nivel bajo, pero epidemiológicamente significativo para mantener una incidencia positiva. Se recomienda entonces iniciar un programa de control vectorial, tal como lo presenta el proyecto CHAGLAG.

# ÍNDICE GENERAL

Ficha resumen .....	iv
Índice general .....	v
Índice de figuras .....	vii
Índice de tablas .....	vii
1. Introducción .....	1
2. Justificación del estudio .....	3
3. Objetivos .....	5
3.1. Objetivo general .....	5
3.2. Objetivos específicos .....	5
4. Marco teórico .....	6
4.1. La enfermedad de Chagas .....	6
4.1.1. Epidemiología .....	6
4.1.2. Vías de infección .....	7
4.1.3. Los insectos vectores .....	7
4.1.4. El parásito: <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	9
4.2. Detección de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	10
4.2.1. Técnicas de diagnóstico de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	11
4.2.2. Identificación de los DTUs de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	11
4.3. Prevalencia de infección en triatomíneos .....	12
4.4. Situación actual de la enfermedad en Bolivia .....	12
4.5. Control de la transmisión .....	12
5. Material y Métodos .....	14
5.1. Zona de estudio .....	14
5.2. Muestreo de los triatomíneos .....	16
5.2.1. Captura de los triatomíneos .....	16
5.2.2. Procesamiento de las muestras en el terreno .....	17
5.3. Identificación de <i>Trypanosoma cruzi</i> en los triatomíneos .....	18
5.3.1. Disección del contenido intestinal de triatomíneos .....	18
5.3.2. Conformación de grupos de contenido intestinal para extracción de ADN .....	19
5.3.3. Extracción del DNA .....	19
5.3.4. Identificación de <i>Trypanosoma cruzi</i> por PCR .....	19
5.4. Base informática .....	20
5.5. Análisis de datos .....	20
5.5.1. Presencia de <i>Triatoma infestans</i> en viviendas .....	20
5.5.2. Prevalencia de <i>Trypanosoma cruzi</i> en <i>Triatoma infestans</i> .....	21
5.5.3. Relaciones entre la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> en <i>Triatoma infestans</i> y factores bio ecológicos .....	21
5.5.3.1. Análisis univariados .....	22
5.5.3.2. Análisis multivariados .....	23
6. Resultados .....	24
6.1. Presencia de <i>Triatoma infestans</i> en viviendas .....	24
6.2. Prevalencia de <i>Trypanosoma cruzi</i> en <i>Triatoma infestans</i> .....	26
6.2.1. Prevalencia global .....	26
6.2.2. Relaciones con factores bioecológicos .....	28
6.2.2.1. Relación con el estadio de desarrollo .....	28

6.2.2.2. Relación con el estado de nutrición.....	29
6.2.2.3. Relación con la ubicación de la captura en la vivienda.....	29
6.2.2.1. Relación con el lugar de captura dentro la vivienda .....	30
6.2.2.2. Relación con la comunidad de captura.....	31
6.2.2.3. Regresión logística .....	32
7. Discusión .....	35
8. Conclusión .....	39
9. Bibliografía .....	40
Anexos .....	45
Anexo 1. Hoja de información y de consentimiento del proyecto CHAGLAG .....	46
Anexo 2. Protocolo operativo estandarizado de disección de triatominos.....	51
Anexo 3. Protocolo operativo estandarizado de conformación de pooles de triatominos .....	53
Anexo 4. Protocolo operativo estandarizado de extracción .....	54
Anexo 5. Protocolo operativo estandarizado de PCR Múltiplex .....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- <i>Triatoma infestans</i> .....	9
Figura 2.- Formas celulares de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	10
Figura 3.- Mapa de ubicación del Municipio de Lagunillas y las 8 comunidades de estudio. .....	14
Figura 4.- Viviendas de Curupaiti y El Tunal, típicas de la zona de estudio.....	15
Figura 5.- Animales domésticos y de corral habitando dentro las viviendas. ....	16
Figura 6.- Técnica de búsqueda activa.....	17
Figura 7.- Proceso de disección del contenido intestinal de triatominos.....	18
Figura 8.- Productos amplificados en la electroforesis y ejemplo de un grupo positivo con 200 pb. ....	27

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Coordenadas geográficas y datos poblacionales de las 8 comunidades de estudio. .....	14
Tabla 2.- Datos de captura de las viviendas.....	24
Tabla 3.- Índices entomológicos de las 8 comunidades de estudio. ....	25
Tabla 4.- Número de <i>T. infestans</i> capturados por comunidades y estadio.....	26
Tabla 5.- Número de <i>T. infestans</i> capturados por estadio y estado de nutrición. ....	27
Tabla 6.- Número de grupos infestados con <i>T. cruzi</i> de acuerdo al estadio de desarrollo y los resultados de prevalencia de infección. ....	28
Tabla 7.- Relación de probabilidades en el factor de estadio de desarrollo.....	28
Tabla 8.- Número de grupos infestados con <i>T. cruzi</i> de acuerdo al estado de nutrición y los resultados de prevalencia de infección. ....	29
Tabla 9.- Número de grupos infestados con <i>T. cruzi</i> de acuerdo a la ubicación de captura en la vivienda y los resultados de prevalencia de infección. ....	29

Tabla 10.- Relación de probabilidades en el factor de ubicación de la captura en la vivienda. .....	29
Tabla 11.- Número de grupos infestados con <i>T. cruzi</i> de acuerdo al lugar de captura dentro la vivienda y los resultados de prevalencia de infección. ....	30
Tabla 12.- Relación de probabilidades en el factor lugar de captura dentro la vivienda. ....	30
Tabla 13.- Número de grupos infestados con <i>T. cruzi</i> de acuerdo a la comunidad de captura y los resultados de prevalencia de infección. ....	31
Tabla 14.- Relaciones de probabilidades en el factor de comunidad de captura (con resultados estadísticamente significativos resaltados en negrita). ....	32
Tabla 15.- Número de grupos que resultaron positivos y negativos en la prueba de PCR de acuerdo al estado de nutrición, estadio de desarrollo y ubicación de la captura en la vivienda. ....	33
Tabla 16.- Relación de probabilidades en los factores de estado de nutrición, estadio de desarrollo y ubicación de captura en la vivienda. ....	34
Tabla 17.- Tabla de probabilidades de presencia de <i>T. cruzi</i> en <i>T. infestans</i> en base a los factores bioecológicos. ....	34
Tabla 18.- Reactivos utilizados para preparar la mezcla PCR. ....	59
Tabla 19.- Periodos de incubación de las muestras en el termociclador – Modo Multiplex	59



# 1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, también llamada *Tripanosomiasis americana* es una antroponosis parasitaria hística y hemática cuyo agente etiológico es *Trypanosoma cruzi*, un protozoo flagelado hematófago que anida y se reproduce en tejidos (Szarfman, Urman et al. 1975, Cardinal, Orozco et al. 2014). El parásito afecta a mamíferos incluyendo al hombre, produciendo patologías terminales manifestándose con alteraciones cardíacas, digestivas o neurológicas, que pueden conducir a la muerte (WHO 2002). Su área endémica es limitado al continente americano que se extiende entre el paralelo 42° latitud Norte y el paralelo 45° latitud Sur; actualmente constituye un problema de salud pública en Latinoamérica donde 8 a 9 millones de personas en 21 países son afectadas y 90 millones se encuentran en riesgo de contraer la infección (WHO 2010).

La infección por el parásito procede de varias vías de contaminación y en el hombre la contaminación a través de insectos vectores hematófagos de la subfamilia Triatominae es responsable de aproximadamente 75% de los casos (Schofield 1985). La contaminación por vía transfusional o por trasplante de órganos es la principal fuente fuera del área endémica debido a migraciones de trabajadores a países externos (Storino 1984, Tonn 1988). La transmisión congénita también puede tener un papel epidemiológico importante (Howard, Xiong et al. 2014), como en el sur de Bolivia donde la tasa de transmisión puede llegar al 5.1% (Salas, Cot et al. 2007). Otras maneras de transmisión menos frecuentes son los accidentes de laboratorio (Herwaldt 2001), y el consumo de bebidas o alimentos contaminados con las heces del triatomo en las cuales se encuentran los parásitos (Noya, Díaz-Bello et al. 2010). En Bolivia por ejemplo se ha descrito un brote de transmisión oral en la región amazónica debido al consumo del jugo elaborado con el fruto de la palmera *Oenocarpus bataua*, el cual resultó estar contaminado con las heces de triatomos del género *Rhodnius* (Durán, Ali et al. 2012).

La infección guarda estrecha relación con la ignorancia y la falta de higiene, la Organización Mundial de la Salud la considera una enfermedad tropical desatendida y un indicador de pobreza, que afecta a poblaciones con poca visibilidad y poca voz política, causa discriminación y tiene impacto considerable sobre la mortalidad (WHO 2010, Ventura-

García, Roura et al. 2013). Tradicionalmente se limitó a zonas rurales pobres de Centro y Sudamérica, donde se transmitía a través de vectores. En Bolivia los habitantes de viviendas precarias infectadas están expuestos continuamente a picaduras de vectores. Sin embargo, a pesar de estos factores, la incidencia de infección por *T. cruzi* en poblaciones humanas está entre 0,1% - 4% por año en zonas hiperendémicas como el Chaco Boliviano (Felicangeli, Campbell-Lendrum et al. 2003, Samuels, Clark et al. 2013). La migración interna reciente de las zonas rurales a las urbanas, la transmisión congénita y la donación de sangre permitieron que la enfermedad se propague a zonas no afectadas, principalmente las grandes zonas urbanas (Bowman, Kawai et al. 2008), de esta manera la prevalencia de infección por *T. cruzi* en Bolivia llegó a 6,1 casos por cada 100 habitantes (WHO 2015).

Aunque fue descubierta hace más de 100 años, continúa ofreciendo desafíos a los investigadores para encontrar una cura a la infección que sigue siendo un problema relevante social y económico en muchos países de América Latina (Rassi Jr, Rassi et al. 2010), por ello en la actualidad el control de los vectores es la principal forma de disminuir la proliferación de la enfermedad (Gainza 2011).

Existen varios métodos para la detección del parásito, como métodos de cultivo en medios específicos, métodos directos de detección del *Trypanosoma cruzi* y métodos de biología molecular como la PCR, este último ha sido una alternativa a las técnicas convencionales ya que es capaz de detectar incluso fragmentos de parásito. Existen diferentes PCR que utilizan diferentes dianas del parásito como el mini círculo del kADN y la secuencia repetida del ADN satélite. Los diferentes protocolos de PCR permiten detectar el genoma de un solo parásito e incluso cantidades inferiores, por lo que es una herramienta de gran utilidad en los estudios de la enfermedad de Chagas (Riera 2013).

Dentro algunos factores que influyen en la persistencia de la enfermedad de Chagas en nuestro entorno, tenemos la falta de información sobre esta enfermedad que llega a las comunidades alejadas y la falta de percepción sobre la importancia del problema en la región, por lo que existe la impostergable necesidad de fortalecer la enseñanza sobre el Chagas y además de otras patologías de impacto regional (Moretti 2012). También existen otros factores que buscan ser analizados dentro este estudio para determinar si tienen alguna

influencia en la persistencia del parásito del Chagas a nivel de los triatomíneos, como el estadio de desarrollo de estos insectos, su estado de nutrición, el lugar donde fueron capturados dentro de las viviendas y entre las comunidades de estudio también.

## 2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Bolivia es un país altamente endémico en enfermedad de Chagas, que muestra los niveles más altos de infección por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) en la población y los índices más altos de infestación domiciliar por el vector *Triatoma infestans* (*T. infestans*) por sobre otras especies, lo que lo convierte en el vector principal del parásito en el país (Martínez, Chávez et al. 2007), motivo por el cual se escogió a esta especie para detectar a *T. cruzi*, ya que es un vector que rápidamente se ha domiciliado y proliferado con prontitud en ambientes humanos.

Las comunidades comprendidas en este estudio no contaban con datos previos sobre la prevalencia de la enfermedad de Chagas, pero sí habían presentado cifras de infestación de triatomíneos, por lo que se escogieron a las comunidades de Curupaiti, El Tunal, Itaimi, Iviyeca, Tasete, Tenta Piau, Yaiti y Yapumbia para conocer su situación inicial sobre la enfermedad, todas ellas pertenecen al Municipio Lagunillas, Provincia Cordillera, departamento de Santa Cruz, en la región del Gran Chaco. Dentro de esta región, *T. infestans* persiste por razones que permanecen pobremente definidas, hecho que aumenta las posibilidades de transmisión de *T. cruzi* (Gürtler, Kitron et al. 2007). En la provincia Cordillera, la región de Lagunillas presenta un nivel de pobreza de 88,5%, considerándose como hogares pobres aquellos que no pueden satisfacer sus necesidades básicas (PDM 2007-2011). En estos hogares los triatomíneos encuentran un ambiente propicio para su estadía, reproducción y anidación, por ende, las probabilidades de infección por *T. cruzi* en humanos y contraer la enfermedad de Chagas se vuelven elevadas, ya que las viviendas se encuentran hacinadas, y por lo general las paredes de estas no se encuentran revocadas, lo que permite que los insectos puedan encontrar lugares donde esconderse.

En la zona de estudio existen datos recientes de prevalencia de infección del parásito en habitantes de las comunidades (33%) (Lardeux, Torrez et al. 2018) y en animales domésticos

(2,6%) (Coca Rivero 2019) lo que coadyuva en la cadena epidemiológica de transmisión de *T. cruzi*. Por lo que es menester determinar si existen resultados similares de prevalencia en *T. infestans* infectados con *T. cruzi* en este estudio, para poder estimar los impactos de medidas de control de la transmisión o implementar programas de vigilancia epidemiológica en estas comunidades. Es por eso que LEMUMSS<sup>1</sup> desarrolla el proyecto CHAGLAG “*Estudio de la enfermedad de Chagas en la región de Lagunillas*” que pretende estudiar la transmisión de la enfermedad en comunidades guaraníes de la zona de Lagunillas y proponer métodos de control sostenibles que involucren la participación de los comunarios para prevenir la transmisión de la enfermedad en sus hogares. La línea de base del proyecto consiste en estimar la prevalencia de *T. infestans* infectados con *T. cruzi* entre otros parámetros que serán parte de este proceso por portar el conocimiento previo de la tasa de infección por *T. cruzi* en comunidades guaraníes antes de la implementación de los métodos de control.

