

# **CAPITULO 1.**

## **INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Formulación del problema**

La infección por *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas, es una de las patologías que en el Ecuador constituyen un problema de salud pública. La enfermedad de Chagas en su ciclo de transmisión exclusivo del hombre puede ser transmitida: mediante vectores, verticalmente de la madre al feto, como resultado de accidentes de laboratorio, por el uso de drogas endovenosas, transmitida por transfusión (ECT) y por trasplante de órganos, todas ellas formas de contagio preocupantes. *Trypanosoma cruzi* es un parásito altamente complejo, del cual hace falta mucho por investigar. Por otro lado la variabilidad genética, el ciclo biológico del agente infeccioso y la autoinmunidad generada en el huésped durante la infección crónica, han dificultado el desarrollo de una vacuna eficaz. Los aspectos mencionados hacen de la enfermedad de Chagas una de las endemias más importantes del continente americano y una de las enfermedades parasitarias más enigmáticas. El Ecuador posee un programa oficial de control de la enfermedad de Chagas pero las limitaciones presupuestarias del estado lo han hecho poco operativo.

### **1.2 Justificación del problema**

El estudio de la infección por *Trypanosoma cruzi* en las poblaciones humanas constituye una importante avance epidemiológico que permite desarrollar programas de control para la transmisión vectorial, a través de insectos Triatomíneos. Los programas de control se basan en la eliminación de vectores domiciliarios y en el tamizaje serológico de poblaciones infectadas, con estas medidas se ha logrado interrumpir la transmisión en algunas áreas endémicas. Los mecanismos de patogenicidad del *Trypanosoma cruzi* actualmente no son bien comprendidos, sólo se sabe que la respuesta inmune humoral juega un rol muy importante en la resistencia y disminución de los parásitos de circulación sanguínea y, que algunos epitopos de antígenos del parásito pueden desarrollar una reacción cruzada con moléculas propias del huésped desarrollando procesos auto inmunes. Con este proyecto de investigación se pretende

dejar bases para nuevas investigaciones en enfermedades tropicales endémicas en el Ecuador. Así también la determinación de la seroprevalencia de anticuerpos anti-*T.cruzi* en las poblaciones humanas y el nivel de la infestación en los vectores involucrados así como en reservorios silvestres junto a la valoración de la respuesta inmunológica humoral en muestras positivas permitirán establecer o elaborar mecanismos de control de la transmisión de la enfermedad de Chagas en la población de General Villamil, Playas, provincia de Guayas que se someterán a estudio.

Las pruebas moleculares descritas para la caracterización de cepas de *T.cruzi* son muy importantes en el análisis de la enfermedad de Chagas, ya que ayudan a comprender aspectos relacionados a la infección y/o a patologías asociadas que pueden aparecer como producto de la infección por *T.cruzi*. En el transcurso de la infección chagásica se sabe que los parásitos o productos derivados de él son los responsables de problemas digestivos y cardiacos (Guevara, et al, 1997), mixtos o ausencia de lesiones y se torna importante la identificación de las cepas de *T.cruzi* que infectan cada uno de los huéspedes debido a que existe cierto tropismo hacia uno u otro órgano.

Además del control de vectores transmisores de la enfermedad, es necesario un buen manejo de los bancos de sangre en áreas endémicas ya que la infección por transfusión de sangre contaminada por *T.cruzi* también involucra a zonas no endémicas por la elevada migración de individuos infectados, actualmente, estos casos son muy comunes en países desarrollados, por la intervención de personas de origen latino en dichos países así se ve incluida los efectos epidemiológicos acerca de la enfermedad de Chagas en Estados Unidos y Europa (Kirchoff, 1993), es por eso que es importante tomar medidas de control y prevención de inmigrantes que provengan de zonas endémicas o de riesgo.

La mayoría de inmigrantes dentro del Ecuador y hacia fuera de él provienen de áreas endémicas para enfermedad de Chagas (Guevara, 2001). Por lo tanto, el screening serológico de bancos de sangre no solamente puede reducir la transmisión asociada a transfusiones sino que facilitaría la prevención de otras enfermedades. En Ecuador, el screening de bancos de sangre para enfermedad de Chagas es obligatorio pero no es regular en algunas áreas.

Por los antecedentes antes expuestos urge la necesidad de realizar una exploración entomológica en los diferentes barrios del Cantón General Villamil Playas por estar cerca de un sector endémico como la Parroquia rural Posorja.

### **1.3 Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Estudiar las poblaciones humanas, vectores y reservorios silvestres involucrados en el ciclo de vida del parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* en la población de General Villamil Playas, provincia de Guayas y analizar las muestras positivas para infección por *T.cruzi* para establecer el tipo de respuesta inmunológica humoral que presentan las poblaciones.

#### **1.3.2 Objetivos Específicos**

Determinar la seropositividad contra *T.cruzi* en muestras de suero sanguíneo provenientes del cantón General Villamil Playas en la provincia de Guayas y analizar la respuesta inmunológica humoral.

Determinar el nivel de infestación por *T.cruzi* de insectos triatominos y reservorios silvestres colectados en la población de General Villamil Playas de la provincia de Guayas.

Evaluar el riesgo potencial de transmisión de enfermedad de Chagas a humanos por vía vectorial en la provincia de Guayas y determinar las implicaciones de la presencia de esta enfermedad infecciosa emergente en la Costa ecuatoriana.

Aislar mediante cultivo *in vitro* e *in vivo* e identificar mediante técnicas moleculares los parásitos involucrados en la infección a humanos, vectores y reservorios del cantón de General Villamil Playas en la provincia de Guayas.

Evaluar la presentación clínica, respuesta inmunológica y proceder a tratamiento (si amerita) de las personas que presenten anticuerpos contra *T.cruzi*. El analizar la respuesta inmunológica humoral de infecciones experimentales implica utilizar diferentes antígenos totales, péptidos sintéticos derivados de secuencias del genoma de *T.cruzi*.

Establecer un programa piloto de control de vectores transmisores de la enfermedad de Chagas en una provincia de la Costa ecuatoriana, promover el intercambio científico que nos permita colaborar dentro de proyectos básicos y aplicados que se desarrollan en América Latina en relación con diferentes aspectos de la enfermedad de Chagas y que sirvan como base para una correcta ejecución del Programa Nacional de Control de la enfermedad de Chagas en coordinación con el Ministerio de Salud del Ecuador.

#### **1.4 Marco Teórico**

El descubrimiento de la tripanosomiasis americana concedida al Dr. Carlos Chagas, quien en 1909 descubrió el parásito de *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad, así también los vectores, signos clínicos en los seres humanos, reservorios silvestres y por el médico argentino Salvador Mazza quien posteriormente contribuyó al estudio y tratamiento de la enfermedad. (Wendel y Brener, 1992).

Estos hallazgos fueron publicados en Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, con el documento denominado “Nueva Tripanosomiasis Humana”, describiendo morfologías, ciclo vital en tracto digestivo del insecto, comportamientos en cultivos agar-sangre, transmisión vectorial. Posteriormente en 1913 avanza con su investigación en el diagnóstico de la enfermedad, introduciendo el método de fijación por complemento (Prueba de “Machado”) como método de diagnóstico serológico (Guerreiro, 1919) y un año después empieza a practicarse el xenodiagnóstico (Pinto-Días, 1997).

Las pruebas de hemaglutinación y ELISA aplicadas para el diagnóstico de la enfermedad fueron de gran ayuda en zonas de brotes epidemiológicos, con esto se

puedo determinar que *T. cruzi* constituye una población bastante heterogénea de parásitos que pueden o no existir en la misma zona geográfica, con esto se logro caracterizar bioquímicamente cepas de *T. cruzi* aisladas de animales y humanos, usando isoenzimas, a los que se denominó zimodemos (Miles, 1997), y la caracterización genética permitieron conocer las variación intraespecíficas del parásitos así como también para estudios epidemiológicos y diagnósticos. Un avance importante que marca la historia de la enfermedad es que a partir de los 80's inicia la etapa de biología molecular, con la clonación de material genético de *T. cruzi*, detección del parásito por amplificación de ADN del cinetoplasto (Sturm, 1989 y Ávila, 1991), secuencia repetitivas de *T. Cruzii* (Moser, 1989).

### **1.4.2 Epidemiología**

La enfermedad de Chagas es una infección parasitaria causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* y transmitida, casi siempre por artrópodos de la familia Reduvidae y subfamilia Triatominae, a este triatomo hematófago, que se le conoce como chinche. Se calcula que unos veinticinco millones de personas en todo Latinoamérica sufren sus consecuencias y que más de 100 millones están en riesgo de contagio (Montiel, Díaz. 2002).

Cada una de las parasitosis posee un ciclo epidemiológico característico, que se lo relaciona directamente con el ciclo de vida del parásito causante de la enfermedad para la supervivencia de la especie, así también los factores ecológicos, tales como el clima, terreno, pluviosidad, y las condiciones económicas, sociales y culturales que condicionan a la aparición y distribución de las parasitosis en las diversas partes del mundo (Pumarola, et al. 1978).

#### **1.4.2.1 Incidencia y prevalencia de la infección Humana**

La incidencia y prevalencia de la enfermedad es difícil de establecer con exactitud debido a la amplia variabilidad de las tasas de prevalencia, vías de transmisión, características de los parásitos con respecto a los tropismos tisulares, curvas de parasitemia, fases de desarrollo, patología clínicas, reservorios silvestres que varían de una zona endémica a otra. La enfermedad se encuentra distribuida desde 42° la latitud norte (norte de California) y 43° latitud sur (sur de Argentina y Chile), sin

embargo la distribución vectorial y silvestre es mucho más amplia (Figura 1.1) que el de la enfermedad humana. (WHO, 1991).

En general en Latinoamérica presenta datos alarmantes de la incidencia y prevalencia de la enfermedad de chagas descritos en diferentes años tomados como base de Organización Panamericana de la Salud (WHO, 1991) y estimados de PAHO determinando 18 países endémicos, desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Chile y Argentina (Figura 1.2) y un aproximado de 300.000 nuevos casos por año ocurren en Latinoamérica, 36 a 38 millones de personas afectadas de la forma crónica de la enfermedad y 30000 a 50000 muertes por año indicando una gran problemática en la salud humana y analizando a los siguientes países como los mas afectados por la enfermedad de Chagas, con una prevalencia en aéreas endémicas de cada zona coloca a Bolivia 6.8% , Argentina 4.1%, El Salvador 3.4%, Honduras 3.1%, Paraguay 2.5%, Guatemala 2%, Ecuador 1.7%, Venezuela 1.2%, Nicaragua 1.1%, Brasil 1%, y México 1%.

Con respecto a la incidencia de la enfermedad en datos anuales de algunos países se tiene Colombia con datos de 39 mil casos nuevos anuales, Guatemala con 30 mil casos nuevos por año Perú 24 mil nuevos casos anual, Paraguay 15 mil casos nuevos anuales, Honduras la incidencia es de 9 800 casos por año, siendo baja todavía esta incidencia. Sin embargo en distintos países la prevalencia de seropositividad de los donantes de sangre varia, Bolivia tiene la mayor incidencia con mas del 60% en personas donantes infectadas, Argentina varia entre 5% – 20%, Guatemala con un 13 %, Chile de 0- 15% y Costa Rica con una baja incidencia de hemodonantes infectados apenas 1%.

En el caso de Estados Unidos se han reportado cinco casos autóctonos de la enfermedad, se considera que un gran numero de inmigraciones latinos se encuentran infectados, por lo que el estudio epidemiológico y la prevalencia de la enfermedad es monitorea especialmente por lo donantes de sangre, transplantes de órganos en los diferentes distritos del país (Kirchoff, 1993), ya que en 1990 se estimo que mas de 100 mil personas residentes en el país era seropositivos (Hagar, 1991).

#### **1.4.2.2 Enfermedad de Chagas en el Ecuador**

Se estima que actualmente la prevalencia en el Ecuador de la enfermedad de Chagas de acuerdo a las últimas investigaciones realizadas se estima que es de 1.38% de la población en general (0,65 % en la Sierra, 1,99 en la Costa y 1,75 en la Amazonía) (Grijalva, et al, 2003), lo que sugiere que entre 176.400 personas son seropositivas en el país y unas 3 a 5 millones de personas viven vulnerables a contagio en áreas donde la transmisión vectorial se ha demostrado, se describen como las principales zonas endémicas a regiones que se encuentran en Guayas, Manabí, El Oro, Loja (Chico et al., 1997; Aguilar et al., 1999 Abad- Franch y Aguilar, 2000; Abad- Franch et al., 2001). También se han descubierto focos de transmisión en la Amazonia norte (Sucumbíos, Napo y Orellana); sin embargo, escasa información documentada se tiene de la provincia de Pastaza.

En cuanto a la incidencia de nuevos casos, las estimaciones indican que puede esperarse que unas 3000 nuevos casos de personas adquieran la infección cada año en ausencia de un control epidemiológico adecuado de la enfermedad y más de 300 muertos por año (Abad- Franch et al., 2002).

La mayoría de inmigrantes dentro del Ecuador y hacia fuera de él provienen de áreas endémicas para enfermedad de Chagas (Guevara, 2001). El Ecuador es uno de los pocos países que carecen de un programa estructurado de control, por eso en Ecuador, el screening de bancos de sangre para enfermedad de Chagas es obligatorio pero no es regular en algunas áreas. Además, se ha detectado donantes de sangre positivos para anticuerpos anti-*T.cruzi* en áreas endémicas y no-endémicas del Ecuador (Guevara, et al, 1999) por lo que el screening de todos los bancos de sangre en el Ecuador junto a la eliminación de vectores o la comprensión de sus ciclos biológicos dentro de la naturaleza son una prioridad dentro del control de la enfermedad de Chagas. En 1999, se informó que la tasa de prevalencia era del 1.1% en el banco de sangre de la Cruz Roja de Guayaquil y del 6.9% en el banco de sangre de Machala (Guevara, et al, 1999). En años posteriores se determinó que la prevalencia de la enfermedad de Chagas en zonas como Manabí 0.4%, Guayas 1.2%, El Oro 16.4% y Pichincha 3.9%. (Garzón, Et al, 2002). De acuerdo a los estudios que se tiene disponible la información en los bancos de

sangre después de 1995, las seroprevalencias alcanzan el 4.4% en Guayaquil zona endémica. Hasta la actualidad se tiene información de las tasas de incidencia de la enfermedad de Chagas en el Ecuador (Figura 1.3).

