Tiempo de detección del gen *Cytb* en la identificación de fuentes alimenticias de *Panstrongylus chinai*, vector de Chagas en Perú.

Detection time of the CytB gene in the identification of food sources of Panstrongylus chinai Chagas vector in Peru.

Rosa Elena Santillan-Valdivia[1,a], Archi Alejandro Ruiz-Polo[1,b].

Filiación:
1 Dirección Sub Regional de Salud Luciano Castillo Colonna, Centro de Investigación y Capacitación en Entomología-CICE. Sullana-Piura, Perú.
a Biólogo, Entomóloga Médica.
b Biólogo, Magister en Investigación y Docencia Universitaria.

ORCID:
- Rosa Santillan Valdivia: https://orcid.org/0009-0002-8032-5958
- Archi Ruiz Polo: https://orcid.org/0009-0005-1273-2625

Correspondencia:
Archi Alejandro Ruiz Polo.
archi.ruiz.polo.mail.work@gmail.com

Conflictos de Interés:
Los autores declaran no presentar conflictos de interés.

Financiamiento:
El estudio ha sido financiado por los autores.

Revisión de Pares:
Recibido: 06-11-2024
Aceptado: 08-01-2025

Citar como:
Santillan-Valdivia R, Ruiz-Polo A. Tiempo de detección del gen Cytb en la identificación de fuentes alimenticias de Panstrongylus chinai, vector de Chagas en Perú. Rev méd Trujillo.2025;20(1):9-15.
DOI: https://doi.org/10.17268/rmt.2024.v20i1.6469

2025. Publicado por Facultad de Medicina, UNT.
Artículo de acceso abierto bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0.
DOI: http://dx.doi.org/10.17268/rmt.
OJS: https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/RMT/

RESUMEN

***Objetivo*:** Determinar el tiempo de detección del gen Cytb en la identificación de fuentes alimenticias de Panstrongylus chinai vector de la enfermedad de Chagas en Perú. ***Métodos*:** Se realizó una investigación descriptiva y con diseño experimental en el que se analizaron tres tratamientos (TP1, TP2 y TP3), cada uno conformado por tres triatominos de la especie Panstrongylus chinai. Los triatominos fueron alimentados con Gallus gallus (pollo), y la sangre fue aislada del abdomen de los insectos en función del tiempo transcurrido desde la alimentación. Los tiempos evaluados fueron 48 horas (TP1), 120 horas (TP2) y 192 horas (TP3). Se extrajo ADN total de las células sangre aislada, se amplificó el gen Cytb mediante PCR y se realizó una digestión enzimática con la restrictasa HaeIII. La detección del gen Cytb para la identificación de fuentes alimenticias se llevó a cabo mediante un ensayo de PCR-RFLP. ***Resultados*:** de los tratamientos TP1 y TP2, se logró aislar sangre y los triatominos Panstrongylus chinai sobrevivieron al procedimiento. En contraste, con TP3 no se aisló sangre y los ejemplares analizados no sobrevivieron. De todas las muestras de sangre, se extrajo ADN y se amplificó el gen Cytb de todas las muestras de sangre. La digestión enzimática del gen Cytb con la enzima HaeIII reveló fragmentos de ADN de 159 pb, 125 pb y 74 pb, que corresponden a los RFLP del gen Cytb en Gallus gallus. ***Conclusión*:** La detección del gen Cytb para identificar fuentes alimenticias de Panstrongylus chinai es viable hasta 120 horas post-alimentación.

Palabras Clave: In vitro, Panstrongylus, citocromo b, PCR, RFLP. (Fuente: DeCS BIREME).

SUMMARY

***Objetive*:** Determine the detection time of the Cytb gene in the identification of food sources of *Panstrongylus chinai*, a vector of Chagas disease in Peru. ***Methods*:** A descriptive and experimental research design was conducted, analyzing three treatments (TP1, TP2, and TP3), each consisting of three Panstrongylus chinai triatomines. The triatomines were fed on Gallus gallus (chicken), and blood was isolated from the insect abdomen according to the time elapsed since feeding. The evaluated times were 48 hours (TP1), 120 hours (TP2), and 192 hours (TP3). Total DNA was extracted from the isolated blood cells, the Cytb gene was amplified by PCR, and enzymatic digestion was performed with the restriction enzyme HaeIII. Detection of the Cytb gene for food source identification was carried out using a PCR-RFLP assay. ***Results*:** Blood was successfully isolated in treatments TP1 and TP2, and the *Panstrongylus chinai* triatomines survived the procedure. In contrast, no blood was isolated in TP3, and the analyzed specimens did not survive. DNA was extracted and the *Cytb* gene was amplified from all blood samples. The enzymatic digestion of the *Cytb* gene with HaeIII revealed DNA fragments of 159 bp, 125 bp, and 74 bp, which correspond to the RFLP of the *Cytb* gene in *Gallus gallus*. ***Conclusion*:** *Cytb* gene detection for identifying food sources of *Panstrongylus chinai* is viable up to 120 hours post-feeding.

Key words: In vitro, Panstrongylus, citocromo b, PCR, RFLP. (Source: MeSH).