---

<sup>1</sup> LEMUMSS: Laboratorio de Entomología Médica de la Universidad Mayor de San Simón

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la prevalencia de infección de *Trypanosoma cruzi* en *Triatoma infestans* en las comunidades guaraníes de Curupaiti, El Tunal, Itaimi, Iviyeca, Tasete, Tenta Piau, Yaiti y Yapumbia de la región de Lagunillas, Provincia Cordillera, Departamento de Santa Cruz.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Capturar *T. infestans* en ambientes domésticos y peri domésticos de las 8 comunidades de estudio a través del método de búsqueda activa;
- Detectar la presencia de *T. cruzi* en los insectos mediante PCR;
- Calcular los índices de infestación, densidad y concentración de triatominos a nivel de las comunidades;
- Determinar si existen factores bio ecológicos que influyan en la probabilidad de presencia de *T. cruzi* en triatominos de la especie *T. infestans*.

## **4. MARCO TEÓRICO**

### **4.1. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS**

La *Tripanosomiasis americana* o también conocida como la Enfermedad de Chagas es una parasitosis, cuyo agente causal es *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), protozooario flagelado de la familia Trypanosomatidae. Actualmente se sabe que los parásitos infectantes se hallan en las deyecciones de un vector denominado Triatomino, las cuales salen y se introducen a un organismo a través del orificio de la picadura, heridas o excoriaciones de la piel o atravesando directamente la mucosa ocular, nasal o bucal. Los triatominos se describen como insectos hematófagos pertenecientes a la subfamilia Triatominae, comúnmente conocidos en Bolivia como vinchucas, estos insectos solo existen en el continente americano, por lo que la enfermedad es considerada endémica de Latinoamérica y abarca desde los estados fronterizos del Sur de Estados Unidos hasta la Región del sur de Argentina y Chile (Pereira and Navarro 2013, WHO 2015).

Esta enfermedad se ha convertido en un problema de salud pública incluso en regiones no endémicas debido a que existen otras vías de infección del parásito, como el riesgo de infección congénita y transmisión por transfusión sanguínea de individuos infectados; y esto es favorecido por la constante migración de personas de Centro y Sur América hacia países desarrollados (Noya, Díaz-Bello et al. 2015).

La importancia de la parasitosis radica en su elevada prevalencia, grandes pérdidas económicas por incapacidad laboral y la muerte repentina de personas aparentemente sanas (Carrada-Bravo 2004).

#### **4.1.1. Epidemiología**

Se estima que 10 millones de personas están infectadas en todo el mundo, sobre todo en América Latina, donde la enfermedad de Chagas es endémica. Más de 25 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad y el año 2008, se estimó que la enfermedad de Chagas causó la muerte a más de 10,000 personas. Aunque esta enfermedad se distribuye principalmente en América Latina, en las últimas décadas se ha observado en

Europa y algunos países como Estados Unidos de América y Canadá, los cuales presentan casos asociados a esta enfermedad. Esto se debe principalmente a la movilidad de la población entre América Latina y el resto del mundo (WHO 2010).

La enfermedad se caracteriza clínicamente por la existencia de dos fases: aguda y crónica; cada una de ellas con características clínicas, criterios diagnósticos y terapéuticos diferentes. En el caso particular de la transmisión vectorial, la fase aguda se inicia con la infección y generalmente pasa desapercibida debido a que no hay síntomas o son muy leves y poco característicos, en este momento es donde se encuentran circulando por el torrente sanguíneo una gran cantidad de parásitos. En la fase crónica de la enfermedad, se puede producir miocarditis severa y menos frecuentemente agrandamiento de las vísceras huecas, tales como colon, estómago y otras vísceras manifestándose con alteraciones cardiacas, digestivas o neurológicas, que puede conducir a la muerte (Machado, Dutra et al. 2012, González Blanco, Pérez Fuentes et al. 2014).

#### **4.1.2. Vías de infección**

Hablando detalladamente de las vías de infección por el parásito, la ya mencionada transmisión vectorial afecta principalmente al hombre, a especies de animales domésticos (perros, gatos, cobayos, etc.) y mamíferos silvestres (roedores, marsupiales, armadillos, etc.) (Rassi Jr, Rassi et al. 2010). La enfermedad también puede ser transmitida al hombre por otros mecanismos, tales como la transfusión sanguínea, la transmisión transplacentaria (de madre a hijo), por la ingestión de alimentos y líquidos contaminados con *T. cruzi*, y por accidentes de laboratorio que están relacionados con el manejo de parásitos (Noya, Díaz-Bello et al. 2015).

#### **4.1.3. Los insectos vectores**

Los vectores de *T. cruzi* son insectos hemípteros hematófagos de la subfamilia Triatominae que se desarrollan en 5 estadios ninfales (N1, N2, N3, N4 y N5) antes de llegar a su etapa adulta. Los vectores más importantes son *Triatoma infestans* (*T. infestans*) en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay, Uruguay y Perú; *Rhodnius prolixus* en Colombia, Venezuela y Centroamérica; *Triatoma dimidiata* en Ecuador y América Central;

y *Rhodnius pallescens* en Panamá (OPS 2021). En general se conocen aproximadamente 141 especies adaptadas a varios entornos ecológicos, artificiales o naturales en asociación estrecha con sus huéspedes vertebrados (Telleria and Tibayrenc 2017).

Las especies de Triatominae de gran importancia epidemiológica en cuanto a la transmisión al hombre, son aquellas que se encuentran en el entorno próximo a los humanos, colonizando las habitaciones, viviendo en las grietas de las paredes y saliendo de noche para alimentarse de la sangre de las personas dormidas, momento donde comúnmente ocurre la infección (Lent and Wygodzinsky 1979). La transmisión ocurre por contacto de mucosas o de piel herida con las heces del vector infectado que contiene al parásito en su tracto digestivo. De hecho, al alimentarse, los triatominos se llenan de sangre, provocando la excreción y así la liberación de los parásitos en el medio exterior. Así, un vector eficaz para los humanos es un triatomino viviendo en el entorno cercano a la gente, capaz de defecar rápidamente al momento de la picadura sobre la piel de su huésped. De las especies de triatominos hoy reconocidas, solamente seis responderían a esta definición: *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. dimidiata*, *T. sordida*, *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus megistus* (Schofield 1994).

En Bolivia se conocen 17 especies de triatominos (Martínez, Chávez et al. 2007), de las cuales, *Triatoma infestans* (Figura 1) es el principal responsable por la transmisión domiciliar de la infección de *T. cruzi* representando más del 80% de todos los casos de transmisión de la enfermedad en los países del Cono sur (Cassab, Noireau et al. 1999). *Triatoma infestans* es una especie “domiciliada”, es decir que desarrolla todo su ciclo biológico dentro de las viviendas (y en el peri domicilio), por tanto, cerca al hombre. Además, esta especie tiene una tasa de reproducción alta que permite la formación de colonias grandes en las viviendas y sus alrededores (Noireau 1999).





Figura 1.- *Triatoma infestans*

#### 4.1.4. El parásito: *Trypanosoma cruzi*

*T. cruzi* es un protista perteneciente a la clase Kinetoplástida, orden Trypanosomatida, familia Trypanosomatidae, género *Trypanosoma*, subgénero *Schizotrypanum*, sección Stercoraria. Todos los miembros de la clase Kinetoplástida están caracterizados por la presencia de un organelo peculiar que los define, llamado cinetoplasto que contiene una red fibrosa de DNA, incluye también protozoos flagelados unicelulares que pasan por diferentes etapas morfológicas (epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes). El género *Trypanosoma* se caracteriza por utilizar dos huéspedes, uno vertebrado y otro invertebrado, para completar su ciclo de vida y el subgénero *Schizotrypanum* reúne los tripanosomas que se multiplican en los vertebrados por vía intracelular, de ahí que el nombre taxonómico completo es *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. La sección Stercoraria conforma a los tripanosomas que se desarrollan hacia la forma infectante en el tracto digestivo del vector y contaminan el mamífero por las deyecciones de éste. (Cassab, Noireau et al. 1999, Coura and Dias 2009).

En otras palabras *T. cruzi* es un parásito intracelular del huésped vertebrado, el cual es depositado en el lugar de la picadura arrastrado por las heces del vector hematófago que defeca después de la ingesta sanguínea. *T. cruzi* es una especie heterogénea con gran diversidad genética y fenotípica, clasificándose filogenéticamente en seis “unidades discretas de tipificación” (en Inglés: Discrete Typing Units o DTU) (Zingales, Andrade et al. 2009). La plasticidad y variabilidad del genoma de *T. cruzi* es elevada (Franzén, Ochaya et al. 2011) confiriendo al parásito la capacidad de invadir un número significativo de diferentes tipos

celulares, así como tener diversos tropismos de tejidos, causando diferentes sintomatologías y afecciones asociadas a la enfermedad de Chagas (De Pablos and Osuna 2012).

A lo largo de su ciclo evolutivo, el parásito sufre profundas alteraciones de forma que, de modo general, reflejan su adaptación al medio en que se localizan. Las formas celulares reciben nombres diferentes en función de su aspecto general, de la manera como el flagelo emerge del cuerpo celular y de la posición relativa de dos importantes estructuras intracelulares: el núcleo y el cinetoplasto. Las diferentes formas celulares son epimastigote, tripomastigote y amastigote (Figura 2) (Cassab, Noireau et al. 1999, Coura and Dias 2009).

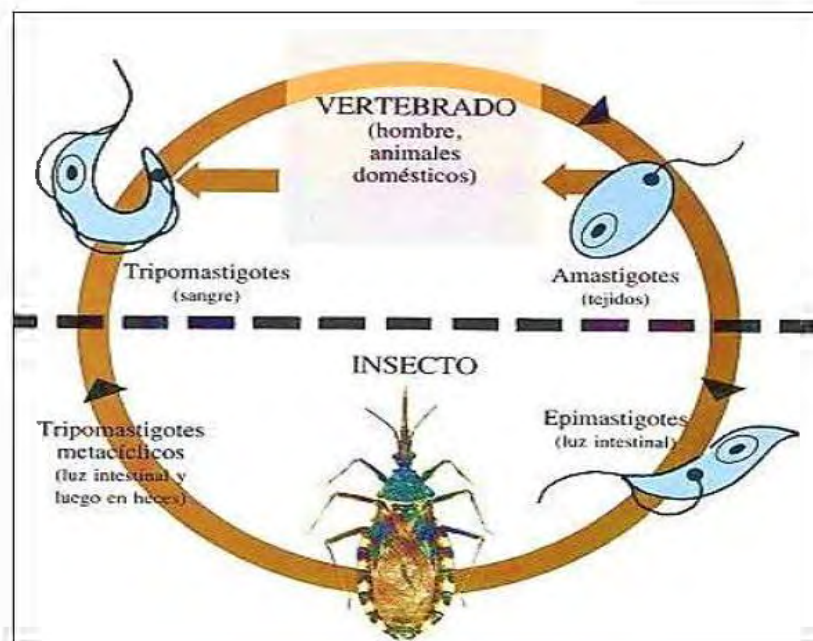


Figura 2.- Formas celulares de *Trypanosoma cruzi*.

#### 4.2. DETECCIÓN DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Diversos estudios han establecido que *T. cruzi* comprende un conjunto de poblaciones de cepas que circulan entre los seres humanos, los reservorios animales y los vectores, ya sean domésticos o silvestres. Ha sido posible aislar el parásito de diferentes hospederos y zonas de un mismo país, pudiendo así observar grandes diferencias expresadas en la morfología de los tripomastigotes, los niveles de parasitemia, el tropismo por ciertos órganos, así como en el desarrollo de diversas patologías en los mamíferos infectados (incluyendo al

ser humano, las que pueden ser desde daños leves hasta la muerte) y la sensibilidad a los medicamentos. Estas características tan variables de las cepas de *T. cruzi* han sido atribuidas a diversas causas, como factores ambientales, inmunidad, virulencia (capacidad de multiplicación en el huésped), patogenicidad (capacidad de producir lesiones en los tejidos y las respuestas inmunológicas), el paso por diferentes vectores y hospederos y finalmente el contenido de DNA. Por lo tanto, el protozoario *T. cruzi* presenta una marcada heterogeneidad a nivel fenotípico y genético, por lo que ha sido posible investigarlo por diversos métodos para correlacionarlo con los hallazgos clínicos y epidemiológicos.

#### **4.2.1. Técnicas de diagnóstico de *Trypanosoma cruzi***

Las técnicas diagnósticas están encaminadas a detectar el parásito o bien a detectar la respuesta inmune que se genera. El criterio para utilizar uno u otro test diagnóstico se basa en el conocimiento de la fase celular en que se encuentra el parásito o sospecha respecto a que fase de la infección presenta el paciente (Riera 2013).

Entre los métodos para la detección del parásito en triatominos se encuentran los métodos de cultivo en medios específicos, métodos directos de detección del *Trypanosoma cruzi* y técnicas de biología molecular como PCR y secuenciación para la determinación de los DTUs (Telleria and Tibayrenc 2017).

#### **4.2.2. Identificación de los DTUs de *Trypanosoma cruzi***

Durante varios años, numerosos marcadores moleculares se han utilizado para caracterizar la estructura poblacional de *T. cruzi*, con el objetivo de definir el número de subgrupos existentes. En el siglo XXI, la comunidad científica avanzó en el conocimiento de la diversidad de las poblaciones de *T. cruzi*, por lo que actualmente las poblaciones naturales del parásito se clasifican en seis unidades discretas de tipificación o DTUs (TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI), las cuales aparentemente se distribuyen diferencialmente entre las diversas especies de triatominos, hospedadores mamíferos y hábitats en distintas áreas geográficas dentro de las Américas (Ceballos 2010), pudiendo ser identificables por marcadores genéticos, moleculares y/o inmunológicos (Duffy 2010).

### **4.3. PREVALENCIA DE INFECCIÓN EN TRIATOMINOS**

La prevalencia de infección en los triatominos es uno de los parámetros de interés cuando se quiere estimar los impactos de medidas de control de la transmisión o implementar programas de vigilancia epidemiológica, junto con varios índices como la densidad de las poblaciones domiciliadas o peri-domiciliadas, la frecuencia de invasión de las viviendas en el caso de las especies no domiciliadas y la preferencia por la toma de sangre humana o de otros vertebrados domésticos (Guhl 2013). Comparando los valores de estos índices antes y después de una campaña de control permite evaluar el impacto en cuanto a la evolución de la transmisión.

### **4.4. SITUACIÓN ACTUAL DE LA ENFERMEDAD EN BOLIVIA**

En la primera reunión panamericana de la enfermedad de Chagas celebrada en Argentina en 1949, el investigador Rafael Torrico, el padre de la enfermedad de Chagas en Bolivia, presentó un trabajo sobre el conocimiento de la enfermedad de Chagas en Bolivia. Dijo que *T. infestans* era el principal vector y el más importante debido a su alto índice de infección, su prevalencia y amplia distribución, predominantemente en los valles, donde es un anfitrión obligado en la mayoría de las casas (Telleria and Tibayrenc 2017).