En el Ecuador a los transmisores se los conoce comúnmente con el nombre de Chinchas. Existen más de cien especies de chinchorros, pero no todas transmiten la enfermedad. En el territorio ecuatoriano se han clasificado 15 especies, pero las más peligrosas por convivencia con el hombre es en primer lugar *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius ecuadoriensis* son los vectores de mayor importancia epidemiológica. *T. carrioni*, *Pastrongylus rufotuberculatus*, *P. chinai* se constituyen en especies domiciliadas en áreas geográficas restringidas. Especies que invaden hábitats humanos desde ecótopos silvestres: *P. geniculatus*, *R. pictipes*, *R. robustus* y *P. howardi*. Las tres primeras especies han sido involucradas en la transmisión de la enfermedad en los focos amazónicos. Todas las especies citadas han sido encontradas naturalmente infectadas por *T. cruzi*.

Se ha estimado que alrededor de al menos 14000 pacientes sufren diferentes grados de cardiopatía crónica de origen chagásico en el Ecuador (Abad- Franch et al., 2002). Y se calcula que las formas digestivas pueden representar alrededor del 3% de todos los pacientes chagásicos del Ecuador, el megacolon podría ser más frecuente que la enfermedad cardíaca en la zona del Oro (Guevara, 2001). Pero obviamente es importante destacar que el sistema de atención primario en el país es muy débil por lo que en muchos casos de EC no son diagnosticados.

### **1.4.3 *Trypanosoma cruzi***

*Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* es un protozooario hemoflagelado, se caracteriza por presentar un solo flagelo y una sola mitocondria donde se sitúa el cinetoplasto, que es un organelo especializado que contiene el DNA. (Kirchhoff LV, 1993, Miles MA, 1998).

*T. cruzi* presenta un ciclo vital complejo en el que pueden diferenciarse en cuatro estadios morfológicos tanto en los distintos hospederos y en medios de cultivo se identifican.

**Amastigote:** forma evolutiva esférica u ovoide de pequeño tamaño, 1,5 - 4 micrómetros, en el que distinguen en núcleo y el cinetoplasto, inmóvil por carecer de flagelo libre. Presente exclusivamente en el huésped vertebrado como parásito intracelular, donde se multiplica.

**Epimastigote:** tienen cuerpo alargado, delgado y fusiforme, con corta membrana ondulante y flagelo libre, mide de 20 a 40 micrómetros, con el cinetoplasto ubicado delante del núcleo. Parasita exclusivamente al insecto vector en el lumen del tubo digestivo, donde se multiplica, manteniéndose la infección del invertebrado por tiempo indefinido.

**El tripomastigote sanguíneo** es flagelado, alargado, con el cinetoplasto grande alejado de la parte anterior del núcleo; similar al estadio anterior, puesto que también presenta flagelo y membrana ondulante. Este estadio se encuentra en la sangre y no tiene capacidad para dividirse, pero sí la tiene para invadir otras células.

**Tripomastigote metacíclico:** presente tanto en el huésped como en el vector. Posee cuerpo alargado y fusiforme, citoplasma granuloso con un núcleo central, presenta un cinetoplasto subterminal con larga membrana ondulante y flagelo libre, longitud promedio 20 micrómetros, son extracelulares y no tienen capacidad para replicarse. Se las define como forma de traslado para pasar de un huésped a otro. (Brenner Z, 1971., Tay J, et al, 1991) (Figura 1.4).

El parásito es capaz de atravesar las mucosas sanas. Las más expuestas son la ocular, la nasal y bucal. El material contaminante puede llegar directamente a ellas, debido a que las deyecciones frecuentemente son evacuadas con cierta violencia, disparadas como un proyectil, o ser arrastradas involuntariamente con las manos, al rascarse o refregar la cara.

#### **1.4.3.1 Taxonomía de *Trypanosoma cruzi***

La clasificación de los trypanosomas está basada en un conjunto de criterios que incluye el ciclo de vida, su morfología, el desarrollo dentro del invertebrado y la relación parásito-hospedero.

La clasificación del *Trypanosoma cruzi*.

<b>Reino</b>	Protista
<b>Sub Reino</b>	Protozoa
<b>Phylum</b>	Sarcomastigophora
<b>Sub Phylum</b>	Mastigophora
<b>Clase</b>	Zoomastigophorea
<b>Orden</b>	Kinetoplastida
<b>Sub Orden</b>	Trypanosomatina
<b>Familia</b>	Trypanosomatidae
<b>Género</b>	Trypanosoma
<b>Sub género</b>	Schizotrypanum
<b>Especie</b>	cruzi

*Trypanosoma cruzi* pertenece al orden Kinetoplástida, familia Trypanosomatidae por presentar un flagelo y una organela con ADN muy condensado llamada cinetoplasto. Se encuentra dentro del subgénero Schizotrypanum por tener un cinetoplasto voluminoso y multiplicarse intracelularmente dentro de sus huéspedes vertebrados. Pertenece a la Sección Stercoraria porque la forma infectante es transmitida por las heces del insecto vector (Paes y Rayol, 1996).

#### 1.4.3.2 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo de vida de *T. cruzi* requiere normalmente de dos huéspedes: un insecto capaz de producir formas metacíclicas y un mamífero. El insecto vector son Hemípteros de la familia Reduviidae subfamilia Triatominae. Por su característica de hematófagos obligatorios, se infecta al ingerir sangre de los mamíferos con tripomastigotes. En el lumen del intestino medio del insecto, los parásitos se multiplican muy activamente como epimastigotos fisión binaria y, al cabo de quince a treinta días, se desarrollan los tripomastigotes metacíclicos formas infectantes no replicativas en el intestino posterior del triatoma. Cuando el insecto infectado pica al mamífero, emite deyecciones con tripomastigotes, que atraviesan la piel por el sitio de la picadura o por las mucosas. En los mamíferos, los tripomastigotes se introducen en las células del

tejido celular laxo, vecino al sitio de la penetración y adquieren la forma de amastigotes formas intracelulares replicativas presentes en varios tejidos de los huéspedes. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria, repletan la célula, que termina por romperse y salen los parásitos a la circulación bajo el aspecto de tripomastigotes circulantes en sangre periférica de los huéspedes mamíferos: formas extracelulares, no replicativas. El ciclo se completa cuando los tripomastigotes son ingeridos por el insecto vector. (Noireau, 1999; Abad-Franch y Aguilar, 2000). (Figura 1.5).

*Trypanosoma cruzi* presenta una gran diversidad de huéspedes vertebrados. Anfibios y las aves son refractarios a la infección; mientras que ha sido demostrada la susceptibilidad en más de 200 especies/subespecies de mamíferos. Las zarigüeyas (*Didelphis* spp.) algunos roedores (*Rattus* spp., *Mus musculus*) y armadillos (*Dasypus* spp.) son los principales reservorios silvestres, se concluye tal vez que suceda como resultado del desequilibrio ecológico, y así también esta enfermedad se extiende al ambiente domiciliario y peri domiciliario afectando humanos y animales domésticos (O'Daly y Azocar, 1984; Zingales *et al.*, 1998; Noireau, 1999; Abad-Franch y Aguilar, 2000).

#### **1.4.3.2 Variaciones intraespecíficas y genoma de *Trypanosoma cruzi***

Este parásito constituye una población altamente heterogénea, el *T. cruzi* comprende un conjunto de cepas que circulan entre vectores, hombre y reservorios, tanto domésticos como selváticos. Los aislamientos del parásito de diversos hospederos han demostrado una gran variación intraespecífica en cuanto a diferencias morfológicas de las formas sanguíneas, virulencia, habilidad para inducir lesiones, susceptibilidad para agentes quimioterapéuticos, constitución antigénica y capacidad de infección para células hospederas, curvas de parasitemias y respuesta inmune del huésped (Brenner Z, 1985). Desde 1950 se han realizado estudios en diferentes cepas del parásito, lo que ha permitido establecer que el *T. cruzi* que proviene de diferentes transmisores, reservorios y regiones del mismo país, se comportan diferente al infectar experimentalmente animales de laboratorio. Estas diferencias se manifiestan en los niveles de parasitemia e invasión a ciertos órganos, así como a diferencias en las infecciones que el parásito ocasiona tanto en animales como en humanos, causando desde daños leves hasta la

muerte. Este comportamiento tan variado se ha atribuido a múltiples causas como: factores ambientales, inmunidad, virulencia, patogenicidad, y el paso por diferentes especies de transmisores y hospederos (Bice D, Zeledón R, 1970).

La importancia de analizar las diferentes cepas de *T. cruzi*, es para conocer si las diferencias biológicas de estas cepas están involucradas en la presentación clínica de los pacientes así también en la respuesta inmunológicas al tratamiento, ya que el comportamiento del parásito puede estar influenciado por el mismo hospedero o las condiciones del medio ambiente, lo que lleva a realizar una caracterización molecular, bioquímica de las diferentes cepas de *T. cruzi*, para correlacionar con los hallazgos clínicos y epidemiológicos de la enfermedad ligados a la respuesta inmune humoral de los pacientes. (Andrade SG, 1985).

El conocer las bases biológicas de tal variación se han aplicado métodos que permiten identificar cepas de *T. cruzi* a nivel molecular, entre ellas los basados en lectinas, la caracterización de isoenzimas, propiedades bioquímicas e inmunológicas, la restricción del ADN de los mini círculos del cinetoplasto (Pinto-Días, 1997). A nivel molecular el estudio del genoma del *Trypanosoma cruzi* es muy limitado.

A pesar de esta variabilidad, las poblaciones de *T. cruzi* fueron clasificadas en tres grupos sobre la base e sus perfiles isoenzimáticos (zimodemas Z1, Z2 y Z3) (Miles MA, 1977; Barrett TV, et al, 1980). Más tarde, la aplicación extensiva de métodos de electroforesis a diversos aislados del parásito llevó a la subdivisión de estos zimodemas en un gran número de pequeños subgrupos isoenzimáticos (hasta 43) (Tibayrenc M, 1988).

En estudios recientes, algunos marcadores moleculares (genes del RNA ribosomal, genes mini-exón, microsatélites) y el análisis funcional de genes promotores permitieron la definición de dos grupos principales de parásitos (descritos como linajes filogenéticos 1 y 2, que se corresponden ampliamente con Z2 y Z1, respectivamente); estos hallazgos ayudaron a poner de manifiesto la complejidad de los ciclos selváticos de este parásito. En la actualidad los taxones de *T. cruzi* son agrupados en dos linajes principales: *T. cruzi* I (zimodema Z1 o linaje 2) y *T. cruzi* II (zimodema Z2 o linaje 1,

que incluye cuatro subgrupos [IIa=Z3, IIb=Z2, IIc=Z3/Z1 ASAT, IId=Z2 Boliviano y IIE=Z2 Paraguayo] (Miles MA, 2002).

#### **1.4.4 Mecanismos de Transmisión del *Trypanosoma cruzi***

El reservorio es animal (armadillo, ratón campestre, perro, gato, cerdo, etc) y humano. La transmisión se realiza casi siempre por artrópodos de la familia Reduvidae y subfamilia Triatomidae, que incluye varios géneros que pueden transmitir la enfermedad. Resulta menos frecuente el contagio por transfusión, coito, alimentos, leche materna, accidentes en laboratorio y congénito. Las medidas de profilaxis se basan en el control de donantes seropositivos en áreas endémicas, eliminación del reservorio animal y lucha contra el artrópodo vector mediante insecticidas de contacto (Pumarola, et al, 1978).

La mayoría de los casos de infección humana ocurre en las áreas rurales en donde la transmisión se produce a través del contacto de la piel o de las mucosas del futuro huésped con heces u orina contaminada de los insectos vectores, por lo general, el contacto de las heces contaminadas se establece por los sitios de la picadura del vector al huésped durante el proceso de alimentación del vector. De esta manera los humanos entran a formar parte del ciclo de vida del parásito, generalmente en calidad de huéspedes accidentales.

En áreas urbanas, sin presencia de triatominos, la principal vía de transmisión de *T. cruzi* puede ser la transfusión sanguínea tanto de sangre total como de hemoderivados (Guevara *et al.*, 1999). Este modo de transmisión es un problema potencial inclusive en áreas no endémicas ya que por la migración de pobladores de las áreas rurales hacia las zonas urbanas, se incrementa la posibilidad de infección a través de sangre infectada y con deficiente control en los bancos de sangre (Grijalva *et al.*, 1997).

*T. cruzi* también puede ser transmitido por otras rutas: la vía congénita, transplante de órganos, transmisión oral, accidentes de laboratorio y en casos

excepcionales infección a través de la leche materna o por transmisión sexual (Noireau, 1999; Valente *et al.*, 1999; Abad-Franch y Aguilar, 2000)

#### **1.4.4.1 Transmisión Vectorial**

La transmisión vectorial es la infección con mayor porcentaje (80%) de contagio por insectos hematófagos obligatorios de la subfamilia *triatominae*. El vector más importante de la enfermedad de Chagas en el Ecuador es el *triatoma dimidiata*, predominantemente en las Provincias de Guayas y Manabí, aunque se ha encontrado en todas las Provincias de la Costa, es exclusivamente doméstico y peridoméstico, por lo que puede ser erradicado; *Rhodnius ecuadoriensis* actúa como vector primario en los valles interandinos de Loja y El Oro, y como vector secundario en zonas de la Costa donde existen poblaciones silvestres. La amplia distribución del parásito está íntimamente relacionado con el vector ya que este está presente en clima tropical y subtropical con una temperatura que oscila entre los 20° a 34° C. Los triatominos ocupan áreas con un amplio rango climático, incluyendo pluviosidad anual (desde 62.5-125mm/año en zonas de desierto tropical hasta 2000-4000mm/año en zonas de bosque lluvioso) y temperaturas medias anuales (desde 12-18°C en el bosque montano bajo hasta 24-30°C en zonas costeras de bosques secos tropicales). En cuanto a la altitud, varias especies ocupan áreas a nivel del mar, mientras que existe un registro de *T. carrioni* a 2650m (Abad-Franch, et al, 2001)

De las 130 especies de Triatominos actualmente reconocidas, más de 100 son capaces de albergar al parásito; sin embargo, solamente los Triatominos domiciliados son considerados vectores epidemiológicos importantes aunque no se debe descartar la presencia de vectores peri-domiciliarios como riesgo de infección humana. En el Ecuador, se han reportado 16 especies de triatominos, de los cuales 13 son vectores potenciales. Los principales vectores son *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius ecuadoriensis* en la sierra y costa; mientras que en la amazonía *Rhodnius pictipes*, *R. robustus* y *Panstrongylus geniculatus* han sido identificados como vectores potenciales (Amunárriz, 1991; Chico *et al.*, 1997; Aguilar *et al.* 1999; Abad-Franch y Aguilar, 2000; Abad-Franch *et al.*, 2001). Tienen el aspecto similar al de las grandes chinches vegetales, con forma alargada y el abdomen ancho y aplastado cuando está vacío. El

tamaño y la coloración varían con la especie. La cabeza es alargada, cilíndrica o cónica que posee en su parte anterior la probóscide o trompa picadura, tiene dos antenas largas, el tórax es firme, duro y de él nacen dos pares de alas bien desarrolladas, el abdomen es amplio, ensanchado con un borde lateral llamado conexivo que en muchas especies, posee manchas características de gran importancia taxonómica. *Triatoma infestans* en el ámbito domiciliario se comporta como un insecto nocturno, que solo abandona su refugio en la noche, o cuando hay oscuridad y tranquilidad suficiente para atacar a las personas y animales mientras duermen, durante el día se refugia en la profundidad de las grietas, o detrás de los cuadros o papeles, dentro de los muebles o de las prendas de ropa que quedan colgadas en la pared.