INTRODUCCIÓN

En el contexto del cambio climático y la expansión de las áreas rurales, que favorecen la interacción entre animales silvestres, domésticos y el ser humano, los patrones alimenticios de los vectores del parásito *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas), han adquirido una relevancia creciente. La enfermedad de Chagas es transmitida al ser humano y a otros mamíferos silvestres y domésticos por insectos hematófagos conocidos como triatominos [1].

Entre 2000 y 2023, Perú ha registrado un total acumulado de 1,270 casos de enfermedad de Chagas, distribuidos de la siguiente manera: 5 casos en 2000; 9 en 2001; 74 en 2002; 64 en 2003; 55 en 2004; 33 en 2005; 133 en 2006; 70 en 2007; 46 en 2008; 126 en 2009; 24 en 2010; 90 en 2011; 45 en 2012; 61 en 2013; 64 en 2014; 83 en 2015; 30 en 2016; 33 en 2017; 28 en 2018; 45 en 2019; 24 en 2020; 29 en 2021; 36 en 2022 y 63 en 2023 [2].

A pesar de su importancia, existen aún grandes vacíos de conocimiento acerca de las fuentes alimenticias de los triatominos, con pocos estudios al respecto [3]. La identificación de las fuentes alimenticias de los insectos hematófagos que transmiten enfermedades al ser humano proporciona información crucial sobre los patrones de alimentación en condiciones naturales, la capacidad vectorial del insecto, y ofrece datos importantes sobre los reservorios potenciales, lo que ayuda a entender el ciclo epidemiológico de los patógenos [4,5].

Los métodos para identificar las fuentes de alimentación de insectos hematófagos incluyen técnicas basadas en reacciones antígeno-anticuerpo, pero estas presentan limitaciones como las reacciones cruzadas y la necesidad de anticuerpos específicos en grandes cantidades. Además, las modificaciones en los epítopos de los insectos debido a procesos digestivos pueden reducir la especificidad y el tiempo de detección [6,7,8]. En contraste, métodos moleculares más avanzados, como PCR multiplex, PCR convencional, secuenciación de ADN y PCR-RFLP, utilizan marcadores moleculares nucleares y mitocondriales [9,10,11,12]. La PCR-RFLP, en particular, permite identificar las fuentes alimenticias al analizar el polimorfismo de los fragmentos de restricción de un gen específico, detectando diferencias en los fragmentos generados por enzimas de restricción [13].

El marcador molecular más comúnmente utilizado para identificar las fuentes de alimentación de insectos hematófagos es el gen *Citocromo b* (Cytb), debido a que presenta variaciones específicas en su secuencia que permiten la diferenciación entre especies, además de encontrarse en un alto número de copias por célula, lo que facilita su detección [14,15,16]. Sin embargo, durante el proceso de amplificación del gen *Cytb*, es posible que también se amplifique el material genético del sistema biológico que está siendo estudiado, lo que puede generar interferencias en los resultados [17].

Los genes nucleares también se utilizan como marcadores, pero tienen un número limitado de copias por célula y su detección es menos duradera, siendo confiable sólo durante las primeras 24 horas tras la recolección de la muestra [18,19]. Para obtener resultados precisos en los procedimientos moleculares, es crucial controlar varios factores en el manejo de las muestras, como el adecuado aislamiento y transporte de la sangre, la correcta relación con el conservante, la homogeneización para evitar hemólisis, la prevención de la coagulación, la minimización de la contaminación bacteriana y el uso de agujas de tamaño adecuado [20]. Además, es importante considerar que la cantidad de sangre ingerida varía entre especies de insectos y que los procesos digestivos, incluidos los efectos de la actividad enzimática sobre el ADN, presentan diferencias significativas [12].

En el Perú, existe una escasez de estudios que utilicen técnicas eficaces para identificar las fuentes alimenticias de insectos hematófagos y determinar los reservorios de los agentes infecciosos que transmiten, lo que representa una brecha en el conocimiento científico. Esta falta de investigación es particularmente relevante en el contexto del cambio climático y la expansión rural, que están incrementando la interacción entre animales silvestres, domésticos y humanos, favoreciendo la propagación de enfermedades zoonóticas como la tripanosomiasis americana, transmitida por triatominos. Ante ello, la aplicación de estas técnicas moleculares en el campo de la salud podrían contribuir a la prevención de enfermedades causadas por insectos vectores en países tropicales como el Perú. El objetivo del estudio fue determinar el tiempo de detección del gen *Cytb* en la identificación de fuentes alimenticias de *Panstrongylus chinai*, vector de la enfermedad de Chagas en Perú.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño: Se llevó a cabo un estudio in vitro de tipo descriptivo y con diseño experimental, en el cual se evaluaron tres tratamientos (TP1, TP2 y TP3) para determinar el tiempo de detección del gen *Cytb* a partir del ADN extraído de la sangre aislada del abdomen de ejemplares de *P. chinai*, alimentados con *Gallus gallus* (vertebrado refractario a la infección por *T. cruzi*). Los tratamientos consistieron en el aislamiento de sangre del abdomen de cada triatomino en distintos tiempos posteriores a su alimentación: TP1 a las 48 horas, TP2 a las 120 horas y TP3 a las 192 horas.