Desde entonces, nuevos estudios han determinado que el área de dispersión de *T. infestans*, cubre más del 60% del territorio, en zonas geográficas comprendidas entre los 300 a 3000 m.s.n.m. comprendiendo los departamentos de Chuquisaca, Tarija, Cochabamba, Santa Cruz, La Paz y Potosí, con un total de 168 municipios y una población en riesgo de 3.700.000 habitantes (ISSN 2015).

### **4.5. CONTROL DE LA TRANSMISIÓN**

Desde comienzos de la década de 1990, las medidas más eficaces para el control de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica tratan de disminuir la transmisión a través del control de los bancos de sangre (WHO 2002) y a través del control vectorial por tratarse de la forma de contagio más importante (Schofield 1985, Bos 1988). El control vectorial consiste actualmente en el rociado de las viviendas con insecticidas remanentes, tarea que

corresponde en Bolivia al Programa Nacional de Control de Chagas (Rojas, Barrientos et al. 2007). Desde entonces la prevalencia a nivel general descendió notablemente, sin embargo, la frecuencia de la transmisión aumentó en zonas como la cuenca amazónica (transmisión oral) y algunas partes del Gran Chaco (debido a resistencia del vector a los piretroides<sup>2</sup>) (Gurevitz, Gaspe et al. 2013).

---

<sup>2</sup> **Piretroides:** son moléculas con actividad insecticida que se aplican a cosechas, plantas de jardines, animales domésticos y también directamente a seres humanos.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. ZONA DE ESTUDIO

La recolección de triatominos se realizó en noviembre del 2017 y enero del 2018 en ocho comunidades guaraníes del Municipio de Lagunillas (Provincia Cordillera, Santa Cruz): Curupaiti, El Tunal, Itaimi, Iviyeca, Tasete, Tenta Piau, Yaiti y Yapumbia (Tabla 1). Estas comunidades están dispersadas a lo largo de 64 km de un camino Norte-Sur (Figura 3).

Localidades	Latitud (° decimales)	Longitud (° decimales)	Altitud (m.s.n.m.)	Número de viviendas	Número de habitantes
Curupaiti	-19.56	-63.64	916	38	260
El Tunal	-19.62	-63.65	907	40	169
Itaimi	-19.49	-63.67	841	38	239
Iviyeca	-19.94	-63.63	957	40	187
Tasete	-20.01	-63.64	853	20	110
Tenta Piau	-19.56	-63.66	842	14	168
Yaití	-20.06	-63.64	865	16	117
Yapumbia	-20.04	-63.64	864	8	47
Total				214	1297

Tabla 1.- Coordenadas geográficas y datos poblacionales de las 8 comunidades de estudio.



Figura 3.- Mapa de ubicación del Municipio de Lagunillas y las 8 comunidades de estudio.

El Municipio está ubicado en la región geográfica del Chaco, y sus características topográficas corresponden a las últimas estribaciones de la Cordillera de los Andes, constituida por pequeñas colinas moderadamente escarpadas con regiones planas. Tiene una temperatura media anual de 22°C y sus principales ríos son el Parapetí, Ñancahuazú, Taparasi y la Laguna Peña. En el Municipio existen grupos sociales de distinto origen como los Chañé, Guaraní, Valluno, Caray (o gente blanca) y la lengua guaraní es la más hablada al igual que el castellano. Las comunidades se dedican principalmente a la producción agrícola minifundista, con productos como el maíz, frijol, maní, zapallo, sandía, yuca y arroz; también realizan ganadería en poca escala, orientada más que todo al consumo familiar con subproductos como el queso y la leche. La actividad artesanal se limita al tejido, trabajo en arcilla, madera y cuero, actividad que genera ingresos limitados. En su territorio contempla la serranía de Incahuasi, un rico reservorio gasífero explotado por la empresa petrolera TOTAL E&P. En cuanto a la estructura social, las comunidades indígenas guaraníes escogen anualmente a capitanes a cargo de cada comunidad, los cuales coordinan los asuntos concernientes a la población (PDM 2007-2011).

En las localidades de estudio, la disposición de las casas es dispersa, pudiendo haber separaciones de 100 metros o más entre ellas y no existen muros que delimiten los territorios entre propietarios. Las viviendas por lo general contienen varias estructuras que están construidas con diferentes materiales, como adobe, ladrillo, madera y tabique, y las paredes las revocan con yeso, adobe, cemento o a menudo sin revoque (Figura 4).



**Figura 4.- Viviendas de Curupaiti y El Tunal, típicas de la zona de estudio.**



Otra convivencia que se observa es la permanencia de algunos animales domésticos o de corral dentro las diferentes construcciones de las viviendas, ya sea empollando (en caso de las aves como gallinas o patos) o caminando dentro de ellas (perros, gatos, chanchos y cabras) (Figura 5).



Figura 5.- Animales domésticos y de corral habitando dentro las viviendas.

## 5.2. MUESTREO DE LOS TRIATOMINOS

### 5.2.1. Captura de los triatominos

Los triatominos se colectaron mediante la técnica de búsqueda activa. Esta consiste en investigar todos los dormitorios, cocinas, depósitos y los anexos tales como los gallineros, corrales, trojes, nidos de gallinas, etc., utilizando linternas de mano y pinzas largas para la captura de los insectos. Se buscó principalmente en grietas y en hendiduras de las paredes internas y externas de los hogares, en los muros de piedras, ladrillos y adobes próximos a las viviendas, en las camas y colchones de las habitaciones, detrás de cuadros, ropa colgada en las paredes y en todos los lugares propicios para el desarrollo de las colonias de triatominos (Figura 6). Los triatominos capturados fueron colocados en frascos de plástico, etiquetados con un código de captura en el cual se anotó el código de la comunidad, de la vivienda, el



tipo de construcción (dormitorio, gallinero, corral, troje, etc.) en la que fueron encontrados los triatomíneos, en que pared o cama y si fue dentro o fuera de la habitación.



**Figura 6.- Técnica de búsqueda activa.**

Se visitó todas las viviendas de las 8 localidades de estudio después de hablar con los “capitanes” a cargo de cada localidad y explicarles el motivo de las visitas, además se presentó a cada vivienda la hoja de información sobre el proyecto CHAGLAG y la hoja de consentimiento, informando sobre la búsqueda activa de triatomíneos en sus viviendas (Anexo 1).

### **5.2.2. Procesamiento de las muestras en el terreno**

Al final de cada día de muestreo, los triatomíneos de cada frasco de captura fueron colocados individualmente en micro tubos de centrifugación de 1.5 ml con alcohol al 70% para su procesamiento ulterior en LEMUMSS<sup>3</sup> y el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBISMED) en Cochabamba. Cada tubo fue enumerado en secuencia, reportando en una hoja, el código de la captura, la especie del triatomíneo, sexo, estadio de desarrollo y su estado de nutrición (estomago con sangre o no).

---

<sup>3</sup> Laboratorio de Entomología Médica de la Universidad Mayor de San Simón

### 5.3. IDENTIFICACIÓN DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN LOS TRIATOMINOS

En los laboratorios de LEMUMSS e IIBISMED, el parásito *T. cruzi* fue identificado por PCR en el tracto digestivo de los triatominos mediante los siguientes procedimientos (1) Disección del contenido intestinal de triatominos, (2) Extracción del DNA y (3) PCR y lectura del gel agarosa, que se detallan a continuación.

#### 5.3.1. Disección del contenido intestinal de triatominos

El contenido intestinal de cada triatomo fue obtenido por disección de los insectos con material esterilizado (pinzas y tijeras), para cada triatomo se utilizó material de manera individual para evitar la contaminación de muestras entre individuos, siguiendo el protocolo operativo estandarizado del LEMUMSS (Anexo 2) (Figura 7). Se depositó la muestra final en tubos de 1.5 ml con 200  $\mu$ l de buffer fosfato salino (Phosphate Buffered Saline en inglés, o PBS) y se procedió a triturarla con las tijeras, posteriormente se refrigeraron a 4°C hasta su procesamiento de extracción de DNA para PCR.



Figura 7.- Proceso de disección del contenido intestinal de triatominos.

### **5.3.2. Conformación de grupos de contenido intestinal para extracción de ADN**

Para disminuir los costos de PCR, en vez de realizar extracciones individuales por cada triatomino, se decidió extraer el DNA de *T. cruzi* en grupos con 5 muestras digestivas de los triatominos. Los grupos fueron constituidos a partir de las muestras individuales, agrupadas por estadios de desarrollo y estado de nutrición. Para preparar cada grupo se colocaron los 5 tubos con las muestras digestivas en el vortex y luego se extrajo 100 µl del tracto digestivo triturado de cada tubo y se conformó una agrupación de 500 µl con el tracto digestivo de 5 insectos. Todo el procedimiento fue realizado según el protocolo del IIBISMED (Anexo 3).

### **5.3.3. Extracción del DNA**

Para aumentar el nivel de disolución del material genético contenido en los grupos de muestras y para evitar que se formaran partículas sólidas, se añadieron 200 µl de buffer de lisis junto a 40 µl de proteinasa K por cada tubo de extracción, dejándolos en disolución a 55°C por mínimo 12 horas. Luego, cada grupo fue sometido al proceso de extracción de DNA usando el protocolo “High Pure PCR Template Preparation Kit” del kit de extracción (Roche, Basel, Suiza) (Anexo 4).

### **5.3.4. Identificación de *Trypanosoma cruzi* por PCR**

Actualmente el parásito *T. cruzi* se clasifica en seis unidades discretas de tipificación (Discrete Typing Units en inglés, o DTUs): TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI, las cuales se distribuyen diferencialmente entre las diversas especies de triatominos, hospedadores mamíferos y hábitats en distintas áreas geográficas dentro de las Américas (Ceballos 2010), pudiendo ser identificables por marcadores genéticos, moleculares y/o inmunológicos (Duffy 2010).

En el presente estudio, se utilizó el protocolo de Fernandes, Santos et al. (2001) que consiste en una PCR Multiplex permitiendo identificar 3 grupos de DTUs, ([Tc I], [Tc II, Tc V, Tc VI], y [Tc III, Tc IV]). Para éste proceso se siguió los procedimientos del protocolo operativo estandarizado de PCR Múltiplex del IIBISMED que también describe las

concentraciones y cantidades usadas en los reactivos y los ciclos de amplificación de la PCR (Anexo 5).

Para la interpretación de los resultados, los productos de PCR, se visualizaron en geles de agarosa al 3% en 100 ml de TAE (1X) y los geles se tiñeron con 15 µl de SYBR Safe DNA gel Stain. Para la corrida en la electroforesis se cargó 3 µl de buffer de carga (Azul de bromofenol); 10 µl del volumen de la muestra, y 12 µl para el marcador de peso molecular (HyperLadder IV), de 100 a 1000 pb (pares de bases). Posteriormente, los geles se sometieron a un voltaje de 100 V durante una hora, y se visualizaron los resultados bajo el transiluminador de luz UV. No hubo ninguna contaminación, ya que los controles negativos (guanidina) y el control blanco (agua tridestilada) no amplificaron ninguna banda y se esperó que las muestras positivas y los controles positivos (ADN de *T. cruzi* sacado del banco de muestras del laboratorio de IIBISMED) amplifiquen bandas de 150, 200 o 250 pb, que son los amplicones característicos generados por los DTUs Tc I (200 pb), Tc II, Tc V y Tc VI (250 pb) y Tc III y Tc IV (150 pb) (Fernandes, Santos et al. 2001, Padilla, Alvarado et al. 2017). Para aquellos grupos de muestras donde el resultado no fue claro en las fotografías tomadas en el transiluminador, se repitieron sus amplificaciones en una siguiente electroforesis.

## **5.4. BASE INFORMÁTICA**

Los datos colectados en el terreno para cada triatomino capturado y para cada vivienda, así como los resultados de la búsqueda de *T. cruzi* por PCR., fueron reportados en una base de datos informática. Para ello se usó el programa RedCAP (Research Electronic Data Capture) que permite el diseño rápido de una base de datos, la captura de datos electrónicos de manera conectada al internet (o no) y el almacenaje de los datos de manera segura (Harris, Taylor et al. 2009).

## **5.5. ANÁLISIS DE DATOS**

### **5.5.1. Presencia de *Triatoma infestans* en viviendas**

Para realizar una comparación de la infestación de *T. infestans* a nivel de las comunidades, se calcularon los siguientes tres índices:

- a. Índice infestación (II): de las viviendas visitadas, es el porcentaje de viviendas positivas.

$$II(\%) = \frac{\text{Número de viviendas con triatominos}}{\text{Número total de viviendas visitadas}} * 100$$

- b. Índice de densidad (ID): es el promedio de triatominos por vivienda visitada.

$$ID = \frac{\text{Número total de triatominos}}{\text{Número total de viviendas visitadas}}$$

- c. Índice de concentración (IC): es el promedio de triatominos por vivienda positiva.

$$IC = \frac{\text{Número total de triatominos}}{\text{Número de viviendas con triatominos}}$$

### **5.5.2. Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en *Triatoma infestans***

Al haber trabajado con grupos de cinco insectos para identificar a *T. cruzi*, se utilizaron técnicas estadísticas que permitieran estimar una prevalencia con un intervalo de confianza del 95% a partir de los datos de grupos de muestras positivos y el total general. Para dichos cálculos, se usó el sitio Epitools, que permite utilizar las estadísticas adecuadas cuando las muestras se encuentran agrupadas (Sergeant 2018). En este caso las calculadoras de Epitools estaban especialmente diseñadas para estimar la prevalencia a partir de muestras con un tamaño de grupo fijo (5 individuos por grupo), usando pruebas de sensibilidad y/o especificidades de la PCR de detección del parásito del 100%.

### **5.5.3. Relaciones entre la infección por *Trypanosoma cruzi* en *Triatoma infestans* y factores bio ecológicos**

Los factores bioecológicos fueron los siguientes:

- El estadio de desarrollo del triatomo con 5 modalidades: N2, N3, N4, N5 y adultos, o con dos modalidades: ninfas y adultos.

- Su estado de nutrición con dos modalidades: flaco y alimentado.
- La ubicación de la captura con dos modalidades: intra y peri domicilio.
- El lugar de captura en el cual fue encontrado el triatomino dentro la vivienda con 5 modalidades: dormitorio, gallinero, intra de otros ambientes, peri de otros ambientes y trojes, o con dos modalidades: gallineros y dormitorios.
- La localidad de captura, con 8 modalidades correspondiente a las 8 comunidades del estudio.