Este insecto es conocido en Bolivia con el nombre de vinchuca, en Brasil como barbeiro, chupa o bicudo, en Perú como chirimacha, en Ecuador como chinchorro, en Estados Unidos como kissing bug o cone nose bug.

Generalmente los jóvenes y niños son los más afectados de la transmisión vectorial, estos reducidos pican en general por la noche y transmiten el parásito a través de las heces por la herida de la picadura, otras heridas o la piel y mucosas (conjuntival) sanas, ocasionando la principal manifestación de la enfermedad, denominado signo de Romania. En diferentes especies de triatomíneos, la susceptibilidad a diferentes cepas del parásito varía así como la capacidad del parásito en diferenciarse en formas infectantes meta cíclicas (Pinto-Días, 1997).

#### **1.4.4.2 Transmisión por transfusión sanguínea**

Se han descrito otros mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas como la transfusión de sangre o hemoderivados provenientes de individuos infectados por *T. cruzi* como causa de casos fatales de enfermedad de Chagas aguda (Villalba, et al, 1992). En el humano esta es la transmisión segunda más importante de la enfermedad de Chagas, actualmente la enfermedad no se encuentra solo en Latinoamérica pero por las tasas altas de las inmigraciones se ha visto la posibilidad de encontrar casos en países desarrollados donde la enfermedad no es endémica debido al alto porcentaje de transfusiones sanguíneas, extendiéndose así la enfermedad y causando un problema

mundial. Factores relacionados al parásito, individuo receptor, número de transfusiones recibidas, prevalencia de la infección en las áreas de estudio pueden ser asociadas con el riesgo de adquirir el T.cruzi, así también un grupo de alto riesgo de adquirir la enfermedad son los pacientes hemofílicos ya que ellos requieren de transfusiones frecuentes (WHO, 1991).

#### **1.4.4.3 Transmisión vertical (Trans placentaria)**

En Latinoamérica alrededor del 2-10 % oscila el riesgo de contraer la infección por transmisión transplacentarias, es decir aproximadamente entre 10-20% de las mujeres embarazadas chagásicas corren el riesgo de transmitir la enfermedad a sus hijos. (Pinto-Días, 1997). En humanos se ha podido determinar que el mecanismo congénito suele ocurrir en el 3<sup>er</sup> a 5<sup>to</sup> mes de embarazo, dependiendo de la infección o colonización y daño del parásito a la placenta, desde donde este es capaz de causar la infección al feto (Wendel, 1992). El neonato puede presentar un espectro amplio de manifestaciones clínicas que van desde la manifestación de síndromes agudos, que pueden ser fatales, hasta cuadros asintomático.

Por otra parte importante de la transmisión congénita, es que la madre transmite IgG al feto, las pruebas serológicas convencionales no necesariamente detecta la enfermedad al hijo, particularmente durante los primeros 4 a 5 meses de vida. El diagnóstico congénito de la enfermedad de Chagas se lo realiza por métodos parasitológicos y detección de anticuerpos IgM específicos. Lo relevante de la transmisión congénita está en el diagnóstico temprano y terapia específica a los infantes infectados, con métodos serológicos convencionales a los 6 -12 meses también pueden ayudar a diagnosticar al bebé y su posterior tratamiento (Wendel, 1992). Estudios en Chile y Argentina han demostrado que cuando el tratamiento se inicia antes de los 6 meses de edad, el niño puede recuperarse de los síntomas y es posible erradicar la infección del organismo.

#### **1.4.4.4 Formas excepcionales de transmisión**

##### **Accidentes de laboratorio**

Esta transmisión es muy común en hospitales o laboratorios por el manejo inadecuado de agentes biológicos contaminados, por parte de los investigadores o del equipo de colaboradores que no acatan las medidas de bioseguridad de los laboratorios. Es así importante el manejo de triatominos, cultivos, animales de experimentación infectados, muestras sangre. Aproximadamente 60 casos han sido reportados por accidentes de laboratorio, por eso debe ser considerada la enfermedad de Chagas una de las mayor enfermedades infecciosas parasitarias importantes con riesgo en los laboratorios, con riesgo mayor incluyendo enfermedades virales y bacterianas (Pinto-Días, 1997).

##### **Transmisión oral**

El método de transmisión es posible a través del consumo de alimentos contaminados con heces de triatominos infectados, alimentación con triatominos y animales infectados o por la leche materna.

##### **Transplante de Órganos.**

Dada la poca información documentada sobre la transmisión de T.cruzi a través de transplante de órganos, ha recibido poca atención. Sin embargo los pacientes que han recibido donaciones de pacientes chagásicos crónicos han presentado episodios agudos de la enfermedad. Algunos casos fatales se han reportado en los cuales el parásito se ha identificado y aislado de diferentes órganos. Es decir como los individuos receptores son inmunosupresores, la susceptibilidad de ellos aumenta considerablemente (Wendel, 1992).

#### **1.4.5 Clínica de la Enfermedad**

La clínica de la enfermedad de chagas que sufre el huésped vertebrado puede clasificarse en tres etapas: Una fase aguda de corta duración, otra etapa bastante duradera la fase crónica y una fase asintomática llamada etapa indeterminada. El

porcentaje de mortalidad en el Chagas varía del 1% al 5% con una mayor incidencia en niños de corta edad. En los casos de muerte cardíaca los casos ocupan más del 50%. En los niños es más común que afecte el encéfalo y el corazón, lo que origina un mayor riesgo de muerte. El periodo de incubación es de 1-2 semanas y la enfermedad evoluciona en dos fases, aguda y crónica. El período de incubación dura entre 7 y 10 días en los casos de transmisión vectorial y de 7 a 40 días en los de contagio por transfusión de sangre contaminada. Este período puede de todos modos variar ampliamente; así, en contaminaciones con grandes volúmenes de inóculo (como accidentes de laboratorio con material altamente infectado) el período puede ser menor; además, el tiempo de incubación es imposible establecer con precisión en los pacientes asintomáticos.

### **Fase aguda**

La mayor parte de las veces pasa inadvertida y cuando se detecta aparece principalmente en niños. El principal síntoma es la fiebre observándose en el 95% de los casos, el periodo febril guarda relación con el nivel de parasitemia y con la gravedad de la infección persiste entre 2 a 4 semanas después del contacto inicial con el parásito, Los síntomas de esta fase, cuya mortalidad es de 5-10% duran 2-3 meses. Esta etapa presenta síntomas generales como fiebre, decaimiento, anorexia, astenia, vómitos, diarrea, cefalea, raquialgia, irritabilidad, llanto persistente, inquietud, convulsiones, tos, palpitaciones. Cuando la picadura es próxima de la boca, ojo o nariz comienza con una papula de color oscuro o un nódulo ulcerado (chagoma), en el lugar de la picadura, acompañado de adenopatía regional. El edema subcutáneo se observa en más del 50% de los casos inicialmente se presenta en la cara y avanza hacia el tronco y extremidades. Sin embargo la cardiopatía parece ser la lesión más anatomopatológica más constante. La hepatoesplenomegalia se presenta del 30% a 40% de los casos con repercusiones, principalmente en lactantes. La cura espontánea de la enfermedad en la fase aguda se ha observado que es del 30 al 70% de pacientes en esta etapa. ( Filardi, 1987). La presencia de una serie de síntomas y signos de alarma puede orientar el diagnóstico: complejo oftalmoganglionar o signo de Romania, chagoma aparece en el 20-25% de casos agudos diagnosticados, fiebre 90-100% de casos; prolongada, irregular, sin respuesta a tratamientos convencionales, edema 50-60% de casos, generalmente discreto; extensión céfalo-caudal; en ocasiones generalizado, sobre todo en niños.

## **Fase indeterminada**

Luego de superada la fase aguda se entra en una fase de latencia que puede durar muchos años o el resto de la vida. Se considera que están dentro de esta fase los pacientes que tengan pruebas serológicas y/o parasitológicas positivas para una enfermedad de chagas, ausencia de manifestaciones clínicas de la enfermedad, electrocardiograma convencional y corazón, colon y esófago radiológicamente normales. Muchos casos agudos no tratados pasan a la fase crónica indeterminada. Los pacientes pueden permanecer estables (50-70% de casos) o evolucionar hacia formas crónicas sintomáticas cardiacas y/o digestivas (30-50%); la muerte súbita acontece en un porcentaje mal definido de pacientes, lo que obliga a imponer algunas restricciones laborales (pilotos, operadores de maquinaria peligrosa, conductores de transporte público, etc.). Esta es la forma más común en zonas endémicas, y puede persistir por el resto de la vida en un 40% o más de los individuos infectados y gran parte de ellos 30% sufrirán daños cardiacos y digestivos crónicos después de 10 a 25 años.

## **Fase crónica**

La fase crónica se presenta en alrededor del 30% de los pacientes y produce lesiones en el sistema cardíaco, digestivo y en el sistema nervioso central y periférico. Si, la enfermedad puede llegar a ser mortal en aquellos pacientes, en la etapa crónica, que desarrollan lesiones cardíacas graves, las que determinan la muerte en forma sincopal o por insuficiencia cardiaca progresiva.

Se manifiesta varios años después y a veces sin antecedentes de la fase anterior. Los dos hechos primordiales son la afectación miocárdica, que conduce a un deterioro cardiaco progresivo y muerte en 6-12 meses, y la dilatación de los órganos tubulares, megacolon mega esófago, mega uréter, etc., razón por lo que se conoce como enfermedad 'mega' (Pumarola, et al, 1978). Se puede manifestar como miocardiopatía chagásica o como formas digestivas crónicas.

La forma cardiaca, es la mas estudiada y fácil de diagnosticas, las manifestaciones clínicas depende del grado del daño al miocardio, arritmias, y el grado de falla cardiaca. (Wendel, 1992) Miocardiopatía chagásica: se manifiesta desde el período subclínico, con alteraciones del electrocardiograma que comprenden un bloqueo de la rama derecha del haz de Hiss y un hemibloqueo anterior izquierdo. El paciente

puede mantenerse con esta alteración durante años o durante toda su vida en forma asintomática pero también puede hacerse sintomática, en este último caso el paciente puede presentar disnea de esfuerzo, palpitaciones dolor precordial y puede llegar a la insuficiencia cardíaca que es predominantemente derecha y el ecocardiograma resulta de gran utilidad para el seguimiento y evolución, radiológicamente se encuentra un acusado agrandamiento del área cardíaca. Los pacientes con daño severo del miocardio desarrollan enormes aumentos de tamaño del miocardio, insuficiencia cardíaca y fenómenos de trombo embolismo. La muerte súbita, por fibrilación ventricular, puede ocurrir en cualquier momento de la evolución de la enfermedad. La punta del ventrículo izquierdo frecuentemente es sede de una lesión aneurismática característica de la miocardiopatía chagásica crónica.

Formas neurológicas, están involucradas con sistema nervioso central, autónomo o periférico, estas son formas clínicas más desconocidas (Wendel, 1992), un 10% de pacientes desarrolla alteraciones del sistema nervioso periférico, que por lo general no interfieren con la vida normal. Estas incluyen parestesias en miembros inferiores. Hay pérdida de neuronas motoras en algunos grupos musculares de los miembros superiores e inferiores y una reducción de la velocidad de conducción en los nervios motores periféricos.

La forma digestiva, cualquier porción del tracto digestivo puede verse involucrado en la fase crónica de la enfermedad, pero los fragmentos más afectados son el esófago y colon. (Wendel, 1992) Formas Digestivas crónicas, las principales alteraciones del tubo digestivo en los pacientes chagásicos son las megavisceras como el megaesófago y el megacolon, que son los lugares que más frecuentemente son afectados, pero también puede aparecer mega uréter, mega vejiga, megas de la vía biliar pero estas formas son de rara observación, los pacientes se desnutren y sufren de frecuentes infecciones del aparato respiratorio. En el megacolon los principales signos y síntomas son la constipación, el meteorismo y el dolor abdominal.

#### **1.4.6 Respuesta humoral: Anticuerpos e Inmunoglobulinas**

La respuesta inmunitaria humoral se caracteriza por la aparición de sustancias denominadas anticuerpos, capaces de reaccionar con los antígenos que desencadenaron su producción, se habla de globulinas plasmáticas que precisamente por su actividad anticuerpo, se conoce genéricamente como inmunoglobulinas Ig. En el hombre se conoce 5 clases de Inmunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, la relación de los anticuerpos a una u otra clase de IG depende de la naturaleza del antígeno, vías de administración y momentos de inmunización, especie de animal. Las especificidades que se encuentran en todos los individuos de la misma especie constituyen los isótopos.

Las relaciones entre el parásito y el huésped pueden dar lugar a los diferentes grados de parasitismo, con o sin alteración del huésped, que pueden manifestarse en caso positivo por la aparición de síntomas y signos clínicos. Los factores para que se de una respuesta inmunitaria, cuando el parásito (antígeno) toma de contacto, reconocimiento de la puerta de entrada, penetración, invasión y tropismo tisular. El huésped humano ofrece una resistencia a los parásitos mediante unas barreras mecánicas y físico-químicas inespecíficas, y una respuesta inmunitaria específica. Las primeras son similares en todos los casos, el mecanismo de la inmunidad en el huésped varía según el parásito. (Pumarola, et al, 1978).