Población de estudio y muestra: Se analizaron tres ejemplares de *P. chinai* por tratamiento (en total nueve ejemplares), en diferentes estadios de su desarrollo: ninfal estadio 4, ninfal estadio 5 y adulto. La población de insectos proviene de una cepa originaria del centro poblado de Jibito (4°54′16″S/80°44′47″O), ubicado en el norte de Perú. Esta cepa ha sido previamente descartada de infección por *T. cruzi*, ya que los insectos han sido criados con fines de investigación en el insectario del Centro de Investigación y Capacitación en Entomología - CICE de la Dirección Subregional de Salud Luciano Castillo Colonna, perteneciente al Gobierno Regional de Piura.

Procedimiento:

- **Alimentación de triatominos in vitro:** Los triatominos de cada tratamiento fueron alimentados durante 40 minutos. Antes de la alimentación, cada ejemplar se ubicó en un vaso de polipropileno con papel toalla en la base y cubierto con tela tipo tull, la cual se fijó con cinta adhesiva en los bordes para evitar la fuga de los insectos. Posteriormente, cada vaso que contenía un triatomino se colocó debajo del ala derecha de *G. gallus* para que el insecto pudiera alimentarse. Transcurrido el tiempo de alimentación, cada vaso fue trasladado a un corcho acondicionado para la crianza, donde los ejemplares permanecieron en reposo después de la ingesta de sangre.
- **Aislamiento de sangre y extracción de ADN de células sanguíneas:** Los triatominos alimentados fueron expuestos a acetato de etilo ($C_4H_8O_2$) impregnado en algodón durante 8 minutos, con el fin de inducir un estado de inmovilización. Posteriormente, se utilizó una jeringa

tuberculina cargada con 300 µL de solución conservante Shield DNA/RNA (Zymo Research) para la preservación de las células sanguíneas. Luego de la alimentación, se aisló la sangre del abdomen de cada ejemplar según el tratamiento (TP1, TP2, TP3). El aislamiento de sangre se realizó mediante punción en la ampolla rectal del insecto con una aguja de 0,5 × 16 mm, aspirando entre 80 y 100 µL de sangre.

El ADN fue extraído de las células de la sangre siguiendo las instrucciones del protocolo del Kit comercial Zymo BIOMICS DNA Miniprep (D4300). Se modificó el paso de lisis celular utilizando un macerado realizado con pistilos plásticos estériles en lugar de las microperlas de sílice, seguido de una centrifugación a 10,000 RPM. Finalmente, 15 µL del ADN obtenido fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 3% para verificar la calidad y concentración del ADN extraído.

- **PCR dirigida al gen CytB y digestión enzimática:** Se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de acuerdo con el protocolo descrito por Chena et al. (13) y las indicaciones del kit GoTaq™ G2 PCR (Promega M7801), y empleando los cebadores diseñados por Oshagi et al. (18): *Cytb1*: 5'-CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3' (Forward) y *Cytb2* 5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3' (Reverse). El volumen final de la reacción fue de 50 µL, compuesto por 22,5 µL de agua libre de nucleasas, 10 µL de buffer 1X, 3 µL de $MgCl_2$ (1,5 mM), 1 µL de dNTPs (200 µM), 2,5 µL de cebador *Cytb1* (10 µM), 2,5 µL de cebador *Cytb2* (10 µM), 0,5 µL de la enzima GoTaq Polimerasa (1 U/reacción) y 8 µL de ADN extraído de las muestras. Las condiciones térmicas del ciclaje fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 ºC durante 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturalización a 95 ºC por 30 segundos, hibridación a 58 ºC por 30 segundos, y extensión a 72 ºC por 1 minuto. Luego, se realizó una extensión final a 72 ºC durante 5 minutos, con conservación a 4 ºC hasta por 24 horas.
- Para la digestión de los amplicones, se utilizó la enzima restrictasa Hae III, que reconoce un sitio RFLP en Hae III de *G. gallus*, siguiendo el protocolo del fabricante. La mezcla de digestión consistió en 40 µL del producto PCR, 20 µL de buffer 1X y 15 µL de la enzima (10 U/reacción). La digestión enzimática se llevó a cabo a 37 ºC durante 15 minutos, seguida por una inactivación a 80 ºC durante 20 minutos. Posteriormente, 15 µL de los productos de la digestión enzimática fueron migrados por electroforesis en gel de agarosa al 3%. Como resultado esperado, se observó la presencia de tres fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) con tamaños de 159 pb, 125 pb y 74 pb, conforme a lo reportado por Chena et al [13].
- **Electroforesis en gel de agarosa:** Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3% utilizando una mezcla que consistió en 2,7 gramos de agarosa, 90 mL de tampón TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA), 4,5 µL de bromuro de etidio y 4 µL de colorante de carga (6X DNA loading dye). Se cargaron 15 µL de cada muestra (ADN, amplicones y productos de digestión enzimática) en los pozos del gel. El gel fue sometido a una electroforesis a 80 voltios y 200 mA durante 40 minutos y como marcador molecular se utilizó el Opti-DNA Marker (G016).