Para cada factor, solo se tomaron en cuenta los tubos que contuvieran muestras homogéneas, y se descartaron los tubos con muestras mezcladas relativamente al factor de estudio. Por ejemplo, al estudiar la relación entre el estado de nutrición (“flaco” / “alimentado”) y la prevalencia de infección, se tomaron en cuenta los tubos en los cuales los 5 insectos fueran ya sea todos “flacos” o “alimentados” y se descartaron los tubos con mezclas entre insectos “flacos” y “alimentados”. De esta manera, la cantidad de datos presentes en cada factor bio ecológico variaron uno del otro en cuanto a la totalidad analizada.

Para estimar el grado de relación entre la infección por *T. cruzi* en los triatominos y estos factores, se realizaron análisis univariados (Odds-ratio y Chi-cuadrado) y multivariados (Regresión logística) usando el programa informático Minitab 18.1 (Minitab Inc., Pensilvania, USA).

#### 5.5.3.1. Análisis univariados

Se realizaron dos tipos de análisis univariados, Odds-ratio y Chi-cuadrado:

**Relación de probabilidades (Odds-ratio en inglés):** compara las probabilidades de ocurrencia de eventos en base a varios factores. En el estudio fue usado para analizar cada uno de los 5 factores bio ecológicos.

Para entender cómo interpretar esta estadística, Minitab establece la comparación colocando los factores en 2 columnas dentro una tabla: nivel A y nivel B. El nivel B es el nivel de referencia para el factor, (Minitab 2021).

Variable	Nivel A	Nivel B	Relación de probabilidades (Odds-ratio)	Intervalo de confianza de 95%
FACTOR	MODALIDAD 1	MODALIDAD 2	3	(0,9; 9)

La interpretación del Odds-ratio es la siguiente:

- Si el Odds-ratio  $> 1$  significa que el evento es menos probable en el nivel B.
- Si el Odds-ratio  $< 1$  significa que el evento es más probable en el nivel B.

**Chi Cuadrado:** permite determinar si existe una relación entre 2 variables categóricas (cualitativas). El chi cuadrado fue usado para establecer si existían o no relaciones entre los 5 factores bio ecológicos y los resultados de infección de los triatominos por *T. cruzi*. Es necesario resaltar que esta prueba no señala el grado o el tipo de relación entre las variables; es decir, no indica el porcentaje de influencia de una variable sobre la otra o la variable que causa la influencia (Gómez 2008). Para cada factor también se realizó su prueba chi cuadrada siguiendo un nivel de confianza del 95% ( $\alpha = 95\%$ ),

### 5.5.3.2. Análisis multivariantes

**Regresión logística binaria:** es un modelo estadístico en el que se desea conocer la relación entre una variable dependiente cualitativa dicotómica y una o más variables explicativas independientes, o covariables, ya sean cualitativas o cuantitativas (Berlanga Silvente and Vilà Baños 2014). Para la prueba de regresión logística binaria realizada en el estudio, la variable dependiente se estableció como la respuesta a la presencia del parásito o no en los triatominos, y las variables explicativas independientes fueron los factores de estadio de desarrollo, estado de nutrición y la ubicación de la captura en la vivienda.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. PRESENCIA DE *TRITOMA INFESTANS* EN VIVIENDAS

Se evaluaron un total de 195 viviendas entre las 8 comunidades de estudio (91% del total de casas) (Tabla 2), de las cuales se capturaron 1656 triatominos, de esta cantidad 16 pertenecían a la especie *Triatoma sordida* (*T. sordida*) y los restantes 1640 a la especie *T. infestans*, objeto de nuestro estudio. Existió sin embargo un renuente de 19 casas que no fueron visitadas (9%) dado que estaban deshabitadas, no se encontraban los dueños o no se permitió la visita.

Comunidad	<i>T. infestans</i> capturados	Número de viviendas	Viviendas visitadas	Viviendas positivas con <i>T. infestans</i>
Curupaiti	428	38	35	20
El Tunal	265	40	39	24
Itaimi	91	38	30	5
Iviyeca	381	40	38	16
Tasete	159	20	20	11
Tenta Piau	138	14	13	5
Yaití	20	16	12	6
Yapumbia	158	8	8	6
<b>Total</b>	<b>1640</b>	<b>214</b>	<b>195</b>	<b>93</b>

Tabla 2.- Datos de captura de las viviendas.

Entre las 8 comunidades, el promedio de infestación fue del 48%, siendo Yapumbia la comunidad con el mayor valor (75%), y el valor más bajo en Itaimi (17%) (Tabla 3). El índice de densidad en general tuvo un promedio de 8 individuos por casa visitada, con el valor máximo en la comunidad de Yapumbia (20) y el más bajo en Yaití (2). Sin embargo, la mediana del índice de densidad obtuvo un valor de 0, esto quiere decir que al menos el 50% de los datos de captura de las casas visitadas no obtuvo capturas. En el índice de concentración, el promedio entre las 8 comunidades fue de 18 individuos por casa positiva, esta vez la comunidad con el valor más alto fue Tenta Piau (28), y el más bajo se registró nuevamente en Yaití (3). Aun así, la mediana del índice de concentración (6) indicó que al



menos el 50% de los datos de captura por casa positiva obtuvo un promedio de 6 capturas por casa. El rango máximo de capturas por casa positiva fue muy elevado en todas las comunidades excepto en las comunidades de Yaití (9) y El Tunal (36), este hecho elevó los resultados en los índices entomológicos de las otras comunidades y marca una diferencia notable entre los valores de la media y la mediana de los índices, también indica que existen casas con una elevada infestación de triatominos en comparación con otras casas. Cabe recalcar además que en la comunidad de Yaiti se capturó la menor cantidad de triatominos (20) y sus índices de densidad y concentración fueron los más bajos de las 8 comunidades.

Comunidad	Índice de infestación (%)	Índice de densidad		Índice de concentración		Rangos de captura por casa positiva
		Valor (desv. est)	Mediana	Valor (desv. est.)	Mediana	
Curupaiti	57	12,2 (27,7)	2	21,4 (34,2)	11	2 - 153
El Tunal	62	6,8 (9,6)	2	11 (10,2)	8,5	1 - 36
Itaimi	17	3 (14,9)	0	18,2 (35,7)	1	1 - 82
Iviyeca	42	10 (30,4)	0	23,8 (4)	7,5	1 - 150
Tasete	55	7,9 (2)	1,5	14,4 (31,4)	6	1 - 109
Tenta Piau	38	10,6 (25,3)	0	27,6 (36,5)	2	1 - 76
Yaití	50	1,7 (2,7)	0,5	3,3 (3)	2,5	1 - 9
Yapumbia	75	19,8 (40,5)	1	26,3 (45,7)	5	1 - 117
<b>Total</b>	48	8,4 (23,1)	0	17,6 (31,1)	6	

Tabla 3.- Índices entomológicos de las 8 comunidades de estudio.

De los 1640 *T. infestans* capturados, 1142 individuos fueron ninfas (69,6%) a partir de los cuales se los identificó y separó de acuerdo a su estadio de desarrollo (N1, N2, N3, N4 y N5), se identificaron a la vez 498 triatominos adultos, 302 machos (18,4%) y 196 hembras (12%) (Tabla 4).

Comunidad	Estadios de desarrollo					Machos adultos	Hembras adultas	<i>T. infestans</i> capturados
	N1	N2	N3	N4	N5			
Curupaiti	50	34	42	73	104	75	50	428
El Tunal	13	13	40	49	81	45	24	265
Itaimi	2	19	36	18	4	5	7	91
Iviyeca	17	52	60	51	50	94	57	381
Tasete	17	42	34	21	17	16	12	159
Tenta Piau	14	12	10	10	15	46	31	138
Yaiti	8	0	0	1	4	4	3	20
Yapumbia	44	22	39	11	13	17	12	158
<b>Total</b>	<b>165</b>	<b>194</b>	<b>261</b>	<b>234</b>	<b>288</b>	<b>302</b>	<b>196</b>	<b>1640</b>

Tabla 4.- Número de *T. infestans* capturados por comunidades y estadio.

## 6.2. PREVALENCIA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN *TRITOMA INFESTANS*

### 6.2.1. Prevalencia global

Para el trabajo de laboratorio, los 1640 triatominos de *T. infestans* fueron divididos en subgrupos de acuerdo al estadio al que pertenecían y a su estado de nutrición (Tabla 5). Se eliminaron 20 individuos que no contaban con información acerca de su estado de nutrición, y quedaron 1620 triatominos con muestras digestivas disponibles, a partir de las cuales se seleccionaron aleatoriamente 883 (54,4% del total) para su procesamiento en biología molecular por PCR (sin contar con el estadio ninfal 1 ya que la probabilidad de encontrar el parásito en este estadio es muy baja), teniendo en total 177 grupos de muestras de a 5 insectos cada uno. La distribución de estos grupos según los estadios fue la siguiente: 16 grupos del estadio ninfal 2 (80 individuos), 21 grupos del estadio ninfal 3 (105 individuos), 18 del estadio ninfal 4 (90 individuos), 23 del estadio ninfal 5 (115 individuos) y 99 grupos de adultos (493 grupos).

Estadios		N1	N2	N3	N4	N5	Adultos	Total
Estado de nutrición	Alimentados	56	153	190	161	221	178	959
	Flacos	109	40	69	64	64	315	661
	Sin Información	0	1	2	9	3	5	20
<b>Total</b>		165	194	261	234	288	498	1640

Tabla 5.- Número de *T. infestans* capturados por estadio y estado de nutrición.

Del total de grupos de muestras analizadas por PCR, 40 resultaron positivos al parásito *T. cruzi*, a partir de los cuales se estimó una prevalencia global para el estudio de 4,99% (s.d. 0,77). También se estimó la prevalencia de infección a nivel de los grupos de DTUs del parásito, en total 24 grupos de muestras amplificaron 200 pb en la electroforesis (para TcI) (Figura 8), 13 grupos amplificaron 250 pb (para TcII, TcIV y/o TcVI), y 2 grupos amplificaron 150 pb (para TcIII y/o TcIV); en el caso de un grupo, amplificó 2 pares de bases a la vez (200 y 250 pb), debido a que existía más de un tipo de DTU en las muestras. Sobre estos datos, la prevalencia calculada para el primer grupo (TcI) fue de 3% (s.d. 0,059), para el segundo grupo (TcII, TcV y TcVI) fue de 1,64% (s.d. 0,59) y para el tercer grupo (TcIII y TcIV) fue de 0,23% (s.d. 0,16).

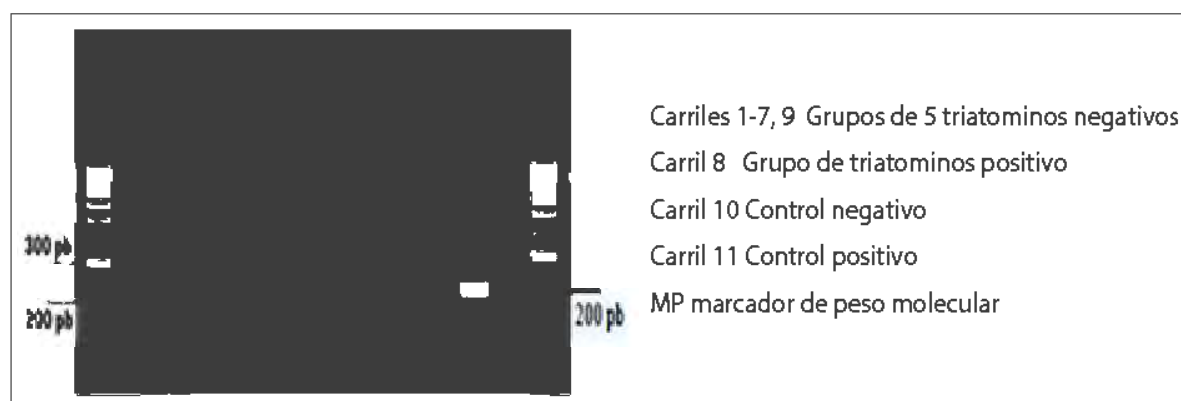


Figura 8.- Productos amplificados en la electroforesis y ejemplo de un grupo positivo con 200 pb.

## 6.2.2. Relaciones con factores bioecológicos

### 6.2.2.1. Relación con el estadio de desarrollo

La prevalencia de infección en los adultos fue de 8,35% (s.d. 1,36), 8 veces mayor a la prevalencia de las ninfas en general que fue de 1,31% (s.d. 0,58). Esta diferencia entre grupos de estadios era de esperarse, debido a que los adultos durante toda su vida, han tenido más oportunidades de infectarse que las ninfas. La relación de probabilidad fue de 7.98, estadísticamente significativa (Pearson  $P = 0,0001$ ) (Tabla 7 y Tabla 6).

Estadio de desarrollo	Nro. de grupos	Nro. de insectos	Grupos positivos	Prevalencia (desv. est.) al 95%	Intervalo de confianza
N2	16	80	3	4,07 (2,30)	0,82 - 11,48
N3	21	105	1	0,97 (0,96)	0,02 - 5,29
N4	18	90	1	1,13 (1,13)	0,02 - 6,17
N5	23	115	0	0	0
Ninfas totales	78	390	5	1,31 (0,58)	0,43 - 3,05
Adultos	99	493	35	8,35 (1,36)	5,84 - 11,47
<b>Total</b>	177	883	40	4,99 (0,77)	3,58 - 6,74

Tabla 6.- Número de grupos infestados con *T. cruzi* de acuerdo al estadio de desarrollo y los resultados de prevalencia de infección.

Factor	Nivel A	Nivel B	Relación de probabilidades	Intervalo de confianza de 95%
Estadio	Adulto	Ninfa	7,98	(2,95; 21,60)

Tabla 7.- Relación de probabilidades en el factor de estadio de desarrollo.

En el grupo de las ninfas (estadios N2, N3, N4 y N5), no se observó un crecimiento progresivo de valores entre los estadios como se esperaría (Tabla 6). Si bien la prevalencia en las N2 fue de solo  $\approx 4\%$ , en los estadios N3 y N4 se observó a penas  $\approx 1\%$  y  $0\%$  en las N5 aun cuando este grupo era compuesto de unos 115 grupos de muestras, los cuales estaban repartidos en su mayoría entre 3 casas de Curupaiti, Iviyeca y El Tunal que juntos sumaron el 36% de las muestras, los demás grupos estaban repartidos entre las demás comunidades. Estas 3 viviendas y algunas de las demás tenían muestras positivas de otros estadios, por lo que no se explica por qué no se hallaron valores positivos de prevalencia en las ninfas N5.

### 6.2.2.2. Relación con el estado de nutrición

La prevalencia de infección en los insectos alimentados fue de 4,47% (s.d. 1,03), cuyo resultado no fue significativamente diferente a la prevalencia en los insectos flacos con 5,74% (s.d. 1,19) de acuerdo a los análisis por chi cuadrado (Pearson  $P = 0.422$ ) (Tabla 8).