#### **1.4.7 Métodos de Diagnóstico**

El diagnóstico adecuado de un proceso infeccioso es la determinación de un agente patógeno o de sus productos en tejidos o fluidos del huésped. Esta detección no siempre es posible debido a la baja presencia del agente infeccioso o a la falta de sensibilidad en los métodos utilizados.

Los métodos inmunológicos directos e indirectos se han utilizado para en cierta forma suplir las deficiencias de los métodos parasitológicos (Guhl F., Nicholls S., 2001). Los diferentes métodos actualmente para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en las diferentes etapas clínicas de la enfermedad, se la determina de acuerdo a la cantidad de parásitos circulantes en la sangre, mediante observación microscópica

como en la fase aguda en donde la parasitemia es alta, previa tinción de Giemsa de muestras de sangre. En las extensiones de los dos primeros tipos de muestras se detecta la presencia de trypomastigotes y en los de tejidos, la de amastigotes. La observación de epimastigotes en los tejidos es más difícil otros métodos parasitológicos directos usados, examen directo de sangre periférica, gota gruesa y extendido de sangre periférica, método de strout, y como métodos indirectos usados como el xenodiagnóstico y hemocultivos en donde los cultivos en células dipolides humanas o en el medio NNN constituyen el procedimiento de elección, especialmente cuando se trata de detectar parásitos. En los cultivos aparecen en forma de epimastigotes. El xenodiagnóstico es un método no empleado en la actualidad, aunque de indudable utilidad. Para el diagnostico indirecto se emplea RFC, IFI, ELISA y HAI. Estas pruebas son positivas a las 3-4 semanas, pero son más eficaces en la fase crónica. En esta fase, la prueba de elección es la RFC, que es positiva en el 100% de los casos, y se consideran significativos los títulos de 1-8 (Pumarola, et al, 1978), En la fase crónica, en donde existe alta cantidad de anticuerpos anti-*T.cruzi* los métodos indirectos son los mas usados para la determinación de la enfermedad en esta fase y en la fase indeterminada en donde se pueden hacer pruebas serológicas para la investigación de anticuerpos circulantes. Las técnicas de PCR también son usadas para el diagnostico de Chagas en las tres etapas clínicas de la enfermedad.

Los métodos serológicos no son útiles para los casos sospechosos de chagas congénito en los recién nacidos y durante el período neonatal porque detectan anticuerpos del tipo Ig G, y estas, probablemente, tienen procedencia materna. Recién son propios a partir del quinto mes de vida, en estos casos el xenodiagnóstico es el usado.

#### **1.4.7.1 Métodos parasitológicos**

##### **Métodos directos:**

Por lo general, la observación directa del parasito se efectúa en la sangre. Las técnicas comúnmente empleadas son el extendido de sangre periférica, gota gruesa o el examen de una muestra de sangre fresca colocada entre el portaobjeto y la laminilla. En tanto que el examen de preparaciones coloreadas permite la caracterización morfológica

del parásito, las preparaciones en sangre fresca permiten detectar más fácilmente los parásitos debido a su movilidad. (Guhl F., Nicholls S., 2001)

**Examen directo de sangre fresca.** Se toma una gota de sangre por punción digital con lanceta se coloca en el porta y con cubreobjeto encima se observa al microscopio óptico con 40 X, buscando los tripomastigotes meta cíclicos moviéndose vigorosamente. Es un método muy sensible.

**Gota gruesa y extendida de sangre periférica:** Se cuentan leucocitos y parásitos simultáneamente. El conteo se detiene cuando se llega a 100 leucocitos y se han identificado dos o más parásitos. Si solamente se identificó un parásito, el conteo sigue hasta que se identifica un parásito más Extendido Fino: Se localiza una porción del extendido en que los campos contengan cantidades similares de eritrocitos y se cuenta el número de eritrocitos en un campo. Luego se cuentan simultáneamente eritrocitos parasitados y campos, hasta llegar a un número de campos equivalentes a 10,000 eritrocitos. Los eritrocitos infectados por más de un parásito se cuentan como uno. Se buscan los tripomastigotes metacíclicos fijados, con sus estructuras características: formas alargadas, en C o en S, con núcleo, cinetoplasto, flagelo y membrana ondulante.

**Método de strout:** Se toma una muestra de sangre en tubo seco, se deja que se retraiga el coagulo, centrifugamos (600 g) para concentrar los parásitos en el sedimento. A partir de este se hace un montaje directo en fresco o hacer extendidos y tinciones para buscarlos (Guhl F., Nicholls S., 2001)

### **Métodos indirectos:**

Los métodos indirectos permiten suponer la presencia del parásito que ha infectado al organismo, mediante el estudio de la respuesta inmune del hospedero. Entre ellos esta el xenodiagnóstico y el hemocultivo, que son métodos de laboratorios más especializados.

### **Xenodiagnóstico.**

Es preciso contar con triatominos libres de infección criados en el laboratorio, y se realiza examinando las heces de reduvios bajo microscopio 40X, que han picado al paciente, a los 10- 30 días de la picadura, para detectar formas de T. cruzi. Este método presenta una sensibilidad de 100% en casos agudos y de 36% en la fase crónica. Teniendo en cuenta el desarrollo de técnicas moleculares de diagnóstico como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), cada vez se tiende a utilizar menos el método de xenodiagnóstico por los múltiples inconvenientes que presenta, tanto para el paciente que ha recibido 40 picaduras o más, como para el laboratorista que requiere de un insectario. Además está presente el riesgo por la manipulación de los insectos. En la actualidad se recomienda realizar el xenodiagnóstico artificial utilizando membranas finas de látex, que reemplazan la piel del paciente y a través de las cuales el insecto se alimenta de sangre heparinizada del paciente (Guhl F., Nicholls S., 2001)

### **Hemocultivo**

En cuanto al hemocultivo, esta técnica también presenta sensibilidad muy alta en casos agudos de enfermedad de Chagas y hasta un 40% de sensibilidad en casos crónicos. El método permite la amplificación de los parásitos al inocular en ellos sangre del paciente. Se emplean medios líquidos tales como el LIT (Triptosa de Infusión de Hígado) o BHI (Infusión cerebro-corazón). (Guhl F., Nicholls S., 2001)

#### **1.4.7.2 Métodos Serológicos**

Dado el carácter transitorio de la circulación de los parásitos en sangre periférica en la mayoría de los casos exceptuando la fase aguda, los métodos Serológicos constituyen una herramienta valiosa para el diagnóstico de la infección. En una etapa inicial de la infección los anticuerpos contra T. cruzi son de la clase IgM, siendo reemplazados gradualmente por anticuerpos de tipo Ig G a medida que progresa la enfermedad. Entre estas pruebas serológicas encontramos Inmunofluorescencia (IFI), las pruebas enzimáticas de ELISA y la Hemaglutinación Indirecta (HAI), que han demostrado alta sensibilidad y especificidad y prueben estandarizarse como pruebas de rutina. Debido a que la especificidad de las pruebas pueden variar considerablemente, los límites de positividad deben definirse localmente utilizando panel de sueros conocidos, para que haya confiabilidad, las técnicas deben ser apropiadamente estandarizadas.

### **Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)**

La prueba de ELISA se basa en la detección de anticuerpos contra un determinado antígeno que es adsorbido sobre una fase sólida (placas de poliestireno) a la cual posteriormente se adicionan las muestras que pueden o no contener los anticuerpos específicos, siempre y cuando exista reacción de antígeno-anticuerpo específicos, con una reacción de un conjugado, sustrato en el cual actúa la enzima dando origen a un cambio de color que puede leerse en forma visual o idealmente en un espectrofotómetro para determinar la densidad óptica (DO). Esta técnica es una prueba fácil de realizar y de bajo costo; puede utilizarse con muestras de suero recolectados en papel de filtro. La ELISA presenta una sensibilidad y especificidad de 98% en suero, y de eluidos de sangre recolectados en papel filtro presento una concordancia de 96%.

### **InmunoFluorescencia Indirecta (IFI)**

Se basa en el uso de láminas portaobjeto con áreas circulares que contienen epimastigotes de *T. cruzi* previamente fijados y listos para la identificación de inmunoglobulinas específicas presentes en el suero del paciente. Estas se adhieren a la membrana del parásito, donde se detectan por medio de un conjugado marcado con isotiocianato de fluoresceína, la reacción se lee al microscopio de fluorescencia y se define el título como la última dilución del suero a la cual se observa fluorescencia en toda la periferia de los epimastigotes; aunque sea poco intensa, esta sería una reacción positiva a esa dilución. (Guhl F., Nicholls S., 2001)

### **Hemaglutinación Indirecta (HAI)**

Se basa en la aglutinación de glóbulos rojos de humanos, sensibilización con antígenos de *T. cruzi* en presencia de suero que contiene anticuerpos contra ese parásito. La prueba se realiza en una placa de microdilución, de fondo en U. La lectura debe realizarse a contraluz o utilizando un fondo de contraste.

#### **1.4.7.3 Técnicas Moleculares**

Con el advenimiento de las técnicas moleculares, la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) ha sido utilizada como diagnóstico parasitológico en varias enfermedades. Esta técnica se basa en la amplificación de secuencias blanco de ADN que se presentan de manera abundante y específica en el parásito. Para el *Trypanosoma*

*cruzi*, dos secuencias blanco han sido probadas y representan utilidad diagnóstica: la región variable de ADN del mini círculo del Cinetoplasto, que corresponde a 40 000 copias por célula y una secuencia de ADN de 195 pares de bases (bp) presente aproximadamente en 100 000 copias en el genoma del parásito. La sensibilidad de esta técnica es bastante alta. Dada la complejidad de los procedimientos para realizarla, su uso está limitado a laboratorios especializados. Otras de las aplicaciones importantes de la técnica del PCR son la detección de parásitos en la transmisión congénita y en individuos crónicos infectados (Guhl F., Nicholls S., 2001).

#### **1.4.8 Tratamiento**

El período agudo chagásico dispone de tratamiento específico: un nitronifurfuriliden-amino (NIFURTIMOX) y un Nitroimidazolacetamida (BENZNIDAZOL). En la actualidad casi no se consigue nifurtimox por que se suspendió su fabricación.

El tratamiento se lo realizara utilizando una droga tripnosomicida de elección: LAMPIT, comprimido activo: Nifurtimox. La dosis debe ser adecuada a la edad y peso del paciente. Para la dosificación que se detalla a continuación se consideran niños hasta los 10 años de edad., adolescentes de 11 a 16 años y adultos a partir de los 17 años (Anexo A).

Los medicamentos actuales se ha visto que su eficacia es limitada y son altamente tóxicos, de modo que su indicación debe evaluarse cuidadosamente. Los efectos secundarios de las drogas disponibles pueden ser severos y requieren en ocasiones atención especializada; además, se trata de medicamentos caros y, en la práctica, inaccesibles para la mayoría de los pacientes. Una vez establecidas las lesiones crónicas, los tratamientos son largos. No hay vacunas eficaces y seguras que ayuden a prevenir la aparición de la enfermedad; las particularidades biológicas del parásito, junto con la relación entre el sistema inmune y el desarrollo de las lesiones crónicas (Corrêa-Oliveira R, et al, 1999., Andrade ZA 1999), sin duda dificultarán la producción de vacunas en los próximos años. Las reacciones adversas de estos medicamentos pueden ser importantes. Pueden provocar epigastralgias, hiporexia, náuseas, vómitos y

pérdida de peso, efecto en común puede ser la dermatopatía por hipersensibilidad que es de intensidad variable y se presenta en el 30% de los casos, principalmente con el benznidazol, se observa alrededor del noveno día después de iniciado el tratamiento y cuando es intensa es necesario suspender su administración. El tratamiento de la enfermedad con estos medicamentos son mejor tolerados en los niños y en particular en la fase aguda (Pumarola, et al, 1978).

### **1.5 Sistema de hipótesis o pregunta de investigación**

Durante los últimos años se ha determinado que la prevalencia de la enfermedad de Chagas en la provincia de Guayas, Cantón General Playas ha incrementado.

## **CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Participantes**

El Proyecto enfermedad de Chagas en el Ecuador se realizó en los laboratorios de la Unidad de Parasitología Molecular del Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador, como director de la institución el Dr. Edmundo Estévez y a su vez codirector del proyecto de investigación.

El Director del Proyecto Dr. Ángel Guevara, B.Sc, Ph.D, Docente-investigador, Departamento de Ciencias de la Vida /Biotecnología.

Con la colaboración y tutoría académica del Dr. Manuel Calvopiña, Docente-Investigador, Unidad de Parasitología Molecular y Medicina Tropical, Centro de Biomedicina-Universidad Central del Ecuador.

### **2.2 Zona de Estudio**

La zona en la cual se ejecutará este proyecto se encuentra ubicada centralmente en la región Costa del País, en la provincia de Guayas en la zona geográfica ubicada exactamente al norte con la Provincia de Santa Elena; al Sur y al Oeste con el Océano Pacífico, al Este con las Parroquias Rurales del Cantón Guayaquil Posorja y El Morro. (Ver Figura 2.1).

Conformado por los recintos: Data de Villamil, Arenal y las Comunas de San Antonio y Engabao, la recolección de muestras para el estudio se realizó en la población General Villamil Playas, el procesamiento de las mismas se ubicó en los laboratorios de la Unidad de Parasitología Molecular del Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador.

El Cantón General Villamil Playas, está situado al suroeste de la Provincia del Guayas a 96 kilómetros de la ciudad de Guayaquil, con una superficie de 279.90 Km<sup>2</sup>, cuenta con 14 kilómetros de playas siendo una de las más extensas de la costa del Pacífico Sur, está clasificada como bosque tropical seco y muy seco, con temperaturas que oscilan entre 23 grados C. (entre mayo a diciembre, época de verano) y 30 grados C. (entre diciembre a abril, época de invierno), con estaciones lluviosas definidas. La población del Cantón es básicamente urbana de aproximadamente 31.000 habitantes

### **2.3 Período de tiempo de investigación**

El inicio del proyecto fue a principios del mes de febrero del 2008, y su finalización fue en Mayo del 2009.

### **2.4 Diseño**

El estudio es de tipo demostrativo. La metodología usada fue validada con técnicas moleculares como PCR con sus respectivos controles negativos y positivos, para las muestras analizadas así también con técnicas inmunológicas como ELISA para la determinación de la respuesta inmune humoral en las infecciones experimentales.

Y en la parte estadística usamos métodos no paramétricos para comparar los diferentes antígenos o derivados de antígenos usados.