Análisis de datos: Se utilizaron hojas de cálculo del Software Microsoft Excel Versión 2021 para el registro de los productos PCR y RFLP del gen *Cytb* que se obtuvieron por cada muestra de sangre. De este modo, en el análisis descriptivo se especificó el tamaño de las moléculas obtenidas mediante comparación con un marcador molecular.

Consideraciones éticas:
En el presente estudio se siguió con los lineamientos éticos establecidos en la Ley N° 30407 sobre el bienestar de los animales. Así como las pautas éticas del International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS).

RESULTADOS

Aislamiento de sangre: En los tratamientos TP1 y TP2, se logró aislar sangre de los ejemplares de *P. chinai*, los cuales sobrevivieron. Sin embargo, en el tratamiento TP3 no fue posible aislar sangre, y los ejemplares no sobrevivieron, lo que se atribuye a una disminución del volumen sanguíneo debido a su degradación, la profundidad de inserción de la aguja para la aspiración de sangre y el número de intentos realizados, que causó daño en los órganos internos y la eventual muerte de cada ejemplar. Por tanto, no es recomendable proceder con el aislamiento a las 192 horas o en ejemplares de *P. chinai* cuyos abdómenes no estén distendidos debido a la escasa cantidad de sangre. Esta observación es aplicable a todos los estadios que componen el ciclo biológico del insecto, especialmente a las ninfas de estadios 4 y 5, ya que los insectos en estos estadios son de menor tamaño (con abdomen más pequeño que los adultos), lo que los hace más vulnerables a manipulaciones bruscas que podrían ocasionar su muerte.

Por otro lado, en los tratamientos TP1 y TP2, de los cuales se aisló sangre, se observó una diferencia en las características de la sangre obtenida entre las 48 y las 120 horas. A las 48 horas, la sangre presentaba un color rojo homogéneo con la presencia de coágulos, mientras que a las 120 horas, el color era rojo amarillento y no contenía coágulos. Estos resultados sugieren que la sangre obtenida a las 48 horas no mostraba signos evidentes de degradación, mientras que la sangre a las 120 horas presentó indicios de procesos de descomposición, lo que apunta a una desnaturalización de células, como las plaquetas o trombocitos, y de proteínas, como el colágeno y la trombina, que participan en la formación de coágulos (Figura 1).

Extracción de ADN, PCR y digestión enzimática del gen CytB: Se logró la extracción exitosa de ADN de la sangre aislada en los tratamientos TP1 y TP2, evidenciado por la aparición de bandas luminiscentes cercanas al pocillo, lo que indica la presencia de ADN total proveniente de células sanguíneas (Figura 2A). Así mismo, con la PCR se amplificó el gen *Cytb* de todas las muestras, llegando a observarse bandas de 358 pb (Figura 2B), lo cual demostró la obtención de material genético mitocondrial en el ADN total extraído. Además, tras la digestión del gen *Cyb* con la enzima HaeIII, se identificaron fragmentos de 159 pb, 125 pb y 74 pb, que corresponden a los polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP) del *Cytb* de *G. gallus* (Figura 2C).