Estado de nutrición	Nro. de grupos	Nro. de insectos	Grupos positivos	Prevalencia (desv. est.) al 95%	Intervalo de confianza
Alimentados	88	438	18	4,47 (1,03)	2,66 - 6,99
Flacos	86	430	22	5,74 (1,19)	3,61 - 8,58
<b>Total</b>	174	868	40	5,09 (0,78)	3,64 - 6,87

Tabla 8.- Número de grupos infestados con *T. cruzi* de acuerdo al estado de nutrición y los resultados de prevalencia de infección.

### 6.2.2.3. Relación con la ubicación de la captura en la vivienda

La prevalencia de infección encontrada en individuos del intra domicilio fue de 5,31%, 3 veces mayor a la prevalencia de infección en el peri domicilio (1,98%) (Tabla 9). La relación de probabilidad fue de 2,98 estadísticamente significativa (Relación de verosimilitud  $P = 0,042$ ) (Tabla 10). Esta diferencia podría ser atribuida a la circulación doméstica del parásito, pudiendo deberse a la presencia de mamíferos infectados dentro las viviendas, ya sea domésticos o silvestres, o a la existencia de personas infectadas con Chagas anteriormente.

Ubicación	Nro. de grupos	Nro. de insectos	Grupos positivos	Prevalencia (desv. est.) al 95%	Intervalo de confianza
Intra	88	438	21	5,31 (1,13)	3,29 - 8,01
Peri	42	208	4	1,98 (0,98)	0,54 - 5,00
<b>Total</b>	130	646	25	4,18 (0,82)	2,71 - 6,12

Tabla 9.- Número de grupos infestados con *T. cruzi* de acuerdo a la ubicación de captura en la vivienda y los resultados de prevalencia de infección.

Factor	Nivel A	Nivel B	Relación de probabilidades	Intervalo de confianza de 95%
Ubicación en la Vivienda	Intra	Peri	2,98	(0,95; 9,32)

Tabla 10.- Relación de probabilidades en el factor de ubicación de la captura en la vivienda.

### 6.2.2.1. Relación con el lugar de captura dentro la vivienda

Las modalidades “troje”, “intra (otros ambientes)” y “peri (otros ambientes)”, no tenían un número suficiente de muestras para ser representativos (2, 3, 3 muestras respectivamente) (Tabla 11). Sin embargo, las 2 muestras de los trojes salieron positivas, indicando que probablemente los trojes (construcciones donde se guarda el maíz de las cosechas) son lugares donde haya una circulación regular del parásito. En los dormitorios la prevalencia de infección (4,71%) fue 6 veces mayor que la prevalencia en los gallineros (0,93%). La relación de probabilidad entre ambas construcciones fue de 5,73 estadísticamente significativa (Relación de verosimilitud  $P = 0,047$ ) (Tabla 12). Se confirma entonces nuevamente la dominancia del parásito en un ambiente del intra domicilio (dormitorios) sobre un ambiente del peri domicilio (gallineros), no obstante, aunque mínima, queda evidente la presencia del parásito en este último ambiente, y dado que las gallinas no pueden ser portadoras del parásito, podría significar que exista una circulación del parásito entre intra y peri domicilio.

Construcción	Nro. de grupos	Nro. de insectos	Grupos positivos	Prevalencia (desv. est.) al 95%	Intervalo de confianza
Dormitorios	56	278	12	4,71 (1,33)	2,43 - 8,10
Intra (otros ambientes)	3	15	0	0	0
Troje	2	10	2	1	X
Gallinero	22	110	1	0,93 (0,92)	0,02 - 5,05
Peri (otros ambientes)	3	15	0	0	0
<b>Total</b>	86	428	15	3,76 (0,95)	2,11 - 6,13

Tabla 11.- Número de grupos infestados con *T. cruzi* de acuerdo al lugar de captura dentro la vivienda y los resultados de prevalencia de infección.

Factor	Nivel A	Nivel B	Relación de probabilidades	Intervalo de confianza de 95%
Construcción de la Vivienda	Dormitorios	Gallineros	5,73	(0,69; 47,01)

Tabla 12.- Relación de probabilidades en el factor lugar de captura dentro la vivienda.

### 6.2.2.2. Relación con la comunidad de captura

La mayor prevalencia de infección se encontró en las comunidades de Curupaiti (10%) y El Tunal (9,71%), seguida de la comunidad de Tenta Piau (4,71%), Itaimi (4,36%), Yapumbia y Tasete (3,58%) y por último Iviyeca (1,55%) (Tabla 13). La comunidad de Yaití no entró en los análisis por no presentar grupos que contuvieran a todas sus muestras individuales pertenecientes a la misma comunidad, esto debido a que todas las muestras fueron escogidas aleatoriamente, y dentro de esta comunidad existían muy pocos individuos capturados.

Comunidades	Nro. de grupos	Nro. de insectos	Grupos positivos	Prevalencia (desv. est. al 95%)	Intervalo de confianza
Curupaiti	34	170	14	10,07 (2,58)	5,50 - 16,45
El tunal	20	98	8	9,71 (3,30)	4,15 - 18,46
Itaimi	5	25	1	4,36 (4,28)	0,10 - 22,27
Iviyeca	40	200	3	1,55 (0,89)	0,32 - 4,45
Tasete	6	30	1	3,58 (3,52)	0,08 - 18,54
Tenta Piau	14	70	3	4,71 (2,66)	0,95 - 13,22
Yaiti	0	0	0	0	0
Yapumbia	6	30	1	3,58 (3,52)	0,08 - 18,54
<b>Total</b>	125	623	31	5,54 (0,97)	3,78 - 7,78

Tabla 13.- Número de grupos infestados con *T. cruzi* de acuerdo a la comunidad de captura y los resultados de prevalencia de infección.

Las relaciones de probabilidad fueron estadísticamente significativas entre Iviyeca vs. Curupaiti y El Tunal con 8,6 y 8,22 respectivamente (Pearson  $P = 0,026$ ) (Tabla 14), indicando que en Curupaiti y El Tunal la probabilidad de encontrar triatominos infectados es 8 veces mayor a la de Iviyeca.

Nivel A	Nivel B	Relación de probabilidades	Intervalo de confianza de 95%
<b>Curupaiti</b>	<b>Iviyeca</b>	<b>8,63</b>	<b>(2,21; 33,65)</b>
<b>El Tunal</b>	<b>Iviyeca</b>	<b>8,22</b>	<b>(1,87; 36,04)</b>
Curupaiti	Tasete	3,50	(0,36; 33,30)
Curupaiti	Yapumbia	3,50	(0,36; 33,30)
Tenta Piau	Iviyeca	3,36	(0,59; 19,08)
El Tunal	Tasete	3,33	(0,32; 34,12)
El Tunal	Yapumbia	3,33	(0,32; 34,12)
Itaimi	Iviyeca	3,08	(0,25; 37,08)
Curupaiti	Itaimi	2,80	(0,28; 27,79)
El Tunal	Itaimi	2,66	(0,25; 28,43)
Curupaiti	Tenta Piau	2,56	(0,60; 10,91)
Tasete	Iviyeca	2,46	(0,21; 28,53)
Yapumbia	Iviyeca	2,46	(0,21; 28,53)
El Tunal	Tenta Piau	2,44	(0,51; 11,61)
Tenta Piau	Tasete	1,36	(0,11; 16,57)
Tenta Piau	Yapumbia	1,36	(0,11; 16,57)
Itaimi	Tasete	1,25	(0,05; 26,86)
Itaimi	Yapumbia	1,25	(0,05; 26,86)
Tenta Piau	Itaimi	1,09	(0,08; 13,77)
Yapumbia	Tasete	1,00	(0,04; 20,82)
El Tunal	Curupaiti	0,95	(0,30; 2,93)

**Tabla 14.- Relaciones de probabilidades en el factor de comunidad de captura (con resultados estadísticamente significativos resaltados en negrita).**

### 6.2.2.3. Regresión logística

En este análisis entraron 94 datos de pooles en condición homogénea que contenían a los siguientes factores: estado de nutrición, ubicación de la captura en la vivienda y el estadio de desarrollo (separadas en categoría ninfa y adulta), resultando ser 21 grupos de muestras positivas y 73 negativas (Tabla 15). Dado que la mayoría de los ambientes del intra domicilio eran en su mayoría dormitorios y básicamente en el peri domicilio dominaban los gallineros, no se encontró sentido tocar el factor del lugar de captura dentro la vivienda en la



regresión logística. Respecto al factor de la comunidad, también se tuvo que descartar por el tipo de datos que requiere este análisis, ya que no todas las comunidades contaban con datos tanto positivos como negativos para poder definir un resultado.

Factor	Modalidad	Resultado PCR		Total
		Negativo	Positivo	
Estado de nutrición	Flaco	30	13	43
	Alimentado	43	8	51
	Total	73	21	94
Estadio de desarrollo	Adulto	41	20	61
	Ninfa	32	1	33
	Total	73	21	94
Ubicación de la captura en la vivienda	Intra	49	18	67
	Peri	24	3	27
	Total	73	21	94

Tabla 15.- Número de grupos que resultaron positivos y negativos en la prueba de PCR de acuerdo al estado de nutrición, estadio de desarrollo y ubicación de la captura en la vivienda.

Las relaciones de probabilidades indicaron que solo el estadio de desarrollo fue estadísticamente significativo con un valor de 17,17 ( $P = 0,001$ ) (Tabla 16), en cuanto a la ubicación de la captura en la vivienda, la relación de la probabilidad fue 2,9 en favor al intra domicilio pero no resultó significativo, al igual que el estado de nutrición con un valor de 1,34 en favor a los alimentados. En consecuencia, la ecuación de la regresión logística fue la siguiente:

$$P = e^Y / (1 + e^Y)$$

Donde:

- $P$  = probabilidad de presencia de *T cruzi* en *T infestans*
- $Y = -4,51 + 0,293$  (Alimentado) + 1,066 (Intra) + 2,84 (Adulta)
- Los coeficientes para las demás modalidades “flaco”, “peri” y “ninfa” fueron 0.

<b>Factor</b>	<b>Nivel A</b>	<b>Nivel B</b>	<b>Relación de probabilidades</b>	<b>Intervalo de confianza al 95%</b>
Estado de Nutrición	Alimentado	Flaco	1,34	(0,40; 4,40)
Estadio de Desarrollo	Adulto	Ninfa	17,17	(1,98; 148,95)
Ubicación en la Vivienda	Intra	Peri	2,90	(0,67; 12,52)

**Tabla 16.- Relación de probabilidades en los factores de estado de nutrición, estadio de desarrollo y ubicación de captura en la vivienda.**

A partir de la ecuación se puede calcular la probabilidad de que un triatomino pueda contener al parásito en base a estos 3 factores bioecológicos. La probabilidad más alta se da cuando el triatomino se encuentra como adulto alimentado del intra domicilio ( $P = 0,42$ ) mientras, un triatomino que sea ninfa, flaco y del peri domicilio tiene la probabilidad más baja ( $P = 0,01$ ). Dependiendo de las diferentes combinaciones de las modalidades, los resultados están comprendidos entre estas 2 probabilidades (Tabla 17).

<b>Estadio de desarrollo</b>	<b>Adulto</b>				<b>Ninfa</b>			
	<b>Intra</b>		<b>Peri</b>		<b>Intra</b>		<b>Peri</b>	
<b>Ubicación en la vivienda</b>	Alimentado	Flaco	Alimentado	Flaco	Alimentado	Flaco	Alimentado	Flaco
<b>Estado de nutrición</b>								
<b>Probabilidad</b>	0,42	0,35	0,20	0,16	0,04	0,03	0,02	0,01

**Tabla 17.- Tabla de probabilidades de presencia de *T. cruzi* en *T. infestans* en base a los factores bioecológicos.**

## 7. DISCUSIÓN

En el Chaco boliviano, *T. sordida* no tiene un papel vector de importancia epidemiológica (Noireau, Brenière et al. 1999), mientras que *T. infestans* es el vector principal de *T. cruzi* en toda Bolivia (Romero Davalos 1979). Las capturas realizadas en las 8 comunidades de este estudio corroboraron esta información, al capturarse 1640 *T. infestans* y solamente 16 *T. sordida* (capturadas en el peri domicilio) representado 99% y 1% de las capturas respectivamente.

Dentro este estudio se utilizó la técnica de PCR para identificar *T. cruzi* en los triatomos de *T. infestans*, cuyo uso ha demostrado tener mayor sensibilidad que la microscopía y el xenodiagnóstico (Cevallos and Hernández 2001), de esta manera, la detección del parásito fue obtenida con la mayor exactitud posible. La prevalencia global de *T. cruzi* en *T. infestans* fue de aproximadamente 5%, variando de 2% al 10% entre las comunidades. Estos valores resultaron más bajos que en otras zonas del Chaco donde se observaron prevalencias promedias de 21,4% en la provincia de Velasco (Noireau, Brenière et al. 1997), 24% en el municipio de Saipina (Pérez Cascales, Sossa Soruco et al. 2020) y 27,2% en la zona noreste del Chaco Argentino (Cardinal, Orozco et al. 2014). Esta prevalencia de infección baja en la zona de estudio refleja también una infección baja de los hospederos reservorios (humanos, animales silvestres peri domésticos y animales domésticos). Se observó por ejemplo solamente 33% de infección en los habitantes de las 8 comunidades (Lardeux, Torrez et al. 2018), cifra en el rango inferior comparando con prevalencias de otros estudios donde se obtuvo 39% en el municipio de Anzaldo - Cochabamba (Muñoz Vera, Hervas Eid et al. 2004), hasta 54,4% en el noreste de Argentina (Alonso, Fabre et al. 2009). Un solo espécimen de *Rattus rattus* (roedor) fue encontrado positivo en la zona de estudio (Lardeux, Torrez et al. 2018) y solamente 2,6% de los perros resultaron infectados en las 8 comunidades (Coca Rivero 2019) cuando, en esta misma zona (región de Lagunillas) se observó una prevalencia de 9,6% en el año 2005 (Guarachi 2006).

En el estudio, una de dos casas (48% de las casas) fue encontrada positiva por *T. infestans*, cifra en el rango inferior de acuerdo a otros estudios en la región del Chaco que obtuvieron el 50.8% en la provincia de Velasco (Noireau, Brenière et al. 1997), 54,4% en el

municipio de Saipina (Pérez Cascales, Sossa Soruco et al. 2020) y del 68,9% hasta el 96,7% en la región de Camiri (Herrero 2010). Sin embargo, la infestación en las viviendas no fue homogénea existiendo algunas viviendas donde se capturaron grandes cantidades de insectos (hasta más de 100 *T. infestans*). En promedio, se capturaron 6 insectos por vivienda, cifra en el rango inferior de acuerdo a otros estudios en la región del Chaco donde más del doble se ha observado (Lardeux, Depickère et al. 2015), por ende la probabilidad de transmisión del parásito no debe ser muy alta en las comunidades de estudio.