## **2.5 Procedimientos**

### **2.5.1 Toma de muestras humanas**

Para el análisis de la infección por *T. cruzi* de las personas sometidas al estudio de investigación, se realizó primero un screening para la detección de anticuerpos anti- *T. cruzi*, con la prueba comercial STAT PAK Chagas (CHEMBIO), que consiste en un pequeño pinchazo en el dedo índice con una lanceta y colocando la gota sobre estas placas, después se añade un diluyente del Kit y esperamos 15 minutos hasta observar presencia de anticuerpos anti- *T. cruzi* observados dos rayas indicando positivo para la prueba. Si la persona que presente serología positiva para la prueba rápida de STAT PAK (ANEXO B) serán confirmadas mediante pruebas serológicas adicionales (ELISA, IFI, Western Blot), y se realizara cultivos para la detección parasitológica directa. Para la obtención del suero se tomo, mediante punción venosa, 5 ml de sangre total de personas con sospecha de infección por *T. cruzi*, luego de que se formó el coagulo sanguíneo la muestra se centrifugó a 3.500 r.p.m. durante 15 minutos y se separó el suero el cual fue colocado en criotubos y almacenados a -20 °C hasta su utilización.

### **2.5.2 Recolección y análisis del material fecal de triatominos**

La recolección de los triatominos se la realizó en la zona de estudio en la provincia de Guayas, población General Villamil Playas, con la ayuda del equipo técnico del Servicio de Control de Enfermedades transmitidas por vectores (SNEM), los vectores fueron colectados por medio de búsquedas domiciliarias y peridomiciliarias, para su establecimiento se utilizo el equipo GPS (Etrex Garmin, Legend), el cual nos brinda información acerca de la ubicación geográfica de cada punto en donde se hizo la recolección vectorial.

Fueron utilizadas para identificar los triatomas recolectados en la zona de estudio, claves taxonómicas que corresponden a características morfológicas que distinguen las diferentes especies de triatomas, como en la zona de estudio el principal vector es *Triatoma dimidiata*, se llegó a verificar su especie con estas características morfológicas, tomadas de (Lehmann, et al, 2005), posteriormente se realizó un análisis morfométrico, se tomaron medidas de la cabeza de machos y hembras empleando un estéreo microscopio ( Meiji Techno Co. EMZ, Tokyo Japan).

### ***Observación microscópica***

Para determinar el nivel de infestación por *T.cruzi* del vector se realizó mediante observación microscópica del contenido de heces de los insectos colectados, para esto primero se hizo un conteo y clasificación de estos en ninfas 1er, 2do y 3er estadio, ninfas de cuarto estadio y adultos, para el estudio solo se analizaron las ninfas de cuarto estadio y adultos, mediante presión abdominal se obtuvo el material fecal de los triatomos después de alimentarlos con ratones blancos de laboratorio sanos, estas muestras fueron disueltas en solución salina fisiológica y observadas al microscopio de luz (Carl Zeiss Jena), con objeto 40X en búsqueda de trypomastigotes de *T.cruzi*, los cuales son formas móviles del parásito que se observan fácilmente. En los casos de triatomas con resultados positivos, se procedió a realizar cultivo en medio líquido, inocular animales de experimentación y parte de esta solución se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posteriormente ser utilizada en PCR y caracterización molecular.

### **2.5.3 Infecciones experimentales**

En los casos de triatomas con resultados positivos, se procedió a tomar parte de la muestra y realizar inoculaciones en animales de laboratorio para desarrollar una infección experimental que nos permita luego aislar el parásito en los medios apropiados y se inoculó a tres ratones blancos de laboratorio (bioterio UCE), para aislar la cepa, después de obtener parasitemia visible en estos, se procedió a hacer punción cardiaca por ratón se recolectó 1 - 2.5 ml de sangre y se infectó con 0.5 cc a seis nuevos ratones de 10 semanas, 25 gramos, con  $10 \times 10^6$  trypomastigotes / ml.

A partir de los 7 días de infección se procedió a observar parasitemia, en estos ratones, desinfectando con alcohol las colas de ellos y haciendo un pequeño corte en la punta, se obtiene una gota fresca de sangre y es observado al microscopio (Carl Zeiss Jena), hasta encontrar parásitos, se recoge un poco más de sangre para obtener suero de los ratones y analizar la respuesta inmune humoral. De estos ratones también se hizo punción cardiaca para confirmar la infección mediante PCR y cultivo.

### **2.5.4 Aislamiento y cultivos de *T. cruzi***

Como se menciono anteriormente el aislamiento y cultivo de *T. cruzi* se realizo de varias fuentes y como medio líquido de cultivo se utilizo LIT (Liver Infusion Tryptose), (Anexo C).

De los pacientes sospechosos de la infección y del *Didelphis marsupialis*, encontrado en el lugar de captura de los vectores, se les extrajo sangre a los pacientes por punción venosa 5 – 10 ml y del animal se le realizo punción cardiaca, se hicieron medios de cultivo de sangre total 1 ml y 10 ml de LIT medio el resto se centrifugo a 3500 r.p.m por 15 minutos, y se uso la interfase formada para realizar el cultivo como seindico anteriormente, con todas la medidas de esterilidad posible, este proceso se realizo para las dos muestras, tanto de pacientes sospechosos como del animal encontrado, los cultivos fueron incubados a 28°C y fueron observados cada 24 horas para visualizar y comprobar que no exista contaminación.

A partir de las heces de los Triatomas positivos mediante observación microscópica, la parte posterior del vector es lavada con solución salina fisiológica estéril que contiene estreptomycin 10000 ug/ml, penicilina 10000 units/mg y anfotericina 25 mg/ml (Duque, et al, 1988) con la cual nos permite aislar el parásito en un medio líquido (LIT), cada 24 horas son observados los cultivos para comprobar esterilidad y crecimiento de parásitos.

De la sangre de ratones infectados, se recolecto por punción cardiaca, se realizo el cultivo en la cámara de flujo laminar (EACH) con todas las condiciones de esterilidad, se coloco en los frascos de cultivo (Nunclon™ Surface, Brand Products) 1ml de sangre y 10 ml del LIT medio, e incubados a 28°C hasta la visualización de parásitos en el medio.

## **2.5.5 Antígeno parasitario**

### **2.5.5.1 Preparación del antígeno parasitario**

La cepa utilizada en este estudio para la preparación del antígeno total forma parte de un stock de cepas de *T. cruzi* del Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Biología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

La cepa fue aislado de un ejemplar de *Rhodnius ecuadoriensis* colectado en la comunidad de Maconta en el cantón Portoviejo, provincia de Manabí, la cepa fue llevada a un medio líquido (Liver Infusión Tryptose), suplementado con 10 % de suero fetal bovino por pases sucesivos y se dejó alcanzar a una fase exponencial de crecimiento. (Garzón *et al.*, 2002).

Una vez hecho esto se hizo el conteo de los parásitos en una cámara de Neubauer, la concentración fue de  $34.8 \times 10^6$  parásitos/ml o  $34.8 \times 10^7$  parásitos/10ml en el medio de cultivo.

Posteriormente los epimastigotes fueron recolectados por centrifugación a 3500 r.p.m por 20 minutos a 4°C y lavados 3 veces por centrifugación en tampón fosfato-salino (PBS) Ph 7.4. Luego el sedimento (pellet) fue resuspendido en 10 ml de una Solución de Lisis con inhibidores de proteasas (Anexo D) y manualmente macerados en un mortero por tres veces seguidas congelando y descongelando paulatinamente para no dañar los epítipes y hasta obtener una solución homogénea. El lisado se centrifugó a 10.000 rpm, a 4°C durante 10 minutos, luego este fue colocado en una membrana de diálisis activada contra sucrosa por tres horas cambiando constantemente la sucrosa.

Finalmente se midió su concentración y se prepararon alícuotas de 1 mL que fueron conservadas a -20°C hasta su uso.

#### **2.5.5.2 Cuantificación del antígeno parasitario**

Para determinar la cantidad de proteínas presentes en el antígeno parasitario, se utilizó un kit comercial (PROTI 2, Protein Assay Reagent, método colorimétrico para determinación de Proteínas Totales y Albúmina en suero, WIENER LAB. BCF, Argentina), que permite la cuantificación espectrofotométrica (Eppendorf, Espectrofotómetro PCP 6121, ®) de proteínas solubles en soluciones acuosas. (Anexo E).

Con los datos de absorbancia de las proteínas estándar, se procedió a elaborar una curva de calibración a partir de la cual se obtuvo la ecuación de la línea recta que se utilizó para calcular la cantidad de proteínas en la muestra del antígeno parasitario (Anexo F).

### **2.5.6 Chagas test**

Se utilizó el kit comercial de Chagas Test ELISA recombinante, 3<sup>ra</sup> generación (Wiener Lab), para confirmar las muestras de pacientes de la población de General Villamil Playas que resultaron positivos con las pruebas rápidas de STAT PAK, proporcionadas por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador.

Se procedió a colocar en la policubeta del kit 200 ul del diluyente de muestras, y se colocó 10 ul de las muestras, se analizó con tres controles negativos y dos controles positivos proporcionados por el kit, las muestras de pacientes sospechosos de la infección fueron analizadas por duplicados, se mezcló suavemente durante 10 segundos, e incubados durante 30 minutos a 37°C, luego fue lavado 5 veces con Buffer de lavado empleando aproximadamente 300ul/vez/pocillo, se añadió en cada pocillo una gota del conjugado y nuevamente se incubó 30 minutos a 37°C. Fue lavado nuevamente como indicamos anteriormente y luego se agregó el revelado A y revelado B una gota se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos y finalmente se agregó la solución para parar la reacción. La absorbancia fue leída a 450 nm en el lector de ELISA (EIA Reader EIA 400 AT , Whittaker Bioproducts).

### **2.5.7 Immunocomb**

Las muestras fueron también analizadas con otra prueba comercial InmunoComb II, Chagas Ab (Orgenics). (Anexo H)

Es una reacción antígeno-anticuerpo (Fila A de las placas). Se procede a colocar 10 ml de la muestra en la Fila A de las placas, mezclan rellenando y expulsando la solución repetidamente, este proceso se repite para un control positivo y un control negativo proporcionados por el Kit, seguidamente el peine es insertado durante 10 minutos (con la cara impresa mirando hacia Ud.) dentro de los pocillos de la fila A que contiene muestras y controles. Se procede a lavar en la Fila B Agitando vigorosamente el peine durante 10 segundos varias veces durante 2 minutos, después se da una reacción con el conjugado (Fila C) mezclando como anteriormente mencionamos por 10 minutos, Lavamos nuevamente en la Fila D como se menciona en el anterior lavado,

agite en forma repetida durante 2 minutos, y un tercer lavado (Fila E) se procede de igual forma durante 2 minutos. Al cabo de 2 minutos, se retira el Peine para dar la reacción de color en la Fila F mezclando por 10 minutos y finalmente la reacción última se da realizando un lavado final (Fila E), durante 1 minuto y dejamos secar al aire.

### **2.5.8 Inmunofluorescencia**

Inmunofluorescencia es un método que nos permite confirmar el diagnóstico de la enfermedad de Chagas de nuestras muestras positivas de la población de General Villamil Playas, verificadas con los dos métodos mencionados anteriormente. (Taibi, 1995). Una de las técnicas de confirmación para la enfermedad de chagas es la de Inmunofluorescencia, la cual es una técnica inmunológica más sensible que ELISA. Las placas de IFI fue fijadas con el antígeno descrito en usado en la sección 2.5.5.1, en las placas Evert well (IFA SLIDES) se diluyo el antígeno parasitario (*Trypanosoma cruzi*) al 4 % con Formol y se dejo a temperatura ambiente por 20 minutos a temperatura para ser almacenados posteriormente a -20°C hasta su utilización.

Para el proceso de IFI añadimos 30 ul del Suero diluido en PBS 1/40 por 30 minutos a 37 °C, se lavo con PBS y dejamos 15 minutos al ambiente, así hacemos tres veces, luego de este tiempo colocamos 30ul del conjugado 1:100 diluido en blue evans (1:1000 stock), dejamos por 30 minutos a 37 °C. (0.1 g en 100 ml PBS (1:1000), de esta dilución cogemos 0.1 ml en 0.9 ml de PBS (1:10000) a esta solución de 1 ml añadimos 10 ul del conjugado para tener 1/100). Lavamos nuevamente como se menciona anteriormente, y leemos en un microscopio de Fluorescencia (Olympus BH-2-RFCA) con objetivo 100 X y aceite de inmersión, en las placas se coloca una solución de PBS/ glicerol 1:1 y un cubre objetos.

Es importante notar que en cada placa o slide se colocaron dos controles positivos y dos controles negativos y todas las muestras se analizo por duplicado.

### **2.5.9 Western Blot**

#### **2.5.9.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).**

Para el proceso SDS-PAGE se utilizó el antígeno total parasitario mencionado en la sección 2.5.5.1, el gel de electroforesis en matriz de poliacrilamida y condiciones desnaturizantes: 0,1% SDS, es la técnica electroforética más utilizada para el análisis de proteínas en base a su peso molecular.

Se utilizaron geles discontinuos de poliacrilamida (Anexo G) de 1.5 mm de espesor, 2.5 cm de longitud y 9 cm de ancho para el gel superior; y 1.5 mm de espesor, 6 cm de longitud y 9 cm de ancho para el gel inferior.

Para efectuar la migración electroforética en los geles, el antígeno parasitario descrito anteriormente, fue mezclado con un buffer de carga (0.5 M Tris HCl, pH 6.8, 5% Mercaptoetanol, 10% SDS, 0.5% azul de bromofenol como marcador de frente o de migración y 10% glicerol) y sometido a ebullición por 5 minutos. Como control de la migración se utilizó una proteína standard (GIBCOBRL) rango de peso molecular de la proteína 14,300-200,000. Las muestras se añadieron en una porción de 1:1 v/v con el buffer de migración para la migración se utilizó una cámara vertical (Vertical Mini-Gel System, Cat. # MGV-102, C.B.S. Scientific Company, USA). Como buffer de migración se usó una solución 1x Tris-Glicina pH 8.3 (3,02 g de Tris Base, 18,8 g de glicerol, 10 ml SDS al 10%) y se dejó migrar a 25 voltios hasta que la migración de las proteínas alcance el gel inferior, luego se incrementó el voltaje a 100 voltios hasta que el marcador de frente se encuentre a 2 cm del borde inferior del gel de resolución.