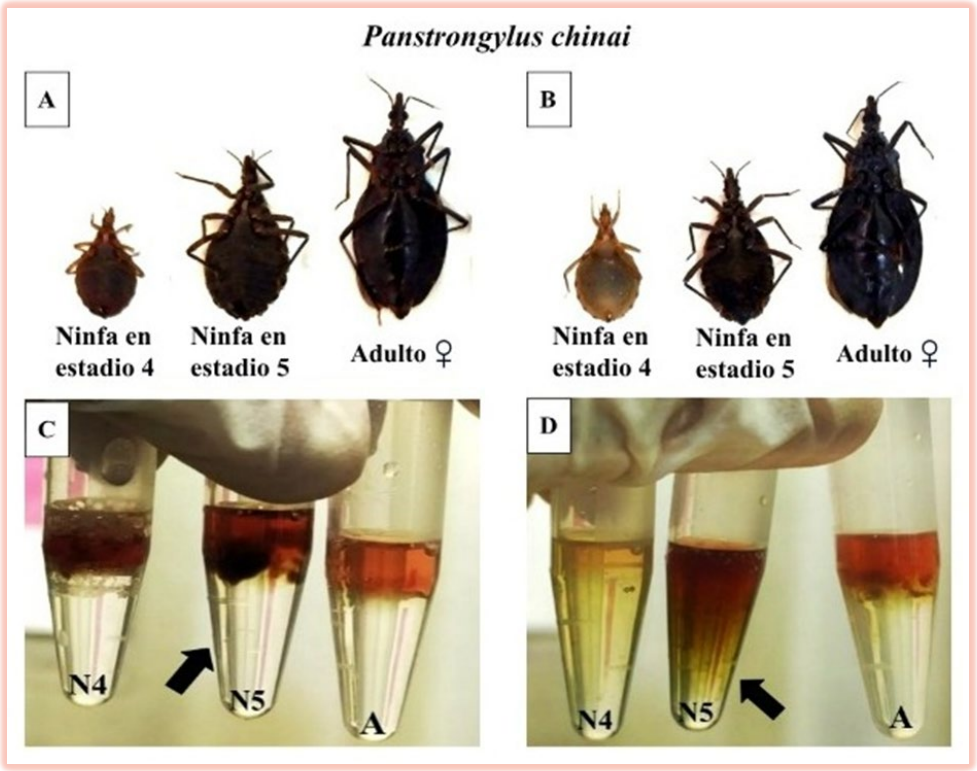

Figura 1. *P. chinai* y muestras de sangre aisladas del abdomen a las 48 horas (TP1) y 120 horas (TP2). **A.** *P. chinai* del tratamiento TP1 luego de ingerir sangre de *G. gallus.* **B.** *P. chinai* del tratamiento TP2 luego de ingerir sangre de *G. gallus.* **C.** Sangre aislada a las 48 horas en ninfa 4, ninfa 5 y adulto. **D.** Sangre aislada a las 120 horas en ninfa 4, ninfa 5 y adulto. Flecha negra señala diferencias en el aspecto de la sangre.

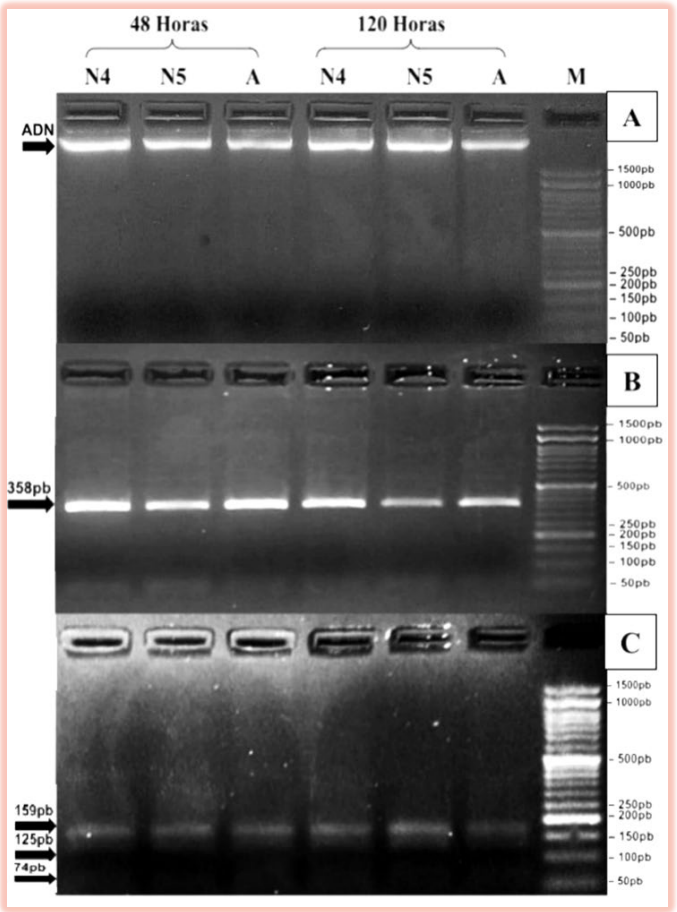

Figura 2. *Electroforesis en gel de agarosa al 3%. **A.** ADN extraído. **B.** Productos de PCR (Amplicones). **C.** Productos de digestión enzimática. (N4. Ninfa 4. N5. Ninfa 5. A. Adulto. M. Marcador de peso molecular 100 pb).*

DISCUSIÓN

A pesar de que Perú es un país tropical que continuamente es impactado por brotes de enfermedades metaxénicas y/o escenarios epidémicos de enfermedades transmitidas por insectos vectores, pocos son los estudios enfocados en la prevención. Más aún en el contexto del cambio climático que brinda las condiciones óptimas para la transmisión de enfermedades por vectores [20].

En nuestro estudio, se logró el aislamiento de sangre del abdomen de *P. chinai* alimentados con *G. gallus* a las 48 y 120 horas, lo que permitió observar diferencias en el aspecto de la sangre recolectada a lo largo del tiempo. A las 48 horas, la sangre tenía un color rojo uniforme con residuos de coágulos, mientras que a las 120 horas presentó un tono amarillento y no mostraba coágulos. Esta variación en el color y la presencia de coágulos es indicativa de procesos fisiológicos y bioquímicos que ocurren en el insecto a medida que la sangre ingerida se degrada. La degradación de la sangre puede explicarse en parte por la hemólisis, un proceso en el cual los glóbulos rojos son destruidos, liberando hemoglobina en el plasma [23,24], dicho fenómeno es consistente con lo observado a las 120 horas, cuando la sangre presenta un color amarillento. De acuerdo con Ochoa y Bouda (2007) y López (2016), la liberación de proteínas como el fibrinógeno, que juega un papel crucial en la coagulación, puede resultar en la formación de coágulos durante la toma de muestras, esto explicaría que la sangre aislada a las 48 horas del abdomen del triatomino difiera en su aspecto con la sangre aislada a las 120 horas, siendo la primera la que se encontró más fresca. Según Vegara et al. [12], la degradación de la sangre varía dependiendo de la cantidad ingerida por el insecto y de las enzimas digestivas presentes en su intestino. Estos procesos enzimáticos pueden favorecer la descomposición de las células sanguíneas y de las proteínas plasmáticas, lo que influye en el color y la visibilidad de coágulos en la muestra. Por tanto, los resultados obtenidos en este estudio son coherentes con la literatura existente sobre los procesos de degradación sanguínea que observamos. Estos hallazgos refuerzan la importancia de considerar el tiempo transcurrido desde la ingestión para la interpretación de las muestras sanguíneas en estudios de identificación de fuentes alimenticias en insectos hematófagos.