En el proceso de transmisión del parásito, se han identificado factores bio ecológicos que elevan la probabilidad de infección en *T. infestans* por parte de *T. cruzi*, en particular se tiene la edad del insecto (su estadio de desarrollo) indicando que los adultos, al tener mayor tiempo de vida, han tenido un mayor número de ingestas que las ninfas, y, por ende, mayor probabilidad de haberse infectado con el parásito de *T. cruzi*. Sin embargo, en este estudio, si bien se encontraron N2 infectadas (prevalencia de infección del 4%) y adultos infectados (prevalencia de infección del 8%), no se evidenció N5 infectadas, debiendo esperarse un crecimiento progresivo de la prevalencia entre el 4% y 8% desde los estadios menores hasta los mayores lo que no se observa en los resultados, pese a que se buscó el origen de donde fueron capturadas estas ninfas para dar razón a la falta de presencia del parásito, y no se ha podido dar una explicación racional de por qué no hay muchos casos positivos entre los estadios. Cabe recalcar también que la presencia de ninfas infectadas de otros estadios dentro de las casas confirma la existencia de transmisión doméstica.

El estudio demostró que tanto la prevalencia de infección de los triatomíneos como el número de triatomíneos capturados, fueron más elevados en el domicilio (especialmente en los dormitorios) que en el peri domicilio, que concuerda con otro estudio en el municipio de Saipina donde capturaron el 56% de los triatomíneos en interiores y 43,8% en exteriores (Pérez Cascales, Sossa Soruco et al. 2020). Este resultado indica que aun cuando la transmisión de *T. cruzi* es baja, esta ocurre principalmente en los dormitorios donde los humanos se encuentran más expuestos. Es por eso que al colonizar así los domicilios, *T. infestans* queda como el vector más importante de la enfermedad de Chagas en Bolivia (Noireau, Brenière et al. 1999). Dentro las comunidades de estudio, la transmisión de *T. cruzi* encajó como una transmisión doméstica, como corrobora la presencia de los DTU TcI (61,6% de los DTUs) y

TcII, V, y VI (33,7% de los DTUs) que son principalmente marcadores de ciclos domésticos y fueron hallados en mayor proporción (Brenière, Aliaga et al. 2012), por lo que los humanos parecen ser el reservorio más probable del parásito. Sin embargo, no se descarta pequeños ingresos de ciclos silvestres en el área doméstico, ya que también se identificó el grupo con los DTU Tc III y IV (4,7% de los DTUs) en los resultados, que son más raramente muestreados en toda el área endémica, se hallan en zonas andinas e intermedias y parecen ser específico de los ciclos selváticos, con pocos informes de infección humana (Brenière, Aliaga et al. 2012).

La estructura, composición y uso del predio doméstico también juegan un rol importante en el peligro de la transmisión de *T. cruzi* al promover la presencia de animales domésticos y silvestres reservorios y hospederos, en los cuales también se han encontrado casos positivos de *T. cruzi* en la zona de estudio, en perros y roedores (Lardeux, Torrez et al. 2018, Coca Rivero 2019), así que la probabilidad de transmisión del parásito por animales reservorios también es un hecho.

En general, la permanencia de los triatominos en las viviendas ocasiona un riesgo para la transmisión del parásito al hombre y puede deberse a que los habitantes no combaten con eficacia la presencia del insecto, por ejemplo, realizando limpiezas profundas y continuas de sus viviendas y mejoramiento físico de sus habitaciones (como el revoque de las paredes para eliminar las grietas donde se esconden los triatominos). Según estudios, la limpieza de las viviendas se realiza en las comunidades guaraníes de Bolivia pero la regularidad de esta varía entre ambientes, como en el patio, lugar que se limpia más a diario (42,9%) ya que es el lugar donde transcurre la vida cotidiana, donde se cocina y se come, y la zona donde se conversa; en segundo lugar está la vivienda (28,6%) que se limpia entre una y dos veces al mes y por último el corral y/o gallinero (7,1%) que se limpia una vez al año (Verdú and Ruiz 2003). Para acotar, es necesario saber que la estabilidad de la vivienda ofrece protección a los triatominos contra variaciones climáticas y depredadores. Los materiales de construcción y el estado del domicilio pueden permitir su permeabilidad, así como ofrecer sitios de refugio y estabilidad climática que los beneficia. La composición y la organización interna de la vivienda (muebles, enseres, cuadros, adornos y otros) también pueden ofrecer escondites adecuados al vector y cercanos a los humanos y animales, favoreciendo su permanencia. El

agrupamiento de múltiples viviendas, su distribución y el grado de modificación convierten al ambiente doméstico en un hábitat diferenciado en el paisaje que permite la inclusión de las poblaciones de *T. infestans* como se observó en este estudio. Su conectividad con las demás casas y construcciones peri domesticas (gallineros, depósitos, corrales, trojes) establece la dinámica del flujo del parásito (Valdez Tah, Huicochea Gómez et al. 2015).

## 8. CONCLUSIÓN

El presente estudio tuvo la función de ser uno de los estudios preliminares del proyecto CHAGLAG “*Estudio de la enfermedad de Chagas en la zona de Lagunillas*” cuyo objetivo es demostrar que un control vectorial a largo plazo en comunidades Guaraníes es posible, introduciendo métodos de control simples con la participación comunitaria. 8 comunidades de la región de Lagunillas fueron parte del proyecto y el presente trabajo evidenció en la zona la presencia de poblaciones de *Triatoma infestans*, principal vector de la enfermedad de Chagas. Así mismo, se demostró no solamente la infestación de las viviendas por parte de los triatomíneos (en particular el intra domicilio representado por los dormitorios), sino también la infección de los insectos por parte del parásito *T. cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas, con una prevalencia global de aproximadamente 5%.

Aun cuando la prevalencia del parásito en triatomíneos en la zona resultó baja, el riesgo de transmisión sigue siendo epidemiológicamente preocupante, al igual que en toda la región del chaco boliviano, donde a pesar de los esfuerzos de control vectorial (basado en el control químico) realizados por el Programa Nacional Chagas desde hace décadas, la transmisión de la enfermedad de Chagas aún persiste. El presente estudio demostró la legitimidad del proyecto CHAGLAG en la zona, complementando las herramientas clásicas de control del Chagas (detección, seguimiento de los casos y control vectorial químico), con otras técnicas que incluyen el mejoramiento del entorno doméstico y peri doméstico con la participación comunitaria.

---

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, J. M., A. R. Fabre, A. Kuc, M. Galván, et al. (2009). "La enfermedad de Chagas en poblaciones aborígenes del Noreste de Argentina." Enferm. emerg: 115-118.
- Berlanga Silvente, V. & R. Vilà Baños (2014). "Cómo obtener un modelo de regresión logística binaria con SPSS." REIRE. Revista d'Innovació i Recerca en Educació **vol. 7, num. 2**.
- Bos, R. (1988). "The importance of peridomestic environmental management for the control of the vectors of Chagas' disease." Revista Argentina de Microbiología **20** (1 Suppl): 58-62.
- Bowman, N. M., V. Kawai, M. Z. Levy, J. G. Cornejo del Carpio, et al. (2008). "Chagas disease transmission in periurban communities of Arequipa, Peru." Clinical Infectious Diseases **46**(12): 1822-1828.
- Brenière, S. F., C. Aliaga, E. Waleckx, R. Buitrago, et al. (2012). "Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* DTUs in wild *Triatoma infestans* from Bolivia: predominance of TcI." PLoS Neglected Tropical Diseases **6**(5): e1650.
- Cardinal, M. V., M. M. Orozco, G. F. Enriquez, L. A. Ceballos, et al. (2014). "Heterogeneities in the ecoepidemiology of *Trypanosoma cruzi* infection in rural communities of the Argentinean Chaco." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **90**(6): 1063.
- Carrada-Bravo, T. (2004). "*Trypanosoma cruzi*." Rev Mex Patol Clin **51**(4): 205-219.
- Cassab, J. R. A., F. Noireau & G. Guillén (1999). La enfermedad de Chagas en Bolivia: conocimientos científicos al inicio del Programa de Control (1998-2002). La enfermedad de Chagas en Bolivia: conocimientos científicos al inicio del programa de control (1998-2002), EG.
- Ceballos, L. A. (2010). Ciclo silvestre de transmisión de *Trypanosoma cruzi* en el noroeste de Argentina, Universidad de Buenos Aires.
- Cevallos, A. & R. Hernández (2001). "*Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (*Tripanosomiasis americana*) cap 15." Microbios en línea. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Coca Rivero, C. A. (2019). Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en perros (*Canis familiaris*) en ocho comunidades Guaraníes del municipio lagunillas (Provincia Cordillera, Santa Cruz). Facultad de ciencias veterinarias. Cochabamba Bolivia, Universidad Mayor de San Simón.
- Coura, J. R. & J. C. P. Dias (2009). "Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **104**: 31-40.
- De Pablos, L. M. & A. Osuna (2012). "Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity." Infection and Immunity **80** (7): 2258-2264.
- Duffy, T. (2010). Desarrollo y aplicación de estrategias de PCR para la genotipificación y cuantificación de *Trypanosoma cruzi*, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.



- Durán, P., V. Ali, S. Depickère, T. Chávez, et al. (2012). "*Rhodnius stali* y *Rhodnius robustus* involucrados en la transmisión de la enfermedad de Chagas en la Amazonia boliviana." II International Workshop on Chagas Disease, Triatomine Vectors, Trypanosoma cruzi, and Triatoma virus.
- Feliciangeli, M. D., D. Campbell-Lendrum, C. Martinez, D. o. Gonzalez, et al. (2003). "Chagas disease control in Venezuela: lessons for the Andean region and beyond." Trends in parasitology **19**(1): 44-49.
- Fernandes, O., S. Santos, E. Cupolillo, B. Mendonça, et al. (2001). "A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **95** (1): 97-99.
- Franzén, O., S. Ochaya, E. Sherwood, M. D. Lewis, et al. (2011). "Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* I and comparison with *T. cruzi* VI." PLoS Neglected Tropical Diseases **5** (3): 984.
- Gainza, E. (2011). Desafío tecnológico para el control de triatomíneos en la enfermedad de Chagas y la lucha contra las enfermedades de la pobreza. Bogotá, Colombia., Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical.: 290-292.
- Gómez, O. T. (2008). "Una aplicación de la prueba chi cuadrado con SPSS." Industrial data **11**(1): 73-77.
- González Blanco, J. C., I. A. Pérez Fuentes, C. C. Badell Pomar & D. Rodríguez Yero (2014). "Enfermedad de Chagas crónica e insuficiencia cardíaca congestiva en un adulto joven." Medisan **18**(6): 862-865.
- Guarachi, F. R. Y. (2006). Seroprevalencia del mal de Chagas en canes del área urbana de Lagunillas, Provincia Cordillera, Departamento de Santa Cruz, Bolivia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Santa Cruz, Bolivia, Universidad Autónoma Gabriel René Moreno. **Tesis de Licenciatura: 50**.
- Guhl, F. (2013) Epidemiología molecular de *Trypanosoma cruzi*. Revista Española de Salud Pública 1-8
- Gurevitz, J. M., M. S. Gaspe, G. F. Enriquez, Y. M. Provecho, et al. (2013). "Intensified surveillance and insecticide-based control of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in the Argentinean Chaco." PLoS Neglected Tropical Diseases **7**(4): e2158.
- Gürtler, R. E., U. Kitron, M. C. Cecere, E. L. Segura, et al. (2007). "Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina." Proceedings of the National Academy of Sciences **104** (41): 16194-16199.
- Harris, P. A., R. Taylor, R. Thielke, J. Payne, et al. (2009). "Research electronic data capture (REDCap) metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support." Journal of Biomedical Informatics **42** (2): 377-381.
- Herrero, P. M. (2010). El mal de Chagas y el vampiro de los pobres. Cátedra " Jorge Juan": ciclo de conferencias: curso 2007-2008, Servicio de Publicacións.
- Herwaldt, B. L. (2001). "Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures." Clinical Microbiology Reviews **14** (4): 659-688.

- Howard, E. J., X. Xiong, Y. Carlier, S. Sosa-Estani, et al. (2014). "Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis." BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology **121** (1): 22-33.
- ISSN, I. S. (2015). "Informe Situacional de la Epidemiología y el Control de la Enfermedad de Chagas en Bolivia." Gaceta Médica Boliviana **34**(1).
- Lardeux, F., S. Depickère, C. Aliaga, T. Chavez, et al. (2015). "Experimental control of *Triatoma infestans* in poor rural villages of Bolivia through community participation." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene **109**(2): 150-158.
- Lardeux, F., L. Torrez, J. Espinoza, M. Hidalgo, et al. (2018). Diagnostico Chagas en las poblaciones de la zona de Lagunillas y Estudio de reservorios silvestres (roedores), Proyecto CHAGLAG: Estudio de la enfermedad de Chagas en la zona de Lagunillas **Informe 5**.
- Lent, H. & P. Wygodzinsky (1979). "Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease." Bulletin of the American Museum of Natural History **163** (3): 123-520.
- Machado, F. S., W. O. Dutra, L. Esper, K. J. Gollob, et al. (2012). Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. Seminars in immunopathology, Springer.
- Martínez, A. E., E. T. Chávez, G. D. Sossa, A. R. Aranda, et al. (2007). "*Triatoma boliviana* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) de los valles subandinos de La Paz-Bolivia, similar a *Triatoma nigromaculata*." Cuadernos Hospital de Clínicas **52**: 9.
- Minitab, L. (2021). "Relaciones de probabilidades para ajustar modelo logístico binario."
- Moretti, E. (2012). "Enfermedad de Chagas: breve análisis de algunos factores que influyen en su persistencia." Salud colectiva **8**: 33-36.
- Muñoz Vera, M., D. Hervas Eid & J. A. Muñoz Espinar (2004). "Prevalencia de la enfermedad de Chagas en el Municipio de Anzaldo Cochabamba-Bolivia." Cuad. Hosp. Clín: 87-96.
- Noireau, F. (1999). "La enfermedad de Chagas y sus particularidades epidemiológicas en Bolivia." Chagas, La Enfermedad en Bolivia: Conocimientos Científicos al Inicio del Programa de Control (1998-2002), Primera, La Paz: 17-47.
- Noireau, F., F. Brenière, L. Cardozo, M.-F. Bosseno, et al. (1999). Expansión actual de *Triatoma infestans* a costa de *Triatoma sordida* en Bolivia, EG.
- Noireau, F., F. Brenière, J. Ordoñez, L. Cardozo, et al. (1997). "Low probability of transmission of *Trypanosoma cruzi* to humans by domiciliary *Triatoma sordida* in Bolivia." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **91**(6): 653-656.
- Noya, B. d. A., Z. Díaz-Bello, C. Colmenares, R. Ruiz-Guevara, et al. (2015). "Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **110**(3): 377-386.
- Noya, B. d. A., Z. Díaz-Bello, C. Colmenares, R. Ruiz-Guevara, et al. (2010). "Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela." The Journal of Infectious Diseases **201** (9): 1308-1315.