Al final de la migración, una parte del gel fue teñido con Azul de Comassie (0.25 g Comassie Brilliant Blue, 45 ml de metanol, 45 ml de agua destilada y 10 ml de ácido glacial acético) a temperatura ambiente, en agitación, durante una hora. Para visualizar las fracciones proteicas, se decoloró el gel con una solución de (5% de metanol y 7.5 de ácido acético) hasta obtener una buena resolución de las bandas.

#### **2.5.9.2 Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa**

La parte del gel que no fue teñida se utilizó para transferir a una membrana de nitrocelulosa de 0.45  $\mu$ m (BIO RAD, Zeta-Probe) de 8 x 10 cm, para esto se utilizó una cámara de transferencia (Mini-PROTEAN II Cell, serial No. 32S/17585, BIO RAD), luego se armó el equipo y se elaboró una especie de sándwich en donde en los extremos

anódicos y catódicos se colocaron cojines esponjosos seguidos de papel filtro y en el centro del extremo anódico la membrana de nitrocelulosa y hacia el extremo catódico el gel de poliacrilamida, se procedió a transferir las fracciones proteicas ubicadas en el gel a la membrana de nitrocelulosa, para este proceso usamos un buffer de transferencia Tris- Glicina pH. 8,3 (25 mM Tris, 129 mM glicina y 20% v/v metanol, pH: 8,3) a 45 voltios durante toda la noche a 4°C.

Después de transferir las fracciones proteicas procedimos a bloquear los sitios de la membrana NC libres de proteínas, para esto se utilizó una solución de 5% leche libre de grasa (Carnation), 0,2% Tween-20 y 0.02% azida de sodio en PBS, y se agitó durante dos horas a temperatura ambiente. Las membranas con el antígeno fijado de *T. cruzi* y bloqueadas se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

### **2.5.9.3 Inmunoblotting**

El Immunoblotting se realizó siguiendo protocolos estandarizados (Taibi, et al, 1995), los pasos fueron los siguientes: A la membrana bloqueada se le añadió 1 ml el suero de los pacientes chagásicos de la población General Villamil Playas diluido 1:100 en la solución de bloqueo. Se utilizó un pool de sueros de individuos con la enfermedad, como control positivo. Se agitó durante dos horas a temperatura ambiente.

Posteriormente se lavó cinco veces con PBS y se añadió el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa (IgG anti human) diluido 1:500 en la solución de bloqueo. Se agitó durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar la membrana cinco veces con PBS se revelaron las bandas utilizando la solución de revelado (10 ml de 50mM Tris (pH 7.6), 6 mg de DAB, 10 ul de peróxido de hidrógeno 30%) Se reveló durante 1 a 5 minutos en la oscuridad. Para detener la reacción se lavó la membrana con agua destilada.

### **2.5.10 Elisa ( ENZYME LINKED INMUNOSORBENT ASSAY)**

Para la realización de esta prueba inmunológica se utilizó el antígeno total purificado mencionado anteriormente, primero se determinó las concentraciones óptimas del antígeno, para esto se usó concentraciones de 0.5 – 3.5 ug/ml (antígeno total concentración 69.44 mg/ml) para lo cual se fijó en placas de ELISA fondo plano y se desarrolló el siguiente protocolo detallado en el Anexo I. (modificado de Guevara, et al, 1999).

Una vez estandarizada la cantidad de antígeno total adecuado (1.5 ug/ml), se fijó las placas como se mencionó anteriormente y se siguió el protocolo Anexo I para evaluar la respuesta hacia anticuerpo IgG totales específicos para *T. cruzi*.

También se analizará la respuesta positiva contra las diferentes subclases de IgG; Ig G1; Ig G2a; Ig G2b; Ig G3, realizados en muestras de ratones infectados experimentalmente con *T. cruzi*, las únicas variantes del protocolo anterior es que primero se hace reaccionar con Ig G total, luego con un segundo anticuerpo (diferentes isótopos) y finalmente con un conjugado específico (O-phenyldiamine dihydrochloride). (Guevara, 2005)

Así también se evaluó la respuesta inmunológica en infecciones experimentales utilizando antígeno total purificado, péptido sintéticos derivados de secuencias del genoma *T. cruzi* (2/D/E). El cut off o línea de corte fue determinado con 10 muestras de ratones sanos, el promedio de la absorbancia + 3 desviaciones estándar de DO. (Guevara, 1999., Houghton et al., 1996).

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y en algunos casos por triplicado, como controles positivos de la prueba se utilizaron los ratones de prueba iniciales para la infección y controles negativos ratones sanos proporcionados por el bioterio de la UCE.

## **2.5.11 Técnicas Moleculares**

### **2.5.11.1 Extracción de ADN.**

La extracción del DNA para la PCR se realizó a partir de dos fuentes, la primera el material fecal de los vectores recolectados en la población General Villamil Playas y la segunda a partir de la sangre de los ratones infectados con *T. cruzi*, las muestras de los insectos adultos y ninfas de 4<sup>to</sup> estadio, previamente fueron alimentados una hora antes con ratones de laboratorio sanos y para la extracción se procedió primero a limpiar la parte posterior de cada insecto con una solución de suero fisiológico, luego

por presión abdominal se obtuvo las muestras de los triatominos estas fueron disueltas con solución salina, se congelo a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su extracción, luego se continuo con el protocolo de extracción modificado (Mantis, 1989) (Anexo J).

Se analizaron 6 ratones infectados para el estudio de la respuesta inmune humoral, los cual no se observo parasitemia visible se determino la infección por PCR, para eso se extrajo la sangre de los ratones mediante punción cardíaca, previamente los ratones fueron ligeramente anestesiados con éter, la sangre recuperada se mezcló con un volumen igual de Guanidina HCl 6M-EDTA 0.2M, y siguiendo protocolo (Mantis, 1989) (Anexo K). Como control positivo se utilizó el DNA de parásitos cultivados en medio LIT y como control negativo se utilizó ADN ratones sanos.

#### **2.5.11.2 Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR)**

Las muestras extraídas con el protocolo anteriormente mencionado fueron luego usadas para PCR, descrito a continuación. Para ello se utilizaron dos pares de primers denominados TCRUZI 121 y TCRUZI 122; Tc24-1 Y Tc24-2 los cuales fueron obtenidos comercialmente (TIB Molbiol), en el caso del primer par de primers usados se ha demostrado previamente que son específicos para amplificar los minicírculos de *Trypanosoma cruzi* (Sturm *et al.*, 1989; Britto *et al.*, 1995; Junqueira *et al.*, 1995; Kirchhoff *et al.*, 1996; Miranda, Y. 1996). Así también se ha demostrado que en la utilización de un oligonucleótido correspondiente de 20 a 26 secuencia de péptidos de Tc24 permite demostrar detección específica de *T.cruzi* en infecciones experimentales. (Guevara *et al.*, 1996; Taibi *et al.*, 1995).

La secuencia de los primers es la siguiente:

TCRUZI 121: 5' - AAA TAA TGT ACG GG(T/G) GAG ATG CAT GA - 3'

TCRUZI 122: 5' - GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA- 3'

Los materiales y químicos adicionales para la PCR (Go Taq DNAPolimerasa, DNTP's, Buffer 5x,  $\text{MgCl}_2$ ) se obtuvieron de PROMEGA, USA.

Para cada reacción se preparó un cóctel (master mix) en la siguiente proporción y con la precaución de añadir la enzima Go-Taq DNA Polimerasa al final:

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad c/m</b>
Buffer 5x	10 $\mu$ l
DNTP's 10 mM	5 $\mu$ l
Primer Tcruzi121 200 ng	2 $\mu$ l
Primer Tcruzi 122 200 ng	2 $\mu$ l
Agua	45.5 $\mu$ l
DNA	10 $\mu$ l
Go-Taq Polimerasa	0,5 $\mu$ l
<b>Volumen total</b>	<b>75 <math>\mu</math>l</b>

La amplificación se realizó en un termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, bajo las siguientes condiciones de Desnaturalización, Alineamiento y Extensión:

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
94° C Desnaturalización Inicial	4 min	1 ciclo
94° C Desnaturalización	1 min	33 ciclos
51° C Alineamiento	2 min	
72° C Extensión	10 min	1 ciclo
72° C Extensión final		
4° C	Hasta analizar los productos en gel de azarosa	

La secuencia de los primers es la siguiente:

Tc24-1: 5' - GAC GGC AAG AAC GCC AAG GAC - 3'

Tc24-2: 5' - TCA CGC GCT CTC CGG CAC GTT GTC- 3'

Los materiales y químicos adicionales para la PCR (Go Taq DNApolimerasa, DNTP's, Buffer 5x, MgCl<sub>2</sub>) se obtuvieron de PROMEGA, USA.

Para cada reacción se preparó un cóctel (master mix) en la siguiente proporción y con la precaución de añadir la enzima Go-Taq DNA Polimerasa al final

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad c/m</b>
Buffer 5x	10 µl
DNTP'S 10 mM	5 µl
Primer Tc24-1 100 ng	1 µl
Primer Tc24-2 100 ng	1 µl
Agua	77.5 µl
DNA	5 µl
Go-Taq Polimerasa	0,5 µl
<b>Volumen total</b>	<b>100 µl</b>

La amplificación se realizó en un termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, bajo las siguientes condiciones de Desnaturalización, Alineamiento y Extensión:

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
--------------------	---------------	---------------

94°C Desnaturalización Inicial	4 min	1 ciclo
94°C Desnaturalización 60° C Alineamiento 72° C Extensión 72° C Extensión final	1 min 1 min 2 min 7 min	35 ciclos  1 ciclo
4° C	Hasta analizar los productos en gel de azarosa	

### 2.5.11.3 Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar los amplicones se utilizó un gel de agarosa al 1% en TAE (*Tris-acetate-EDTA*)1X. Se tomó 2 µl de Solución Dye o buffer de corrida (PROMEGA, USA) y 10 µl de cada muestra (producto del PCR), se colocó en la cámara de electroforesis (Quick Screening Horizontal) y se dejó migrar en TAE 1X a 100 Voltios durante 40 minutos (Bio- Rad, Power PAC 300) .Como peso molecular estándar se utilizaron marcador comercial de 1kb DNA Ladder de fragmentos desde 10000 hasta 250 pb (Promega, USA), 50 pb hasta 2672 pb (invitrogen).

Para detectar los fragmentos de DNA se utilizó una solución de TAE con Bromuro de Etidio al 0,05% y se visualizaron bajo una lámpara de luz ultravioleta (Cole- Parmer 9814 mini tables).

### 2.5.12 Identificación Molecular

Para la caracterización molecular se colocaron las muestras en tarjetas de papel filtro FTA clásica (Whatman BioScience, Newton Center, MA), estas muestras fueron enviadas a Japón, al Departamento de Higiene Veterinaria, Facultad de Agricultura, Universidad de Yamaguchi, con la colaboración de Hirotomo Kato, para

confirmar la identificación de *T. cruzi*, las muestras enviadas fueron, materia fecal de *Triatoma dimidiata* (FTA1), sangre de ratones infectados (FTA 2).

El procedimiento al cual se sometieron las muestras para su caracterización fue el siguiente, se perforaron discos de dos mm de diámetro de cada papel de filtro, y los discos se lavaron tres veces con un reactivo de purificación TLC (Whatman BioScience) y una vez con tampón Tris-EDTA. Los discos fueron secados al ambiente y directamente sometido a la amplificación de PCR.

Para la identificación de especies de parásitos fue realizado mediante el análisis de secuencias de genes, en este caso se utilizó el análisis del gen de citocromo b (CYT b) (Kato et al., 2005, 2007).

Para la amplificación del gen CYTb del parásito en las muestras enviadas en las FTA Classic Card, se utilizó la técnica de PCR nested con los primers específicos:

Primers externos: L.cyt-AS (5'-GCGGAGAGRARGAAAAGGC-3') y  
L.cyt-AR (5'-CCACTCATAAATATACTATA-3')

Utilizando reactivos Ampdirect Plus (Shimadzu Biotecnología) y, a continuación, una parte del producto de PCR se reamplificó con:

Primers internos: L.cyt-S (5'-GGTGTAGGTTTTAGTYTAGG-3') y  
L.cyt-R(5'-CTACAATAAACAATCATAATATRCAATT-3')

Los productos fueron clonados usando un plásmido pGEM-T (Promega, Madison, WI). *Escherichia coli* (E. coli) JM109, fueron transformadas con la mezcla de la ligación del plásmido pGEM-T y los productos PCR, se inoculó en LB agar con ampicilina(50 mg/ ml), y 5-bromo-4-cloro-3-indolyl β-D-galactoside (X - gal)(36g/ ml).

Los insertos de los plásmidos fueron secuenciados por el método de terminación de cadena o método dideoxy utilizando un método BigDye Terminator v3.1 Ciclo de Secuenciación Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA).

La secuencia de datos se comparó mediante el programa BlastN programa de nucleótidos de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnología (NCBI).

## **2.6 Análisis de Datos:**

El estudio fue enfocado a un análisis epidemiológico de las muestras tanto vectorial como poblacional, así también el análisis sintético fue realizado mediante la interpretación de los patrones ligados a las diferentes pruebas realizadas.

En los casos que se requiera se utilizarán métodos estadísticos no paramétricos como Mann–Whitney U, para detectar diferencias entre los antígenos que se utilicen. En cualquier caso, valores de  $P < 0.05$  serán tomados como estadísticamente significativo.

## **CAPITULO 3. RESULTADOS**

### **SEROPREVALENCIA**

Las pruebas rápidas de STAT PAK, fueron positivas para cuatro pacientes de la zona de estudio como se observa en la Figura 3.1, cuyos pacientes son 59, 225, 285, 282 de un total de analizados de 318 personas en la población General Villamil Playas (Cuadro 3.1) (Cuadro 3.2)

Estas muestras fueron confirmadas con cuatro técnicas más Chagas test (Cuadro 3.3) IFI (Figura 3.2), Inmuno Comb (Figura 3.3) y Western Blot (Figura 3.4), siendo solo un paciente (285) de los cuatro sospechosos confirmado como positivo para la infección por *Trypanosoma cruzi* se encuentra en resumen Cuadro 3.4.

No se observó contaminación en ningún cultivo realizado ya sea de los pacientes, zorro encontrando en la zona de recolección de los chinchorros y de los ratones infectados.

Se observo como positivo para los cuatro hemocultivos hecho en la población de General Villamil Playas a un solo paciente (285) identificado el parasito a los 35 días de su inoculación en el medio Lit.