En cuanto al tiempo de detección del gen *Cytb*, se logró amplificar a las 48 y 120 horas, lo que sugiere que el ADN mitocondrial (molécula analizada en el presente estudio), puede conservarse durante al menos 120 horas después de la ingestión de la sangre. Así mismo, la digestión enzimática del gen *Cytb* con la enzima HaeIII resultó en tres fragmentos de ADN de 159 pb, 125 pb y 74 pb, que concuerdan con los reportados por Chena et al. [13] y Oshagi et al. [18], quienes utilizaron los mismos cebadores en sus respectivos estudios. Este hallazgo confirma la aplicabilidad de la técnica PCR-RFLP en el análisis de la sangre del abdomen de triatominos, específicamente para identificar fuentes alimenticias. Por otra parte, el uso de genes mitocondriales como el *Cytb*, para la identificación de fuentes alimenticias es ventajoso debido a su alta copia por célula, con estimaciones que sugieren hasta 200 copias por célula [27], lo que facilita su detección en muestras biológicas. Asi mismo, la técnica PCR-RFLP, también se ha empleado para estudiar la distribución de poblaciones de triatominos [28], demostrando ser efectiva no solo en la identificación de especies de triatominos, sino también en la determinación de sus fuentes alimenticias, como en el caso de *Triatoma sordida* [29] y *P. chinai* como hemos demostrado en esta investigación. Sin embargo, existen otras metodologías como la amplificación de marcadores universales seguido de una secuenciación de ADN, la PCR multiplex y la prueba serológica de precipitina también han sido utilizadas para estos fines [9,14,3,30]. Aunque existen diversas técnicas moleculares y serológicas para la identificación de fuentes alimenticias en triatominos, el uso de la PCR-RFLP con el gen *Cytb* es relativamente escasa en la literatura académica peruana enmarcada en el campo de la salud. Esto representa una brecha en la investigación, ya que no se ha reportado el uso de esta técnica en especies de triatominos locales, como *P. chinai*. Más aún, no existen estudios previos que hayan estimado el tiempo de detección del gen *Cytb* en este contexto, lo que hace que nuestros resultados sean particularmente relevantes para la viabilidad de esta técnica en estudios epidemiológicos y/o la prevención de enfermedades metaxénicas en el Perú.

La implicancia del presente estudio es particularmente significativa en el contexto del cambio climático y la expansión rural, fenómenos que están modificando las interacciones entre animales silvestres, domésticos y humanos. Estos cambios aumentan la distribución de los vectores de *T. cruzi*, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, haciendo aún más relevante el estudio de los patrones alimenticios de estos insectos hematófagos. Además, como se ha documentado en investigaciones previas, en Perú se han identificado varios reservorios silvestres del patógeno, entre los que se incluyen especies como *Rattus norvegicus* (rata gris), *Saimiri boliviensis* (mono ardilla), *Tamarinus nigricollis* (titi cuellinegro), *Didelphis paraguayensis pernigra* (zarigüeya andina) y *Phyllotis sp.* (ratón) [332]. Estos reservorios representan un riesgo significativo para la transmisión de *Trypanosoma cruzi* y la propagación de la enfermedad de Chagas, por lo que la identificación precisa de las fuentes alimenticias de los vectores resulta esencial para el desarrollo de estrategias de prevención y control efectivas.

Nuestro estudio presenta tres limitaciones que deben ser tomadas en cuenta. En primer lugar, la evaluación del tiempo de detección del gen *Cytb* se limita exclusivamente a *P. chinai* alimentados con *G. gallus*, por lo que no es posible generalizar los resultados con la sangre de otras especies de organismos vertebrados, debido a las diferencias en el tipo de sangre, la cantidad y la morfología celular. De igual forma, esta restricción debe aplicarse a otras especies de triatominos, ya que la degradación de la sangre podría variar debido a diferencias en la microbiota y en las enzimas presentes en el intestino según la especie. En segundo lugar, factores metodológicos como la profundidad en que se insertó la aguja y la presión aplicada durante el aislamiento de sangre, podrían haber influenciado tanto en la cantidad de sangre aislada, así como en la mortalidad de los triatominos que se vio en el tratamiento TP3. En tercer lugar, debido a la naturaleza de la investigación, se presentó la limitación de no utilizar anticoagulantes en el aislamiento de la sangre, ya que el objetivo principal fue determinar el tiempo de detección del gen *Cytb* en función del estado de la misma luego de obtenerse del abdomen del triatomino. No obstante, a pesar de estas limitaciones, se cumplió el objetivo de estudio ya que nuestros resultados indican que es posible identificar fuentes alimenticias como *G. gallus* a partir de la sangre del abdomen de *P. chinai* hasta por 120 horas después de su ingestión.