- OPS (2021). "Información general: Enfermedad de Chagas." from [https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5856:2011-informacion-general-enfermedad-chagas&Itemid=40370&lang=es](https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856:2011-informacion-general-enfermedad-chagas&Itemid=40370&lang=es).
- Padilla, C. P., U. Alvarado, G. Ventura, D. Luna-Caipo, et al. (2017). "Detección de unidades discretas de tipificación de *Trypanosoma cruzi* en triatominos recolectados en diferentes regiones naturales de Perú." **37**: 167-179.
- PDM (2007-2011). Plan de Desarrollo Municipal de Lagunillas. Censo Nacional de Población y Vivienda. Bolivia, Instituto Nacional de Estadística, 2007.
- Pereira, P. C. M. & E. C. Navarro (2013). "Challenges and perspectives of Chagas disease: a review." Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases **19**(1): 34.
- Pérez Cascales, E., V. M. Sossa Soruco, S. F. Brenière & S. Depickère (2020). "Reinfestation with *Triatoma infestans* despite vigilance efforts in the municipality of Saipina, Santa Cruz, Bolivia: Situational description two months after fumigation." Acta tropica **203**: 105292.
- Rassi Jr, A., A. Rassi & J. A. Marin-Neto (2010). "Chagas disease." The Lancet **375**(9723): 388-402.
- Riera, C. (2013). "Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas." Sociedad Española de Medicina de Laboratorio **16**: 82-92.
- Rojas, M. C., R. E. Barrientos, G. A. Fernández, L. Ortiz, et al. (2007). Reseña histórica del Programa Nacional de Control de Chagas. Triatominos de Bolivia y la Enfermedad de Chagas. M. R. Cortez. La Paz.
- Romero Davalos, A. (1979). "Enfermedad de Chagas." Los Amigos del Libro Ed, La Paz, Bolivia: 698 pp.
- Salas, N., M. Cot, D. Schneider, B. Mendoza, et al. (2007). "Risk factors and consequences of congenital Chagas disease in Yacuiba, south Bolivia." Tropical Medicine & International Health **12** (12): 1498-1505.
- Samuels, A. M., E. H. Clark, G. Galdos-Cardenas, R. E. Wiegand, et al. (2013). "Epidemiology of and impact of insecticide spraying on Chagas disease in communities in the Bolivian Chaco." PLoS Neglected Tropical Diseases **7**(8): e2358.
- Schofield, C. J. (1985). "Control of Chagas'disease vectors." British Medical Bulletin **41** (2): 187-194.
- Schofield, C. J. (1994). Triatominae: biology & control, Eurocommunica Publications.
- Sergeant, E. (2018). "EpiTools Epidemiological Calculators." Ausvet.
- Storino, R. (1984). Evolución natural y fisiopatogenia de la enfermedad de Chagas humana. Facultad de Ciencias Médicas. Argentina, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Médicas. **Tesis de Doctorado**.
- Szarfman, A., J. Urman, A. Ojalora, A. Largaia, et al. (1975). "Specific agglutinins and immunoglobulin levels in congenital Chagas infection." Medicina **35**(3): 245-250.
- Telleria, J. & M. Tibayrenc (2017). American trypanosomiasis Chagas disease: one hundred years of research, Elsevier.

- Tonn, R. (1988). "Review of recent publications on the ecology, biology and control of vectors of Chagas' disease." Revista Argentina de Microbiología **20** (Suppl 1): 4.
- Valdez Tah, A. R., L. Huicochea Gómez, A. Nazar Beutelspacher, J. Ortega Canto, et al. (2015). "La vulnerabilidad humana a la transmisión vectorial de *Trypanosoma cruzi* a través de los procesos de salud-enfermedad y la apropiación social del territorio." Salud colectiva **11**: 191-210.
- Ventura-Garcia, L., M. Roura, C. Pell, E. Posada, et al. (2013). "Socio-cultural aspects of Chagas disease: a systematic review of qualitative research." PLoS Neglected Tropical Diseases **7**(9): e2410.
- Verdú, J. & M. T. Ruiz (2003). "Control del Chagas en comunidades guaraníes: conocimiento y hábitos higiénicos dentro del Proyecto de Mejoramiento de Viviendas en Bolivia." Gaceta sanitaria **17**: 166-168.
- WHO (2002). Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. Geneva, World Health Organization.
- WHO (2010). "Chagas disease (*American trypanosomiasis*) fact sheet (revised in June 2010)." Weekly Epidemiological Record **85** (34): 334-336.
- WHO (2010). First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. First WHO report on neglected tropical diseases: Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases.
- WHO (2015). "Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates= Maladie de Chagas en Amérique latine: le point épidémiologique basé sur les estimations de 2010." Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire **90**(06): 33-44.
- Zingales, B., S. G. Andrade, M. R. d. S. Briones, D. A. Campbell, et al. (2009). "A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **104** (7): 1051-1054.

# **ANEXOS**

## **Anexo 1. Hoja de información y de consentimiento del proyecto CHAGLAG**

### **Propósito del proyecto**

El Proyecto CHAGLAG tiene como propósito demostrar que un control efectivo y a largo plazo de la transmisión de la enfermedad de Chagas es posible en la región de Lagunillas, usando un arsenal de métodos simples complementarios a la estrategia de rociados insecticidas del Programa Nacional. El proyecto puede dividirse en 3 etapas proponiendo lo siguiente:

- **Primera etapa:** Analizar la situación de la enfermedad de Chagas en 8 comunidades guaraníes de la zona de Lagunillas: Iviyeca, Tasete, Yapumbia, Yaiti, Itaimi, El Tunal, Curupaiti y Pueblo Nuevo (Tenta Piau)
- **Segunda etapa:** Implementar estrategias de control de vectores tales como el mejoramiento de vivienda, el manejo de los animales domésticos, basadas en las técnicas locales simples, baratas, con participación comunitaria.
- **Tercera etapa:** Evaluar la efectividad y la sostenibilidad de las intervenciones mediante indicadores de salud, antes durante y después de la intervención, tales como la prevalencia e incidencia de la enfermedad en los habitantes, prevalencia e incidencia en los perros y otros animales domésticos, infestación de casas por triatominos, densidades de triatominos en las casas, etc.), y comparar estos índices con sus valores al inicio del proyecto.

### **Beneficios**

Quisiéramos invitarle a participar en este estudio porque Ud. vive en esta área y puede tener información importante sobre la enfermedad. Al participar en el estudio, no habrá beneficio personal directo o compensación para Ud., pero el estudio será útil para la comunidad en la que vive, para toda el área y en general para el país. Le otorgaremos información personalizada sobre la enfermedad, explicándole de manera sencilla y entendible. En esta investigación no proveeremos ningún servicio de salud, pero les daremos sugerencias sobre qué hacer y a cuál servicio de salud acudir cuando se sospeche de un miembro de la familia que pueda tener la enfermedad de Chagas.

### **Tipo de estudio, duración de las encuestas y procedimiento**

Durante el desarrollo del proyecto vamos a hacerle varias visitas para conocer mejor sus condiciones de vida, la relación que Ud. y su familia tiene con la enfermedad, le

pediremos permiso para buscar y coleccionar los triatominos en su casa y las dem as dependencias (corrales, trojes etc.), le pediremos hacer un diagnóstico de la enfermedad a Ud. y a los miembros de su familia, y también a algunos de sus animales domésticos. Tomaremos fotos en el interior y exterior de su domicilio a fines de análisis de datos y discusión para conocer las condiciones en las cuales se pueden desarrollar los triatominos y así encontrar soluciones para eliminarlos. Cada visita no tomar  más de 30 minutos.

Esperamos que coopere con nosotros al compartir sus datos personales y la de los miembros de su familia. Si usted está de acuerdo procederemos con las encuestas.

### **Riesgo e incomodidad**

Hay un bajo riesgo de que comparta información confidencial o se sienta incómodo(a) hablando de algunos temas o dejando que nuestro equipo entre a su propiedad a tomar muestras de animales. No queremos que esto ocurra y Ud. puede rehusarse a contestar o a no participar en parte de la encuesta si siente que las preguntas son confidenciales o le incomodan los procedimientos.

### **Confidencialidad y Privacidad**

Escribiremos un código para cada hogar y no se escribir  el nombre o identificación de la familia en las fotos. Su nombre y otra identificación personal solo serán conocidas por el equipo que los visitar  y no será parte de sus respuestas. Sus respuestas serán confidenciales, por lo que nadie las leer  excepto algunos miembros del equipo de investigación. La información y fotografías serán guardadas en nuestra oficina y destruidas después del estudio por el personal de investigación. Su identidad será protegida en cualquier presentación pública en reuniones o publicaciones.

### **Diseminación**

Habr  pequeñas reuniones en las comunidades que forman parte del estudio, en la que se presentarán resultados. Después de estas reuniones publicaremos los resultados para que otras personas con interés en el tema puedan aprender de este estudio. El material de publicación será enviado al Ministerio de Salud y Deportes y al Programa Nacional y

Departamental de Chagas. Si quiere el material al final del estudio, con gusto se lo proporcionaremos.

### **Participación Voluntaria**

La participación al proyecto es voluntaria, pero, si no quiere participar en el estudio, puede parar la entrevista en cualquier momento. Si tiene preguntas puede preguntarme ahora o durante la entrevista. Cuando terminemos la entrevista contestaré todas sus preguntas. Si quiere saber algo más sobre el estudio y nos hemos ido, puede contactar a las siguientes personas.

Dr. Frédéric Lardeux – Laboratorio de Entomología Médica, UMSS-Carrera de Biología Cochabamba. Tel: (4) 44127437

Dra. Lineth García– Laboratorio de Biología Molecular, IIBISMED-UMSS- Facultad de Medicina. Cochabamba Tel: (4) 4539490 - 4232206

Nombre del Participante (o huella digital)		Nombre del Investigador	
Firma del Participante		Firma del Investigador	
C.I. Participante		C.I. del Investigador	

Fecha:

### **Consentimiento Informado**

#### **para la búsqueda de vinchucas en la vivienda y encuesta CAP**

He sido invitado a participar en la investigación sobre Chagas titulada “: Estudio de la Enfermedad de Chagas en la zona de Lagunillas (Santa Cruz)” que se hará en nuestra comunidad. Se me entrevistará durante 30 minutos aproximadamente. Las preguntas serán sobre los miembros de mi hogar, lo que conozco sobre Chagas, lo que pienso sobre la enfermedad y lo que hago o puedo hacer para prevenir el Chagas. Sé que me pueden hacer preguntas personales. Responderé honestamente a las preguntas y cooperaré con el entrevistador.



Se me ha dicho que el propósito del estudio es encontrar las razones para la transmisión de la enfermedad y cómo se pueden controlar. Este estudio le dirá al grupo de investigación lo que se puede hacer para prevenir y controlar el Chagas.

Después de la entrevista podrán observar algunas cosas en mi hogar. Entrarán a la casa para realizar una búsqueda de las vinchucas. Colectarán vinchucas y se las llevarán a su laboratorio para estudios ulteriores. El grupo de investigación me informo que le proyecto tiene una duración de 5 años, así que regresara en el transcurso del estudio para completar la encuesta con otros tipos de encuestas y así conocer la evolución de la situación en mi hogar.

Sé que el estudio beneficiará a todos los que viven en nuestra zona. Yo me beneficiaré junto con ellos. Ahora debo hablar con ellos y darles mi tiempo. Puede ser que me sienta incómodo compartiendo mi estilo de vida personal, pero me han dicho que mi identidad nunca será publicada. Lo que muestre y lo que diga no se ligará a mi nombre. Sólo el grupo de entrevista me conocerá, pero los reportes no tendrán mi nombre. También se me ha dicho que tengo el derecho de parar la entrevista y retirar mi consentimiento de participar en el estudio en cualquier momento que quiera. Mi atención médica no cambiará de manera alguna si dice que no. Si tengo preguntas durante la entrevista se me dará la respuesta. Si tengo preguntas después, sé a quién debo contactar y en dónde. He leído o se me ha leído la información anterior. Me han explicado el propósito del estudio. Consiento voluntariamente a participar en el estudio. Sé que puedo parar la entrevista y rehusarme a participar en el estudio en cualquier momento. Rehusar a participar no afectará mi acceso a los servicios de salud que provee el gobierno.

Nombre del Participante \_\_\_\_\_ y/o Huella dactilar del participante

Firma del Participante \_\_\_\_\_ Fecha ...(*día/ mes/ año*)..... ..

C.I. Participante: \_\_\_\_\_

### **Testigo**

He sido testigo de la lectura total del formulario de consentimiento por el participante de la entrevista y las encuestas entomológica y de animales donde el entrevistado ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirмо que el entrevistado ha dado consentimiento voluntario.

Nombre del testigo \_\_\_\_\_  
Firma del testigo \_\_\_\_\_ Fecha ...(*día/ mes/ año*).....  
C.I. Testigo: \_\_\_\_\_

Nombre del Investigador \_\_\_\_\_  
Firma del Investigador \_\_\_\_\_ Fecha ...(*día/ mes/ año*).....  
C.I. del Investigador: \_\_\_\_\_

Una copia de este consentimiento ha sido dada al participante \_\_\_\_\_  
(inicializado por el investigador/asistente):

## **Anexo 2. Protocolo operativo estandarizado de disección de triatomino**

- Retirar al triatomino del tubo con alcohol con una pinza estéril y colocarlo en una toalla de papel.
- Proceder con la disección de acuerdo al estadio en el que se encuentre:
  - Ninfas de segundo y tercer estadio: cortar sólo el abdomen y depositarlo en un tubo nuevo.
    - Verter 200 µl de PBS en el tubo donde está la muestra.
    - Pulverizar la muestra digestiva dentro el tubo con PBS con tijeras entomológicas estériles.
    - Retirar el resto del triatomino al tubo de origen en el que estaba con alcohol al 96%.
    - Las tijeras y pinzas entomológicas usadas se depositan en lavandina al 10% y detergente.
  - Ninfas de cuarto y quinto estadio: Agarrar al triatomino de las 6 patas para que estas no interfieran o no sean cortadas en el proceso.
    - Abrir al triatomino por la región abdominal con un corte frontal, cortando los bordes en la región que une la parte dorsal y ventral del triatomino.
    - Extraer el tracto digestivo del triatomino cuidadosamente con pinzas entomológicas y verter el contenido en un nuevo tubo.
    - Verter 200 µl de PBS en el tubo donde está la muestra.
    - Pulverizar la muestra digestiva dentro el tubo con PBS con tijeras entomológicas estériles.
    - Retirar el resto del triatomino al tubo de origen en el que estaba con alcohol al 96%.
    - Las tijeras y pinzas entomológicas usadas se depositan en lavandina al 10% y detergente.
  - Adultos: Agarrar al triatomino de las 6 patas para que estas no interfieran o no sean cortadas en el proceso. Levantar también las alas cuidadosamente para proceder a la disección.
    - Abrir al triatomino por la región abdominal con un corte frontal, cortando los bordes en la región que une la parte dorsal y ventral del triatomino.
    - Extraer el tracto digestivo del triatomino cuidadosamente con pinzas entomológicas y verter el contenido en un nuevo tubo (retirar las gónadas del insecto), si es que el triatomino está alimentado, extraer de 30 a 50 mg del tracto. Si el triatomino no está alimentado, depositar el tracto digestivo completo.
    - Verter 200 µl de PBS en el tubo donde está la muestra.