Se considero como positivo para el hemocultivo realizado del animal (zorro) encontrado en la zona cerca del lugar donde se recolectaron los vectores, el cultivo fue positivo a los 40 días de la inoculación.

## **ANALISIS DE LOS TRIATOMINOS**

El nivel de infección por *Trypanosoma cruzi*, en los vectores, *Triatoma dimidiata*, recolectados en la población General Villamil Playas de la provincia de Guayas, es de 98,48 % (Cuadro 3.5), encontrado por microscopia.

Así también la infección de los *Triatoma dimidiata*, por el parasito fue confirmada por PCR, usando dos primers específicos para la infección por *T. cruzi*. En la Figura 3.5 usando primer (Tc24) observamos amplificando una banda de 600 pb y en la Figura 3.6 se observa un fragmento amplificado de las heces del vector específico de 330 pb con primer de (Tcruzi).

En los cultivos realizados de las heces de los Triatominos no se observo contaminación, pero tampoco se observo parásitos en el cultivo.

## **INFECCIONES EXPERIMENTALES**

Los ratones infectados con *T. cruzi*, no presentaron parasitemia visible, sin embargo la infección de los 6 ratones fue confirmada mediante PCR, (Figura 3.7) con primers específicos de *T.cruzi* (330pb).

La respuesta inmune de los ratones infectados con *T. cruzi*, con característica de parasitemia subpatente (no se observa parásitos en sangre circulante), se obtuvo como resultados que los seis ratones infectados presentaron anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi*, observada desde día 16 hasta el día 26 (Figura 3.8), en donde la Ig G fueron aumentando con valores de absorbancia de 0.120 hasta la fase crónica de la enfermedad cuya absorbancia es de 0.949 (Tabla 3.1).

De igual forma la respuesta inmune específica frente a diferentes isotipos Ig G, presentaron valores de absorbancia altos a la infección con *T. cruzi*, (Figura 3.14), es así que la Ig G total fue el más prominente isotipo detectado en los sueros de los ratones infectados presentando un valor de absorbancia de 0.951, (Tabla 3.2) (Figura 3.9), confirmando lo anteriormente mencionado con respecto a la respuesta inmune humoral, Ig G1 que es específica frente a la infección por este parásito es de 0.656, (Tabla 3.3) (Figura 3.10), Ig G2a 0,696, (Tabla 3.4) (Figura 3.11) e Ig G2b 0,654, (Tabla 3.5)(Figura 3.12) que de igual forma son específicas para la infección por *T.cruzi* , presenta valores altos de absorbancia, con respecto a Ig G3 0,638, (Tabla 3.5)(Figura 3.13) que no es específica para el parásito y observándose (Figura 3.14) como la respuesta inmune con Ig G3 es la más baja en todos los ratones y específica para IgG1 e IgG2.

La respuesta inmune en infecciones experimentales fue también probada con diferentes antígenos de *T. cruzi*, demostrando alta significancia  $p < 0.05$ , entre el antígeno total y el péptido sintético obteniendo mejores resultados con el lisado total (Cuadro 3.6)(Cuadro 3.7).

Los hemocultivos realizados de los ratones infectados, fueron positivos, observándose parásitos a los 30 días de inoculación.

## **IDENTIFICACION MOLECULAR.**

Con técnicas moleculares, se confirmó que el parásito (*T. cruzi*) encontrado en las muestras de cultivo y de la heces de los Triatominos recolectados y con los cuales se han realizado las inoculaciones, y análisis respectivos obtuvimos la siguiente secuencia de nucleótidos.

### **Secuencia analizada.**

Try2

TCTATTTATTATGTTACAGATAAATATGTGGTGTTTGCTTAGCATGAA  
TGTTTTTTAGTTGTTTTATTTGTGCAAATTGATATTTTATTTTATTTTGTGAG  
ACTTTGATTTAGGTTTTGTGATTAGAAGTATTCATATCTGTTTTACTTCTTTG  
CTATATTTTCTATTATATGTGCATATATTTAAATGTATAAATATTGGTAATTTT  
ATTTGACACACATTTATTAGTATGATTTATAGGATTTATATTATTTATGTTTA  
TAATAATTATTGCATTTATTGGGTACGTGTTACCATGTACAATGATGTCTTAT  
TGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATATTTTAGCTACTGTTCCCTGTATTTCGGCCA  
GTGATTATGTTATTGAATATGGGGTAGTGAATTTATAAATGATTTTACGCTT  
TTAAACTTCATGTATTACATGTCNTGCTCCCTTTTGTTTAATTATGGTATT  
ATTTTTGCATCTTTTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCAGATGCTTTTTGTGA  
TAGGTTTGCTTTTTATTGTGAGCGACTTTGTTTTTGTATGTGATTTTATTGA  
GAGATATGTTTCTTGCATTTTTTCATATTATTTTGTGTAATATATGTTATTTTA  
TAAATTGATATTTTGTTTCCATGAAGAATCTTGGGTCATTGTTGATACATTA  
AAAACATCCGATAAAATATTACCTGAATGATTTTTCCTATTTCTATTTGGTTT  
CCTTAAAGCAGTACCTGACAAATTCATGGGATTATTTCTAATGGTAGTTCTA  
TTATTCGCGCTATTTATGTTTATATTA

### **Alineamiento genes de citocromo b**

T. cruzi maxicircle.gnu

8941:GGGTTTAGTTTAGGTTTTTTTTATTATGTTACAGATAAATATGTGG  
TGTCTGTTTAGCGTGA 9000

Try2.gnu

1:-TCTATTTATTATGTTACAGATAAATATGTGGTGTTTGCTTAGCATGA  
46

T. cruzi maxicircle.gnu

9001:ATGTTTTTTAGTTGTTTTATTTGTGCAAATTGATATTTTATTTTA  
TTTTTGTGAGATTTT 9060

Try2.gnu

47:ATGTTTTTTAGTTGTTTTATTTGTGCAAATTGATATTTTATTTTATTTTGT  
GAGACTTT 106



T.cruzimaxicircle.gnu

9301:ACTGTACCTGTGATCGGTCAGTGATTGTGTTATTGAATATGAGGTAGTG  
AATTTATAAAT 9360

Try2.gnu

347:ACTGTTCCCTGTATTCGGCCAGTGATTATGTTATTGAATATGGGGTAGTG  
AATTTATAAAT 406

T.cruzimaxicircle.gnu

9361:GATTTTACGCTTTTAAACTTCACGTATTACACGTTCTACTTCCTTTTGT  
ATTAATAATG 9420

Try2.gnu

407:GATTTTACGCTTTTAAACTTCATGTATTACATGTCNTGCTCCCTTTTGT  
TTAATTATG 466

T.cruzimaxicircle.gnu

9421:GTATTATTTTTGCATCTTTTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCAGATGC  
TTTTTGTGAT 9480

Try2.gnu

467:GTATTATTTTTGCATCTTTTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCAGATGCT  
TTTTTGTGAT 526

T.cruzimaxicircle.gnu

9481:AGGTTTGCTTTTTATTGTGAGCGACTTTGTTTTTGTATGTGATTTTATTT  
GAGAGATATG 9540

Try2.gnu

527:AGGTTTGCTTTTTATTGTGAGCGACTTTGTTTTTGTATGTGATTTTATTTG  
AGAGATATG 586

T.cruzimaxicircle.gnu

9541:TTTCTCGCATTTCATATTATTTGTGTAATGTACGTTATTTTATAAA  
TTGATATTC 9600

Try2.gnu

587:TTTCTTGCATTTCATATTATTTGTGTAATATATGTTATTTTATAAAT  
TGATATTTT 646

T.cruzimaxicircle.gnu

9601:GTTTTCCATGAAGAATCTTGGGTCATTGTTGATACATTAAAAACATCCG  
ATAAAATATTA 9660

Try2.gnu

647:GTTTTCCATGAAGAATCTTGGGTCATTGTTGATACATTAAAAACATCCG  
ATAAAATATTA 706

T.cruzimaxicircle.gnu

9661:CCCGAATGATTTTCCTATTTTATTTGGCTTCCTTAAAGCAGTGCCTG  
ACAAATTTATG 9720

Try2.gnu

707:CCTGAATGATTTTCCTATTTCTATTTGGTTTCCTTAAAGCAGTACCTGA  
CAAATTCATG 766

T.cruzimaxicircle.gnu

9721:GGATTATTTTGGATGGTAGTACTATTATTCGCAT-  
TATTTATGTTTATATTAATTGCAT 9779

Try2.gnu

767:GGATTATTTCTAATGGTAGTTCTATTATTCGCGC-  
TATTTATGTTTATATTA----- 817

Se analizo la filogenia de la secuencia obtenida en nuestro estudio para compararla con otras secuencias cercanas. (ver Figura 3.15 )

## **CAPITULO 4.**

### **DISCUSIÓN**

#### **ANALISIS SEROPREVALENCIA**

La baja incidencia en la población para la infección por *T. cruzi*, a pesar de que el vector principal (*Triatoma dimidiata*) en el Ecuador de la Enfermedad de Chagas se encuentra en esta zona tanto en la parte domiciliar como peri domiciliar y presentando niveles altísimo de infección por el parásito nos da indicios de que existen otros reservorios silvestres o barrenas naturales que de cierta forma están siendo utilizados como huéspedes primarios del vector para la transmisión y hasta el momento no ha llegado a sobrepasar esta barrera, ya que en lugares donde se encontró el insecto vector de igual manera se encontraron animales como zorros que presentaron infección por *T. cruzi*.

Otra posible causa de la baja incidencia en humanos sea por el tiempo de defecación del vector es posible que si esta en forma domiciliar tal vez nos indique que esta alimentándose de los humanos pero al momento de infectar (heces) este se encuentra lejos del huésped, causando ninguna infección en el hombre.

En las infecciones humanas, es importante destacar que a pesar que las técnicas inmunológicas son altamente sensibles, la especificidad es cuestionada debido a que con

frecuencia se ha visto reacciones cruzadas, es decir infecciones con microorganismos de la familia Trypanosomatidae, dando falsos positivos (Junqueira et al, 1996).

## **ANALISIS TRIATOMINOS**

El vector encontrado en la zona de estudio es de alarmante preocupación debido a que es uno de los principales vectores transmisores de la enfermedad de Chagas en el Ecuador y la presencia de estos insectos recolectados de forma peri-domiciliar y domiciliar es debido a que en la zona de estudio General Villamil Playas existen casas cuyo material es de paja, caña, madera o mixtas que son reservorios silvestres para estos animales, así también los restos de basura y desechos como madera, llantas viejas que ayudan a que el vector permanezca de forma continua estas casas, hacen que su prevalencia en la zona sea alta.

La gran mayoría de la población ecuatoriana reside en zonas altas donde no se encuentran triatomos domiciliados, (con algunas excepciones, como la presencia de *T. Carrioni* en parroquias andinas del sur), y que no hay en el país vectores domésticos extremadamente eficientes como *T. infestans* (abundante en el sur del Perú) o *Rhodnius prolixus* (el principal vector en el norte de Colombia). Obviamente esto tal vez influya a que las tasas generales de prevalencia en el país sean más bajas consideradas con los países vecinos.

## **INFECCIONES EXPERIMENTALES**

La infección a los ratones con *T. cruzi* que no presentaron parasitemia visible fue necesario analizarlo mediante PCR dando resultados positivos para la infección, la baja o ninguna parasitemia visible en los ratones se debe tal vez a la cantidad de parásitos infectantes inoculados, ya que no se tiene una concentración ideal para infección por *T. cruzi* sin embargo se confirma que la infección existe por la técnica molecular de PCR utilizada específica para la enfermedad de Chagas. La técnica de PCR utilizada es específica para amplificar fragmentos del cinetoplasto del parásito sin que afecte la cantidad de DNA de hospedero. (Sturm et al, 1989)

Es posible también que la parasitemia no visible en los ratones infectados se deba a que la infección por sangre de ratones infectados se encontraba en fase crónica, y en esta fase no hay mucha cantidad de parásitos que causen sintomatologías o parasitemia visible. (Guevara A, et al, 1997)

Así también estudios demuestran que la técnica de PCR es mas sensible para detectar *T. cruzi*, que los métodos directos debido a que la concentración de parásitos en la sangre es baja con respecto a una fase crónica de la enfermedad, por lo que se sugiere utilizar estos métodos moleculares en detección del parásito en infecciones experimentales, en estudios epidemiológicos, taxonómicos y filogenéticos ( Kirchhoff et al, 1996)

El usar moléculas recombinantes o péptidos sintéticos derivados del genoma del *T. cruzi*, en las pruebas inmunológicas pueden incrementar la especificidad y sensibilidad de las pruebas de diagnostico para la enfermedad de Chagas, ya que se ha visto que existe fracciones antigénicas similares entre especies del mismo genero. (Guevara et al, 1997), y evitando dar reacción cruzada con otros tipos de antígenos, para esto se debe realizar péptidos o proteínas recombinantes altamente eficientes que puedan reemplazar al antígeno total, sin embargo hemos visto en este proyecto que aun el lisado total reacciona mejor.

## **IDENTIFICACION MOLECULAR**

En el estudio se confirmo mediante secuenciación y técnicas moleculares que el parásito (*T. cruzi*) fue encontrado en las muestras de cultivo y de heces de los triatominos. La utilización de las técnicas moleculares facilita la confirmación de especies de microorganismos, en este caso de *Trypanosoma cruzi*, lo cual permite establecer relaciones filogenéticas entre las diferentes especies del microorganismo, esto es importante para determinar características de virulencia y/o patogenicidad de las diferentes cepas.

## **CAPITULO 5.**

### **CONCLUSIONES**

Del 1,03% de personas analizadas en la población de General Villamil Playas se encontró que solo 0,31% de las personas se encuentran infectadas por *Trypanosoma cruzi*.

La gran mayoría de la población ecuatoriana reside en zonas altas donde no se encuentran triatominos domiciliados, excepto en parroquias andinas del sur y vectores domésticos extremadamente eficientes, obviamente esto influye a que las tasas generales de prevalencia en el país sean bajas.

Todos los cultivos realizados en medio Lit estuvieron libres de contaminación, lo que indica que los protocolos usados y el buen manejo de ellos nos hacen tener resultados confiables.

El 98,48 % de nivel de infección por *T. cruzi* vectorial en la población de General Villamil Playas es altísimo, causando un riesgo muy elevado de la infección de la enfermedad a humanos, sin embargo, todavía existen barreras naturales y comportamientos del vector que evitan la transmisión potencial a humanos.