CONCLUSIONES

el presente estudio evidenció que el tiempo máximo para la detección del gen *Cytb* para identificar fuentes alimenticias en *P. chinai*, un vector de la enfermedad de Chagas en Perú, es de 120 horas después de la alimentación. Luego de este periodo, la sangre entra en un proceso de digestión en el abdomen del triatomino (aproximadamente a las 192 horas),

disminuyendo e impidiendo su aislamiento para el análisis de fuentes alimenticas.

Por otro lado, a pesar de que la sangre recolectada a las 120 horas (TP2) presenta evidentes signos de degradación en comparación con la obtenida a las 48 horas (TP1), en ambos tratamientos se logró extraer ADN con éxito y amplificar el gen *Cytb*. Estos resultados indican que, aunque la calidad de la sangre disminuye con el tiempo debido a la degradación, la capacidad para recuperar material genético y amplificar un gen mitocondrial como el *Cytb* se mantiene viable, hasta las 120 horas post-alimentación.

Se sugiere que para futuras investigaciones, se considere el desarrollo de técnicas menos invasivas para el aislamiento de sangre directamente del abdomen de triatominos, con el fin de evitar la mortalidad de los insectos y facilitar su conservación para estudios posteriores. Asimismo, se recomienda que la biotecnología molecular sea implementada y complementada con la entomología médica para innovar las estrategias de vigilancia entomoparasitológica en Perú, ya que mediante técnicas moleculares como la PCR-RFLP se podrá realizar el monitoreo de los patrones alimenticios de insectos hematofagos como los triatominos y la identificación de potenciales reservorios de distintos agentes etiológicos, lo cual permitiría mitigar el riesgo de futuros brotes epidémicos y mejorar las medidas de control sanitario.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Vega S, Mendoza A, Cabrera R, Cáceres AG, Campos E, Ancca J, et al. Primer caso de enfermedad de Chagas aguda en la Selva Central del Perú: investigación de colaterales, vectores y reservorios. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2006;23(4):288-292. doi: https://doi.org/10.17843/rpmesp.2006.234.1061

[2] Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. Número de casos de Enfermedad de Chagas, Perú 2000 – 2024. [Internet]. CDC; 2024 [citado el 05 de febrero del 2024]. Disponible en: https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2024/SE04/chagas.pdf

[3] Pinto J, Cáceres AG, Vega S, Martínez R, Náquira C. Fuentes de alimentación de Panstrongylus herreri (Hemiptera: triatominae) capturados en Utcubamba, Amazonas-Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2008;25(2):179-184. doi: https://doi.org/10.17843/rpmesp.2008.252.1255

[4] Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. Clin Dermatol. 1996;14:523-32. doi: https://doi.org/10.1016/0738-081X(96)00041-7

[5] Ngo KA, Kramer LD. Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with order-specific primers. J Med Entomol. 2003;40(2):215-22. doi: https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.2.215

[6] Tempelis CH. Host-feeding patterns of mosquitoes, with review of advances in analysis of blood meals by serology. J Med Entomol. 1975;11(6),635-53. doi: https://doi.org/10.1093/jmedent/11.6.635

[7] Marassa AM, Consales CA, Galati EA. Enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method standardization, for identification of Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis blood meals (Lutz & Neiva, 1912). Rev Soc Bras Med Trop. 2004;37(6):441-446. doi: https://doi.org/10.1590/S0037-86822004000600003

[8] Maleki-Ravasan N, Oshaghi M, Javadian E, Rassi Y, Sadraei J, Mohtarami F. Blood Meal Identification in Field-Captured Sand flies: Comparison of PCR-RFLP and ELISA Assays. Iran J Arthropod Borne Dis. 2014;3(1):8-18. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3385529/

[9] Mota J, Chacon JC, Gutiérrez A, Sánchez V, Wirtz A, Ordoñez R, et al. Identification of Blood Meal Source and Infection with Trypanosoma cruzi of Chagas Disease Vectors using a Multiplex Cytochrome b Polymerase Chain Reaction. Vector Borne and Zoonotic Diseases. 2007;7(4),617-27. doi: https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0106

[10] Pizarro JC, Stevens L. A New Method for Forensic DNA Analysis of the Blood Meal in Chagas Disease Vectors demonstrated using Triatoma infestans form Chuquisaca, Bolivia. Plos One. 2008;3(10):e3585. doi: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003585

[11] Palermo Infante PM. Identificación molecular de fuentes de alimentación en vectores virales (Díptera: Culicidae) provenientes de zonas endémicas de arbovirosis en Loreto. [tesis de maestría]. Lima: Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017. Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/7483

[12] Vergara JG, Verbel Vergara D, Bejarano EE, Montesino AM, Pérez Doria A. Estimación del tiempo límite de detección del gen citocromo b de humanos en hembras de Lutzomyia evansi. Biomédica. 2017;37(2):187-182. doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i0.3396

[13] Chena L, Nara E, Sánchez Z, Espínola E, Russomando, G. Estandarización de la técnica PCR-RFLP del gen mitocondrial cytb como herramienta para la identificación de fuentes de alimentación de insectos hematófagos. Mem Inst Investig Cienc Salud. 2014;12(2):33-42. Disponible en: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?pid=S1812-95282014000200007&script=sci_arttext