- Pulverizar la muestra digestiva dentro el tubo con PBS con tijeras entomológicas estériles.
  - Retirar el resto del triatomino al tubo de origen en el que estaba con alcohol al 96%.
  - Las tijeras y pinzas entomológicas usadas se depositan en lavandina al 10% y detergente.
- Depositar los tubos con las muestras digestivas en refrigeración a 4°C.

### **Anexo 3. Protocolo operativo estandarizado de conformación de pooles de triatominos**

- Esterilizar el material a usar sometiéndolo a luz ultra violeta por 10 minutos.
- Añadir 200  $\mu$ l de guanidina a las muestras digestivas, que fueron mezcladas en 200  $\mu$ l de PBS previamente (V/V), para su conservación. En total tendremos al menos 400  $\mu$ l de muestra digestiva individual.
- Vortexear 10 segundos cada tubo y luego colocar al spin por 4 segundos.
- Formar cada pool genético con 5 muestras digestivas individuales de triatomino.
- Registrar en una planilla los códigos de las 5 muestras digestivas al momento de formar cada pool, asignando un código nuevo al pool conformado.
- La estrategia para agrupar las 5 muestras digestivas por pool debe seguir las siguientes instrucciones:
  - Deben estar agrupadas de acuerdo al estadio del triatomino (N1, N2, N3, N4, N5 y adultos), para que la cantidad de tracto digestivo extraído sea igual en todas las muestras digestivas y tengamos un valor representativo por pool.
  - Una vez estén agrupadas por estadios, dividir de acuerdo al estado de nutrición, para mantener muestras homogéneas y del mismo tamaño.
  - Por último, terminar de agrupar de acuerdo a la localización en que fue encontrado cada triatomino, si fue en la peri o intra domicilio.
- Para formar el pool genético, extraer 100  $\mu$ l de cada una de las 5 muestras digestivas (usar un tip diferente para extraer por cada muestra).
- Como resultado, cada pool contendrá 500  $\mu$ l de volumen.
- Vortexear 10 segundos cada tubo y luego colocar al spin por 4 segundos.
- En caso de salir positivo el pool genético, tendremos volumen disponible para realizar una segunda extracción de la muestra digestiva individual.

#### **Anexo 4. Protocolo operativo estandarizado de extracción**

- Esterilizar el material a usar sometiéndolo a luz ultra violeta por 10 minutos.
- Trabajamos con un estándar de 10 muestras por cada proceso de extracción (9 pooles más un control negativo que contenía Guanidina).
- Etiquetar previamente 10 tubos vacíos con los datos de los pooles y el control negativo (-).
- A continuación, vortexear 10 segundos la proteinasa K y alícuotar 40  $\mu$ l de este a cada uno de los tubos vacíos.
- Añadir 200  $\mu$ l de Buffer de Lisis a cada tubo (Tissue Lisis Buffer) y proceder a cerrar los tubos para evitar que se contaminen entre ellos al momento de añadir el material genético.
- Pasamos a vortexear por 10 segundos los pooles que vamos a procesar
- Agarrar uno de los tubos etiquetados y añadir 200  $\mu$ l del pool que le corresponde.
- Cerrar el tubo, vortexear 10 segundos y luego colocar al spin por 4 segundos.
- Repetir los mismos pasos con el restante de pooles y el pool negativo.
- Sellar cada tubo con papel Parafilm.
- Meter las 10 muestras al termomixer debidamente distribuidos a 55°C toda la noche (Over night).
- Al día siguiente alistar y alícuotar los reactivos que vamos a necesitar de acuerdo a la cantidad de muestras que tenemos más una, en caso de error:
  - EB = Buffer de Elusión: 100  $\mu$ l x muestra
  - BB = Biding Buffer: 200  $\mu$ l x muestra
  - ISO = Isopropanol: 100  $\mu$ l x muestra
  - IRB = Buffer Removedor de Inhibidores: 500  $\mu$ l x muestra
  - WB = Washing Buffer: 1000  $\mu$ l x muestra (este reactivo se aplica dos veces)
- Sacar las muestras del termomixer y lo subimos de 55 a 70°C.
- Spinnear las muestras 4 segundos.
- Agregar 200  $\mu$ l de BB a cada tubo de manera vertical.
- Vortexear todas las muestras de 10 a 15 segundos y luego colocar al spin por 4 segundos.
- Meter las muestras al termomixer junto con el EB a 70°C por 10 minutos.

- Sacar las muestras del termomixer y colocar al spin por 4 segundos (dejamos el EB a 70°C en el termomixer).
- Añadir 100 µl de isopropanol a cada muestra de manera casi vertical (se forma una fase diferenciada en la parte de arriba de la muestra).
- Vortexear todas las muestras de 10 a 15 segundos y luego colocar al spin por 4 segundos.
- Alistar los tubos tipo columna del kit de extracción y acomodarlos en la gradilla.
- Dentro de los tubos tipo columna colocar los tubos filtro y etiquetar estos últimos con los datos de los pooles que se están procesando.
- Añadir dentro de cada tubo filtro toda la muestra del pool que le corresponde.
- Colocar los tubos a la centrífuga con cuidado durante 1 minuto a 8000 rpm (revoluciones por minuto).
- Alistar nuevos tubos tipo columna en la gradilla.
- Sacar las muestras de la centrífuga, colocar los tubos filtro a los nuevos tubos tipo columna y desechar los anteriores.
- Añadir 500 µl de IRB a cada tubo tipo filtro de manera vertical.
- Colocar los tubos a la centrífuga con cuidado durante 1 minuto a 8000 rpm (revoluciones por minuto).
- Alistar nuevos tubos tipo columna en la gradilla.
- Sacar las muestras de la centrífuga, colocar los tubos filtro a los nuevos tubos tipo columna y desechar los anteriores (las muestras deben salir transparentes para saber que no hay inhibidores, en caso de salir amarillo volver a lavar cada muestra con 500 µl de PBS o Buffer de Fosfatos).
- Añadir 500 µl de WB a cada tubo tipo filtro de manera vertical.
- Colocar los tubos a la centrífuga con cuidado durante 1 minuto a 8000 rpm (revoluciones por minuto).
- Alistar nuevos tubos tipo columna en la gradilla.
- Sacar las muestras de la centrífuga, colocar los tubos filtro a los nuevos tubos tipo columna y desechar los anteriores.
- Añadir nuevamente 500 µl de WB a cada tubo tipo filtro de manera vertical.

- Colocar los tubos a la centrífuga con cuidado durante 1 minuto a 8000 rpm (revoluciones por minuto).
- Alistar ahora tubos de centrífuga nuevos en la gradilla sin rotular.
- Sacar las muestras de la centrífuga, colocar los tubos filtro a los nuevos tubos y desechar los anteriores de tipo columna.
- Colocar los tubos a la centrífuga con cuidado durante 10 segundos a 12500 rpm (revoluciones por minuto).
- Alistar otra vez nuevos tubos de centrífuga y etiquetar cada uno con los datos y códigos de los pooles, la fecha y las iniciales del investigador.
- Sacar las muestras de la centrífuga, colocar los tubos filtro a los recientes nuevos tubos rotulados previendo que corresponda cada muestra con sus datos correctos y desechar los anteriores que no estaban rotulados.
- Añadir 100  $\mu$ l de EB a cada tubo (el EB debe encontrarse a una temperatura de 70°C).
- Colocar los tubos a la centrífuga con cuidado durante 2 minutos a 8000 rpm (revoluciones por minuto).
- Sacar las muestras de la centrífuga, desechar los tubos tubo filtro y cerrar los tubos de centrífuga rotulados con el ADN extraído.
- Refrigerar las muestras de ADN extraídas que se encuentra en los tubos a -20°C.



## **Anexo 5. Protocolo operativo estandarizado de PCR Múltiplex**

- Limpiar y esterilizar el material a usar sometiéndolo a luz ultra violeta por 10 minutos.
- Trabajamos con un estándar de 23 muestras por cada proceso de PCR (18 muestras con material genético, 2 controles negativos de Guanidina, 2 controles positivos de 200 y 250 pb cada uno y un control blanco de agua tridestilada).
- Alistar el material genético que se va a usar descongelándolo previamente.
- Alistar los reactivos para preparar el Mix de la PCR en una gradilla (excepto la Taq Polimerasa, dejarla dentro el refrigerador) y alícuotar el volumen que se va a necesitar de acuerdo a la cantidad de muestras que tenemos más una, en caso de error.
- Preparar el Mix dentro un tubo de centrifuga de 1.5 ml de volumen.
- Empezar por el Buffer NH<sub>4</sub> (2.5 µl por prueba 1X).
- Continuar por el MgCl<sub>2</sub> (1 µl por prueba 1X).
- Añadir el dNTP Mix (0.75 µl por prueba 1X).
- Colocar el primer Tc I (1 µl por prueba 1X), y continuar con el primer Tc II, Tc III, Tc IV y Tc V.
- Añadir agua tridestilada (13.5 µl por prueba 1X).
- Por último, agregar Taq Polimerasa (0.25 µl por prueba 1X), sacar del refrigerador y proceder rápidamente para que no se descongele.
- Vortexear el tubo con el Mix 5 segundos y luego al spin 4 segundos.
- Alistar nuevos tubos PCR de acuerdo al número de muestras que se va a procesar y colocar 23 µl del Mix principal a cada uno de los tubos PCR.
- En uno de estos tubos PCR añadir 2 µl de agua tridestilada y rotular como control blanco.
- Para proceder con los controles positivos, negativos y las muestras de ADN, hay que vortexear las antes de usar.
- Comenzar alicotando 2 µl de los controles negativos en los tubos PCR y rotularlos.
- Seguir con las muestras de ADN y añadir 2 µl por muestra, rotular debidamente cada tubo PCR de acuerdo al número de muestra que le tocó.
- Por último, añadir 2 µl de los controles positivos a los tubos PCR y rotular.
- Meter todos los tubos PCR preparados al spin por 4 segundos.

- Colocar los tubos PCR dentro el termociclador y distribuirlos equitativamente, anotando el orden en el que se los está posicionando, luego colocar la máquina en Modo Multiplex para un volumen final de 25  $\mu$ l y dejar correr por 34 ciclos (2 horas y media aproximadamente).

#### PREPARACIÓN DEL GEL AGAROSA

- Disolver 3 gramos de agarosa en 100 ml de TAE al 1X; para ayudar a diluir rápidamente meter en periodos de un minuto al microondas evitando que el TAE se evapore.
- Cuando el agar se encuentre tibio, añadir 15  $\mu$ l de SYBR Safe DNA gel Stain.
- Alistar la caja de electroforesis y los peines que se vayan a utilizar, asegurar que estén en un mesón nivelado para que las muestras corran debidamente.
- Mezclar y vaciar el gel a la caja de electroforesis con calma (evitar la formación de burbujas en el gel y de pelusas) y esperar a que se solidifique.
- Sacar las muestras de ADN del termociclador y asegurarse de que no haya habido errores ni modificaciones en el proceso, luego meter los tubos al spin por 4 segundos.
- Retiramos los peines del gel agarosa y nos alistamos para alicotar dentro los pocillos.
- Sobre un pedazo de papel Parafilm, con un tip mezclar 3  $\mu$ l de Buffer de Carga (Azul de Bromofenol) con 10  $\mu$ l de volumen de la muestra de ADN y meter la carga hasta la mitad de uno de los pocillos; repetir el mismo proceso con el resto de muestras de ADN.
- Para el Marcador de Peso (HyperLadder IV) mezclar 6  $\mu$ l de este con 3  $\mu$ l del Buffer de Carga y colocar en los pocillos asignados.
- Una vez que alicotamos todos los pocillos, zambullir el gel de agarosa en la electroforesis con agua TAE a 0.5X y dejar correr a 100 V por una hora.
- Retirar el gel cuidadosamente de la electroforesis y llevarla al transiluminador.
- Visualizar los resultados bajo el transiluminador de luz UV, esperando que las muestras positivas y los controles positivos, produzcan un producto de 150, 200 o 250 pb.
- Guardar los resultados plasmados en una foto en un computador e imprimir dicha foto y apuntar los resultados en un cuaderno de laboratorio.

La mezcla preparada en la PCR (Mix) usó los siguientes reactivos de la línea BIOLINE (Tabla 18):

Reactivos	Concentración	Volumen p/1X
Agua Tridestilada	--	13,5 µl
Buffer NH <sub>4</sub>	10X	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1 µl
dNTPMix	20 mM	0,75 µl
Primer Tc I	10 µM	1 µl
Primer Tc II	10 µM	1 µl
Primer Tc III	10 µM	1 µl
Primer Tc IV	10 µM	1 µl
Primer Tc V	10 µM	1 µl
Taq	1 U/µl	0,25 µl
	TOTAL	23 µl
ADN	--	2 µl
	TOTAL	25 µl

**Tabla 18.- Reactivos utilizados para preparar la mezcla PCR.**

En la amplificación del ADN molde se requirió múltiples ciclos térmicos, en este trabajo se utilizó 34 ciclos térmicos con variaciones de temperatura entre 94, 50 y 72°C. En la tabla siguiente (Tabla 19) se detalla las condiciones en el cual se incubó la Mix en el termociclador en Modo Multiplex:

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	94°C	5 min	1
2	94°C	30 seg	34
3	50°C	30 seg	
4	72°C	30 seg	
5	72°C	7 min	1
6	4°C	∞	

**Tabla 19.- Periodos de incubación de las muestras en el termociclador – Modo Multiplex**