La infección por *T. cruzi* en la población de General Villamil Playas no ha incrementado, aunque el nivel de infección en los vectores es alto, todavía existen factores naturales que han impedido la transmisión a humanos.

Se demuestra que a pesar que en los ratones no se encontró parasitemia visible, la infección por *T. cruzi* fue analizada por PCR, obteniendo resultados positivos.

Además la respuesta inmune humoral, con anticuerpos de tipo IgG total muestra la infección del parásito en los ratones de experimentación.

Isotipos específicos para la infección por *T. cruzi* IgG1, IgG2a, IgG2b aseguran también la infección por el parásito.

Se determino que el antígeno total frente al péptido sintético fue más eficiente dando una mejor respuesta frente al suero de los ratones analizados.

El material de las casas y desechos de madera, llantas y basura aledaños a las casas en donde la población habita es un factor de riesgo para la enfermedad debido a que este es el principal reservorio silvestre para el vector.

Los tratamientos actuales para la enfermedad no son totalmente eficientes en pacientes en fase crónica, es necesario buscar nuevas drogas que ataquen el parásito.

El plan de control y vigilancia de la Enfermedad de Chagas en la zona de estudio de forma continua, debe ser administrado cada dos veces al año, es decir cada seis meses, rociando insecticida para poder eliminar en mayor tiempo los vectores transmisores de la enfermedad en la población.

Realizar seguimiento de vigilancia entomología, en caso de reinfestación por chinches rápidamente detectada se puede dar respuestas inmediata y eficaz para las zonas locales infectadas.

Como una medida de control de la enfermedad es educar y capacitar a la población de zonas endémicas para eliminar desechos y residuos de las casas que sirvan

como reservorios para el vector de la enfermedad de Chagas y para otros vectores causantes de enfermedades infecciosas.

Dentro del plan de control se encuentra evitar la deforestación que afecten los nichos ecológicos de los vectores causando cambios de hábitat y llegando a ser vectores domiciliarios, infectando a la población.

Medida de control es la colaboración e intervención de autoridades locales que ayuden a crear programas de mejora habitacional, incluyendo construcción, mejora y mantenimiento de viviendas.

## **CAPITULO 6.**

### **RECOMENDACIONES**

Un estudio sobre la transmisión vertical sería recomendado realizar para evitar este riesgo potencial en la población infectada por *T.cruzi*, ya que en este proyecto se encontró 33,33% de transmisión de la madre a hijos en infecciones experimentales, demostrando alto porcentaje de contagio.

La diseminación e información más relevante y detallada de los datos o informes resultantes de las investigaciones similares para lograr un seguimiento de la enfermedad en zonas endémicas del país y lograr eliminar también enfermedades afines a la transmisión por vectores.

Es importante realizar screening serológico de bancos de sangre en diferentes puntos estratégicos de país para reducir la transmisión por transfusiones y facilitar la prevención de otras enfermedades.

A pesar que existe en el Ecuador la forma legal y obligación de analizar todas las donaciones de sangre para detectar la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi*. Es importante tomar medidas más efectivas que incluyan controles de calidad rigurosos en los Kit de diagnóstico, equipamiento, reactivos, así como también de verificar los centros de diagnóstico y al personal de los laboratorios que se encuentran a cargo para una mejor valoración de la enfermedad.

## **CAPITULO 7.**

### **BIBLIOGRAFIA**

Abad-Franch, F. y Aguilar, M. 2000. Control de la Enfermedad de Chagas en el Ecuador. Datos y Reflexiones para una Política de Estado. Revista del Instituto Juan César García 10 (1-2): 12-32.

Abad-Franch, F., Paucar, C., Carpio, C., Cuba, C., Aguilar, M., Miles, M. 2001. Biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in Ecuador: Implications for the design control strategies. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 96: 611-620.

Abad-Franch F, 2002. The ecology and genetics of Chagas disease vectors in Ecuador, with emphasis on *Rhodnius ecuatoriensis* (Triatominae). Phd Thesis, Department of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Universidad de Londres, Reino Unido, 411 pp.

Aguilar, M., Abad-Franch, F., Racines J. y Paucar A. 1999. Epidemiology of Chagas Disease in Ecuador. A Brief Review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 94: 387-393.

Andrade SG. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. Rev Soc Bras Med Trop 1985;18 (suppl):39-46.

Andrade ZA (1999). Immunopathology of Chagas disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 94(Supl. 1), 71-80.

Avila, HA., Sigma DS., Cohem, LM., et al. 1991. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolate from blood lysates: diagnosis of chronic chagas disease. *Mol Biochem Parasitology* 48: 211-22

Barrett TV, Hoff RH, Mott KE, Miles MA, Godfrey DG, Teixeira R, Souza AA (1980). Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74, 84-89.

Bice DE, Zeledón R. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* *J Parasitol* 1970; 56:663-70.

Brener Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1971; 12:171-8.

Brener Z. General review on *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy. *Rev Soc Bras Med Trop* 1985; 18 (suppl):1-8.

Britto, C., Cardoso, M., Monteiro, C., Hasslocher-Moreno, A., Xavier, S., Oelemann, W., Santoro, A., Pirmez, C., Morel, C., Wincker, P. 1995. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology* 110: 241-247.

Corrêa-Oliveira R, Gomes JAS, Lemos EM, Cardoso GM, Reis DD, Adad S, Crema E, Martins-Filho OA, Costa MOR, Gazzinelli G, Bahia-Oliveira LMG (1999). The role of

the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 94 (Supl. 1), 253-255.

Chico, H., Sandoval, C., Guevara, A., Calvopiña, M., Cooper, P., Reed, S., Guderian, R. 1997. Chagas' disease in Ecuador: evidence for disease transmission in an indigenous population in the Amazon region. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 92: 317-320

Duque, S., Pelaez, D., Gualdron, L., Villarreal, E., Corredor, A. 1988. Aislamiento de Trypanosomas a partir de materia fecal de *Rhodnius prolixus*, BIOMEDICA, vol, 8, Nos 1-2. 37-39.

Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Geneva, Organización Panamericana de Salud. Ref Type: Pamphlet. Department of Control of Neglected Tropical Diseases (NTD). 2006.

Filardi, LS and Brener, Z, 1987, Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs use clinically in Chagas' disease. Trans. Roy. Soc Trop Med Hyg 81:755-759.

Garzon EA, Bamabe C, Cordova X, Bowen C, Paredes W, Gomez E, Ouiaissi A, Tibayrenc M, Guevara AG, 2002. *Trypanosoma cruzi* isoenzyme variability in Ecuador: first observation of zymodeme III genotypes in chronic chagasis patients. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 96, 378-382.

Guerreiro, C., Machado, A. 1919. Da reacao de Bordet e Gengou na moléstia de Chagas como element diagnostic. *Braz. Medico* 27:225-226.

Guevara, A. 2001.G. Enfermedad de Chagas en Ecuador. *Informe al FUNDACYT*, proyecto Fundacyt-BID 422.

Guevara AG, Eras JW, Recalde M, Vinueza L, Cooper PJ, Ouaiissi A, Guderian RH. 1997. Severe digestive pathology associated with chronic Chagas disease in Ecuador: report of two cases. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30, 389-392.

Guevara AG, Ruiz CJC, Houghton RL, Reynolds L, Sleath P, Benson D, Ouaiissi A, Guderian RH. Evaluation of a recombinant protein (RTC24) and synthetic peptides in anti-*Trypanosoma cruzi* positive samples from blood bank donors in chagasic endemic areas of Ecuador. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 27, 19-22. 1999.

Guevara E. A., Taibi, A., Billaut-Mulot, O., Ouaiissi A. 1996. PCR- based Detection of *Trypanosoma cruzi* Useful for Specific Diagnosis of Human Chagas' Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 485-486.

Guhl F., Nicholls S., 2001, Manual de procedimientos para el diagnostico de la enfermedad de Chagas, Universidad de los Andes, 1<sup>era</sup> edicion, Santafé de Bogotá-Colombia.

Grijalva MJ, Escalante L, Paredes RA, Costales JA, Padilla A, Rowland EC, Aguilar HM, Racines J (2003) Seroprevalence and risk factors for *Trypanosoma cruzi* infection in the Amazon region of Ecuador. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 69: 380-385.

Hagar, JM, and Shahbudin, H. 1991, Chagas' heart disease in the United States. *New England J, of Medicine* 325: 763-768.

Harlow, Ed., LANE.D, *Antibodies, A Laboratory Manual*, 1988 by cold spring Harbor Laboratory.

Houghton, R.L Benson, D.R., Sheiky, Y.A., Sleath, P., Lodes, M., Badaro, R., Krettli, A.U, and Reed, S.G. 1996: Multiple- epitope ELISA for the detection of serum antibodies to *Trypanosoma cruzi* in patients with treated and untreated Chaga's disease. *Transfusion*, 36 (suppl), 5135.

Junqueira, A., Chiari, E., Wincker, P. 1996. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 90: 129-132.

Kirchhoff, L., Votava, J., Ochs, D., Moser, D. 1996. Comparison of PCR and Microscopic Methods for Detecting *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 1171-1175.

Kirchoff, L (1993): American trypanosomiasis (Chagas' disease)- a tropical disease now in the United States. N. Eng. J. Med., 329, 639-644.

Kirchhoff LV (1993). Chagas disease. *Infectious Disease Clinics of North America*, 7, 487-502.

Krautz, G.M., Galvao, L.M.C., Cancado, J.R., Guevara- Espinoza, A., Ouaisi, A. and Krettli, A.U. 1995: Use of a 24 KD *Trypanosoma cruzi* recombinant protein to monitor cure of human Chaga's disease. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 2086-2090.

Lehmann, P., R-Ordóñez., R-Ojeda Baranda., J Méndez de Lira., Hidalgo-Sosa., C Monroy., Ramsey JM.m. 2005. Análisis morfométrico de poblaciones de *Triatoma dimidiata* (Reduviidae: Triatominae) de Mexico y el norte de Guatemala Memórias do Instituto Oswaldo Cruz *versionPrint* ISSN 0074-0276

Mantis, T., Fritsh, SF., and Sambrook, J. 1989. *Molecular Cloning, A laboratory Manual*. Ford N, Noland., Ferguson M (Eds). Cold Spring Harbord Laboratory Press, N.Y.

Miles MA, Toye PJ, Oswald SC, Godfrey DG (1977). The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 71, 217-225.

Miles MA (1998). New World Trypanosomiasis, pp. 238-302 en (Collier L, Balows A, Sussman M eds.) Microbiology and Microbial Infections, Vol. 5: Parasitology, 9th Edition, Topley & Wilson's, Reino Unido.

Miles MA, Yeo M, Gaunt MW (2002). Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* and the epidemiology of Chagas disease, en (Kelly JM ed.) Molecular mechanisms in the pathogenesis of Chagas disease. Landes Bioscience, Austin, TX, EEUU. [Ver [www.eurekah.com](http://www.eurekah.com)].

Miranda, Y. 1996. Diagnóstico Etiológico. En: Doença de Chagas. (J. Malta, ed.), Sarvier, São Paulo, Brasil.

Montiel, G; Díaz, G, Respuesta inmune de las células del hospedero a la infección por *Trypanosoma cruzi*, Revista Médica del Hospital Nacional de Niños ISSN 1017-8546 *versión impresa*, Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica) v.37 n.1-2 San José 2002

Moser, DR., Kirchoff, L., and Donnelson, JE. 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplication using polymerase chain reaction. J Clin Microbiology 27:1477-1482.

Noireau, F., 1999. La Enfermedad de Chagas y sus particularidades epidemiológicas en Bolivia. En: Chagas. La enfermedad de Bolivia. Conocimientos científicos al inicio del programa de control (1998-2002). (J. Cassab, F. Noireau, G. Guillén, eds). Ediciones Gráficas, La Paz, Bolivia.

O'Daly, J. y Azocar, J. 1984. Immunological Alterations in Chagas' Disease. En: Critical Reviews in Tropical Medicine, Vol.2 ( R. Chandra, ed.) Plenum Publishing Corporation, USA.

Paes, P. y Rayol C. 1996. Etiología. En: Doença de Chagas. (J. Malta, ed) Sarvier, São Paulo, Brasil.

Pinto-Dias, JC., e Rodriguez-Coura, J. 1997. Clínica e terapéutica da doença de Chagas uma abordagem practica para o clínico geral. Edit. FIOCRUZ.

Pumarola, A., Rodriguez-Torres, A., Garcia-Rodriguez, J.A., Piedrola-Angulo., 1978, Microbiologia y Parasitologia Medica, 2da edicion, Salvat editores S.A, Madrid.

Romero CV, Macias CF, Suppo Rj, Macias CC, Tinoco ME, 1998. Enfermedad de Chagas, incidencia en donantes de sangre, Hospital Teodoro Maldonado Carbo (Guayaquil), jun. 1996-jul. 1997 Medicina (quito) ,4 132-134.

Sturm, N., Degrave, W., Morel, C., Simpson, L. 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. Molecular and Biochemical Parasitology 33: 205-214.

Tay J, Lara R. Velazco O, Gutiérrez M. Parasitología Médica 5a. ed. México; Méndez Cervantes; 1991. p. 112-22.

Taibi, A., Guevara, E, A., R. Schoneck, B., Yahiaoui, and A. Ouaissi. 1995. Improved specificity of *Trypanosoma cruzi* identification by polymerase chain reaction using an oligonucleotide derived from the amino-terminal sequence of a Tc24 protein. *Parasitology*, 111: 581-590.

Tibayrenc M, Ayala FJ (1988). Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetic, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution*, 42, 277-292.

Villalba, R., Fornés, G., Alvarez, M. A., Román, J., Rubio, V., Fernández, M., García, J. M., Viñals, M. and Torres, A. Acute Chagas' disease in a recipient of a bone marrow transplant in Spain: case report., *Clin. Infect. Dis.*, 14, 594-595.1992.

Wendel,S., Brener, Z.1992. Historical Aspects. En: Chagas' Disease. American Trypanosomiasis: its impact on transfusion and clinical medicine (S. Wendel, Z. Brener, M. Camargo, A. Rassi, eds.), Sociedad Brasileira de Hematología e Hemoterapia, Sao Paulo, Brasil.

WHO,1991. Control of Chagas´disease- Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical report series 811-Geneva.

WHO, 1996. Chagas disease. ([www.who.int/ctd/chagas/geo.htm](http://www.who.int/ctd/chagas/geo.htm)).