[14] Pizarro JC, Lucero D, Stevens L. A method for the identification of guinea pig blood meal in the Chagas disease vector, Triatoma infestans. Kinetoplastid Biol Dis. 2007;6(1):1-6. doi: https://doi.org/10.1186/1475-9292-6-1

[15] Omondi D, Masiga DK, Ajamma YU, Fielding BC, Njoroge L, Villinger J, et al. Unraveling host-vector-arbovirus interactions by two-gene high resolution melting mosquito blood meal analysis in a Kenyan wildlife-livestock interface. PLoS One. 2015;10(7):e0134375. doi: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134375

[16] Haouas N, Pesson B, Boudabous R, Dedet JP, Babba H, Ravel C, et al. Development of a molecular tool for the identification of Leishmania reservoirs hosts by blood meal analysis in the insect vectors. Am J Trop Med Hyg. 2007;77(6):1054-1059. doi: https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.1054

[17] Oshaghi MA, Chavshin AR, Vatandoost H. Analysis of mosquito bloodmeals using RFLP markers. Exp Parasitol. 2006;114(4):259-264. doi: https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.04.001

[18] Baum M, de Castro EA, Pinto MC, Goulart TM, Baura W, Klisiowicz DR, et al. Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis, Paraná State, Brazil. Acta Trop. 2015;143:8-12. doi: https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.11.006

[19] Cornejo A, Serrato A, Rendón B, Rocha M. Extracción y purificación de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos [Internet]. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales; 2014 [citado el 08 de febrero del 2024]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Alejandra-Vazquez-Lobo/publication/280731680_Microsatelites/links/55c3903008aeca747d5fa98f/Microsatelites.pdf#page=17

[20] Ayala Sulca YO. Mosquitos culícidos en dos áreas endémicas de dengue en Ayacucho: taxonomía, ecología larval y distribución potencial en el VRAEM. [tesis de licenciatura]. Lima: Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2023. Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/20873

[21] Riera MA, Rojas ME, Zapata PD. Protocolo de extracción de DNA por salting-out para pequeños volúmenes de sangre. Rev Cien Tecnol. 2010;(14):4-7

[22] López-Hurtado M, Cuevas-Recillas KN, Flores-Salazar VR, Guerra-Infante FM. ADN de Chlamydia trachomatis en leucocitos de sangre periférica de neonatos ADN de Chlamydia trachomaatis en leucocitos de sangre periférica de neonatos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015;33(7):458-463. doi: https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.09.019

[23] Thomas L. Hemólisis como influencia y factor de interferencia. Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory

Medicine. 2002;13(4):107–113. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6208058/

[24] Agós MD, Lizarraga R, Gambra D, Marañón A, Orozco C, Díaz E, et al. Factores relacionados con la hemólisis en la extracción de muestras sanguíneas. Anales del Sistema Sanitario de Navarra. 2008;31(2). Disponible en: https://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v31n2/breve.pdf

[25] Ochoa LN, Bouda J. Patología clínica veterinaria [Internet]. Universidad Autónoma de México; 2007 [citado el 14 de octubre del 2024]. Disponible en: https://www.bibliotecavirtualtodoeduca.com/wp-content/uploads/2021/12/Libro-Patologia-Clinica-Veterinaria.pdf

[26] López-Santiago N. Pruebas de coagulación. Acta Pediatr Méx. 2016;37(4):241-245. doi: https://doi.org/10.18233/APM37No4pp241-245

[27] Sales KG, Costa PL, de Morais RC, Otranto D, Brandao Filho SP, Cavalcanti M, et al. Identification of phlebotomine sand fly blood meals by real-time PCR. Parasit Vectors. 2015;8:230. doi: https://doi.org/10.1186/s13071-015-0840-3

[28] González-Brítez N, Morocoima A, Martínez C, Carrasco HJ. Infección por Trypanosoma cruzi y polimorfismo del citocromo B del ADN mitocondrial en Triatoma maculata de Anzoátegui y Portuguesa, Venezuela. Bol Mal Salud Ambl. 2010;50(1):85-93.

[29] Sánchez Z, Guillén L, Pineda D, Paredes B, Russomando G. Técnicas moleculares integradas a la vigilancia entomológica de vectores de la enfermedad de Chagas: Estudio del vector secundario Triatoma sordida en la Región Oriental del Paraguay. Mem Inst Investig Cienc Salud. 2020;18(1):76-83. doi: https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2020.018.01.76-083

[30] Siqueira AF. Estudos sobre a reação identificação de sangue da precipitina aplicada à ingerido por triatomíneos. Rev Inst Med trop São Paulo.1960;2(1):41-53. Disponible en: https://www.revistas.usp.br/rimtsp/article/view/202864

[31] Solís H, De Carvalho E, Ferreira C, Casanova C, Huamán A, Mendoza V, et al. Contribución al estudio de la epidemiología de la enfermedad de Chagas en tres localidades de la zona sur del Perú. In Anales de la Facultad de Medicina. 2003; 64(4):223-227. doi: https://doi.org/10.15381/anales.v64i4.1418

[32] Nancy C, Solís H, Pancorbo F. Reservorios silvestres de Trypanosoma cruzi: evaluación preliminar en la amazonia peruana. The biologist. 2012;10(2):19. Disponible en: https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4164236